

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRECIPITAÇÃO DO CLAVULANATO DE POTÁSSIO
A PARTIR DO ÁCIDO CLAVULÂNICO PRESENTE
NO CALDO DE FERMENTAÇÃO**

DANIELA BATTAGLIA HIRATA

SÃO CARLOS - SP
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRECIPITAÇÃO DO CLAVULANATO DE POTÁSSIO A PARTIR DO
ÁCIDO CLAVULÂNICO PRESENTE NO CALDO DE FERMENTAÇÃO**

DANIELA BATTAGLIA HIRATA

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

SÃO CARLOS - SP
2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

H668pc

Hirata, Daniela Battaglia.

Precipitação do clavulanato de potássio a partir do ácido clavulânico presente no caldo de fermentação / Daniela Battaglia Hirata. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
175 f.

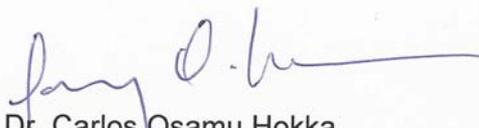
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Precipitação. 2. Ácido clavulânico. 3. Clavulanato de potássio. 4. Amina. 5. Cristalização. I. Título.

CDD: 660.28424 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **DANIELA BATTAGLIA HIRATA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 29 DE AGOSTO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:



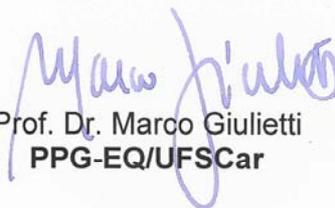
Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka
Presidente, PPG-EQ/UFSCar



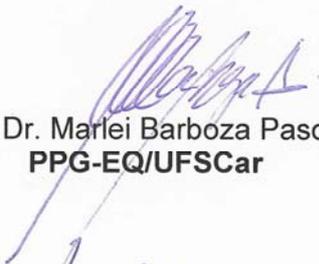
Profª. Drª. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
IQ/ UNESP



Profª. Drª. Maria Isabel Rodrigues
FEA/ UNICAMP



Prof. Dr. Marco Giulietti
PPG-EQ/UFSCar



Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto
PPG-EQ/UFSCar



Drª Jaine Honorata Hortolan-Luiz de Oliveira
DEQ/UFSCar

*Querido Deus obrigada pela vida e pela oportunidade de
retornar. Que meu ser possa evoluir e ser digno de propagar a
Vossa Luz.*

O Homem depende de seu pensamento. É realmente verdade que gratidão gera gratidão e lamúria gera lamúria ... Quem vive agradecendo, torna-se feliz; quem vive se lamuriando, caminha para a infelicidade.

Mokiti Okada (Meishu-Sama)

*O que vocês desejam que os outros lhes façam, também vocês devem fazer a eles ...
Sejam misericordiosos, como o Pai de vocês é misericordioso.*

Jesus

Dedicatória

A minha querida madrinha-mãe Rose Marie por tantos anos de amor, incentivo e compreensão. Sem a sua coragem e dedicação eu não chegaria até aqui. Não tenho palavras para agradecer o quanto você fez por mim. Muito Obrigada por tudo, querida Rose, que Deus a abençoe hoje e sempre.

A minha querida tia Sueli e ao querido irmão Lucas, por toda ajuda e apoio prestados, principalmente nestes dois últimos anos tão difíceis.

À Sonia, Giuliana e Fernando por toda atenção e amizade.

Ao meu amado filho Mateus, um verdadeiro presente de Deus, sua simples presença fortalece e ampara minha alma. Obrigada pelo seu amor meu querido filho.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho, entretanto desejo agradecer especialmente a algumas sem as quais esta tese não seria possível:

À Jaine, minha companheira de trabalho e amiga muito querida, um exemplo de amor à profissão, dedicação e competência. Agradeço a Deus o privilégio de poder ter trabalhado ao seu lado durante esses últimos anos.

Ao estimado Professor Dr. Hokka, por todo apoio e orientação durante esses quatro anos.

Ao Professor Dr. Marlei, por toda ajuda, incentivo e sugestões prestadas ao longo deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marco, por sua imensa generosidade, paciência e gentileza. Não tenho palavras para agradecer-lhe tudo o que o senhor fez por mim. Que Deus o abençoe hoje e sempre.

À querida Professora Dra. Maria Isabel, por toda a ajuda, paciência e atenção a mim dispensadas. Que Deus a ilumine cada vez mais.

Aos Professores Dr(a)s, Alberto e Lúcia, por toda a ajuda e sugestões, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Gilberto pela gentileza de permitir as análises no equipamento de RMN, e a Katyuscya por executá-las.

E finalmente a todos os amigos, protetores, guias e mentores do plano espiritual, pela paciência, desvelo e carinho com que vêm me assistindo. Que Deus derrame sobre todos vós Sua imensa luz, paz e amor.

RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de certas β -lactamases produzidas por bactérias resistentes às penicilinas e cefalosporinas. A combinação do AC com a amoxicilina é o exemplo de maior sucesso do uso de um antibiótico β -lactâmico sensível a β -lactamase juntamente com um inibidor desta enzima, permitindo assim que a amoxicilina continue sendo efetiva no tratamento de muitas doenças. É produzido via fermentação por linhagens do *Streptomyces* e dentre estas se encontra o *Streptomyces clavuligerus*. O ácido clavulânico é um óleo altamente instável e higroscópico, não sendo viável a sua utilização em medicamentos nessa forma, mas sim na sua forma de sal, mais especificamente a de clavulanato de potássio, na qual apresenta maior estabilidade.

Assim no presente trabalho foi proposto a precipitação do clavulanato de potássio a partir do ácido clavulânico presente no caldo de fermentação, cultivado no DEQ-UFSCar. Para tanto foram necessários estudos preliminares como a caracterização, monitoramento e padronização do AC (Clavulin®) e também o melhoramento das etapas de purificação empregadas anteriormente a etapa da precipitação.

Foram avaliadas a reação direta (R_0), na qual ocorreu a precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio, e a reação indireta, com a passagem por um intermediário estável, na qual ocorreu a precipitação do AC com a t-octilamina (R_1), formando um sal de amina do AC (intermediário estável) que posteriormente foi reagido com o 2-etilexanoato de potássio para a formação de clavulanato de potássio (R_2). As reações estudadas foram otimizadas através da análise por superfície de resposta (planejamento fatorial) de forma a maximizar o rendimento além de avaliar a estabilidade do clavulanato de potássio precipitado.

Foram obtidos excelentes resultados que demonstraram que a reação de precipitação empregada é adequada para ser utilizada como a etapa final do processo de purificação do AC proveniente do caldo de fermentação, permitindo a obtenção do clavulanato de potássio com bom rendimento associado a uma pureza elevada.

ABSTRACT

Clavulanic acid is a potent inhibitor of many β -lactamase enzymes producing bacteria, which attribute bacterial resistant against cephalosporins and penicillins. The combination of CA with amoxicillin is the most successful example, that clavulanic acid have the ability to enhance the effectiveness of β -lactam antibiotic, which was β -lactamase sensitive, allowing the use of amoxicillin in treatment of a lot of diseases. Clavulanic acid is obtained by a fermentation method from various microorganisms belonging to many *Streptomyces* strains such as *Streptomyces clavuligerus*. CA itself is an unstable hygroscopic oil which is not used for the preparation of pharmaceutical compounds, for this suitable salts are more appropriated. Among these compounds potassium clavulanate is the most stable compound which is normally used for pharmaceutical preparations.

In the present work a precipitation of potassium clavulanate starting from the clavulanic acid present in the fermentation broth (cultivated at DEQ-UFSCar) was proposed. Therefore were necessary preliminary studies such as the characterization, monitoring, standardization of CA (Clavulin®) and improvement of the previously purification steps employed before precipitation step.

The directly precipitation (R_0) which occurred the reaction of CA with potassium 2-ethyl hexanoate resulting in the potassium clavulanate and the precipitation with an intermediate step which occurred an previously reaction of CA with the t-octylamine (R_1) allowing a formation of a amine salt of CA (stable intermediate) that afterward it was reacted with the potassium 2-ethyl hexanoate for the formation of potassium clavulanate (R_2) were evaluated. The studied reactions were optimized through by response surface methodology (experimental design) in order to permit maximize the yield and to evaluate the stability of the potassium clavulanate precipitated.

The results obtained were excellent and demonstrated that the reaction of precipitation employed is very appropriate to be used as the final stage of the process of AC purification from fermentation broth, allowing to obtain a raised yield of the potassium clavulanate associated to a high purity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1	Comparação das paredes celulares de bactérias gram-positivas e gram-negativas (MURRAY <i>et al.</i> , 2002).....	4
Figura 2.1.2	O caminho percorrido pelo antibiótico β -lactâmico quando este ataca uma bactéria gram-negativa (KNOWLES, 1985).....	6
Figura 2.1.3	Fórmula estrutural das penicilinas (ácido 6-amino penicilânico).....	7
Figura 2.1.4	Fórmula estrutural da penicilina G.....	7
Figura 2.1.5	Fórmula estrutural da cefalosporina C.....	8
Figura 2.1.6	Fórmula estrutural dos carbapenens.....	8
Figura 2.1.7	Fórmula estrutural dos monobactâmicos.....	9
Figura 2.1.8	Fórmula estrutural do aztreonam.....	9
Figura 2.1.9	Inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente.....	10
Figura 2.2.1	Mecanismo geral da Ser- β -lactamase (A) e metalo- β -lactamase (B), durante a hidrólise da amoxicilina.....	11
Figura 2.3.1	Fórmula estrutural do ácido clavulânico.....	13
Figura 2.3.2	Produtos de degradação do ácido clavulânico isolados por Haginaka <i>et al.</i> (1985).....	15
Figura 2.3.3	Esquema: reagentes i, H ₂ O; ii, H ₂ O, -CO ₂ , -CH ₃ CHO; iii-CO ₂ ; iv, (14), -2H ₂ O, -2[H] (FINN <i>et al.</i> , 1984).....	16
Figura 2.4.1	Hábito cristalino (PAMPLIN, 1980 <i>apud</i> CONDOTTA, 2002).....	23
Figura 2.4.2	(a) Cristais na forma de plaquetas e (b) na forma de agulhas, em uma escala de divisão de valor igual a 10 μ m (SÖHNEL e GARSIDE, 1992).....	24
Figura 3.2.1	Esquema de reação do AC com imidazol.....	35
Figura 4.4.1	Reação de formação do éster benzil clavulanato.....	47
Figura 4.4.2	Reação do AC com a trietilamina.....	47
Figura 4.4.3	Reação de precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio.....	48
Figura 4.4.4	Reação do AC com a t-octilamina, com a formação de um intermediário estável (sal de amina do AC).....	50

Figura 4.4.5	Reação de precipitação do clavulanato de potássio a partir do sal de amina do AC.....	51
Figura 4.5.1	Reator encamisado, banho termostático e controlador de velocidade. No detalhe o reator encamisado utilizado.....	55
Figura 5.1.1	Espectro de RMN- ¹ H do clavulanato de potássio precipitado com a presença de amino cetona, a partir da amostra clavulanato/ celulose.....	61
Figura 5.4.1	Espectro de RMN- ¹ H do clavulanato de potássio precipitado, obtido no ensaio 4A - Clavulin®, sem traços de amoxicilina.....	69
Figura 5.4.2	Espectro de RMN- ¹ H para amoxicilina pura.....	70
Figura 5.4.3	Espectro de RMN- ¹ H de uma(s) substância(s) diferente(s) do AC, obtido no ensaio 1C - caldo de fermentação.....	73
Figura 5.4.4	Espectro de RMN- ¹ H do clavulanato de potássio precipitado, obtido no ensaio 3C - caldo de fermentação.....	74
Figura 5.4.5	Espectro de RMN- ¹ H obtido para o caldo de fermentação após a ultrafiltração.....	75
Figura 5.4.6	Espectro de RMN- ¹ H obtido para a reação do AC com a t-octilamina, obtido no ensaio 2T – clav/celulose.....	77
Figura 5.4.7	Cristais do sal de amina do AC, obtidos na reação de precipitação do AC com a t-octilamina. Na foto à direita uma roseta formada por várias plaquetas unidas.....	78
Figura 5.4.8	Gotículas de óleo formadas após 24 horas de exposição da amostra clavulanato/celulose à temperatura ambiente.....	78
Figura 5.4.9	Espectro de RMN- ¹ H obtido para a reação do sal de AC com o 2-etil, com a precipitação do clavulanato de potássio a partir do ensaio 2T (clav/celulose).....	79
Figura 5.5.1	Reação direta com o 2-etilexanoato de potássio: (a) Formação de óleo; (b); Formação de incrustação.....	84
Figura 5.5.2	Superfícies de respostas e curvas de contorno para Y (%) em função: (a) da concentração de 2-etil e de AC; (b) da vazão de 2-etil e da concentração de AC; (c) da vazão e da concentração de 2-etil.....	87
Figura 5.5.3	Espectro de RMN- ¹ H do clavulanato de potássio precipitado do caldo de fermentação a partir da reação direta (R ₀), utilizando o planejamento fatorial.....	90
Figura 5.5.4	Fotomicrografias obtidas com ampliação de 100X para: (a) Sistema SE; (b) Sistema BSE.....	92

Figura 5.5.5	Fotomicrografia obtida com ampliação de 300X, utilizando o sistema BSE, para a amostra precipitada do caldo de fermentação.....	92
Figura 5.5.6	Fotomicrografia obtida com ampliação de 1000X, utilizando o sistema BSE, para a amostra precipitada do caldo de fermentação.....	93
Figura 5.5.7	Fotomicrografia obtida com ampliação de 10000X, utilizando o sistema BSE, para a amostra precipitada do caldo de fermentação.....	93
Figura 5.5.8	Valores experimentais de Y (%) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.....	96
Figura 5.5.9	Superfícies de resposta e curvas de contornos para Y (%) em função: (a) da Concentração de AC e da Temp.; (b) da Vazão de amina e da Temp.; (c) da Vazão de amina e da Concentração de AC.....	99
Figura 5.5.10	Espectro de RMN ¹ H do sal de amina do AC precipitado do caldo de fermentação a partir da reação do AC com a t-octilamina, utilizando as mesmas condições do ensaio 11 do planejamento fatorial.....	101
Figura 5.5.11	Espectro de RMN ¹ H do sal de amina do AC precipitado do Clavulin a partir da reação do AC com a t-octilamina para o ensaio 11 do planejamento fatorial.....	102
Figura 5.5.12	Fotomicrografias para o ensaio com o caldo de fermentação, obtidas utilizando-se Sistema SE : (a) com ampliação de 250X; (b) com ampliação de 1000X.....	102
Figura 5.5.13	Fotomicrografias para o ensaio 11 (DCCR) obtidas utilizando-se Sistema SE com ampliação de 800X.....	103
Figura 5.5.14	Reação indireta com o 2-etil (R ₂) sem a formação de incrustação.....	105
Figura 5.5.15	Reação direta com o 2-etil (R ₀) com a formação de incrustação.....	105
Figura 5.5.16	Valores experimentais de Y (%) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.....	107
Figura 5.5.17	Superfícies de resposta e curvas de contornos para Y (%) em função: (a) da Conc. de sal do AC e da Temp.; (b) da Vazão de 2-etil e da Temp.; (c) da Vazão de 2-etil e da Conc. de sal do AC.....	110
Figura 5.5.18	Fotomicrografias para o ensaio 17 (DCCR) obtidas utilizando-se Sistema BSE: (a) com ampliação de 1250X; (b) com ampliação de 10000X.....	113
Figura 5.5.19	Espectro de RMN ¹ H do clavulanato de potássio precipitado do caldo de fermentação através da reação indireta R ₂	114
Figura 5.5.20	Fotomicrografia do ensaio para o caldo obtida utilizando-se Sistema BSE com ampliação de 500X.....	115

Figura 5.5.21	Fotomicrografia do ensaio para o caldo obtida utilizando-se Sistema BSE com ampliação de 1500X.....	115
Figura 5.5.22	Fotomicrografia do ensaio para o caldo obtida utilizando-se Sistema BSE com ampliação de 10000X.....	116
Figura 5.5.23	Espectro de RMN ^1H do clavulanato de potássio precipitado a partir do ensaio 10 (DCCR), depois de 100 dias de armazenamento.....	120
Figura 5.5.24	Espectro de RMN ^1H do clavulanato de potássio precipitado a partir do ensaio 17 (DCCR), depois de 100 dias de armazenamento.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.3.1	Espectro de atividade antibacteriostática da amoxicilina na presença do ácido clavulânico, comparado com a amoxicilina e ácido clavulânico sozinhos contra organismos produtores de β -lactamases.....	14
Tabela 2.4.1	Métodos de criação da supersaturação (NÝVLT <i>et al.</i> , 2001).....	19
Tabela 4.4.1	Condições utilizadas para os experimentos de precipitação.....	49
Tabela 4.4.2	Condições utilizadas para os experimentos de precipitação para o caldo de fermentação.....	49
Tabela 4.4.3	Condições utilizadas para os experimentos de precipitação com a t-octilamina.....	50
Tabela 4.5.1	Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado.....	53
Tabela 4.5.2	Valores utilizados no DDCR para a reação direta do AC (R_0).....	54
Tabela 4.5.3	Valores utilizados no DDCR para a reação indireta do AC (R_1).....	56
Tabela 4.5.4	Valores utilizados no DDCR para a reação indireta do AC (R_2).....	56
Tabela 4.5.5	Condições utilizadas para o experimento de precipitação do caldo de fermentação com o 2-etil – Reação direta.....	58
Tabela 4.5.6	Condições utilizadas para o experimento de precipitação do caldo de fermentação com a t-octilamina – Reação indireta (R_1).....	58
Tabela 4.5.7	Condições utilizadas para o experimento de precipitação do caldo de fermentação – Reação indireta (R_2).....	58
Tabela 5.2.1	Valores do coeficiente de partição do ácido clavulânico (K_{pAC}) e para a amoxicilina (K_{pAmox}), rendimento (Y) e fator de purificação (FP) para o AC.....	62
Tabela 5.3.1	Concentração de AC para as frações analisadas por CLAE e impurezas para as frações analisadas por CCD.....	64
Tabela 5.3.2	Concentração e massa de AC obtidas para as frações analisadas por CLAE	65
Tabela 5.4.1	Resultados obtidos para os ensaios preliminares de precipitação do AC com o 2-etil.....	68
Tabela 5.4.2	Resultados obtidos para os ensaios preliminares para a precipitação do AC do caldo de fermentação.....	72

Tabela 5.4.3	Resultados obtidos para os ensaios preliminares da reação de precipitação do sal de amina do AC.....	76
Tabela 5.5.1	Valores codificados e reais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento (Y).....	81
Tabela 5.5.2	Estimativa dos efeitos para o rendimento (%) de clavulanato de potássio....	82
Tabela 5.5.3	Valores codificados e reais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento.....	83
Tabela 5.5.4	Coefficientes de regressão para o rendimento de clavulanato de potássio.....	85
Tabela 5.5.5	ANOVA para o rendimento de clavulanato de potássio (Y).....	85
Tabela 5.5.6	Valores utilizados variando-se a concentração de AC. Os ensaios 5 e 6 pertencem ao planejamento fatorial descrito anteriormente e encontram-se representados apenas para efeitos de observação.....	88
Tabela 5.5.7	Valores codificados e reais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento de sal de amina do ácido clavulânico (Y).....	94
Tabela 5.5.8	Coefficientes de regressão para o rendimento de sal de amina do AC.....	95
Tabela 5.5.9	ANOVA para o rendimento de sal de amina do AC (Y).....	96
Tabela 5.5.10	Valores do rendimento (Y) experimental e previsto pelo modelo e desvios relativos.....	97
Tabela 5.5.11	Valores codificados e originais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento de clavulanato de potássio (Y).....	104
Tabela 5.5.12	Coefficientes de regressão para o rendimento de clavulanato de potássio.....	106
Tabela 5.5.13	ANOVA para o rendimento de clavulanato de potássio.....	107
Tabela 5.5.14	Valores do rendimento (Y) experimental e previsto pelo modelo e desvios relativos.....	108
Tabela 5.5.15	Observações efetuadas para os precipitados obtidos para R ₂ (DCCR), após 100 dias de armazenamento a 5°C e com adição de celulose (1:1).....	118

NOMENCLATURA

a_c	atividade da substância c, -
$a_{c,eq}$	atividade da substância c em equilíbrio, -
C	concentração final, mg/L
C_0	concentração inicial, mg/L
C_{eq}	concentração de equilíbrio a uma dada temperatura, kg de soluto/kg de solvente
C_S	concentração da solução, kg de soluto/kg de solvente
C_T	concentração final de impurezas, mg/L
C_{T0}	concentração inicial de impurezas, mg/L
C_{FA}	concentração do composto na fase aquosa, mg/L
C_{FA1}	concentração do soluto na primeira fase aquosa, mg/L
C_{FA2}	concentração do soluto na segunda fase aquosa, mg/L
C_{FO}	concentração do composto na fase orgânica, mg/L
FP	fator de purificação, -
K_p	coeficiente de partição, -
R	constante dos gases ideais, J/mol.K
S	razão de supersaturação, -
T	temperatura, K
T_{eq}	temperatura de saturação, K
V	volume final, mL
V_0	volume inicial, mL
V_{FA2}	volume da segunda fase aquosa (re-extração), mL
V_{FO1}	volume da fase orgânica, mL
Y	rendimento, -
Δ	variação, -
μ_1	potencial químico da substância c em solução supersaturada, -
μ_2	potencial químico da substância c em fase sólida, -
σ	supersaturação relativa, -

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Antibióticos.....	3
2.1.1 Bactérias gram-negativas e gram-positivas.....	3
2.1.2 Antibióticos β -lactâmicos.....	5
2.1.2.1 <i>Mecanismo de ação de um antibiótico β-lactâmico.....</i>	5
2.2 β-lactamases.....	10
2.2.1 Hidrólise enzimática.....	11
2.3 Ácido clavulânico.....	12
2.3.1 Estabilidade do ácido clavulânico.....	14
2.4 Precipitação.....	17
2.4.1 Solução supersaturada.....	18
2.4.2 Nucleação.....	21
2.4.3 Crescimento dos cristais.....	22
2.4.4 Tamanho e forma dos cristais (hábito cristalino).....	23
2.4.4.1 <i>Aspectos físicos da precipitação.....</i>	25
2.4.5 Aglomeração.....	26
2.4.6 Empedramento dos cristais.....	26
2.4.7 Soluções coloidais.....	27
2.4.8 Formação de incrustações.....	28
2.5 Processo de separação do ácido clavulânico.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Origem do AC.....	34
3.2 Métodos analíticos.....	34
3.2.1 Determinação da concentração de ácido clavulânico.....	34
3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	35
3.2.3 Cromatografia em coluna pré-empacotada.....	36
3.2.4 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	36
3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
3.3 Equipamentos e materiais.....	37
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39

4.1 Caracterização e seleção de método para monitoramento do AC.....	39
4.1.1 Estudos em cromatografia em camada delgada (CCD).....	39
4.1.2 Estudos em coluna pré-empacotada (Sep Pak).....	40
4.2 Desenvolvimento de método para preparação do padrão de AC puro a partir do Clavulin®.....	40
4.2.1 Estudos para extração do ácido clavulânico.....	41
4.2.2. Extração do ácido clavulânico em diferentes solventes.....	41
4.3 Melhoramento das etapas de purificação que antecedem a etapa final de precipitação, para o caldo de fermentação.....	44
4.3.1 Cromatografia utilizando resina Amberlite XAD-4.....	44
4.3.2 Sequência de cromatografias.....	45
4.4 Avaliação das reações descritas em literatura e estabelecimento de metodologia para precipitação do clavulanato de potássio.....	46
4.4.1 Reação de formação de um éster.....	46
4.4.2 Reação com a trietilamina.....	47
4.4.3 Precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio - ensaios preliminares.....	47
4.4.3.1 <i>Ensaio para o caldo de fermentação.....</i>	49
4.4.3.2 <i>Precipitação do clavulanato de potássio com a passagem por um intermediário estável.....</i>	49
4.5 Otimização das reações de precipitação.....	51
4.5.1 Reação direta de precipitação do AC (R_0).....	52
4.5.2 Reação indireta, com a passagem por um intermediário estável (R_1 e R_2).....	55
4.5.3 Ensaio para o caldo de fermentação.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1 Caracterização e seleção de método para monitoramento do AC.....	59
5.1.1 Estudos em cromatografia em camada delgada (CCD).....	59
5.1.2 Estudos em coluna pré-empacotada (Sep Pak).....	60
5.2 Desenvolvimento de método para preparação do padrão de AC puro a partir do Clavulin®.....	61
5.2.1 Estudos para extração do ácido clavulânico.....	61
5.2.2 Extração do ácido clavulânico em diferentes solventes.....	62
5.3 Melhoramento das etapas de purificação que antecedem a etapa final de precipitação, para o caldo de fermentação.....	64
5.3.1 Cromatografia utilizando resina Amberlite XAD-4.....	64
5.3.2 Sequência de cromatografias.....	65

5.4 Avaliação das reações descritas em literatura e estabelecimento de metodologia para precipitação do clavulanato de potássio.....	66
5.4.1 Reação de formação de um éster.....	66
5.4.2 Reação com a trietilamina.....	66
5.4.3 Precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio – ensaios preliminares.....	67
5.4.3.1 <i>Ensaio para o caldo de fermentação.....</i>	<i>72</i>
5.4.3.2 <i>Precipitação do clavulanato de potássio com a passagem por um intermediário estável.....</i>	<i>75</i>
5.5.Otimização das reações de precipitação.....	80
5.5.1 Reação direta de precipitação do AC (R ₀).....	80
5.5.1.1 <i>Ensaio para o caldo de fermentação.....</i>	<i>89</i>
5.5.2 Reação indireta com a passagem por um intermediário estável– reação do AC com a t-octilamina (R ₁).....	94
5.5.2.1 <i>Confirmação experimental das condições otimizadas.....</i>	<i>99</i>
5.5.2.2 <i>Ensaio para o caldo de fermentação.....</i>	<i>100</i>
5.5.3 Reação indireta com a passagem por um intermediário estável – reação do sal de amina de AC com o 2-etil (R ₂).....	104
5.5.3.1 <i>Confirmação experimental das condições otimizadas.....</i>	<i>111</i>
5.5.3.2 <i>Ensaio para confirmação do tempo de indução.....</i>	<i>112</i>
5.5.3.3 <i>Ensaio para o caldo de fermentação.....</i>	<i>113</i>
5.5.3.4 <i>Verificação da estabilidade para os cristais formados.....</i>	<i>117</i>
6 CONCLUSÕES.....	122
7 SUGESTÕES.....	124
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
APÊNDICE A – Cálculo estequiométrico e memória de cálculo.....	132
APÊNDICE B – Reação de formação do 2-etilexanoato de potássio.....	142
APÊNDICE C – Tabelas de deslocamento químico, correlações e espectros de RMN.	144

1 INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC) é uma substância de ocorrência natural, detectada pela primeira vez em culturas de *Streptomyces clavuligerus* por pesquisadores do Beecham Laboratories na Inglaterra. É um potente inibidor de β -lactamases. As β -lactamases são o mais importante mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos. Atualmente, existe um grande número de patógenos produtores de β -lactamases, dentre os quais se destacam *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* e *Haemophilus influenzae*. O uso combinado do ácido clavulânico e de antibióticos β -lactâmicos tornou possível a cura de várias infecções resistentes a terapias convencionais, sem necessitar de utilização de medicamentos com fortes efeitos colaterais (BAGGALEY *et al.*, 1997; COLE *et al.*, 1978). No Brasil, é comercializado com o nome de Clavulin pela SmithKline Beecham do Brasil Ltda. e Sigma-Clav BD pela EMS Indústria Farmacêutica Ltda.

Dentre as estratégias para reduzir o preço dos medicamentos, a substituição da importação pela produção local é, sem dúvida, uma das mais importantes. Mas se é verdade que a indústria nacional farmacêutica cresceu significativamente na década de 90, respondendo hoje por aproximadamente 90% do que é consumido no país (dados da Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica - Abiquif), o contrário se deu para a indústria farmoquímica (responsável pela fabricação dos princípios ativos e intermediários), cujo desenvolvimento foi praticamente nulo. Atualmente, 82% dos farmoquímicos utilizados na fabricação de medicamentos são ainda importados, segundo os dados da Abiquif (BARRERO, 2001). Na atualidade a atividade do setor farmacêutico no Brasil consiste, basicamente, em misturar os componentes para dar a forma final de apresentação aos medicamentos (comprimido, pó, líquido etc).

Resolver a disparidade entre indústria farmacêutica e indústria farmoquímica está no centro das discussões sobre o crescimento do setor de fármacos no Brasil. A necessidade de atuação do governo, através de uma política de incentivo à pesquisa e desenvolvimento e de incentivo à indústria nacional, é apontada como requisito para solucionar o problema (BARRERO, 2001).

A integração entre todos os setores é vista como fundamental, uma vez que o número de importações de princípios ativos e medicamentos é muito maior do que a quantidade de exportações pelo Brasil.

Tendo em vista tanto o aspecto clínico como a importância comercial e o restrito conhecimento das etapas do processo de produção do ácido clavulânico, torna-se indispensável o estudo dos processos de produção, extração e purificação deste fármaco, para que seja possível disponibilizar sua tecnologia de produção.

Assim vários trabalhos na Área de Pesquisa de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da UFSCar foram e vêm sendo desenvolvidos para o ácido clavulânico.

O presente trabalho apresenta um estudo dos processos e operações para a separação e purificação do ácido clavulânico, produzido por fermentação (cultivados pelos alunos integrantes da pós-graduação do DEQ), com ênfase na etapa final do processo de produção deste importante fármaco.

Desse modo o objetivo principal desta tese foi a precipitação do clavulanato de potássio a partir do AC presente no caldo de fermentação. Entretanto para tornar esse objetivo possível, outros objetivos específicos precisaram ser atingidos, tais como:

- 1 - Caracterização e seleção de método para monitoramento do AC;
- 2 - Desenvolvimento de método para preparação do padrão de AC puro a partir do Clavulin®;
- 3 - Melhoramento das etapas de purificação que antecedem a etapa final de precipitação, para o caldo de fermentação;
- 4 - Avaliação das reações descritas em literatura e estabelecimento de metodologia para precipitação de clavulanato de potássio;
- 5 - Otimização das reações de precipitação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibióticos

Os antibióticos interferem em diferentes atividades da célula bacteriana, causando a sua morte ou somente inibindo o seu crescimento, sendo chamados de bactericidas e de bacteriostáticos respectivamente.

De forma geral, os antibióticos atuam sobre bactérias de diversos gêneros. As bactérias são normalmente classificadas levando-se em consideração a forma: *cocos*, *bacilo*, *cocobacilo*, *bacilo fusiforme*, *víbrio*, *espirilo* e *espiroqueta* (MURRAY *et al.*, 2002). De acordo com a coloração: a coloração Gram classifica a bactéria em gram-positiva ou gram-negativa.

Geralmente, a maneira de atuação dos antibióticos, encontra-se subdividida em grupos descritos abaixo (MURRAY *et al.*, 2002);

- Que atuam no nível dos ribossomos; Diversas classes de antibióticos atuam na inibição da síntese de proteínas bacterianas.
- Inibidores da síntese de ácido nucléico das bactérias;
- Inibidores da síntese de metabólitos necessários a certos microrganismos;
- Que atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana; A parede celular bacteriana constitui-se em um alvo óbvio para os antibióticos. As duas classes mais importantes de inibidores da síntese da parede celular são os glicopeptídeos e os β -lactâmicos, estes últimos serão abordados neste trabalho.

2.1.1 Bactérias gram-negativas e gram-positivas

As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que contém grandes quantidades de lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas. As porinas são proteínas que formam canais por onde é permitida a entrada por difusão de moléculas hidrofílicas menores que 700 Da em massa. A membrana citoplasmática é revestida por uma fina camada de peptidoglicano. No espaço periplásmico, situado entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, encontram-se as β -lactamases, no caso das bactérias patogênicas. As gram-negativas representam um desafio à entrada de grandes moléculas, a membrana externa e o canal formado pelas porinas permitem a passagem de metabólitos e de pequenos antibióticos hidrofílicos, constituindo em uma barreira para antibióticos maiores ou

hidrofóbicos. As gram-positivas não possuem membrana externa, apenas uma espessa parede celular formada por múltiplas camadas de peptidoglicano (Figura 2.1.1).

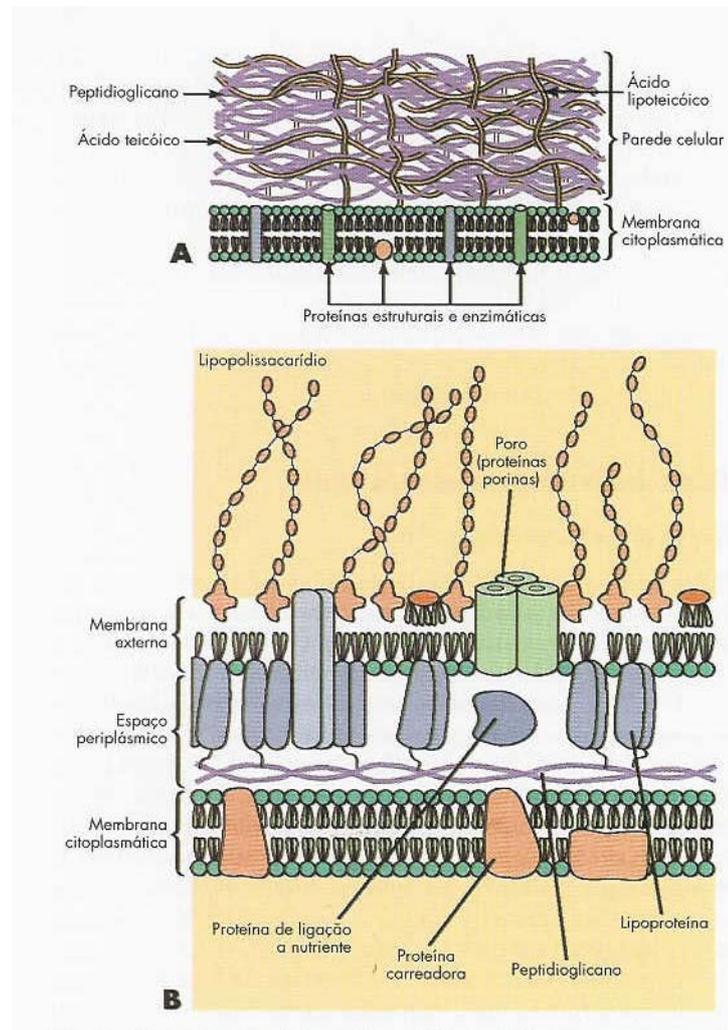


Figura 2.1.1 – Comparação das paredes celulares de bactérias: (A) gram-positivas; (B) gram-negativas (MURRAY *et al.*, 2002).

São exemplos de bactérias gram-positivas os gêneros de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, entre outros.

E gram-negativas; *Neisseria*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Bordetella*, *Francisella*, *Brucella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Legionella*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Ehrlichia*, *Coxiella* entre outras (MURRAY *et al.*, 2002).

2.1.2 Antibióticos β -lactâmicos

Em 1941, ano em que a penicilina foi utilizada clinicamente pela primeira vez, mais de 90% dos estafilococos isolados eram suscetíveis ao antibiótico. Entretanto, a resistência à penicilina rapidamente se desenvolveu devido principalmente à produção da penicilinase pelos microrganismos, hoje chamadas de β -lactamases. A distribuição disseminada dessa enzima foi garantida pela sua presença em plasmídios transmissíveis (MURRAY et al., 2002).

As bactérias biossintetizam membranas plasmáticas, paredes celulares e cápsulas. Tal proteção se faz necessária para seu crescimento e desenvolvimento, desde que o interior bacteriano é hiperosmolar (mais concentrado) em relação ao meio extracelular. Sem ela, a existência da célula é comprometida.

O componente estrutural mais importante das paredes celulares bacterianas é a camada de peptidoglicano, com uma estrutura básica de uma cadeia de 10 a 65 resíduos de dissacarídeos. Essas cadeias são interligadas por pontes peptídicas que criam uma cobertura reticular rígida para as bactérias. A construção das cadeias e das ligações cruzadas é catalisada por enzimas específicas (por exemplo, transpeptidases, carboxipeptidases, endopeptidases). Essas enzimas reguladoras são também chamadas de proteínas de ligação à penicilina (PBPs – penicillin-binding proteins), uma vez que elas podem se ligar aos antibióticos β -lactâmicos. Quando bactérias em crescimento são expostas a esses antibióticos, o antibiótico se liga às PBPs na parede celular em crescimento, impedindo conseqüentemente a síntese, e resultando na lise e morte da célula bacteriana. Assim os β -lactâmicos atuam como agentes bactericidas.

2.1.2.1 Mecanismo de ação de um antibiótico β -lactâmico

O caminho percorrido pelo antibiótico β -lactâmico quando este ataca uma bactéria gram-negativa como a *E.Coli* ou do gênero *Pseudomonas* esta ilustrada na Figura 2.1.2 abaixo (KNOWLES, 1985).

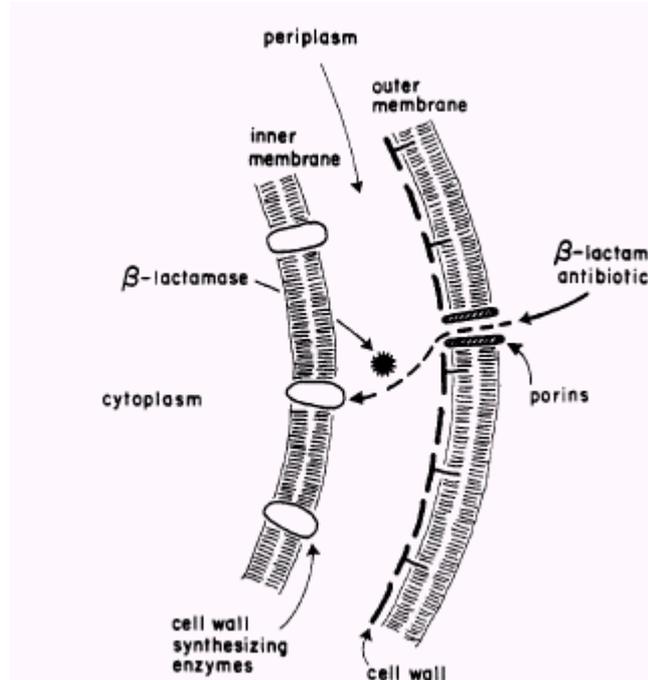


Figura 2.1.2 – O caminho percorrido pelo antibiótico β -lactâmico quando este ataca uma bactéria gram-negativa (KNOWLES, 1985).

Inicialmente o antibiótico deve atravessar a membrana externa por difusão passiva através dos canais formados pelas porinas. Estes canais apresentam algumas barreiras ao livre acesso ao espaço intermediário, o espaço periplásmico, exceto para substâncias pequenas e hidrofílicas que parecem penetrar prontamente. O antibiótico então atravessa a parede celular, a qual é uma malha de peptidoglicano cruzado responsável pela integridade estrutural celular.

O antibiótico β -lactâmico deve então atravessar o espaço periplásmico para, desta maneira, atingir o alvo da sua ação, que são as enzimas da membrana interna, as responsáveis pela biossíntese da parede celular. Se a bactéria possui o gene para a síntese da β -lactamase, então o espaço periplásmico pode conter milhares de cópias desta enzima. Por exemplo uma célula de *E.coli* que contenha o gene pode ter até 65000 moléculas de β -lactamases no seu espaço periplásmico, as quais podem catalisar a hidrólise da penicilina ao inativo ácido penicilóico monocíclico. Finalmente se o antibiótico conseguir penetrar ileso no espaço periplásmico, ou seja, sem ser atacado por alguma β -lactamase, ele poderá inativar uma ou mais enzimas envolvidas na síntese da parede celular, enfraquecendo a rede e a estrutura bacteriana, levando a lise e a morte celular (KNOWLES, 1985).

Existem quatro subclasses de antibióticos β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, monobactâmicos. (BAGGALEY *et al.*, 1997; MURRAY *et al.*, 2002).

Penicilinas

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928 como um co-produto do *Penicillium notatum*, o qual deu origem ao nome do medicamento. As penicilinas (Figura 2.1.3) consistem em um anel β -lactâmico fundido a um anel de cinco membros chamado tiazolidina. Uma modificação bioquímica nessa estrutura resulta em antibióticos com diferentes propriedades antibacterianas e farmacológicas, que possuem um maior espectro de atividade, incluindo as bactérias gram-negativas (FONSECA, 1986).

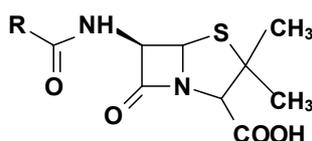


Figura 2.1.3 - Fórmula estrutural das penicilinas (ácido 6-amino penicilânico).

Dentre as penicilinas estão representadas a penicilina G ou benzilpenicilina (Figura 2.1.4), e a penicilina V. A primeira revolucionou o tratamento de uma grande variedade de infecções, dentre elas, a febre escarlate, a pneumonia, a gonorréia e sérias infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, as quais, até aquele momento não possuíam tratamento. Logo se aperfeiçoaram os métodos naturais de obtenção dos primeiros antibióticos, surgindo os antibióticos sintetizados em laboratório e com isso o início da fase industrial de produção de antibióticos.

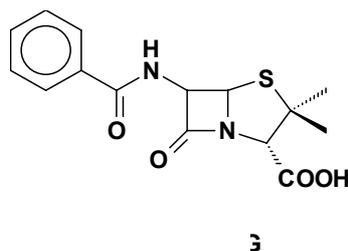


Figura 2.1.4 – Fórmula estrutural da penicilina G.

Cefalosporinas

As cefalosporinas foram originalmente isoladas do fungo *Cephalosporium acremonium*, na Sardenha, por Brotzu em 1945. A cefalosporina C (Figura 2.1.5), apresentou forte atividade contra certas bactérias gram-negativas (DEMAIN *et al.*, 1999). As cefamicinas são estreitamente relacionadas com as cefalosporinas com a diferença de que são mais estáveis à hidrólise ocasionada pelas β -lactamases (FUKASE *et al.*, 1975).

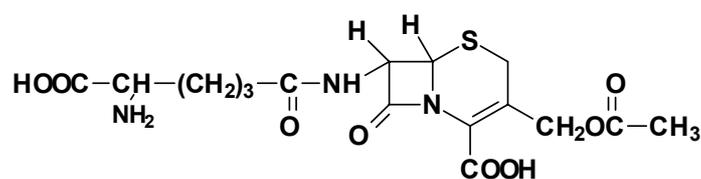


Figura 2.1.5 - Fórmula estrutural da cefalosporina C.

Carbapenems

Os carbapenems (Figura 2.1.6) consistem em um anel β -lactâmico ligado a um anel de carbono de cinco membros chamado penem. Esses antibióticos β -lactâmicos possuem amplo espectro de ação, contra praticamente todos os grupos de microrganismos, com somente poucas exceções (por exemplo, foi descrita a ocorrência de resistência em todos os estafilococos resistentes à oxacilina, Enterobacteriaceae selecionadas e *Pseudomonas* e outros bacilos gram-negativos) (MURRAY *et al.*, 2002). Os carbapenems disponíveis comercialmente são; Imipenem/cilastatina (PrimaxinTM), Panipenem, Biapenem, Meropenem (MerremTM) e Ertapenem (InvanzTM) (BUYNAK, 2005).

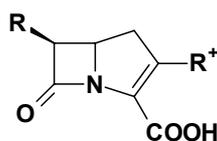


Figura 2.1.6 - Fórmula estrutural dos carbapenems.

Monobactâmicos

O nome monobactâmico (Figura 2.1.7) é a forma abreviada para β -lactâmico monocíclico. Os monobactâmicos consistem em um único anel β -lactâmico, ligado ao grupo ácido sulfônico. O único monobactâmico disponível é o aztreonam (Figura 2.1.8). Diferente de outros antibióticos β -lactâmicos, este é um antibiótico de espectro estreito, ativo somente contra bactérias gram-negativas aeróbicas. As bactérias gram-positivas anaeróbicas são resistentes. A vantagem desse antibiótico é que pode ser utilizado no tratamento de infecções específicas sem interferir na população bacteriana normal protetora do hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2002). Outros monobactâmicos foram recentemente descobertos como o Syn 2190, mas ainda não estão disponíveis comercialmente (BUYNAK, 2005).

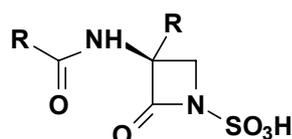


Figura 2.1.7 – Fórmula estrutural dos monobactâmicos.

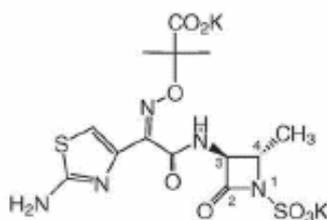


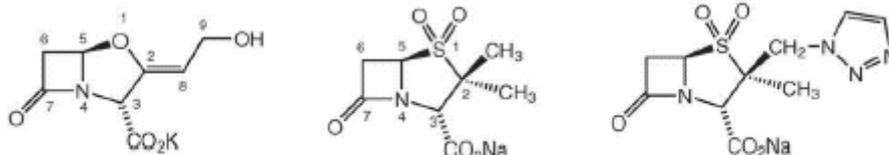
Figura 2.1.8 – Fórmula estrutural do aztreonam.

Inibidores de β -lactamases

O ácido clavulânico produzido pelo *Streptomyces clavuligerus* é o mais conhecido e importante inibidor das β -lactamases bacterianas. Ele é utilizado em conjunto com outros antibióticos conhecidos comercialmente como: AugmentinTM (amoxicilina/ácido clavulânico) e TimentinTM (ticarcilina/ácido clavulânico), (BUYNAK, 2005).

Existem outros inibidores de β -lactamases (Figura 2.1.9) além do ácido clavulânico, como o Sulbactam e o Tazobactam, que são também utilizados em conjunto com

antibiótico como: Unasyn™ (ampicilina/sulbactam) e Zosyn™ (piperacilina/tazobactam), (BUYNAK, 2005).



Clavulanato de potássio

Sal de sódio de sulbactam

Sal de sódio de tazobactam

Figura 2.1.9 – Inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente.

2.2 β -lactamases

Existem quatro diferentes classes de β -lactamases, de A a D. Nas classes A, C e D as β -lactamases são enzimas que contêm um sítio ativo de serina, por isso chamadas de ser- β -lactamases, enquanto a classe B são metaloenzimas de zinco. Na classe A estão incluídas as penicilinas e as famosas β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que são capazes de inativar a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, na classe C estão incluídas as cefalosporinas. Na classe D estão inseridas as hidrólise-oxacilinas (BAGGALEY et al., 1997; LIRAS et al., 2000; MURRAY et al., 2002; WRIGHT, 2005).

Os inibidores comerciais de β -lactamases existentes, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, são efetivos contra a classe A. O tazobactam possui uma modesta atividade contra algumas β -lactamases da classe C, mas não o suficiente para ser clinicamente utilizado (BUYNAK, 2005). O ácido clavulânico é pouco ativo contra as classes C e D e é inativo contra a classe B (LIRAS *et al.*, 2000; WRIGHT, 2005).

Os principais mecanismos de resistência aos β -lactâmicos segundo Wright (2005) são:

- a hidrólise enzimática do anel β -lactâmico pela enzima β -lactamase. É o mais importante dos três mecanismos e ocorre com o gênero *Staphylococcus*, e as bactérias *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* entre outras. Existem muitas β -lactamases que diferem em termos de especificidade pelo substrato;
- O segundo mecanismo mais importante da resistência é a alteração dos sítios-alvo, denominados de proteínas ligantes da penicilina. Alterações em uma proteína

específica ligante das penicilinas constituem o principal mecanismo de resistência nos pneumococos penicilina-resistentes.

- Um terceiro mecanismo de resistência consiste na permeabilidade reduzida das membranas celulares das bactérias gram-negativas.

2.2.1 Hidrólise enzimática

Muitos antibióticos têm ligações químicas hidrolisáveis (ésteres, amidas) cuja integridade é fundamental para exercerem atividade biológica. Existem muitos exemplos de enzimas que têm envolvido a quebra destas ligações vulneráveis destruindo a atividade do antibiótico. Como essas enzimas necessitam apenas de H₂O como co-substrato, podem freqüentemente ser excretadas pela bactéria, interceptando os antibióticos, antes deles entrarem em contato com a mesma.

Existem duas maneiras que são estratégias moleculares empregadas pelas β-lactamases para hidrólise do anel β-lactâmico das penicilinas e cefalosporinas; através da ação de um sítio ativo Ser-nucleófilo ou através da ativação da água via um centro de Zn²⁺, conforme mostra a Figura 2.2.1 abaixo (WRIGHT, 2005).

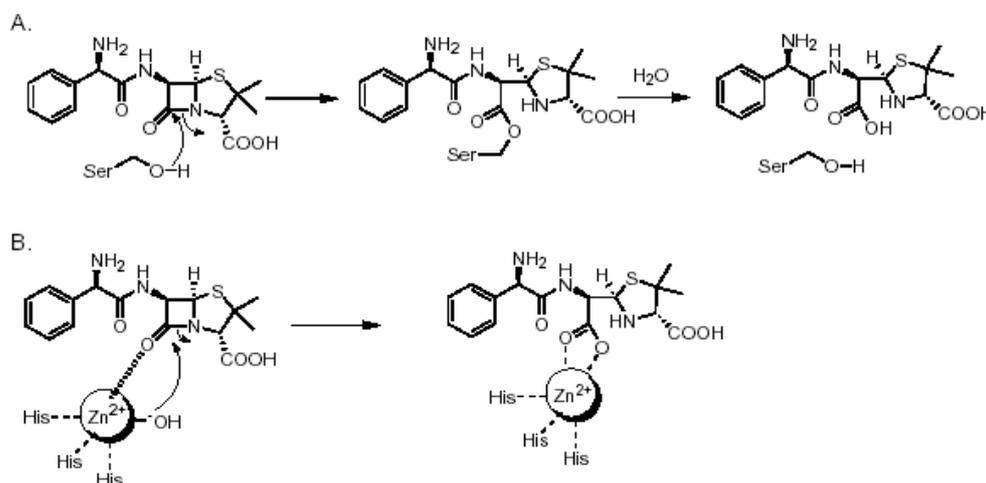


Figura 2.2.1 – Mecanismo geral da Ser-β-lactamase (A) e metalo-β-lactamase (B), durante a hidrólise da amoxicilina.

As Ser-β-lactamases são sem dúvidas as enzimas resistentes mais encontradas e portanto, as mais importantes clinicamente, mas as metalo-β-lactamases vêm crescendo nas últimas décadas, sendo a principal causa da resistência de bactérias gram-negativas aos carbapenens (WRIGHT, 2005).

As β -lactamases interagem com os antibióticos β -lactâmicos, se ligando a eles e promovendo abertura do anel β -lactâmico, causando desta maneira a perda da atividade antibacteriana.

As Ser- β -lactamases formam um complexo temporário com o antibiótico, causando sua inativação biológica. Após a inativação, essa enzima se solta do antibiótico e está pronta para um novo ataque.

O ácido clavulânico é um potente inibidor das Ser- β -lactamases da classe A. Quando esse é utilizado juntamente com antibióticos β -lactâmicos, ocorre uma ligação irreversível entre o grupo hidroxila da serina da β -lactamase e o ácido clavulânico, produzindo um intermediário estável, inativando a enzima e permitindo assim, que o antibiótico atue no combate à infecção (LIRAS *et al.*, 2000).

2.3 Ácido clavulânico

Desde a descoberta e uso clínico dos antibióticos a resistência a estes agentes vem sendo observada com um comensurável impacto negativo no tratamento de doenças infecciosas. A resistência aos antibióticos é agora reconhecidamente o maior problema no tratamento das infecções hospitalares e sua frequência vem aumentando cada vez mais (WRIGHT, 2005).

Em meados dos anos sessenta o Beecham Research Laboratories iniciou um programa de triagem com microrganismos. Esse estudo foi proposto devido à possibilidade de se usar um inibidor de β -lactamase em conjunto com penicilinas ou cefalosporinas para conter problemas de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Esse programa permitiu o isolamento do ácido clavulânico a partir de *Streptomyces clavuligerus*. Sabe-se que o *Streptomyces clavuligerus* foi originalmente observado pela produção de cefamicina C. Esse microrganismo também produz penicilina N, desacetoxicefalosporina C, desacetilcefalosporina C e o 3-carbamoiloximetil análogo a cefalosporina C, holomicina, um antibiótico complexo chamado tunicamicina e uma proteína inibidora de β -lactamases (BLIP), (BAGGLEY, 1997; LIRAS *et al.*, 2000).

O ácido clavulânico é um potente inibidor de certas β -lactamases produzidas pelas bactérias gram-negativas, Enterobacteriaceae, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Branhamella

catarrhalis e Bacteroides fragilis e gram-positivas como Staphylococcus aureus e Bacillus cereus, resistentes às penicilinas e cefalosporinas (BAGGALEY et al., 1997).

É constituído por um anel β -lactâmico condensado a um anel oxazolidina (Figura 2.3.1).

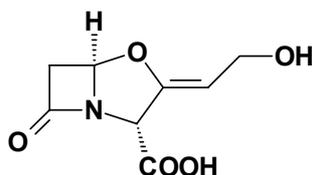


Figura 2.3.1 – Fórmula estrutural do ácido clavulânico.

Um grande número de penicilinas e algumas cefalosporinas, as quais exibem graus de instabilidade frente às β -lactamases, podem ser protegidas da inativação pelo ácido clavulânico. A amoxicilina em particular possui atividade bacteriostática em sinergismo com o ácido clavulânico contra bactérias produtoras de β -lactamases. A Tabela 2.3.1 ilustra o efeito do ácido clavulânico na atividade da amoxicilina contra cada bactéria. Para a ticarcilina em combinação com o ácido clavulânico é encontrado similar proteção e sinergismo. Linhagens sensíveis a amoxicilina e a ticarcilina não demonstraram um aumento de sensibilidade a esses compostos na presença do ácido clavulânico. As β -lactamases estáveis frente à penicilina e as cefalosporinas não demonstraram um aumento de sensibilidade a esses antibióticos nem na presença do ácido clavulânico. Isto pode ser notado nas linhagens de Staphylococcus Aureus resistentes a metilina, essas não exibiram sensibilidade à amoxicilina associada ao ácido clavulânico. A resistência dessas linhagens é o resultado de β -lactamases que não são do tipo resistência mediada por plasmídios transmissíveis, mas podem ser por exemplo, de uma mutação genética como as que alteram as PBP (penicilim binding portein) (BAGGALEY et al., 1997; MURRAY et al., 2002).

Tabela 2.3.1 - Espectro de atividade antibacteriostática da amoxicilina na presença do ácido clavulânico, comparado com a amoxicilina e ácido clavulânico sozinhos contra organismos produtores de β -lactamases.

	MIC valores/ $\mu\text{g.ml}^{-1}$		
	Amoxicilina	Amoxicilina + Ácido clavulânico	Ácido Clavulânico
<i>Escherichia coli</i> NCTC 11560	>512	8	16
<i>Escherichia coli</i> Atcc 35218 ^a	>512	4	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 12	64	2	32
<i>Proteus mirabilis</i> 889	>512	4	32
<i>Proteus vulgaris</i> 7510	512	2	32
<i>Yersinia enterocolitica</i> 10723	32	8	32
<i>Aeromonas hydrophila</i> U53	256	32	16
<i>Bacteroides fragilis</i> B3	32	0,5	32
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 109	16	0,1	32
<i>Bacteroides vulgatus</i> 940	16	0,1	32
<i>Bacteroides thetaiotaomicrom</i> 4873	32	0,5	16
<i>Haemophilus influenzae</i> NEMCI ^a	128	0,5	32
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> AX 1729 ^a	16	1	4
<i>Moraxella catarrhalis</i> 2001 E ^a	16	0,25	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	8	0,25	16
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 11561 ^a	256	1	16
<i>Staphylococcus aureus</i> V 532 ^{a,b}	156	16	512
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 810	128	1	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 254 ^{a,b}	256	4	4

MIC– Concentração inibitória mínima.

a Linhagens produtoras de β -lactamases mediadas por plasmídios transmissíveis

b β -lactamases resistentes a meticilina.

A combinação do ácido clavulânico com a amoxicilina é o exemplo mais bem sucedido do uso de um antibiótico β -lactâmico sensível a β -lactamase juntamente com um inibidor dessa enzima (MAYER *et al.*, 1996). A formulação que contém o AC e a amoxicilina é comercializado no Brasil, com o nome Clavulin® (Smith Kline Beecham Laboratory) e Sigma-Clav BD (EMS Indústria Farmacêutica Ltda).

2.3.1 Estabilidade do ácido clavulânico

Muitos autores investigaram a estabilidade do AC em soluções tampão em diferentes valores de pH. Esses autores observaram que a degradação do AC segue uma cinética de pseudoprimeira-ordem e que essa degradação é muito influenciada pela catálise causada pelos sais do tampão utilizados para manter constante o pH (HAGINAKA *et al.*, 1981; BERSANETTI *et al.*, 2004).

Haginaka *et al.* (1985), estudaram a degradação do clavulanato de potássio em uma solução aquosa levemente alcalina a várias temperaturas. De acordo com os autores, uma maior estabilidade para o ácido clavulânico ocorre em pH 6,39 a 35° C e com uma força iônica (μ) igual a 0,5. Os autores identificaram quatro produtos de degradação, suas estruturas

foram determinadas e seu mecanismo de reação elucidado. Esses produtos são 2,5-bis-(2-hidroxiethyl)pirazina (I), 3-metil-2,5-bis-(2-hidroxiethyl) pirazina (II), 3-(2-carboxiethyl)-2,5-bis(2-hidroxiethyl)pirazina (III) e 3-etil-2,5-bis(2-hidroxiethyl) pirazina (IV). À temperatura de 35 °C não é observado formação do produto II, a 60°C todos os produtos foram observados e a 100°C o produto III não é formado.

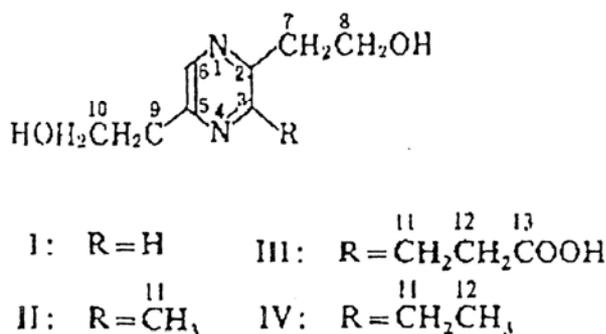


Figura 2.3.2 – Produtos de degradação do ácido clavulânico isolados por Haginaka *et al.* (1985).

A constante de velocidade de degradação aumenta com o aumento da concentração do tampão. A degradação do ácido clavulânico em meio neutro e ácido é diferente da que ocorre em meio básico (HAGINAKA *et al.*, 1981).

O trabalho realizado por Finn *et al.* (1984), teve como objetivo identificar e caracterizar o produto de degradação majoritário resultante da hidrólise do ácido clavulânico em meio ácido. O esquema (Figura 2.3.3) elaborado por Finn mostra uma série de reações que podem ocorrer durante a hidrólise do grupo β -lactâmico do ácido clavulânico.

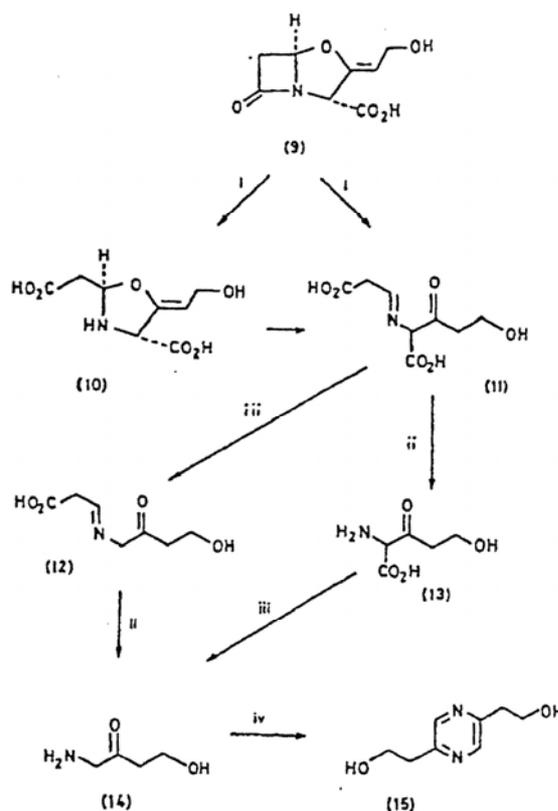


Figura 2.3.3 – Esquema: reagentes i, H₂O; ii, H₂O, -CO₂, -CH₃CHO; iii-CO₂; iv, (14), -2H₂O, -2[H] (FINN *et al.*, 1984).

A simples hidrólise do anel β-lactâmico pode gerar a oxazolidina (10), a qual pode-se esperar que tautomerise em uma imina (11). Outra possibilidade é a hidrólise a qual ao mesmo tempo abre o anel oxazolidino podendo preceder diretamente a imina (11). Dessa maneira, a hidrólise do anel β-lactâmico do ácido clavulânico (9), difere da hidrólise dos penams, penems e carbapenems, no qual é esperado que seja acompanhado da destruição do anel de cinco membros. De acordo com as condições da hidrólise, o intermediário (11) poderá passar por duas reações mais adiante, chamadas de descarboxilação do β-ceto ácido e hidrólise da imina, para chegar eventualmente, na amino cetona (14). Dependendo da ordem dessas últimas reações a imina descarboxilada (12) ou a α-amino β-ceto ácido (13) poderá ser um intermediário nesse processo. Seguindo as bases desse esquema, os produtos de degradação da hidrólise do ácido clavulânico esperados são a amino cetona (14), acetaldeído e duas moléculas de dióxido de carbono. Em condições ácidas, a amino cetona pode ser estável, entretanto em soluções neutras ou básicas pode-se esperar que este composto sofra uma reação de condensação interna formando a pirazina (15).

Finn afirma que este esquema está de acordo com o trabalho de Haginaka *et al.* (1981), no qual estes encontraram que o ácido clavulânico em tampão fosfato a pH 7,83 foi hidrolisado em produtos que são mostrados no espectro de u.v. (λ_{\max}) de 276nm, enquanto na hidrólise ácida (pHs 5,0 e 3,24) os produtos obtidos são transparentes a 276nm. Justificando assim, a presença da pirazina apresenta máxima absorção em torno de 276nm.

Bersanetti *et al.* (2000) concluíram que a estabilidade do antibiótico a 20° C e μ de 0,5 é maior em pH 6,0 e que a degradação ocorre mais rapidamente em soluções básicas do que em soluções ácidas. Verificou-se também que as constantes de degradação do AC em soluções aquosas são menores em relação as soluções obtidas do meio de fermentação, isto devido à presença de outros componentes do meio, tal como compostos que contêm amônio (BERSANETTI *et al.*, 2004).

2.4 Precipitação

A precipitação é largamente utilizada nos processos industriais, tendo um papel de destaque não só na área química, mas metalúrgica, geológica, fisiológica entre outras. No campo industrial, na fabricação de produtos farmacêuticos, tintas e pigmentos, polímeros e plásticos são empregados os princípios de precipitação (MULLIN, 1993).

A precipitação, ou cristalização por precipitação, é um caso particular de cristalização. Assim o fenômeno de precipitação pode ser definido como o processo em que uma nova fase é formada como resultado de uma reação química de dois ou mais componentes contidos na solução-mãe (NÝVLT, 1985).

A precipitação ainda pode ser definida como uma rápida cristalização, e esta rapidez é consequência da supersaturação em que ela ocorre. A supersaturação do sistema é uma outra forma de se identificar um processo de precipitação, uma vez que os processos de cristalização se dão na faixa de supersaturação relativa de 0,001 a 0,20, enquanto que a precipitação pode se dar com valores de supersaturação relativa da ordem de até 1000 (SÖHNEI e GARSIDE, 1992 e MULLIN, 1993).

Mullin (1993) definiu que a precipitação, assim como a cristalização, consiste em três etapas básicas: supersaturação, nucleação e crescimento cristalino, e ainda apresenta mais duas etapas subseqüentes que usualmente exercem um efeito profundo no produto cristalino final; a aglomeração e amadurecimento dos cristais. A aglomeração ocorre logo após a

nucleação dos cristais e o amadurecimento é usado para designar todas as transformações irreversíveis que ocorrem após a formação do precipitado.

Söhnel e Garside (1992), foram mais específicos descrevendo seis características que permitem uma melhor identificação do processo de precipitação frente a cristalização, tais como:

1- Geralmente são materiais relativamente insolúveis que lideram o processo de precipitação, desde que essa baixa solubilidade possa criar uma alta supersaturação no sistema.

2- A alta supersaturação em que a nucleação ocorre assegura que a taxa de nucleação primária seja alta, fazendo com que a nucleação seja a etapa mais importante do processo de precipitação.

3- As altas taxas de nucleação resultam na produção de um grande número de núcleos, limitando o tamanho médio obtido no crescimento dos cristais. Como resultado a concentração destes no sistema é muito elevada, da ordem de 10^{11} a 10^{16} partículas por cm^3 e o tamanho dos cristais é relativamente pequeno, entre 0,1 e $10\mu\text{m}$.

4- Se os cristais precipitados são suficientemente pequenos, processos secundários tais como aglomeração, amadurecimento e coagulação, podem ocorrer e causar alterações significativas na distribuição do tamanho dos cristais. O desenvolvimento de sistemas coloidais também pode ser importante.

5- Uma das condições mais características é que a alta supersaturação necessária nos processos de precipitação é frequentemente obtida através de reações químicas. Essas reações podem envolver dois líquidos, um líquido e um sólido ou um líquido e um gás.

6- Os processos de precipitação ocorrem a temperaturas constantes e não necessitam ser resfriados para gerar a supersaturação, o que ocorre na maioria dos processos de cristalização.

Assim para melhor compreender a precipitação um breve estudo das etapas básicas, supersaturação, nucleação e crescimento cristalino e suas definições empregadas para a cristalização de uma forma geral torna-se necessário.

2.4.1 Solução supersaturada

Uma solução é dita supersaturada quando contém numa dada temperatura uma quantidade de soluto dissolvido maior que a sua solubilidade nessa temperatura.

A supersaturação de uma solução pode ser criada de diversas maneiras, como

apresentado esquematicamente na Tabela 2.4.1.

Tabela 2.4.1 – Métodos de criação da supersaturação (NÝVLT *et al.*, 2001).

Resfriamento	Indireto	Externo (com circulação de solução ou suspensão)
		Interno (serpentina de resfriamento, tubo direcionador, camisa de resfriamento)
	Direto	Injeção de ar
		Borbulhamento
Vácuo		
Líquidos imiscíveis		
Evaporação	Vácuo	Tanque único
		Tanques em série
		Termocompressão
	Pressão atmosférica	
Mudança de Meio	Aquecedor submerso	
	Adição de outra substância sólida	
Reação química	Adição de outro solvente	
	Neutralização, saturação	
	Precipitação	
	Reação eletroquímica	

Por algum desses métodos pode-se atingir uma situação na qual a concentração da solução (o potencial químico do componente dissolvido) é maior do que o correspondente ao equilíbrio. Esse excesso na concentração ou potencial químico, o qual representa a força motriz da cristalização, é chamado supersaturação (NÝVLT, 1985).

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1 \quad (2.1)$$

$$\text{ou} \quad \Delta\mu = -RT \left(\ln \frac{a_c}{a_{c,eq}} \right) \quad (2.2)$$

Sendo:

μ_1 : potencial químico da substância c em solução supersaturada;

μ_2 : potencial químico da substância c em fase sólida;

a_c : atividade da substância c;

$a_{c,eq}$: atividade da substância c em equilíbrio;

R : constante dos gases ideais;
 T : temperatura.

É comum em estudos de cristalização introduzir a nucleação e o crescimento do cristal como função da força motriz (supersaturação), e esta também pode ser definida em função da concentração do sistema:

$$\Delta C = C_s - C_{eq} \quad (2.3)$$

ou pela supersaturação relativa (σ),

$$\sigma = \frac{C_s - C_{eq}}{C_{eq}} = \frac{\Delta C}{C_{eq}} \quad (2.4)$$

ou pela razão de supersaturação (S),

$$S = \frac{C_s}{C_{eq}} = \sigma + 1 \quad (2.5)$$

Onde:

C_s : é a concentração da solução;

C_{eq} : é a concentração de equilíbrio a uma dada temperatura.

Se a supersaturação é atingida por resfriamento, então, a diferença na temperatura entre a correspondente à saturação (T_{eq}) e a temperatura (T) na qual a solução se encontra é definida como super-resfriamento. A supersaturação ou super-resfriamento de um sistema pode ser expresso por diferentes maneiras, isso faz com que seja necessária a especificação tanto das unidades como da correspondente temperatura (NÝVLT, 1985).

O termo super-resfriamento é definido por:

$$\Delta T = T_{eq} - T \quad (2.6)$$

É ocasionalmente utilizado como uma alternativa para a supersaturação, ΔC , sendo as duas quantidades relacionadas através da inclinação da curva de solubilidade, dc_{eq}/dT , por:

$$\Delta C = (dC_{eq} / dT) \cdot \Delta T \quad (2.7)$$

Se a supersaturação da solução não for muito alta, a taxa de formação de novos cristais é desprezível. Esse estado de supersaturação é designado como metaestável, onde novos cristais são formados apenas em uma extensão limitada e os cristais, já presentes na solução, crescem. Se a supersaturação for futuramente aumentada, será atingida uma máxima supersaturação permissível que determinará o limite do estado metaestável. Quando esse limite é excedido, a taxa de nucleação aumenta rapidamente e o processo de cristalização se torna incontrolável (CONDOTTA, 2002).

2.4.2 Nucleação

A nucleação é a etapa que inicia o processo de cristalização, envolve o surgimento de cristais a partir de uma solução supersaturada. A nucleação pode ser considerada como um processo que determina o tamanho do produto cristalino e também exerce uma função substancial na determinação de um número de suas propriedades físicas e da pureza do cristal (NÝVLT, 1985).

Segundo Nývlt *et al.* (2001) os mecanismos da nucleação podem ser classificados como:

Nucleação Primária	{ Homogênea Heterogênea
Nucleação Secundária	{ Aparente (núcleos são introduzidos na solução) Contato (núcleos são gerados na fase sólida) Intermediária (interface cristal-solução)

A nucleação primária é caracterizada por mecanismos nos quais o nascimento dos cristais ocorre na ausência de cristais; se a solução é absolutamente pura (livres de partículas sólidas), a nucleação ocorre pelo mecanismo de nucleação homogênea, enquanto na presença de substâncias sólidas estranhas ao meio (pó, colóides e paredes do cristalizador), a nucleação ocorre de forma heterogênea (NÝVLT *et al.*, 2001). Se a nucleação se dá em uma suspensão cristalina, como é usual em equipamentos de cristalização, ela é denominada nucleação secundária. Parece provável que todas essas nucleações ocorram simultaneamente, mas a

nucleação secundária prevalece fortemente em cristalizadores, sendo que a nucleação homogênea torna-se importante somente em elevadas supersaturações, como é o caso da precipitação, e em soluções muito puras (NÝVLT *et al.*, 2001).

2.4.3 Crescimento dos cristais

De acordo com Nývlt *et al.* (2001) pode-se classificar as teorias de crescimento de cristais em dois tipos:

Tipo 1. Teorias que envolvem a forma final dos cristais – não contêm em seus fundamentos o fator tempo e resolvem a forma final dos cristais em função de parâmetros energéticos do sistema cristal-fase mãe. Estão inclusas neste grupo:

- a) Teoria das faces limitantes de Gibbs, Curie e Wulff – As faces cristalinas de crescimento rápido desaparecem gradualmente na forma final.
- b) Teoria atomística de Kossel e Stranski – permite calcular a forma cristalina de equilíbrio a partir de forças interatômicas conhecidas e da estrutura cristalina. Os novos íons são facilmente incorporados de posição de meio cristal das substâncias iônicas. Após o término do crescimento completo da face, uma nova partícula é incorporada no canto do cristal, onde o crescimento de um novo degrau se inicia.

Tipo 2. Teorias que envolvem a cinética de crescimento cristalino – tentam expressar o efeito da concentração, da temperatura e da pressão na velocidade de crescimento das faces cristalinas individuais. Podem ser relacionados:

- a) Modelo de difusão na superfície de Burton, Cabrera e Frank (Teoria BCF);
- b) Modelo de difusão do volume, BCF e sua modificação por Chernov;
- c) Teoria da camada de difusão;
- d) Teoria da nucleação bidimensional na superfície cristalina;
- e) Modelos da mecânica estatística;
- f) Teoria cinemática.

Para a engenharia química, o modelo de difusão de superfície BCF e, em particular a teoria da camada de difusão são considerados, por Nývlt, os mais importantes.

O crescimento dos cristais é um processo difusional, modificado pelo efeito das superfícies sólidas sobre as quais se produz o crescimento. As moléculas ou íons do soluto alcançam as faces de um cristal que está crescendo, mediante difusão através da fase líquida, aplicando-se a essa etapa o habitual coeficiente de transferência de massa. Uma vez que

chegam à superfície, as moléculas ou íons têm que ser incorporados pelo cristal e organizados dentro de sua rede espacial. A reação transcorre na superfície com uma velocidade finita, e o processo global consta de duas etapas em série. Tanto a etapa difusional como a interfacial não podem transcorrer se a solução não estiver supersaturada (BRITO, 2007).

2.4.4 Tamanho e forma dos cristais (hábito cristalino)

O tamanho e a forma de produtos cristalinos são importantes devido à sua utilização industrial. A propriedade mais marcante e determinante dos cristais de diferentes substâncias é a sua forma (hábito). A variedade de formas cristalinas encontradas pode ser explicada pelas diferentes condições energéticas no arranjo cristalino, levando a diferentes taxas de crescimento dos planos individuais (NÝVLT, 1985).

Segundo Mullin (1993), a morfologia de um cristal depende das taxas de crescimento para as diferentes faces cristalográficas. Algumas faces crescem mais rápido e apresentam um pequeno ou mesmo nenhum efeito sobre a forma de crescimento, já as faces que apresentam maiores influências são as que crescem a uma velocidade menor. O crescimento de uma determinada face é governado, por um lado, pela estrutura do cristal e pelos seus defeitos e, por outro, pelas condições empregadas durante o crescimento.

Essas variações na taxa de crescimento podem causar a formação de diferentes sistemas de deslocamento. O desenvolvimento mais rápido de certas faces em relação a outras promove a formação de cristais com diferentes hábitos cristalinos. A Figura 2.4.1 apresenta alguns dos hábitos para diferentes sistemas.

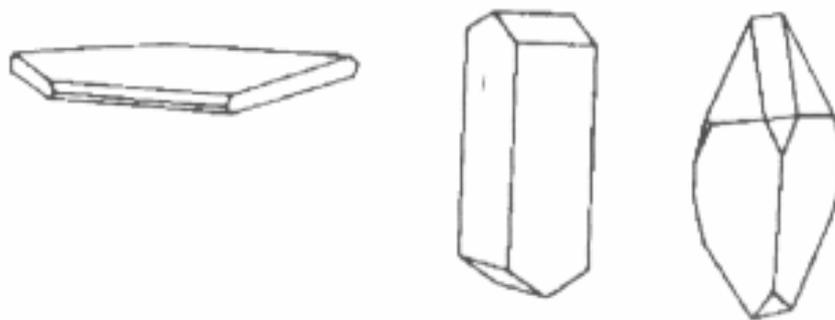
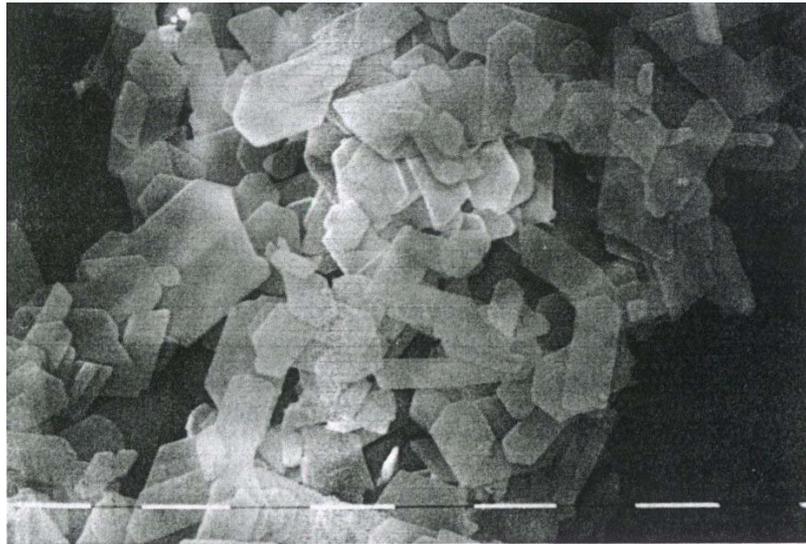


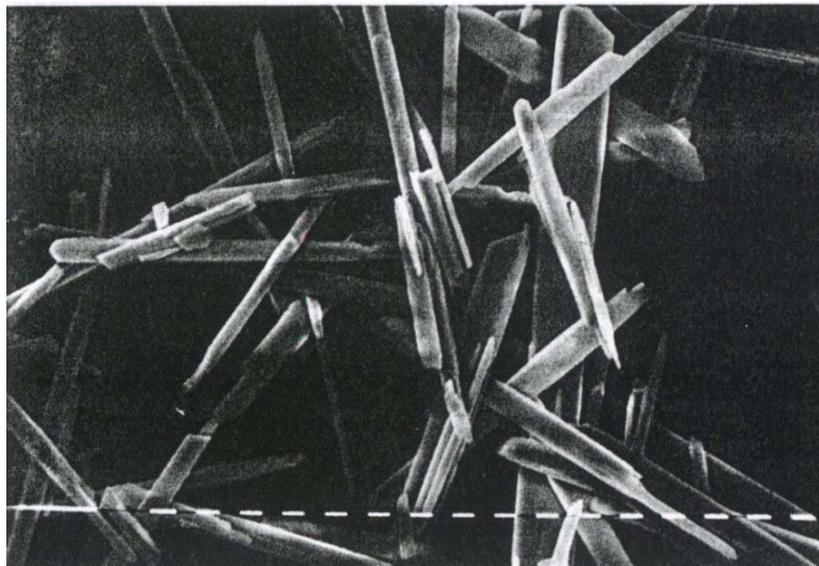
Figura 2.4.2 – Hábito cristalino (PAMPLIN, 1980 *apud* CONDOTTA, 2002).

Esse crescimento relativo pode ser alterado, e na maioria das vezes controlado, por um número de fatores. Cristalizações rápidas em soluções supersaturadas (como no caso da

precipitação) podem resultar na formação de cristais na forma de agulhas ou plaquetas (Figura 2.4.2); impurezas presentes na solução-mãe podem retardar o crescimento do cristal em certas direções; e a cristalização de uma solução de mesma composição em diferentes solventes geralmente resulta em uma mudança de hábito dos cristais formados. O grau de supersaturação ou super-resfriamento de uma solução ou ainda o estado de agitação desse sistema, frequentemente exerce uma considerável influência no hábito cristalino (MULLIN, 1993).



(a)



(b)

Figura 2.4.2 – (a) Cristais de $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na forma de plaquetas e (b) na forma de agulhas, em uma escala de divisão de valor igual a $10\mu\text{m}$ (SÖHNEL e GARSIDE, 1992).

A modificação do hábito cristalino é um fenômeno de máxima importância industrial. Certos hábitos cristalinos são indesejáveis comercialmente, pois podem produzir uma massa cristalina de aparência não adequada para fins comerciais, outros fazem com que o produto formado esteja mais propenso ao empedramento, ainda podem proporcionar um baixo escoamento dos cristais formados ou gerar dificuldades na manipulação ou empacotamento do material cristalino. Para fins comerciais, em sua maioria, uma forma granular ou prismática é usualmente desejada (MULLIN, 1993).

2.4.4.1 Aspectos físicos da precipitação

Um sólido precipitado é caracterizado, sobretudo, pelo tamanho e morfologia das suas partículas, que são determinadas pelos mecanismos e taxas relativas dos processos individuais (nucleação e crescimento) que ocorrem durante a precipitação, influenciando na reatividade do sólido, bem como nas suas propriedades mecânicas, ópticas e em solução (SÖHNEL e GARSIDE, 1992).

Assim o efeito de supersaturação relativa no tamanho da partícula pode ser explicado se considerarmos que os precipitados são formados por esses dois processos: por nucleação e por crescimento da partícula. O tamanho da partícula de um precipitado recentemente formado é determinado pelo mecanismo predominante.

Na nucleação, alguns íons, átomos ou moléculas (talvez tão pouco quanto quatro ou cinco) juntam-se para formar um sólido estável. Muitas vezes, esses núcleos são formados na superfície de contaminantes sólidos em suspensão como por exemplo, a poeira (nucleação heterogênea). A precipitação posterior então envolve uma competição entre a nucleação adicional e o crescimento dos núcleos existentes (crescimento da partícula). Se a nucleação predomina, o resultado é um precipitado contendo um grande número de pequenas partículas; se o crescimento predomina, um número pequeno de partículas grandes é produzido.

Acredita-se que a velocidade da nucleação aumente enormemente com a elevação da supersaturação relativa. Em contraste, a velocidade de crescimento melhora apenas moderadamente a uma supersaturação relativa elevada. Assim, quando um precipitado é formado sob uma supersaturação relativa elevada, a nucleação constitui o mecanismo de precipitação majoritário e um grande número de pequenas partículas é formado. Sob uma supersaturação relativa baixa, por outro lado a velocidade de crescimento das partículas tende a predominar e ocorre a deposição do sólido em partículas existentes, em detrimento a nucleação adicional (SKOOG *et al.*, 2006)

2.4.5 Aglomeração

Partículas pequenas em uma suspensão líquida têm uma tendência a se agrupar. Os termos aglomeração, agregação, coagulação e floculação vêm sendo aplicados nesta área, entretanto não há uma regra geral para se aplicar tais definições, utilizando-se de uma maneira geral, o termo aglomeração (MULLIN, 1993).

A aglomeração é o resultado da formação de blocos compostos por mais de uma partícula. Ela ocorre como resultado de um balanço de forças de atração e repulsão entre as partículas; se as forças de atração forem maiores que as de repulsão, as partículas aglomeram. De um modo geral, como a aglomeração se dá por pontos de contato, e como todas as superfícies são rugosas em escala microscópica, mesmo que aparentemente lisas em escala macroscópica quanto menor for a partícula, maior a tendência à aglomeração (CONDOTTA, 2002).

A aglomeração apresenta dois mecanismos principais: a aglomeração pericinetica e a aglomeração ortocinetica. Na primeira, a colisão ocorre em função do movimento Browniano das partículas pequenas. No segundo mecanismo, a colisão se dá em função dos gradientes de velocidade do fluido.

Os dois mecanismos podem ocorrer no processo de precipitação, mas em cristalizadores agitados a aglomeração ortocinetica é predominante (MULLIN, 1993).

O processo de precipitação resulta na formação de um sistema sólido-líquido dispersado. A cinética de estabilidade desse sistema dispersado é importante para se determinar a variação do grau de dispersão com o tempo. A dispersão original pode modificar-se como o resultado da formação de grandes entidades por aglomeração das partículas (SÖHNEI e GARSIDE, 1992).

2.4.6 Empedramento dos cristais

Uma das propriedades mais problemáticas dos materiais cristalinos é a sua tendência de se unir ou empedrar durante o armazenamento. A maioria dos produtos cristalinos é requerida na forma que permita um bom escoamento. Sua manipulação e empacotamento dentre muitas outras operações são facilitadas se a massa cristalina se mantiver nesse estado particular.

As causas do empedramento podem variar muito de um material para outro; o tamanho do cristal formado, a forma cristalina, o conteúdo de umidade, a pressão na qual o produto foi armazenado, as variações de temperatura e de umidade durante o tempo de

armazenamento e o próprio tempo de armazenamento, são variáveis que podem contribuir para compactar um produto cristalino granular em um sólido amontoado.

Geralmente o empedramento é causado quando as superfícies cristalinas vão ficando úmidas: a solução que se formou (devido à umidade) se evapora posteriormente, unindo os cristais adjacentes como se fosse um “cimento”, causando dessa maneira o empedramento. As superfícies cristalinas podem ficar úmidas por vários motivos; O produto pode conter traços de solvente que foram deixados para trás devido a uma etapa ineficiente de secagem ou a umidade pode vir de fontes externas.

Sais cristalinos comerciais frequentemente exibem higroscopia em atmosferas com baixa umidade quando comparados a sais puros, geralmente a presença de traços de impurezas no produto é a causa desse problema.

Assim várias medidas de precaução podem ser tomadas no intuito de se minimizar a possibilidade de empedramento. Um método óbvio seria a realização do empacotamento somente de cristais perfeitamente secos em uma atmosfera sem umidade, e ainda armazenados em recipientes sob pressão para prevenir qualquer variação de pressão durante o armazenamento. Essas são condições desejáveis, que entretanto, não podem sempre ser obtidas. O empedramento também pode ser minimizado pela redução do número de contatos entre os cristais, e isto pode ser obtido produzindo-se cristais granulares de tamanhos uniformes. Nesse sentido, os cristais deveriam ser tão largos quanto possível, pois pequenos cristais contêm uma maior área de superfície que ficará exposta à atmosfera. Entretanto, o tamanho é de importância secundária, sendo a forma e a uniformidade dos cristais obtidos, sem dúvida, fatores mais importantes para o empedramento. Assim, controlar os fatores que envolvem a precipitação ajuda a produzir cristais de tamanho uniforme (MULLIN, 1993).

2.4.7 Soluções coloidais

A formação de uma solução coloidal ocorre quando um precipitado (que apresenta uma solubilidade muito baixa) é formado durante uma supersaturação relativa muito elevada.

As partículas coloidais individuais são tão pequenas (10^{-7} a 10^{-4} cm de diâmetro) que não podem ser retidas em filtros comuns. Além disso, o movimento browniano impede sua decantação. Entretanto, pode-se coagular ou aglomerar as partículas individuais da maioria dos colóides para gerar uma massa amorfa filtrável que irá se decantar. Os colóides são mais bem precipitados a partir de soluções aquecidas e agitadas contendo eletrólito suficiente para garantir a coagulação (SKOOG *et al.*, 2006).

2.4.8 Formação de incrustações

A incrustação é um sério problema em muitas operações de cristalização, sendo caracterizada por uma deposição de depósitos cristalinos nas faces internas dos cristalizadores (MULLIN, 1993).

As incrustações formadas em superfícies de trocadores de calor ou em nível líquido podem retardar seriamente a produção de um cristizador, diminuindo a transferência de calor e portanto aumentando o tempo necessário da batelada, porém normalmente, pode-se removê-las no início de uma nova batelada. Uma situação pior ocorre com cristalizadores contínuos nos quais as incrustações devem ser removidas de tempos em tempos causando uma parada na operação (MULLIN, 1993; NÝVLT *et al.*, 2001).

A causa mais comum da formação de incrustações em cristalizadores está relacionada com a criação da zona de alta supersaturação nas zonas vizinhas à superfície de metal, e dos tubos trocadores de calor encamisados. A incrustação ainda pode começar com fragmentos cristalinos que foram deixados para trás após uma limpeza insuficiente do reator de cristalização, ou embutido nas rachas e fendas de superfícies deterioradas, as quais entram em contato com a solução supersaturada. Por esse motivo a incrustação nunca deve ser raspada das superfícies do cristizador, pois arranhões minúsculos podem se tornar facilmente em indesejáveis “centros de sementeira”. A dissolução ou aquecimento são os únicos métodos seguros de remoção dos cristais depositados por incrustação (MULLIN, 1993).

De acordo com Nývlt *et al.* (2001) a formação de incrustações pode em muitos casos ser evitada, ou pelo menos retardada, escolhendo-se melhores condições hidrodinâmicas no cristizador, por exemplo, aumentando a vazão do trocador de calor ou mudando a tensão superficial da solução pelo uso de tensoativos.

2.5 Processo de separação do ácido clavulânico

Os artigos encontrados em literatura descrevem que o processo de separação e purificação do AC a partir do meio de fermentação, envolve uma série de etapas como filtração e centrifugação para a separação de células e técnicas de extração, seguidas ou não por uma etapa de adsorção, para posterior purificação do antibiótico. Porém, de acordo com Bersanetti *et al.* (2004), o AC apresenta velocidades de degradação elevadas em temperaturas acima de 30° C, em condições alcalinas $\text{pH} > 7,5$ e em condições ácidas $\text{pH} < 4,5$. Isso leva a

baixos rendimentos durante os processos de purificação, quando comparados a outros compostos β -lactâmicos (MAYER *et al.*, 1997).

Nabais e Cardoso (1995) mencionaram que a separação convencional do processo de benzilpenicilina obtido de caldos fermentados inclui usualmente os seguintes estágios:

1. tratamento do caldo de fermentação pela adição de flocculantes;
2. separação sólido/líquido por filtros rotativos a vácuo;
3. adição de surfactantes e extração do antibiótico com o solvente;
4. purificação, reextração da solução aquosa, concentração e liofilização do antibiótico

O processo de separação do ácido clavulânico é similar ao da benzilpenicilina com a diferença, que devido à natureza do microrganismo usa-se na separação sólido/líquido um auxiliar de filtração que é adicionado ao caldo de fermentação e os filtros rotativos a vácuo são pré-resfriados.

Videira e Aires-Barros (1994) citaram que o ácido clavulânico é produzido industrialmente por fermentação, isolado e purificado do meio de fermentação passando por vários estágios. O primeiro estágio envolve a clarificação do meio por filtração ou centrifugação seguida por adsorção ou extração líquido-líquido por solvente orgânico, normalmente butanol. Mais adiante a purificação é alcançada por cromatografia de troca iônica e que devido a natureza instável do ácido clavulânico, esse é isolado como sal de potássio ou sódio.

Butterworth (1984) descreveu dois métodos de purificação do AC a partir de caldos de fermentação. No primeiro método, o caldo tem seu pH reduzido e a extração do AC é feita com solvente orgânico. A fase orgânica é re-extraída com solução de NaOH em pH 7. O extrato obtido é passado por uma resina Amberlite XAD-4 para desmineralizar o meio, sendo então obtido o clavulanato de sódio. No segundo método, o caldo é passado por uma resina de troca aniônica e eluído com solução salina, seguindo-se as etapas de adsorção em resina XAD-4 e Zerolite SRA 62. Segundo o autor, o meio é desmineralizado em resina XAD-4. O produto final apresenta alto teor de pureza e é obtido por liofilização ou por cristalização na solução aquosa.

Mayer *et al.* (1996) estudaram o uso de resina Amberlite XAD para a purificação do AC a partir do caldo fermentado. Foi observada uma fraca interação entre o ácido clavulânico e a superfície apolar das resinas. Estas resinas foram testadas em combinação com sais de amônio quaternário com diferentes polaridades e formando pares iônicos com o grupo ácido da molécula de AC. Os autores concluíram que a cromatografia com formação de par iônico é uma alternativa eficiente na purificação do AC e que a resina Amberlite XAD-4 com

sais de amônio quaternário é mais eficiente em relação à IRA 400.

Barboza *et al.* (2002) realizaram experimentos de adsorção do ácido clavulânico proveniente do caldo de fermentação utilizando uma resina de troca-iônica Amberlite IRA 400. Os experimentos foram conduzidos em dois pHs (6,2 e 4,0) e a temperaturas de 10 e 20 °C durante a adsorção e de 30°C durante desorção. Os autores desenvolveram um modelo matemático do processo de separação do ácido clavulânico, incluindo a cinética de adsorção, os dados de equilíbrio e as limitações impostas pela transferência de massa. O efeito do pH na fase de equilíbrio da adsorção foi examinado. Foi concluído que uma redução do pH produz um aumento na capacidade de adsorção e na afinidade de adsorção. A troca iônica do ácido clavulânico na resina Amberlite IRA 400 é favorecida pela redução da temperatura, indicando que a adsorção do ácido clavulânico na resina é exotérmica. Os autores concluíram que a difusividade efetiva é dependente do pH, da temperatura e das condições iniciais do ácido clavulânico. As melhores condições observadas durante o processo de adsorção foram a pH 6,2 e a 10°C, uma vez que o ácido clavulânico é mais estável nesse pH, e sua adsorção é mais favorecida nessa temperatura. Pouca degradação do ácido clavulânico foi observada justificando o emprego desse processo para a purificação do ácido clavulânico.

Brites *et al.* (2006) compararam dois diferentes métodos de extração do ácido clavulânico do caldo de fermentação, a extração por solvente orgânico, e por sistema de duas fases aquosas (SDFA). Na extração por solvente orgânico, vários solventes foram estudados, como o acetato de etila, o butil acetato, a metil isobutil cetona, o n-butanol e o 2-butanol em diferentes pHs (de 2 a 5). Já os sistemas de duas fases aquosas eram compostos por PEGs de pesos moleculares diferentes (6000, 4000, 1000, 400 e 600), fosfato em dois pHs (6,0 e 7,0). Os dois métodos foram comparados utilizando-se o coeficiente de partição, fator de concentração e de purificação e rendimento. Os melhores resultados para o solvente orgânico foram a pH 2, pois a constante de ionização do AC é de 2,25. O melhor solvente em termos de coeficiente de partição o n-butanol (1,37), seguido pelo 2-butanol (0,91) e acetato de etila (0,58). Para os SDFA o melhor coeficiente de partição ficou com o PEG 600 (muito alto) e 6000 (15,5). Já em relação aos fatores de purificação e concentração os melhores resultados foram para o n-butanol a pH 2, 5,40 e 2,61 respectivamente.

De acordo com a literatura disponível há muitas maneiras de se isolar e purificar o ácido clavulânico, entretanto a sua elevada instabilidade em soluções aquosas faz diminuir o seu rendimento durante essas etapas de purificação. Por esse motivo, muitas patentes descreveram processos de obtenção e purificação do ácido clavulânico que envolvem reações

químicas, como a esterificação e a precipitação, no intuito de se obter o clavulanato de potássio com um maior rendimento. Essas se encontram descritas a seguir:

As patentes Box (1978), Cole *et al.* (1978) e Box (1980), descreveram diferentes métodos de extração do AC do caldo de fermentação. Geralmente o processo inicia-se com a remoção das células por filtração ou centrifugação. Em seguida é empregada uma extração com solvente orgânico. Vários solventes orgânicos são sugeridos, como o acetato de etila, n-butanol, metilisobutilcetona, acetato de n-butila, entre outros. Depois da separação das fases, o AC presente na fase orgânica é re-extraído com uma nova fase aquosa onde podem ser utilizados, tampão fosfato, solução de bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio ou apenas água, mantendo-se o pH próximo de 7. Esse extrato aquoso, então, é concentrado à pressão reduzida e liofilizado, obtendo-se um precipitado amorfo e de coloração marrom. Para uma posterior purificação pode-se utilizar resina de troca iônica do tipo Amberlite IR4B ou Zerolite FFIF, até a saturação da resina, a qual deve ser lavada com água e com solução de NaCl para eluir o AC, ou ainda a conversão em um éster, através de uma reação de esterificação, podendo ser purificado em seguida por cromatografia de permeação em gel Sephadex LH20, utilizando-se como eluentes uma mistura de ciclohexano e clorofórmio (1:1) e por cromatografia em sílica gel utilizando como eluente ciclohexano e acetato de etila (1:1). O éster obtido é convertido em clavulanato de sódio ou potássio através de uma reação de hidrogenólise utilizando-se um catalisador.

Fleming *et al.* (1979) e Puentes *et al.* (1989) sugeriram que a purificação do AC deve ser feita pela sua conversão em clavulanato de lítio com subsequente precipitação, a qual geralmente ocorre na forma cristalina. Essa precipitação é possível devido à grande afinidade dos íons clavulanato pelos cátions lítio, juntamente com insignificante co-precipitação de impurezas. Diminuindo-se a temperatura para cerca de 0 a 5°C, diminui-se também a solubilidade do clavulanato, o qual alcançará uma máxima precipitação em baixas temperaturas. A adição de um anti-solvente como acetona, metanol, etanol, contribuem para a precipitação, pois diminuem a solubilidade do sal de clavulanato na solução.

As patentes Cook (1997), Kim *et al.* (1995) e Cardoso (1998) descreveram a precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio ou de sódio, como uma das etapas no processo de purificação do AC presente no meio de fermentação. Uma etapa de extração com solvente orgânico é realizada e a fase orgânica concentrada é submetida a uma reação de precipitação, na qual ocorre a precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio (ou sódio) com a formação do sal de AC (clavulanato de potássio ou de sódio).

Contudo a reação direta do AC com o 2-etilexanoato é muito instável, ocasionando às vezes, a formação de um óleo (próprio AC na sua forma de ácido) e não do seu sal que é o produto desejado. Nesse sentido a passagem por intermediários estáveis visa diminuir essa instabilidade e possibilitar que seja obtido com maior facilidade um sal de amina do AC, que depois é convertido a clavulanato de potássio geralmente com a utilização do 2-etilexanoato de potássio. Aminas primárias, secundárias e terciárias são descritas por um grande número de patentes, tais como Cook *et al.* (1987), Weber (1994), Yang *et al.* (1994), Cook e Wilkins (1995) Butterly *et al.* (1997), Capuder (2001) e Butterly *et al.* (2002) para a formação desse intermediário estável.

Geralmente o ácido clavulânico é extraído do caldo de fermentação utilizando-se um solvente orgânico, e posteriormente é adicionado ao solvente sob agitação a amina terciária butilamina, ocorrendo a formação do sal de amina do AC. Os cristais obtidos são então filtrados, lavados e secos. Após secos, esses são dissolvidos em isopropanol e então é adicionado o 2-etilexanoato de potássio para a precipitação do clavulanato de potássio, com uma pureza muito elevada.

Entretanto, Kim *et al.* (1995) descreveram que em geral a maioria das aminas são inadequadas para manufatura do sal de clavulanato, ou usadas como intermediários pois os sais de aminas são tóxicos ou higroscópicos, e que ainda alguns necessitam de grandes quantidades de solvente para que ocorra a sua solubilização para posterior reação. Ainda ressaltam que no caso da amina terciária butilamina (muito utilizada nas demais patentes) essa é solúvel em todas as proporções de água, sendo difícil de ser recuperada da água de descarte. Além da desvantagem econômica há a possibilidade de contaminação dos fluídos de descarte da indústria, e de intoxicação dos funcionários.

A revisão bibliográfica mostrou que devido à sua elevada instabilidade e velocidade de degradação, as técnicas cromatográficas tradicionalmente empregadas para purificação do AC presente no caldo de fermentação estão associadas a baixos rendimentos e a elevados gastos com energia, pois geralmente envolvem a liofilização ou a evaporação de solventes. Nesse sentido novos métodos, como as reações de precipitação do AC diretamente ou através da passagem por intermediários estáveis (aminas) vêm sendo apresentados pelas patentes na tentativa de se obter o AC com uma pureza elevada ao final do processo, diminuindo os custos e possibilitando um incremento no rendimento. Entretanto até o momento não há trabalhos publicados na literatura sobre a precipitação do ácido clavulânico.

Apenas patentes que apresentam informações pouco específicas foram encontradas. Neste contexto, o presente trabalho visou contribuir para a implementação de procedimentos relacionados aos processos de reação de precipitação direta (utilizando-se o 2-etilexanoato de potássio), e indireta (com a passagem por um intermediário estável, empregando-se para tal a t-octilamina), para o ácido clavulânico presente no caldo de fermentação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem do AC

Foi utilizado o AC proveniente dos caldos de fermentação com *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Os caldos foram cultivados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da UFSCar por outros alunos. O meio de cultura era composto essencialmente por glicerol e farinha de soja Prosan (produzida por The Solae Company, Barueri, SP, Brasil), suplementado por óleo de soja e sais minerais, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 (ORTIZ *et al.*, 2007).

Ao final da fermentação, o pH do caldo de fermentação foi ajustado para 6,2 com ácido fosfórico 18N, mantido refrigerado entre 11°C e 20°C e microfiltrado através da membrana tubular de Polisulfona com poros de 0,2µm de diâmetro - Amersham Biosciences (CFP-2-E-8A). O permeado dessa etapa foi utilizado na etapa posterior de ultrafiltração (Membranas de Polisulfona com poros de 3kDa (UFP-3-E-3MA) e 50 kDa (UFP-50-E-3MA), fornecidas por Amersham Biosciences), (SILVA *et al.*, 2007). Essa etapa também foi realizada no Laboratório de Bioquímica do DEQ-UFSCar por outros alunos.

Também foi utilizado o AC presente no medicamento Clavulin® (comprimidos de 625 e de 875mg constituídos por 500 e 750mg de amoxicilina, respectivamente, e 125 mg de clavulanato de potássio, produzido por Smithkline Beecham Laboratórios Ltda, RJ, Brasil) e da amostra de clavulanato de potássio/celulose fornecida por Gist Brocades, hoje DSM-Anti Infectives. Essa amostra já apresentava degradação do clavulanato de potássio presente, (em torno de 13%), provavelmente devido ao longo tempo de estocagem.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Determinação da concentração de ácido clavulânico

A concentração de ácido clavulânico foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pelo método proposto por Foulstone e Reading (1982), com reação com imidazol. Para a realização da análise cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa C-18 µ-Bondapack (3.9 x 300mm). A coluna foi mantida a 28°C, com uma vazão de 2,5mL/min. Como eluente foi utilizado tampão 0,1M (KH_2PO_4) com 6% de metanol a pH 3,2 ajustado com H_3PO_4 . A absorção foi monitorada em 311nm.

Os resultados foram obtidos utilizando-se uma curva de calibração construída a partir de padrão de ácido clavulânico, no caso o produto farmacêutico Clavulin®.

A Figura 3.1 mostra o esquema de reação do AC com o imidazol.

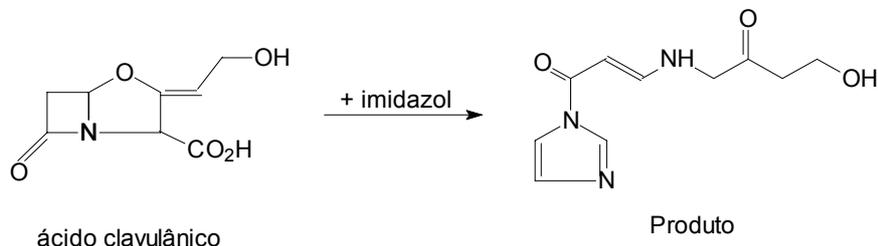


Figura 3.2.1 – Esquema de reação do AC com imidazol

No procedimento de derivatização do AC, o imidazol ataca o grupo carbonila do anel β -lactâmico quebrando a ligação C-N e formando uma nova ligação entre o imidazol e o carbono da carbonila. A quebra do anel β -lactâmico também leva a abertura do anel oxazolidina com conseqüente descarboxilação originando o produto da Figura 3.1. O produto dessa reação é mais estável que o AC e sua formação é diretamente proporcional à concentração de AC presente na reação, o composto apresenta máxima absorção no ultra violeta (UV) em 311nm.

3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para as análises qualitativas em CCD foram usadas cromatofolhas de Sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador de ultravioleta F₂₅₄ 20 X 20 cm (Merck). Foram usados os seguintes reagentes como reveladores:

1. solução de 0,2 g de ninidrina (Aldrich) em 100mL de etanol P.A., aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120°C, para a identificação qualitativa de aminoácidos e amins primárias;
2. solução de 20% de ácido fosfomolíbdico (Aldrich) em etanol P.A., aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120°C, para a identificação qualitativa de substâncias redutoras e do ácido clavulânico;
3. solução do reagente de Dragendorff. A solução reserva é preparada misturando-se volumes iguais das soluções (a) e (b) descritas abaixo:
 - a. 0,85g de nitrato básico de bismuto adicionado a 10mL de ácido acético glacial e a 40mL de água destilada.
 - b. 8,0g de KI adicionado a 20mL de água destilada.

Para pulverização era adicionado 1mL da solução reserva a 2mL de ácido acético glacial e a 10mL de água destilada.

Utilizado para identificação qualitativa de compostos nitrogenados.

Os resultados das análises por CCD são utilizados na seleção das técnicas cromatográficas mais adequadas que podem ser utilizadas na separação do ácido clavulânico do caldo de fermentação. É um método de monitoramento da substância de interesse que possui a vantagem de poder ser executado em poucos minutos sem a necessidade de utilização de aparelhos que necessitam de um tempo bem maior para se verificar os resultados, como por exemplo, a análise por RMN.

3.2.3 Cromatografia em coluna pré-empacotada

O intuito dessa cromatografia é promover uma melhor purificação do AC proveniente do caldo de fermentação, do medicamento ou da amostra clavulanato/celulose, retirando as impurezas presentes que possam interferir na precipitação do AC em etapa posterior.

Para a realização dessa cromatografia utilizou-se a coluna pré-empacotada Sep-Pak^R (Waters) com fase normal – sílica gel derivatizada com grupos diol.

3.2.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Foi utilizado um aparelho Bruker DRX (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 100,10 MHz na frequência do carbono (¹³C), instalado no Departamento de Química (DQ) na UFSCar.

As amostras foram preparadas utilizando-se solventes deuterados.

A técnica de RMN é utilizada para determinar a estrutura dos compostos isolados, permitindo a contagem de átomos de carbono e hidrogênio, além de suas correlações nos espectros bidimensionais. Uma vantagem dessa técnica, é que através da análise dos espectros, pode-se verificar se a substância de interesse encontra-se com a pureza desejada, permitindo assim avaliar a eficiência do processo de purificação empregado.

A análise e interpretação dos espectros de RMN, para a construção das tabelas de deslocamento químico e as correlações observadas, necessárias para a caracterização da substância de interesse, foram realizadas pela pós-doutoranda Jaine H. H. L. de Oliveira.

Essas se encontram disponíveis, juntamente com os espectros de RMN obtidos, no Apêndice C.

3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com a finalidade de se verificar a morfologia dos cristais de clavulanato de potássio.

O equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de varredura, modelo XL30FEG da marca Philips, com sistema de microanálise ISIS da Oxford, e BSE (Backscattered electrons), instalado no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) na UFSCar. O sistema BSE apresenta a imagem por diferença de peso atômico, enquanto o sistema comum (SE- Secondary electrons) apresenta a imagem topográfica da amostra. A vantagem da utilização do sistema BSE consiste em se poder melhor observar cristais que contenham átomos de peso molecular maior do que o carbono, principalmente quando esses cristais são muito pequenos e particularmente finos, exatamente como os obtidos para o clavulanato de potássio. Os cristais que possuem átomos maiores aparecem na amostra observada com uma coloração branca cintilante, facilitando dessa forma sua identificação na amostra. Esse método é apropriado para o clavulanato de potássio devido à presença de um átomo de potássio em sua molécula.

3.3 Equipamentos e materiais

- a) Reator de vidro encamisado com 12 cm de altura, 5 cm de diâmetro e volume útil de 50 mL;
- b) Agitador de vidro com pás do tipo hélice com dimensão de 2 cm;
- c) Banho Termostático Polystat da marca Cole Parmer (mod. 12101-20 – série 709316);
- d) Sistema de agitação da marca Applikon (ADI 1032);
- e) Evaporador rotativo a vácuo da marca TECNAL (TE -211) conectado a bomba Scrubber (TE-152);
- f) Banho Termostático da marca Nova Ética (mod. 521/2D – série 07141/02);
- g) Sistema de centrifugação a vácuo Savant (mod. Speedvac SC 200);
- h) Balança analítica digital da marca Mettler Toledo (XS204) com precisão de 4 casas decimais;
- i) pHmetro da marca Qualxtron, mod. 8010;

- j) Sistema de filtração a vácuo da Wheaton;
- k) Papel de filtro;
- l) Membranas Millipore de 0,45 μ m
- m) Kitassato de 1 L;
- n) Bomba a vácuo da marca Waters (mod. DOA-V152-AA)
- o) Pipeta Pasteur (2 mL);
- p) Cronômetro digital da marca Dumont (mod. Thunder);
- q) Provetas graduadas de vidro de 10 e 50 mL;
- r) Solventes Synth (P.A.): acetato de etila, n-butanol, metil isobutilcetona, metanol, diclorometano, éter, clorofórmio, acetona;
- s) Solventes J. T. Baker (HPLC): acetonitrila e isopropanol.

Os ensaios de precipitação foram realizados no Laboratório de Cristalização do DEQ-UFSCar.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Durante a realização da parte experimental desta tese foi necessário atingir os objetivos específicos, para que as respostas combinadas destes pudessem então possibilitar a precipitação do AC em clavulanato de potássio com pureza e rendimento elevados. Assim visando facilitar a compreensão dos experimentos realizados, estes foram agrupados dentre os objetivos específicos os quais se pretendia atingir.

4.1 Caracterização e seleção de método para monitoramento do AC

A caracterização e monitoramento do AC, através das técnicas de RMN e de CCD, foram sem dúvida essenciais, pois através dessas técnicas foi possível detectar a presença do AC na amostra analisada, mesmo frente às outras impurezas presentes e ainda permitiu avaliar o desempenho da técnica de purificação empregada. O monitoramento, como a própria palavra já diz, constituiu em “monitorar”, ou seja, detectar a presença do AC durante as várias etapas de purificação para possibilitar a sua precipitação em clavulanato de potássio com elevada pureza, necessária para permitir sua direta utilização no medicamento.

4.1.1 Estudos em cromatografia em camada delgada (CCD)

Inicialmente foi realizado um estudo para se verificar o comportamento da amostra de clavulanato/celulose e do medicamento Clavulin®, em CCD, em diferentes misturas de eluentes, com a finalidade de se escolher o melhor eluente para o clavulanato de potássio em sílica gel, e também o revelador apropriado para detecção do mesmo, levando-se em conta que a mostra clavulanato/celulose já apresentava produtos da degradação do clavulanato de potássio.

Como eluentes foram utilizadas as seguintes misturas: diclorometano/metanol (8:2) e (6:4); acetato de etila/metanol (7:3); acetato de etila/acetonitrila (7:3) e (1:1), acetona/acetonitrila (1:1) e acetonitrila/metanol (8:2) e (6:4).

Na CCD, as substâncias presentes nas amostras são separadas através da mistura de eluentes, e migram sobre a placa por capilaridade.

Como reveladores foram testados o ácido fosfomolibdico, a ninhidrina e o reagente de Dragendorff. Antes de serem borrifadas com um dos reagentes, as placas de CCD

foram inspecionadas sob luz UV em 254nm para verificar se havia alguma substância que revelaria sob a luz UV neste comprimento de onda.

4.1.2 Estudos em coluna pré-empacotada (Sep Pak)

Foi testada uma fase estacionária para a separação do clavulanato de potássio da amostra clavulanato/celulose. Foram medidos 63,7mg de AC proveniente da amostra clavulanato/celulose, e submetidos a uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep Pak de 5g de sílica gel derivatizada com grupos diol. Como eluente foi realizado um gradiente de metanol em acetonitrila (acetonitrila 100%, acetonitrila/metanol (9:1, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7) e metanol 100%). Foram coletadas 26 frações que foram evaporadas em um sistema de centrifugação a vácuo Savant (Speedvac). Foram realizados testes em CCD e o clavulanato se concentrou na fração 8. Após evaporação do solvente foi obtido o espectro de RMN-¹H para o ácido clavulânico, utilizando como solvente metanol deuterado (MeOH-d₄).

4.2 Desenvolvimento de método para preparação do padrão de AC puro a partir do Clavulin®

Era necessário partir de um padrão de AC para que algumas técnicas de purificação pudessem ser corretamente avaliadas. O AC disponível para venda, na forma de clavulanato de potássio (Sigma), possuía um preço muito elevado, cerca de US\$ 134 para cada 100mg, e a quantidade de amostra doada pela DMS-Anti Infectives (clavulato/celulose), poderia não ser suficiente para realização dos ensaios de precipitação, uma vez que não sabíamos ainda a quantidade exata que seria utilizada, inviabilizando assim essas alternativas. Partir do AC presente no caldo de fermentação, não é tão simples, pois muitas vezes, os meios de fermentação disponíveis, cultivados por outros alunos do DEQ-UFSCar, variavam na sua composição, pois nestes ensaios de fermentação era comum serem testadas substâncias diferentes, que pudessem promover um aumento na produção de AC. Assim trabalhar com diferentes caldos de fermentação era correr o risco de encontrar problemas na reprodutibilidade de resultados. Por esse motivo, os estudos com extração de solventes e adsorção em resina e posteriormente os de precipitação foram realizados para o clavulanato presente no medicamento Clavulin®, sendo aplicados os melhores resultados obtidos para o caldo de fermentação.

4.2.1 Estudos para extração do ácido clavulânico

O objetivo deste experimento era separar a amoxicilina presente no medicamento, para possibilitar a posterior utilização do AC puro.

Assim, um comprimido de Clavulin® (875mg) foi triturado, dissolvido em 20mL de água milli-Q e filtrado a vácuo em membrana de 0,45µm. Durante a filtração houve formação de um gel presente no comprimido, o qual dificultou a filtração, entupindo os poros da membrana, causando perda de material. O filtrado obtido foi acidificado com H₂SO₄ até pH 2 e foi realizada uma extração com solvente, no caso o n-butanol (150mL). A diminuição do pH até o valor de 2 é necessária para que haja a migração do AC presente na fase aquosa para a fase orgânica, pois a constante de ionização para o AC é de 2,25 (BRITES *et al.*, 2005).

O n-butanol foi escolhido por apresentar um maior rendimento (41,66%) e coeficiente de partição (K_p 1,37), dentre os solventes estudados para o caldo de fermentação por Brites *et al.* (2005). A fração aquosa foi descartada e a fração orgânica foi re-extraída com tampão fosfato pH 6,5 para retirada do clavulanato da fração orgânica e então aplicá-lo em resina de adsorção Amberlite XAD-4 (Rohm & Haas) na qual era esperado que ocorresse a adsorção da amoxicilina e eluição do clavulanato utilizando H₂O, como eluente.

Para monitorar a presença de clavulanato e da amoxicilina em cada etapa deste procedimento, foram realizadas placas de CCD, como reveladores o ácido fosfomolibdico e a ninhidrina.

As frações analisadas foram nomeadas da seguinte maneira:

Fração 1: material insolúvel em água descartado durante a filtração.

Fração 2: fase aquosa de descarte após extração com n-butanol.

Fração 3: fase aquosa de re-extração.

Fração 4: fração coletada após a passagem em coluna.

Fração 5: lavagem da coluna.

4.2.2 Extração do ácido clavulânico em diferentes solventes

Esta análise foi realizada com o objetivo de se verificar dentre os solventes estudados, qual seria o melhor solvente para se fazer a extração do AC visando a sua seletividade frente a outras substâncias presentes no meio, e que também proporcionasse um bom rendimento. No que concerne à seletividade, o trabalho realizado por Brites *et al.* (2005) considerou como impurezas apenas os contaminantes observados na luz ultra violeta (UV) e

apenas em um único comprimento de onda de 280nm. Considera-se que esta técnica não seja tão eficiente para se fazer tal avaliação, outras técnicas tais como RMN associados a EM (espectrometria de massas) são mais adequadas para essa finalidade. Assim, foram incluídos alguns solventes já anteriormente avaliados, como n-butanol, acetato de etila e metil-isobutilcetona, juntamente com alguns solventes ainda não testados, como o diclorometano, clorofórmio e éter.

Para avaliar a seletividade dos solventes estudados, considerou-se a amoxicilina presente no comprimido como a única “impureza”. Uma vez que esta se encontrava em quantidade 6 vezes superior a de AC no comprimido, e partindo da idéia de que a amoxicilina também é um β -lactâmico e portanto sua molécula apresenta algumas propriedades que se assemelham com a do AC, tornando a separação de ambas um processo não tão simples, um solvente que apresentasse seletividade do AC frente a amoxicilina teria maiores chances de ser também adequado para ser utilizado no caldo de fermentação, no qual estão presentes outras inúmeras substâncias além do AC.

Para cada extração realizada para os diferentes solventes, foi utilizado um comprimido de Clavulin® (875mg).

O comprimido triturado foi dissolvido em 20mL de água milli-Q e filtrado a vácuo em membrana de 0,45 μ m. Não houve problemas na filtração, pois se observou que a formação do gel era evitada se a filtração ocorresse logo em seguida à adição e mistura da água com o comprimido triturado. Uma espera nesta etapa foi o que levou a formação de um gel que causou o entupimento da membrana, gerando perdas do material (conforme citado anteriormente).

A seguir o filtrado foi acidificado até pH 2 e colocado em contato com o solvente para a extração. A re-extração ocorreu com tampão fosfato (pH 6,5). Amostras foram coletadas durante o processo para análise em CLAE.

Foram analisadas por CLAE alíquotas das fases orgânicas evaporadas previamente em Speedvac.

Para o n-butanol e acetato de etila, foram realizados experimentos em duplicata. Para o acetato de etila, no 2º experimento, a re-extração foi feita apenas com H₂O, para verificar se a ausência de sal na re-extração afetaria o rendimento. Foram calculados os coeficientes de partição (K_p), o rendimento (Y) e o fator de purificação (FP) para os sistemas estudados.

O coeficiente de partição pode ser representado pela Equação 4.1:

$$Kp = \frac{C_{FO}}{C_{FA}} \quad (4.1)$$

C_{FO} é a concentração do composto na fase orgânica e C_{FA} é a concentração do composto na fase aquosa. Fazendo um balanço de massa para as etapas de extração e re-extração e admitindo como hipótese verdadeira que a concentração do composto na fase orgânica após a re-extração é nula, podemos obter por substituição a Equação 4.2:

$$\frac{C_{FA2}}{C_{FA1}} = Kp \cdot \frac{V_{FO1}}{V_{FA2}} \quad (4.2)$$

V_{FO1} é o volume da fase orgânica e V_{FA2} é o volume da segunda fase aquosa (re-extração), C_{FA1} é a concentração do soluto na primeira fase aquosa e C_{FA2} é a concentração do soluto na segunda fase aquosa. Onde o Kp pode ser estimado por regressão linear. A demonstração do balanço de massa e das equações encontram-se no trabalho realizado por Brites *et al.* (2005).

As equações para o rendimento (Y) e fator de purificação (FP) seguem abaixo respectivamente por Equação 4.3 e Equação 4.4:

$$Y = \frac{V \cdot C}{V_0 \cdot C_0} \quad (4.3)$$

$$FP = \frac{C \cdot C_{T0}}{C_0 \cdot C_T} \quad (4.4)$$

Em que V , e V_0 são os volumes final e inicial de AC e C_0 e C são as concentrações de AC inicial e final respectivamente. C_{T0} e C_T referem-se às concentrações inicial e final de impurezas respectivamente.

Como a amoxicilina presente no medicamento foi considerada como a única impureza existente, foi realizada a sua caracterização em RMN, utilizando como padrão a amoxicilina pura (Sigma). Dessa maneira, foi possível avaliar com segurança, ao final do processo de extração estudado, através da análise do espectro de RMN-¹H, a presença ou ausência da amoxicilina junto ao ácido clavulânico. Essa avaliação foi realizada através da comparação dos sinais de hidrogênio característicos para amoxicilina (obtidos na caracterização) e do AC (obtidos no tópico 4.1.2) com os sinais observados no espectro de

RMN-¹H. Os sinais dos hidrogênios e carbonos da amoxicilina observados nos espectros de RMN encontram-se no Anexo C em maiores detalhes.

4.3 Melhoramento das etapas de purificação que antecedem a etapa final de precipitação, para o caldo de fermentação

Dentre os resultados obtidos durante a realização desta tese verificou-se que era necessário que a etapa final de purificação fosse realizada sem que ocorresse a evaporação de solventes, pois se constatou que havia degradação do AC nessa etapa. Assim as cromatografias (etapas nas quais ocorre evaporação de solventes) seriam mais indicadas para promover uma “limpeza” do caldo de fermentação nas etapas anteriores a etapa final do processo de purificação do AC. A precipitação foi uma alternativa de purificação, que mais tarde se consolidou como a etapa final do processo. Na precipitação é necessário que o caldo de fermentação esteja o mais puro possível, pois as substâncias presentes (contaminantes) podem concorrer com o AC, ou mesmo inviabilizar a reação desejada. Disto decorre a importância de se promover, ao máximo possível, a purificação do caldo anteriormente à entrada desse na etapa final de precipitação.

4.3.1 Cromatografia utilizando resina Amberlite XAD-4

O caldo de fermentação (400mL) na concentração de 345,9 mg/L, foi acidificado com H₂SO₄ (pH 4,5), e posteriormente filtrado e centrifugado (5°C por 15min) para retirada das células e sólidos em suspensão.

Após esse procedimento o pH foi reduzido para 2 (H₂SO₄) e teve sua concentração medida por CLAE. Foram realizadas três extrações com n-butanol, de 200mL cada uma. Essas frações foram reunidas. Apenas 200mL da fração orgânica foi re-extraída com H₂O em pH 6,8. Do volume final da etapa de re-extração, 100mL foram adicionados a uma coluna de vidro empacotada com resina Amberlite XAD-4 (diâmetro 4cm x 12cm de fase estacionária). Após aplicação dessa amostra fez-se a seguinte eluição:

Aplicação da amostra (100mL) frações coletadas 1-7

H₂O (100 mL) frações 8-16

MeOH 10% (50 mL) frações 17-20

MeOH 50% (50 mL) frações 21-22

EtOH 50% (50 mL) frações 23-24

EtOH 100% (200 mL) descarte

Foram coletadas 24 amostras e mais a lavagem da coluna, que ao final do experimento foi descartada.

As frações 6, 10, 14, 18, 21, 24 obtidas a partir da coluna empacotada com XAD-4, bem como uma alíquota do volume restante da re-extração com água, foram analisadas por CCD.

As frações aquosas de re-extração e de descarte (após extração com n-butanol) e as coletadas a partir da resina XAD-4, números 4, 8, 12 e 17 foram secas em Speed vac, ressuspendidas e analisadas por CLAE, com fluxo de 1mL/min.

4.3.2 Seqüência de cromatografias

O caldo de fermentação (590mL) com concentração de AC de 396,08 mg/L foi acidificado com HCl até pH 4,5 para precipitação de impurezas e em seguida centrifugado a 5°C, por 15 minutos (foi determinada por CLAE a concentração de AC após acidificação).

O caldo já centrifugado foi adicionado a uma coluna de vidro empacotada com resina Amberlite XAD-4 (4cm diâmetro x 12cm de fase estacionária). O permeado pela coluna e mais 60mL de H₂O usados nesta coluna, foram adicionados a coluna de troca catiônica IRC-50 (2cm diâmetro x 10cm de fase estacionária), ocorrendo a diminuição do pH para 2,6 (devido a troca de íons ⁺H). O permeado na coluna teve o pH ajustado em 2 e foi utilizado para extração com o solvente n-butanol (duas vezes de 200mL cada). A fração do solvente foi seca em Speevac e posteriormente re-suspendida em água e analisada por CLAE (fluxo de 1mL/min) e CCD (ninhidrina).

Foram analisadas por CLAE a concentração do AC nas frações aquosas do permeado da coluna XAD-4 (650mL), bem como o permeado da coluna IRC-50 (650mL), da água de lavagem da coluna XAD-4 (150mL) e também na fase aquosa resultante após extração com solvente (nas duas vezes em que foi realizada a extração com solvente), no intuito de fazer um monitoramento do AC e verificar se houve degradação em alguma dessas etapas.

4.4 Avaliação das reações descritas em literatura e estabelecimento de metodologia para precipitação do clavulanato de potássio

A instabilidade do AC e a sua elevada velocidade de degradação tornam as operações comumente utilizadas para purificação de antibióticos, ineficientes ou por muitas vezes dispendiosas, pois exigem a inclusão de técnicas cromatográficas associadas a baixas temperaturas que geralmente terminam com a liofilização ou evaporação de solventes, gerando altos custos e gastos de energia além de favorecer a sua degradação (MAYER *et al.*, 1997; CAPUDER, 2001).

Assim dentre outras, as patentes Kim *et al.* (1995) e Cardoso (1998) descreveram o isolamento do AC na sua forma de sal, como clavulanato de potássio ou de sódio, através de reações de precipitação, visando obtê-lo nas etapas finais de purificação sem que ocorra sua degradação ou perda de material e evitando a liofilização e etapas com evaporação do solvente. Outras descreveram reações, como a esterificação e as reações com aminas, que têm por objetivo torná-lo mais estável para que assim possa ser melhor manipulado (BOX, 1978; COLE *et al.*, 1978; CAPUDER, 2001; YANG *et al.*, 1994; BUTTERLY *et al.*, 2002).

Dessa maneira, os experimentos realizados foram baseados nestas patentes, na tentativa de tornar o AC mais estável, e pelos razões já expostas anteriormente, foram realizados inicialmente para amostras de AC provenientes do medicamento Clavulin® e clavulanato de potássio/celulose para depois os melhores resultados obtidos serem aplicados ao caldo de fermentação.

4.4.1 Reação de formação de um éster

Para essa reação utilizou-se 50mg de clavulanato de potássio/celulose, 1mL de dimetilformamida (DMF) e 0,3 mL de cloreto de benzila. A mistura foi agitada por 3 horas a 17 °C, em condições anidras. O meio no qual ocorreu a reação foi analisado por CCD.

A reação esperada está representada pela Figura 4.4.1.

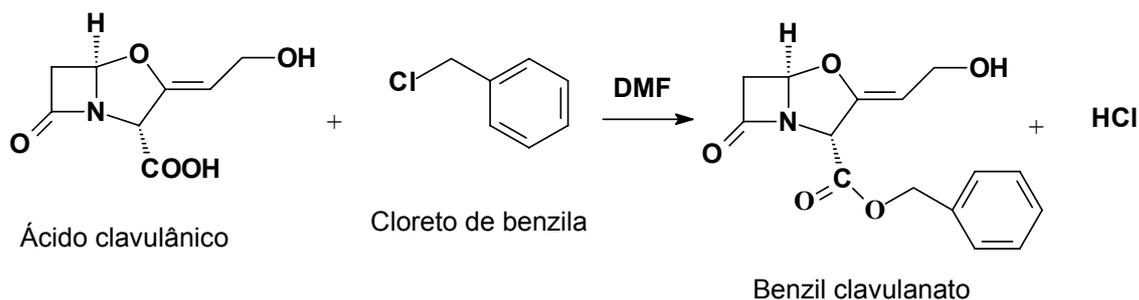


Figura 4.4.1 – Reação de formação do éster benzil clavulanato.

4.4.2 Reação com a trietilamina

Para essa reação foram utilizados 20mg de clavulanato/celulose, 30mL de tetraidrofurano (THF) e 1 mL de trietilamina. A mistura permaneceu durante 16 horas a 4°C. Era esperado, conforme descrito na patente Cook e Wilkins (1993), a formação de um precipitado (sal de amina do AC). A reação esperada está ilustrada pela Figura 4.4.2.

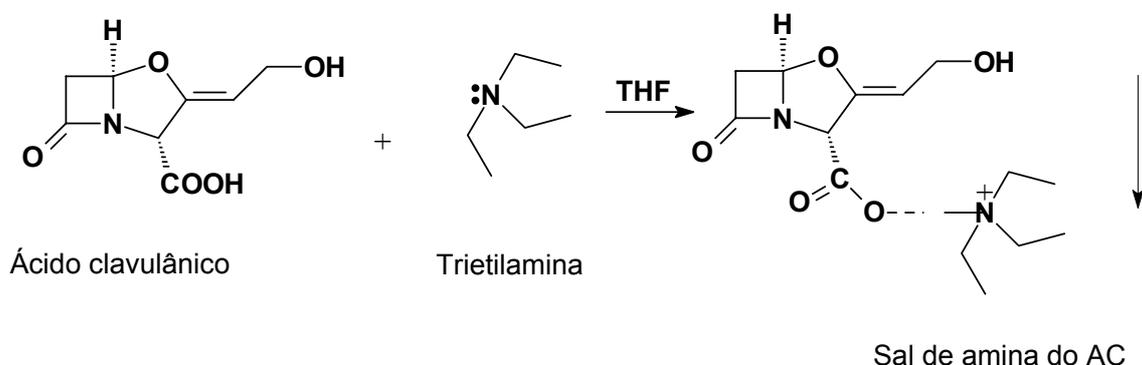


Figura 4.4.2 – Reação do AC com a trietilamina.

4.4.3 Precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio – ensaios preliminares

Foram realizados ensaios preliminares para a verificação da validade das reações descritas para a precipitação do AC na forma de clavulanato de potássio. No transcorrer desses experimentos foram identificadas as influências de algumas variáveis neste processo. Como não há nenhum artigo publicado em literatura, e as patentes existentes são pouco específicas, esses ensaios preliminares foram de fundamental importância para se entender e tentar reproduzir o processo de precipitação do AC. Várias tentativas de precipitação do clavulanato de potássio foram realizadas, através da mudança nas condições dos

experimentos, como para a concentração do AC e do 2-etilexanoato de potássio e na quantidade adicionada desse último. Posteriormente, foram incluídas nos planejamentos fatoriais algumas das variáveis observadas nesta etapa, possibilitando a otimização das reações de precipitação empregadas.

As reações de precipitação seguiram basicamente o seguinte procedimento:

A amostra de AC era acidificada a pH 2 com H₂SO₄ e colocada em contato com um solvente orgânico, geralmente o acetato de etila. A solução era agitada e posteriormente a fase orgânica separada da fase aquosa. Duas novas extrações com solvente orgânico eram realizadas para a mesma fase aquosa. As frações orgânicas eram então combinadas, e concentradas através de um evaporador rotativo, conectado a uma bomba Scrubber e a um banho termostático.

Era adicionado nesta etapa um agente dessecante, geralmente cloreto de cálcio (CaCl₂), para que toda a água que pudesse estar presente no solvente fosse retirada. A adição do 2-etilexanoato de potássio era então realizada a temperatura baixa (entre 0 e 5 °C). A prévia reação de formação do 2-etilexanoato de potássio, a partir do ácido 2-etilexanóico, encontra-se no Apêndice B. O precipitado formado era filtrado e lavado com isopropanol e acetona e depois colocado em dessecador a vácuo para terminar a secagem. A reação esperada está mostrada na Figura 4.4.3 abaixo:

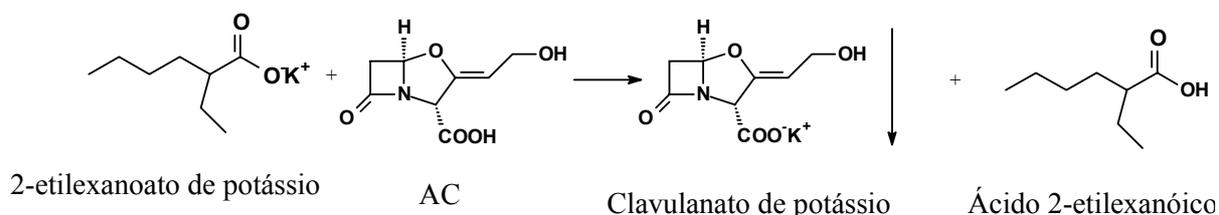


Figura 4.4.3 – Reação de precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio.

Na Tabela 4.4.1 estão as condições utilizadas para os ensaios realizados com o AC proveniente das amostras clavulanato/celulose e do medicamento Clavulin®.

Tabela 4.4.1- Condições utilizadas para os experimentos de precipitação.

Experimento- Origem da amostra	Massa de AC inicial (mg)	Vol.combinado das fases orgânicas (mL)	Conc. de AC no solvente orgânico (mg/mL)	Vol. de 2-etil adicionado (mL)	Conc. do 2-etil (molar)
1A- clav/celulose	160	90	3,7	10	2,5
2A- clav/celulose	370	100	6,9	6	2,5
*3A- clav/celulose	740	130	16,7	2	2,5
4A- Clavulin®	250	130	5,1	gotas	2,5
5A- Clavulin®	250	130	5,1	1,0	2,5
6A- Clavulin®	500	150	22,5	1,5	0,7

* este experimento foi ainda concentrado em evaporador rotativo após terminada a fase de precipitação.

4.4.3.1 Ensaio para o caldo de fermentação

Para os ensaios realizados com caldo de fermentação o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente. Optou-se por trabalhar com o caldo já ultrafiltrado, pois foi verificado ao longo dos experimentos, que a interface solvente-água (emulsão) na etapa de extração com solvente era sensivelmente reduzida quando se utilizava o caldo já ultrafiltrado. A formação de uma emulsão muito grande, não é desejada, pois dificulta a migração do AC da fase aquosa para a fase orgânica, diminuindo desta forma a eficiência da etapa de extração.

Na Tabela 4.4.2 estão descritas as condições utilizadas para os ensaios realizados para o caldo de fermentação.

Tabela 4.4.2- Condições utilizadas para os experimentos de precipitação para o caldo de fermentação

Experimento- Origem da amostra	Conc. inicial de AC no caldo (mg/L)	Vol. inicial de caldo (mL)	Vol.combinado das fases orgânicas (mL)	Conc. de AC no solvente orgânico (mg/mL)	Vol. de 2-etil adicionado (mL)	Conc. do 2-etil (molar)
1C- caldo de fermentação	65,2	250	250	0,5	<1,0	2,5
2C- caldo de fermentação	210,3	310	200	3,5	<1,0	2,5
3C- caldo de fermentação	466,7	600	450	5,5	<1,0	2,5

4.4.3.2 Precipitação do clavulato de potássio com a passagem por um intermediário estável

Várias patentes descreveram a precipitação de um sal de amina do AC como uma alternativa para a purificação do AC proveniente do caldo de fermentação. A reação deste com uma amina geraria um intermediário altamente estável, possibilitando seu isolamento e posterior conversão a clavulanato de potássio com elevado teor de pureza. Esta etapa apresentaria a vantagem, frente as técnicas cromatográficas, que mais comumente são

empregadas para purificação do caldo, de não ser necessário a evaporação de solventes, pois nessa evaporação ocorre sempre a degradação do AC. Entretanto é necessário levar em consideração que muitas reações descritas geram intermediários tóxicos ou higroscópicos, que não são adequados para utilização em medicamentos. É desejado que os intermediários formados sejam estáveis, não tóxicos e que também promovam uma boa purificação, assim a escolha da amina t-octilamina baseou-se nos cuidados apresentados.

A Figura 4.4.4 apresenta a reação do AC com a t-octilamina com a formação de uma sal de amina do AC.

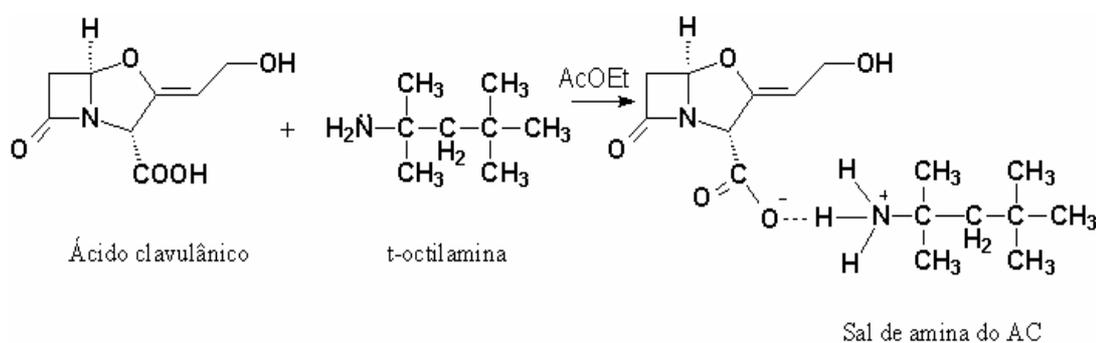


Figura 4.4.4 – Reação do AC com a t-octilamina, com a formação de um intermediário estável (sal de amina do AC).

O procedimento experimental foi semelhante ao descrito anteriormente para a precipitação com o 2-etilexanoato de potássio, com a diferença de que ao invés deste foi adicionado a t-octilamina. O precipitado formado foi lavado com acetato de etila. Na tabela 4.4.3 estão descritas as condições para os experimentos realizados.

Tabela 4.4.3 - Condições utilizadas para os experimentos de precipitação com a t-octilamina.

Experimento Origem da amostra	Massa de AC inicial (mg)	Vol.combinado das fases orgânicas (mL)	Conc. de AC no solvente orgânico (mg/mL)	Vol. de amina adicionada (mL)
1T- clav/celulose	629,7	90	15,7	0,15
2T- clav/celulose	1202,8	100	15,2	0,48

Do sal de amina do AC formado no ensaio 2T, foram separados cerca de 597,3mg, que foram utilizados em reação posterior com o 2-etil, para a precipitação do clavulanato de potássio. O procedimento experimental para esta segunda reação de precipitação foi o seguinte:

O sal de amina (597,3mg) foi dissolvido em 20mL de isopropanol e em seguida foi adicionado 2-etilexanoato de potássio (0,7 molar). A solução permaneceu sob agitação por

uma hora a 1°C. Os cristais de clavulanato de potássio precipitados foram lavados com isopropanol. A reação do sal de amina de AC com o 2-etilexanoato de potássio está representada pela Figura 4.4.5.

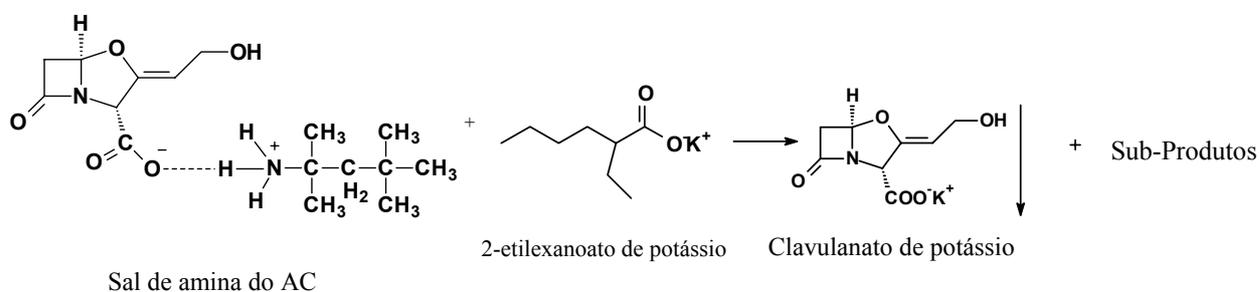


Figura 4.4.5 – Reação de precipitação do clavulanato de potássio a partir do sal de amina do AC.

4.5 Otimização das reações de precipitação

A utilização dos planejamentos fatoriais teve como objetivo otimizar as reações de precipitação, visando maiores rendimento e estabilidade dos produtos formados, através do estudo da influência das variáveis envolvidas nas reações.

Para esses planejamentos foram selecionadas algumas variáveis observadas nos ensaios preliminares e outras dentre as descritas em literatura que mais comumente exercem influência nas reações de precipitação.

Em virtude da elevada velocidade de degradação do AC a altas temperaturas, estas foram mantidas abaixo de 30°C, limitando-se dessa maneira a faixa estudada para a temperatura. O ácido clavulânico utilizado nestes ensaios foi proveniente do produto farmacêutico Clavulin®. Os resultados obtidos no objetivo específico “Desenvolvimento de método para precipitação do padrão de AC puro a partir do Clavulin®” garantiram a obtenção do AC puro, para que fosse possível sua utilização livre de contaminantes que pudessem interferir nas respostas para as reações de precipitação estudadas.

Os ensaios que apresentaram os melhores resultados nos planejamentos utilizados tiveram a sua condição experimental reproduzida para o caldo de fermentação.

Assim as reações estudadas foram:

1. Reação direta – Na qual ocorreu a precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio (R_0) com a formação do clavulanato de potássio. A reação R_0 já foi descrita anteriormente pela Figura 4.4.3.

2. Reação indireta, com a passagem por um intermediário estável – Na qual ocorreu a precipitação do AC com a t-octilamina (R_1), formando um sal de amina do AC (intermediário estável), e depois houve a reação deste sal com o 2-etilexanoato de potássio para a formação do clavulanato de potássio (R_2).

As reações chamadas de R_1 e R_2 estão representadas respectivamente pelas Figuras 4.4.4 e 4.4.5, já mostradas anteriormente. Para essas reações foi realizada ainda a validação experimental dos resultados, através da repetição em triplicata dos ensaios nas condições otimizadas, utilizando para esses um volume maior (50mL).

4.5.1 Reação direta de precipitação do AC (R_0)

Para R_0 foi realizada uma estratégia seqüencial de planejamentos (RODRIGUES e IEMMA, 2005), uma vez que não se conhecia muitos dados específicos da reação estudada. Se fosse realizado diretamente um planejamento completo (Delineamento Composto Central Rotacional ou DCCR) poderia-se correr o risco de não se chegar a otimização da reação de precipitação, caso se estivesse fora das faixas adequadas (o que pode ocorrer quando se está longe das condições otimizadas). A estratégia seqüencial visa chegar ao objetivo desejado, através de uma prévia seleção de variáveis e faixas de operação, utilizando para isto planejamentos fracionados, que possuem um número reduzido de ensaios, quando comparados a um planejamento completo, fazendo com que haja uma grande economia de tempo, caso seja necessário a mudança das faixas utilizadas para as variáveis estudadas. Após a realização de um planejamento fracionado, para a análise dos efeitos dessas variáveis, pôde-se decidir por um DCCR com um número menor de variáveis, possibilitando assim com maior garantia, a otimização do processo estudado.

Deste modo, primeiramente foi realizado um planejamento fracionado para quatro variáveis; a temperatura, a concentração do AC no solvente orgânico, a concentração do 2-etilexanoato de potássio (2-etil) em isopropanol e a vazão de adição do 2-etil ao solvente orgânico, para a reação de precipitação. A velocidade de agitação foi mantida em 250 rpm garantido a homogeneidade da solução, ou seja, que não houvesse supersaturação local (pontos onde a supersaturação é mais elevada). Após análises dos efeitos dessas variáveis, uma foi fixada (temperatura) e realizado um DCCR para as três variáveis restantes.

Na Tabela 4.5.1 estão descritos os valores utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , incluindo três pontos centrais, para a reação direta do AC com o 2-etilexanoato de potássio. Foram selecionados três níveis para a temperatura (Temp), a concentração do ácido clavulânico no solvente (Conc. de AC), a concentração do 2-etil (Conc. de 2-etil) e para a vazão de adição do 2-etil (Vazão de 2-etil).

Tabela 4.5.1 - Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temp. (°C)	8,0	15,0	22,0
Conc. de AC. (mg/mL)	5,0	15,0	22,0
Conc. de 2-etil (molar)	0,5	1,25	2,0
* Vazão de 2-etil (gota/minuto)	0,5	0,75	1,0

*equivale a adição de uma gota a cada 120; 90 e 60 segundos, respectivamente.

A rapidez com que se adiciona o reagente é sem dúvida um dos fatores que exerce influência na formação de precipitados (SKOOG *et al.*, 2006). Entretanto se a variável a ser estudada fosse ao invés de vazão, definida como “tempo de adição de uma gota de reagente”, os níveis do planejamento ficariam invertidos, pois se teria em um menor espaço de tempo uma maior adição de reagente e num maior espaço de tempo se teria menos adição desse reagente. A opção pela vazão veio facilitar esse exame, deixando os níveis em ordem. Porém a primeira vista pode parecer estranho adotar meia gota em um minuto (0,5), na verdade isso significa que 1 gota foi adicionada a cada dois minutos ou 120 segundos. Mantendo a fração ($\frac{1}{2}$) (que significa 1 gota para 2 minutos) obteve-se o valor de 0,5 que vem sendo usado no nível -1. Para o nível +1 tem-se o incremento de $\frac{1}{2}$ e a fração passou a ser $\frac{1}{1}$ (que significa 1 gota em 1 minuto ou em 60 segundos) assim obteve-se o valor 1 mostrado na Tabela 3.3.4. O ponto central (0,75) é a média dos níveis -1 e +1. Optou-se em deixar a representação em números decimais para facilitar a visualização do aumento da vazão, em concordância com os níveis.

Na Tabela 4.5.2 encontram-se os valores utilizados no DCCR para três variáveis, (2^3 , incluindo 3 pontos centrais e seis pontos axiais), para a reação direta do AC com o 2-etil, a temperatura de 22°C.

Tabela 4.5.2 - Valores utilizados no DDCR para a reação direta do AC (R₀)

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Conc. de AC (mg/mL)	x1	8,2	15,0	25,0	35,0	41,8
Conc. de 2-etil (molar)	x2	0,16	0,3	0,5	0,7	0,84
* Vazão de 2-etil (gota/minuto)	x3	0,33	0,5	0,75	1,00	1,17

*equivale à adição de uma gota a cada 140; 120; 90; 60 e 40 segundos, respectivamente.

O procedimento experimental para extração foi semelhante ao descrito anteriormente para os ensaios preliminares de precipitação. A solução aquosa contendo o AC foi filtrada e acidificada com H₂SO₄ até atingir pH igual a 2,0. Foram realizadas três extrações utilizando-se o acetato de etila. Esse solvente foi escolhido por apresentar maior seletividade para o AC (discutido detalhadamente no tópico 5.2.2 - Extração do ácido clavulânico em diferentes solventes) e também pelo fato de que a água solúvel nesse solvente apresenta-se em quantidades muito menores quando comparada ao n-butanol, cerca de 3,3 de água solúvel (em peso) presente no acetato de etila contra 20,5% para o n-butanol (MORITA e ASSUMPÇÃO, 1981). A interferência da água no processo de precipitação é muito grande e foi discutida em maiores detalhes no tópico 5.4.3 - Precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio – ensaios preliminares.

As fases orgânicas foram então combinadas e concentradas utilizando um evaporador rotativo até atingirem o volume desejado, necessário para se obter as concentrações estudadas. Foi adicionado um secante CaCl₂ à fase orgânica concentrada para garantir a retirada de toda água que poderia ainda estar presente no acetato de etila.

Para os experimentos de precipitação, a metodologia consistiu basicamente em adicionar a um reator de vidro encamisado, o volume (já concentrado) de acetato de etila, no qual a concentração de ácido clavulânico era conhecida. Em seguida uma quantidade também conhecida de 2-etil (geralmente estequiométrica) foi adicionada com uma vazão já previamente estabelecida (pelo planejamento fatorial), com auxílio de um cronômetro e uma pipeta Pasteur. Os cálculos necessários para essa etapa encontram-se detalhadamente descritos no Apêndice A (Memória de Cálculo).

Essa solução (solução-mãe) foi mantida a uma temperatura também pré-estabelecida, através do uso de um banho termostático e sob agitação constante de 250rpm por meio de um agitador tipo hélice ligado a um controlador.

Após terminada a adição do 2-etil, a solução-mãe permaneceu sob mesma agitação e temperatura por aproximadamente 45 minutos. Os cristais formados foram filtrados e lavados com acetato de etila e éter e em seguida foi adicionada celulose microcristalina

(Hemefarma) na proporção de 1:1 e colocado em dessecador a vácuo, por um período de aproximadamente 24 horas, para completar a secagem. Após esse tempo a massa foi medida (descontando a de celulose adicionada) e calculado o rendimento.

Na Figura 4.5.1 estão indicados os equipamentos utilizados para realização dos experimentos de precipitação.

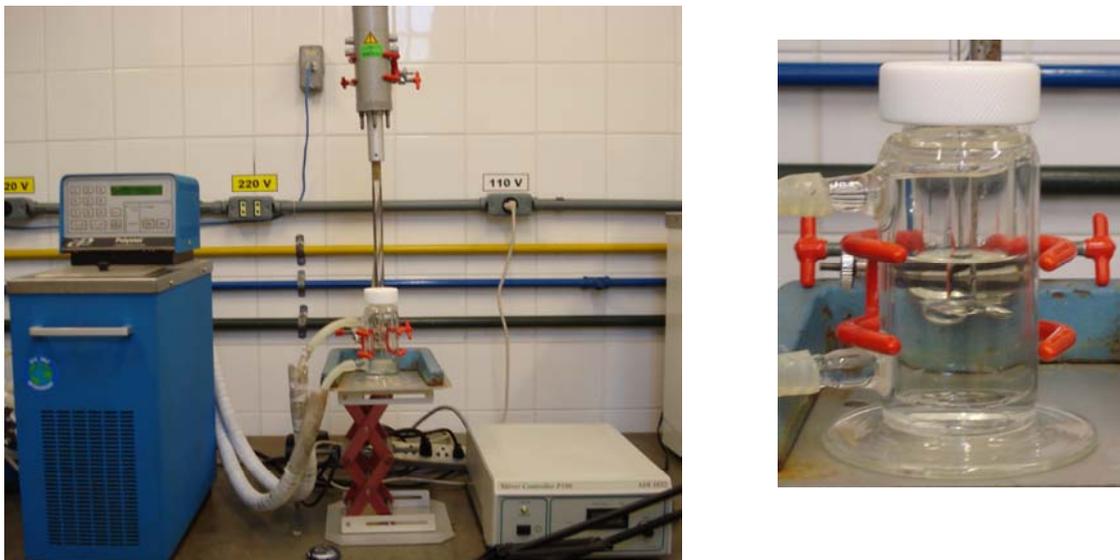


Figura 4.5.1 - Reator encamisado, banho termostático e controlador de velocidade. No detalhe o reator encamisado utilizado.

O rendimento (Y) das reações foi calculado usando a Equação 4.5.1 abaixo:

$$Y\% = \frac{m_{\text{exp}}}{m_t} \times 100 \quad (4.5.1)$$

Onde, m_{exp} é a massa obtida experimentalmente, e m_t é a massa teórica determinada através da estequiometria da reação (O cálculo estequiométrico efetuado para as reações estudadas está representado no Apêndice A).

4.5.2 Reação indireta, com a passagem por um intermediário estável (R_1 e R_2)

Foram realizados planejamentos fatoriais completos (DCCR) para o estudo das reações R_1 e R_2 , pois nos ensaios preliminares efetuados para essas reações obteve-se resultados muito bons, portanto as condições empregadas não se encontravam muito longe das condições que possibilitariam a otimização destas reações.

Assim, para a reação R_1 (com a t-octilamina) foi realizado um DCCR para três variáveis; a temperatura (Temp), a concentração do AC no acetato de etila (Conc. de AC) e a

vazão de adição da amina (Vazão de amina), para que ocorresse a reação de precipitação com a formação do sal de amina do AC.

Na Tabela 4.5.3 encontram-se os valores utilizados no DCCR para a reação indireta do AC com a t-octilamina (R₁). Os valores dos níveis foram selecionados baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios preliminares para essa reação.

Tabela 4.5.3 - Valores utilizados no DCCR para a reação indireta do AC (R₁)

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temp (°C)	x1	6,6	10	15	20	23,4
Conc.de AC (mg/mL)	x2	6,6	10	15	20	23,4
* Vazão de amina (gota/minuto)	x3	0,33	0,5	0,75	1,0	1,17

*equivale à adição de uma gota a cada 140; 120; 90; 60 e 40 segundos, respectivamente.

O procedimento experimental adotado para a reação R₁ foi semelhante ao utilizado para a reação R₀, com a diferença de que agora foi realizada a adição da t-octilamina ao invés do 2-etil. Após o término da adição da amina, a solução-mãe ficou sob agitação e a mesma temperatura por aproximadamente 45 minutos. Os cristais formados foram filtrados, lavados com acetato de etila, e colocados em dessecador a vácuo por um período de aproximadamente 24 horas, para completar a secagem.

Os volumes e cálculos utilizados nesta etapa, encontram-se no Apêndice A.

Para a reação R₂ (do sal de amina do AC com o 2-etil) foi realizado um DCCR para três variáveis; a temperatura (Temp), a concentração do sal de amina do AC em isopropanol (Conc. de sal do AC) a concentração de 2-etil adicionada (Conc. de 2-etil), para que ocorresse a precipitação de clavulanato de potássio. A vazão de adição do 2-etil foi mantida fixa em 0,75gota/minuto, ou seja, uma gota a cada 90 segundos.

Na Tabela 4.5.4 encontram-se os valores utilizados para reação indireta do AC com a t-octilamina (R₂), utilizando um DCCR para três variáveis.

Tabela 4.5.4 - Valores utilizados no DCCR para a reação indireta do AC (R₂)

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temp (°C)	x1	11,6	15	20	25	28,4
Conc. de sal do AC (mg/mL)	x2	8,2	15	25	35	41,8
Conc. de 2-etil (molar)	x3	0,2	0,4	0,7	1,0	1,2

Para os ensaios realizados para a reação R_2 , foi adotado o seguinte procedimento experimental. Foram realizados ensaios para se obter o sal de amina do AC utilizando uma das melhores condições encontradas para a reação anterior - R_1 (ensaio 11).

O sal de amina do AC foi dissolvido utilizando-se metade do volume adequado de isopropanol, com adição de água na razão fixa de 0,012 (água/isopropanol). A outra metade do volume de isopropanol foi adicionada somente depois de toda a solubilização do sal de amina. Esta solução, com concentração conhecida do sal de amina do AC, foi adicionada em um reator encamisado, com agitação controlada (250rpm) e a uma temperatura pré-estabelecida. Uma quantidade de 2-etilexanoato de potássio foi adicionada a uma vazão constante de 0,75gota/minuto.

Após a completa adição do 2-etil, a solução-mãe foi mantida sob mesma agitação e temperatura por aproximadamente mais 45 minutos.

Os cristais formados foram lavados com isopropanol e éter. Para completar a secagem os cristais, juntamente com celulose microcristalina na proporção de 1:1, foram colocados em dessecador a vácuo por um período de aproximadamente 24 horas. Após esse período a massa foi medida (descontada a de celulose) e o rendimento calculado pela Equação 5.4.1 (já exibida anteriormente).

Os cálculos necessários para essa etapa encontram-se detalhadamente descritos no Apêndice A (Memória de Cálculo).

Todos os ensaios realizados para as reações R_0 , R_1 e R_2 foram monitorados por CCD. Ainda foram realizadas análises em RMN e em MEV, para ensaios específicos, conforme os resultados obtidos.

4.5.3 Ensaios para o caldo de fermentação

Para os ensaios realizados com caldo de fermentação, já ultrafiltrado, o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente para as reações R_0 , R_1 e R_2 .

Na Tabela 4.5.5 estão descritas as condições utilizadas para o ensaio realizado para a reação de precipitação direta com 2-etil (R_0). O número do ensaio mostrado na Tabela 4.5.5, (Ensaio 1), foi útil para definir quais as condições utilizadas no planejamento fatorial (DCCR) que foram reproduzidas para o caldo de fermentação. Cabe ressaltar que os cálculos efetuados para os ensaios utilizados nos planejamentos estudados encontram-se nas tabelas do Apêndice A.

Tabela 4.5.5- Condições utilizadas para o experimento de precipitação do caldo de fermentação com o 2-etil – Reação direta

Experimento – Ensaio	Conc. inicial de AC no caldo (mg/L)	Vol. inicial de caldo (mL)	Vol.combinado das fases orgânicas (mL)	Conc. de AC no solvente orgânico (mg/mL)	Vol. do 2-etil adicionado (mL)	Conc. do 2-etil (molar)
1F – Ensaio 1	420,0	600	500	15,1	1,9	0,3

Na Tabela 4.5.6 estão descritas as condições utilizadas para o ensaio realizado para a reação de precipitação indireta com a passagem por um intermediário estável - R₁.

Tabela 4.5.6- Condições utilizadas para o experimento de precipitação do caldo de fermentação com a t-octilamina – Reação indireta (R₁)

Experimento – Ensaio	Conc. inicial de AC no caldo (mg/L)	Vol. inicial de caldo (mL)	Vol.combinado das fases orgânicas (mL)	Conc. de AC no solvente orgânico (mg/mL)	Vol. da amina (mL)
1AF – Ensaio 11	375,2	500	350	6,7	0,15

Na Tabela 4.5.7 estão descritas as condições utilizadas no experimento de precipitação do caldo de fermentação, partindo-se do intermediário estável formado na reação anterior (R₁) com o 2-etil, para a precipitação do clavulanato de potássio (R₂).

Tabela 4.5.7- Condições utilizadas para o experimento de precipitação do caldo de fermentação – Reação indireta (R₂)

Experimento – Ensaio	Massa inicial de sal de amina do AC (mg)	Vol.de isopropanol (mL)	Conc. de AC no solvente orgânico (mg/mL)	Vol. do 2-etil adicionado (mL)	Conc. do 2-etil (molar)
1SF – Ensaio 17	251	10	25,1	1,2	0,7

Todos os ensaios foram monitorados por CCD e posteriormente analisados por RMN. Para a reação indireta ainda foram adquiridos os espectros mono e bidimensionais e analisadas as correlações, para que o(s) sinal(s) correspondente a átomos de hidrogênio e de carbono fosse atribuído corretamente. Os espectros com a tabela de deslocamentos químicos e as correlações observadas estão disponíveis no Apêndice C.

Ainda foram realizadas análises em MEV com a finalidade de se verificar a morfologia dos cristais de clavulanato de potássio e do sal de amina do AC obtidos nas reações de precipitação para o caldo de fermentação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização e seleção de método para monitoramento do AC

Como as estruturas dos antibióticos em questão já são conhecidas, estes dados foram de grande valia para se certificar quais os antibióticos isolados sem qualquer dúvida em relação a sua presença nas amostras e precipitados analisados.

5.1.1 Estudos em cromatografia em camada delgada (CCD)

A molécula de clavulanato de potássio apresenta elevada polaridade, um dos fatores responsáveis por esta característica é a presença de elementos bastante eletronegativos como o oxigênio e o nitrogênio, presentes na molécula.

Devido a essa elevada polaridade, dentre os eluentes testados para CCD, os que melhor eluíram a substância em sílica gel foram diclorometano/metanol (6:4) e acetronitrila/metanol (6:4). Deve-se salientar que o meio não sendo aquoso, as moléculas não se encontram na forma iônica. Para as demais misturas de eluentes testadas o clavulanato de potássio praticamente não saiu da origem, isto é, do ponto de aplicação da amostra.

A máxima absorção observada pela substância ocorre em 227nm (BIRD *et al.*, 1982), portanto quando foi aplicada em placas de CCD com indicadores de UV 254 e inspecionada sob a luz UV em 254nm, não apresentou boa revelação.

Dos reveladores testados, o Reagente de Dragendorff apresentou teste negativo para o clavulanato. A ninhidrina (revelador para aminas primárias e secundárias) também apresentou teste negativo para o clavulanato, mas apresentou teste positivo para a amoxicilina proveniente do comprimido.

O melhor revelador observado para o clavulanato foi o ácido fosfomolibdico (revelador de substâncias redutoras, duplas ligações e grupos OH).

Através da análise das placas de CCD percebeu-se que as duas misturas de eluentes citadas são adequadas, pois eluem através da sílica tanto o clavulanato quanto a amoxicilina, o que indica que é possível utilizar esta fase estacionária sem ocorrer adsorção irreversível da substância de interesse. Por outro lado, percebeu-se que a separação do clavulanato e da amoxicilina em sílica gel, utilizando os eluentes descritos acima, não se mostrou eficiente, pois ambos migram praticamente juntos e isto ocorreu com todos os eluentes testados. Isso indica que uma fase estacionária, mesmo polar como a sílica, não seria

eficiente na separação dos dois componentes principais do medicamento Clavulin®, pelo menos para os eluentes testados.

Como o clavulanato elui de maneira favorável em sílica, esta pode ser útil para separá-lo de outras substâncias presentes, por exemplo, no caldo de fermentação.

Concluí-se que seria necessária uma separação prévia da amoxicilina, quando se trabalha com o medicamento, pois a proporção de amoxicilina/clavulanato é de (6:1), ou seja, a amoxicilina se encontra em grande quantidade quando comparada a quantidade presente de AC.

5.1.2 Estudos em coluna pré-empacotada (Sep Pak)

Dentre as 26 frações estudadas, foi para a fração de número 8 em que houve a maior concentração de clavulanato de potássio. Essa fração foi analisada por RMN-¹H (Figura 5.1.1). Foram observados os sinais para o ácido clavulânico e para a amino cetona, que é um produto de degradação do AC (FINN *et al.*, 1984). Ainda para essa amostra foi realizada uma análise espectroscópica minuciosa em RMN, sendo adquiridos espectros mono e bidimensionais e analisadas as correlações, para que cada sinal correspondente a átomos de hidrogênio e de carbono fossem atribuídos sem ambigüidade e encontram-se disponíveis no Apêndice C.

Também foi possível observar que a técnica cromatográfica empregada não é adequada para ser a etapa final (que precede a entrada do clavulanato no medicamento) do processo de purificação para o AC, pois o espectro de RMN-¹H apresentou sinais de degradação do AC (amino cetona), bem como outros sinais de hidrogênio de impurezas. Essa degradação do AC provavelmente ocorreu na etapa de secagem do solvente utilizada na cromatografia, mesmo não empregando aquecimento (Speedvac).

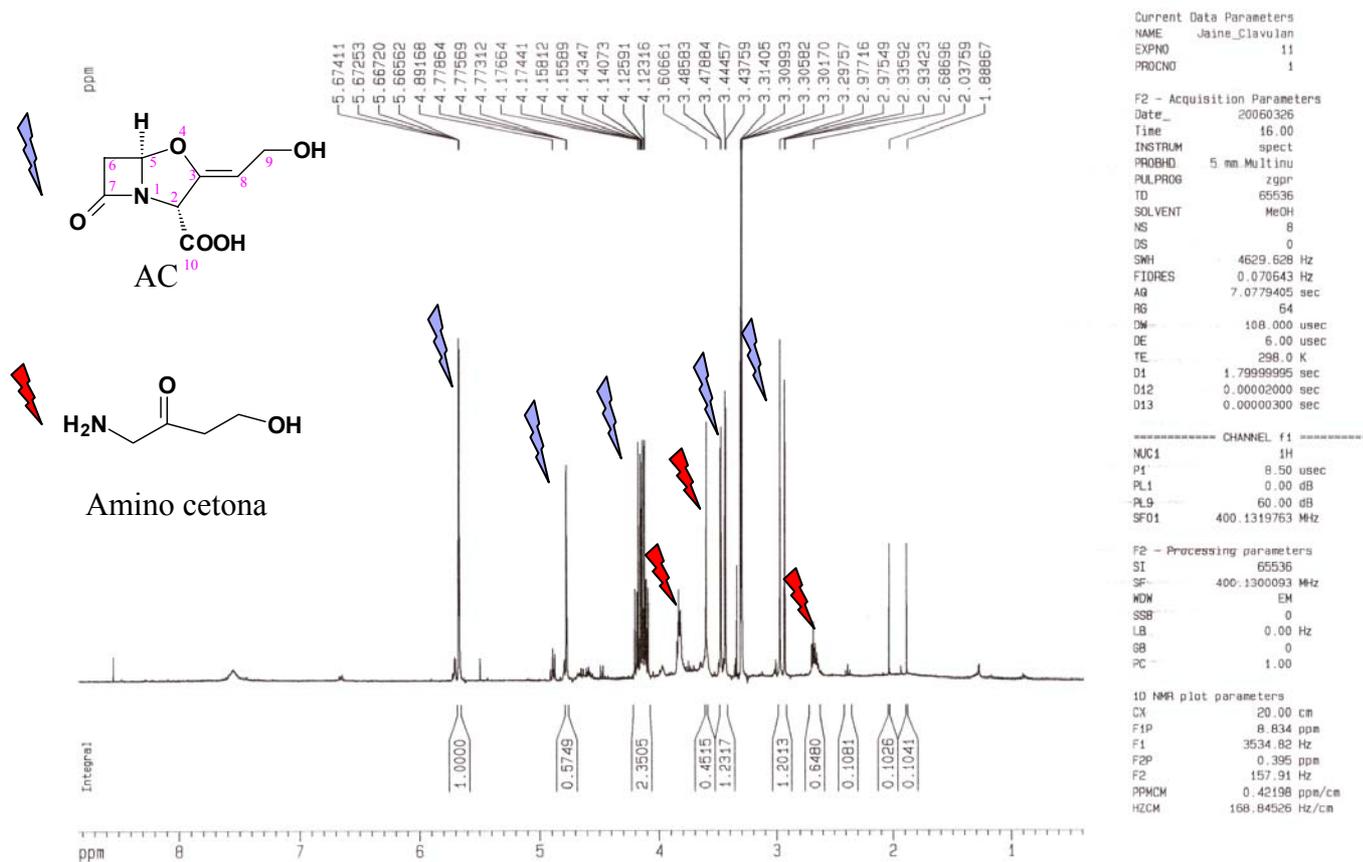


Figura 5.1.1 – Espectro de RMN-¹H do clavulanato de potássio, obtido após cromatografia, com a presença de amino cetona, a partir da amostra clavulanato/celulose.

5.2 Desenvolvimento de método para preparação do padrão de AC puro a partir do Clavulin®

5.2.1 Estudos para extração do ácido clavulânico

Dentre as frações estudadas, observou-se que as frações 1 e 2 (de material insolúvel e a de descarte após a extração) eram ricas em amoxicilina, porém na fração 2 observou-se também a presença de AC. Nas frações 4 e 5 (permeado pela coluna e de lavagem da coluna) foi observada a presença de AC e de amoxicilina, mesmo depois de se utilizar a resina XAD-4. Porém a fração 3 obtida a partir da re-extração em tampão fosfato, continha sal impossibilitando sua secagem total e uma análise mais precisa por CCD, uma vez que para ser realizado o monitoramento por CCD existe a necessidade de se concentrar a fração estudada (em Speedvac). No entanto, pode-se supor que havia a presença de

amoxicilina e de AC, na solução de re-extração, pois essas mesmas substâncias foram encontradas na frações 4 e 5 que são oriundas de etapas posteriores a de re-extração.

Foi verificado que a resina XAD-4 promoveu uma certa adsorção de amoxicilina, mas não o suficiente para separá-la do AC, indicando que este método não está adequado para se obter o AC puro a partir do medicamento Clavulin®.

5.2.2 Extração do ácido clavulânico em diferentes solventes

Foram medidas as concentrações de AC e amoxicilina nas etapas; inicial, de extração tanto para a fase orgânica como aquosa e de re-extração também para ambas as fases.

Com essas determinações de concentração e as correlações da Equação 4.2 (descrita anteriormente), foi possível obter-se os valores do coeficiente de partição para o AC (K_{pAC}) e para amoxicilina (K_{pAmox}) nos solventes estudados. Entretanto, as concentrações medidas na fase orgânica para o AC apresentaram valores inferiores aos valores da concentração do mesmo nas soluções de re-extração. Este fato ocorreu devido à degradação do AC durante a evaporação do solvente, realizada em Speedvac, onde não é necessário aquecimento da amostra. Esse fato certificou de que realmente é necessária uma etapa de precipitação ou derivatização da molécula de AC para torná-la mais estável e então purificá-la.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.2.1 abaixo:

Tabela 5.2.1 - Valores do coeficiente de partição do ácido clavulânico (K_{pAC}) e para a amoxicilina (K_{pAmox}), rendimento (Y) e fator de purificação (FP) para o AC.

Solvente	K_{pAC}	K_{pAmox}	Y (%)	FP
Acetato de etila (1)	0,65	0,017	45,0	24,2
*Acetato de etila (2)	0,40	0,009	25,0	25,4
Clorofórmio	0,008	0,006	0,8	1,3
Diclorometano	0,008	0,00	0,8	-
Éter	0,056	0,004	5,5	11,8
Metil isobutilcetona	0,30	0,003	23,2	60,6
N-butanol (1)	1,81	0,160	66,7	3,6
N-butanol (2)	1,85	0,166	53,1	3,0

*a re-extração foi realizada somente com água.

Pela análise dos resultados da Tabela 5.2.1, observou-se que para os solventes, diclorometano, clorofórmio e éter, os resultados não foram satisfatórios, pois a maior parte do

AC permaneceu na água. Para o acetato de etila, observou-se que quando a re-extração é feita somente com água (e não com tampão fosfato, como nas demais extrações), o rendimento diminuiu consideravelmente. Isso se deve provavelmente à diminuição do pH da água durante a re-extração, conforme foi verificado posteriormente. A patente Cole *et al.* (1978) cita que a re-extração utilizando somente água é possível desde que o seu pH seja mantido próximo a 7.

O maior coeficiente de partição do AC obtido para o foi para o n-butanol (2) no valor de 1,85, porém esse solvente também extraiu um pouco de amoxicilina ($K_{p_{\text{amox}}}$ 0,166). O ideal seria encontrar um solvente que extraísse quase todo o AC junto com pouca amoxicilina, ou seja, que apresentasse além de um alto valor para o coeficiente de partição do AC uma seletividade também elevada (baixo valor para $K_{p_{\text{Amox}}}$). Isto na prática é muito difícil. Os solventes que apresentaram maior seletividade foram a metil isobutilcetona e o acetato de etila (1) ($K_{p_{\text{amox}}}$ de 0,003 e 0,017 respectivamente), porém não apresentaram um coeficiente de partição para o AC tão elevado ($K_{p_{\text{AC}}}$ de 0,3 e 0,65 respectivamente) quanto o observado para o n-butanol (2).

Uma alternativa encontrada foi combinar os métodos de extração e purificação de modo a se obter os melhores rendimentos possíveis juntamente com um elevado grau de pureza. Neste sentido a combinação da etapa de extração com solvente seguida da etapa de precipitação (que está descrita posteriormente em maiores detalhes no tópico 5.4.3 - Precipitação do AC com o 2-etil hexanoato de potássio - ensaios preliminares) constituiu um grande sucesso, pois não foram encontrados traços de amoxicilina no precipitado obtido, possibilitando dessa maneira a utilização do AC proveniente do medicamento Clavulin®, livre da interferência da amoxicilina, nos ensaios de precipitação realizados para a otimização das reações (planejamento fatorial).

Assim, por apresentar um valor de $K_{p_{\text{AC}}}$ superior ao da metil isobutilcetona e um valor de $K_{p_{\text{Amox}}}$ menor do que o encontrado para o n-butanol, o acetato de etila foi inicialmente selecionado para ser o solvente utilizado na etapa de extração com solvente que antecede a precipitação. Mais tarde verificou-se que a seleção deste solvente foi muito afortunada, pois foi verificado na etapa de precipitação, a grande influência da água (que se solubiliza nos solventes orgânicos durante a fase de extração), impedindo que ocorra a reação. Comparado com o n-butanol, o acetato de etila possuía, além da vantagem de ser mais seletivo, também a de possuir menor solubilidade de água em si.

5.3 Melhoramento das etapas de purificação que antecedem a etapa final de precipitação, para o caldo de fermentação

5.3.1 Cromatografia utilizando resina Amberlite XAD-4

Através da análise de concentração de AC realizada por CLAE foi verificado que houve uma queda considerável desta na etapa inicial, realizada para retirada de células do caldo de fermentação e após redução do pH 2, passando de 345,9 para 160mg/L. Essa queda está associada à degradação do AC, indicando que a etapa inicial utilizada para retirada das células do caldo de fermentação, deve ser substituída por outra na qual ocorra menor degradação para o AC.

Na Tabela 5.3.1 estão apresentadas as concentrações de AC, obtidas por CLAE e a presença de impurezas (aminoácidos, por exemplo) analisadas por CCD para as frações estudadas.

Tabela 5.3.1 – Concentração de AC para as frações analisadas por CLAE e impurezas para as frações analisadas por CCD.

Fração	AC (mg/L)	Fração	Presença de Impurezas
Aquosa (re-extração)	56,5	Aquosa (re-extração)	SIM
Aquosa descarte (após extração com solvente)	28,1	Coletada 6 (XAD-4)	SIM
Coletada 4 (XAD-4)	27,6	Coletada 10 (XAD-4)	SIM
Coletada 8 (XAD-4)	42,6	Coletada 18 (XAD-4)	SIM
Coletada 12 (XAD-4)	6,2	Coletada 21 (XAD-4)	SIM
Coletada 17 (XAD-4)	0,0	Coletada 24 (XAD-4)	SIM

Na resina XAD-4 apenas ficou retida uma substância amarelada (provavelmente pigmentos), a qual foi eluída com etanol 50% e 100%. A maior parte do AC eluiu com H₂O, próximo à fração de número 8, porém todas as frações analisadas apresentavam impurezas (CLAE).

Para as frações 6, 10, 14, 18, 21, 24 coletadas a partir da coluna empacotada com XAD-4 e para o volume restante da fração de re-extração que foi analisado em CCD notou-se a presença de uma grande quantidade de aminoácidos (os quais revelavam com ninhidrina), indicando que a resina foi capaz de eliminar pigmentos e substâncias não tão polares quanto os aminoácidos, não promovendo desta maneira uma boa purificação para o caldo.

Parte deste procedimento foi descrito por Butterworth (1984). O autor cita que é necessário uma segunda etapa de purificação que se inicia com a conversão do clavulanato

parcialmente puro em um derivado éster benzílico. Pelas análises realizadas em CCD, nota-se que até este ponto o procedimento utilizado não era suficiente para purificar, mesmo que parcialmente o AC.

Assim outros métodos de separação e purificação deveriam ser desenvolvidos ou adicionados a estes para se obter um resultado satisfatório.

5.3.2 Seqüência de cromatografias

Na Tabela 5.3.2 estão apresentadas as concentrações de AC, obtidas por CLAE para as frações estudadas, que foram transformadas em massa de AC (mg) com o intuito de facilitar a visualização da degradação do AC ocorrida durante o processo estudado.

Tabela 5.3.2 – Concentração e massa de AC obtidas para as frações analisadas por CLAE.

Fração Aquosa	Conc. de AC (mg/L)	Massa de AC (mg)
Após diminuição do pH	358,5	211,5
Permeada (resina XAD-4)	213,0	138,5
Permeada (resina IRC-50)	119,2	77,5
Lavagem (resina XAD-4)	173,1	26,0
Descarte (após a 1ª extração com solvente)	40,7	24,5
Descarte (após a 2ª extração com solvente)	35,8	21,5

Após a aplicação do caldo de fermentação em coluna empacotada com resina XAD-4 houve uma queda considerável na massa de AC, ocorrendo perda de 34,5% em relação à massa encontrada após a diminuição do pH. Após a aplicação do permeado em coluna com resina IRC-50, a perda foi ainda maior de 44%. Se fosse considerado o rendimento total, até esta etapa do experimento, isto é, do caldo descongelado até a aplicação em resina de troca catiônica, a recuperação do AC, em massa, seria de apenas 33,2%, um rendimento muito pequeno, sabendo que novas etapas de purificação são ainda necessárias, pois foi observada a presença de muitos aminoácidos pela análise realizada em CCD (ninhidrina) para a fração orgânica após extração e evaporação (n-butanol).

Os resultados obtidos neste experimento, juntamente com os resultados do experimento de extração do AC em diferentes solventes orgânicos e estudos com o caldo fermentado (cromatografia utilizando resina Amberlite XAD-4) indicaram que a metodologia de trabalho até então empregada deveria ser modificada, principalmente no que diz respeito à evaporação do solvente orgânico (n-butanol) e ao emprego da coluna de troca catiônica (IRC-50), pois foram os procedimentos que mais causaram degradação do AC.

Por esse motivo foram direcionados esforços em outros experimentos que pudessem tornar o AC mais estável, desacelerando a sua degradação. Assim optou-se por estudar as reações de precipitação e a reação de formação de um éster.

5.4 Avaliação das reações descritas em literatura e estabelecimento de metodologia para precipitação do clavulanato de potássio

5.4.1 Reação de formação de um éster

Nessa reação estudada ocorreu a formação do éster do ácido clavulânico conforme citado na patente Box (1978), mas em pequena quantidade. Este foi identificado por CCD, através do revelador ácido fosfomolibdico. Após transcorrida a primeira hora de reação, a presença de AC no meio reacional pareceu se manter constante, mesmo após transcorridas duas horas.

A patente Box (1978) cita como reagente de esterificação o brometo de benzila, no entanto, no experimento foi utilizado o cloreto de benzila, pois o brometo não estava disponível no laboratório, assim como outros reagentes para tal finalidade e que são controlados, como é o caso do iodeto de metila. A importação desses reagentes altamente reativos é muito complicada, por causa da legislação vigente, no intuito de garantir que esses produtos não sejam destinados a outros fins que não a pesquisa científica.

Além disso, a tentativa de se trabalhar com o cloreto de benzila trouxe certos inconvenientes durante a manipulação do meio reacional, devido às propriedades organolépticas do reagente.

Assim, pelos motivos expostos, decidiu-se optar por outro tipo de reação.

5.4.2 Reação com a trietilamina

A reação com a trietilamina não ocorreu, embora tenham sido reproduzidas as condições descritas pela patente Cook e Wilkins (1993). Também não foi observado formação de nenhum outro precipitado para as condições utilizadas.

Para essa reação com a trietilamina, o rendimento citado pela patente era de apenas 27%. Um rendimento muito baixo quando comparado aos descritos com a reação para outras aminas. As patentes Cook *et al.* (1987) e Capuder, (2001) descreveram rendimentos de até 80% para a reação do AC com outras aminas. Assim decidiu-se optar em experimentos

futuros por uma amima que apresentasse um maior peso molecular em relação a trietilamina, visando promover a reação de precipitação.

5.4.3 Precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio - ensaios preliminares

Inicialmente, muitos experimentos de precipitação realizados não formavam precipitados cristalinos, que eram esperados para o sal do ácido clavulânico (clavulanato de potássio), mas um óleo marrom de aspecto viscoso que era simplesmente o próprio AC na sua forma de ácido. Foi através desses experimentos que se observou a grande influência da água presente na fase orgânica da etapa de extração, para a reação de precipitação do AC.

A patente Capuder (2001) descreveu que quando há presença de água na etapa de precipitação, mais propriamente no solvente orgânico utilizado, ocorre a formação de um precipitado marrom, altamente viscoso (óleo). Por esse motivo solventes nos quais a água possua uma grande solubilidade devem ser evitados, como é o caso do n-butanol, no qual a porcentagem de água solúvel é de 20,5% (em peso) contra apenas 3,3% (em peso) para o acetato de etila (MORITA e ASSUMPÇÃO, 1981). Essas patentes sugerem ainda a adição de um agente secante como o cloreto de cálcio ou o sulfato de magnésio, na fase orgânica após realizada a extração, para permitir a retirada de toda água presente.

Assim foi adotado esse procedimento para os experimentos seguintes, realizados com acetato de etila, nos quais se pôde observar em alguns casos, a precipitação do clavulanato de potássio na sua forma cristalina.

É importante ressaltar que ainda foram realizados experimentos utilizando o n-butanol, nas mesmas condições utilizadas para o acetato de etila, e em nenhuma delas ocorreu a precipitação do AC, seja na sua forma cristalina ou na de óleo. Acredita-se que a secagem desse solvente não é suficiente apenas utilizando-se um agente secante, devido a grande quantidade de água que aí consegue se solubilizar. Uma vez que o AC possui uma solubilidade muito elevada em água, qualquer traço desta seria suficiente para promover sua solubilização, inviabilizando dessa forma a reação de precipitação.

Na Tabela 5.4.1 estão mostrados os resultados obtidos para as reações preliminares de precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio. Foram analisados para os precipitados obtidos a presença de incrustação nas paredes do recipiente utilizado, a coloração dos mesmos e a presença de AC através de uma das técnicas, CCD ou RMN-¹H. A

concentração inicial de AC no solvente orgânico (Conc. de AC) foi novamente apresentada na Tabela 4.4 no intuito de facilitar a análise dos resultados obtidos.

Tabela 5.4.1 – Resultados obtidos para os ensaios preliminares de precipitação do AC com o 2-etil.

Experimentos Origem da mostra	Conc. de AC (mg/mL)	Presença de AC	Coloração	Técnica utilizada	Incrustação
1A- clav/celulose	3,7	Não	Branco	RMN- ¹ H	Não
2A- clav/celulose	6,9	Sim	Amarelo	CCD	-
*3A- clav/celulose	16,7	Sim	Branco	CCD	Não
4A- Clavulin®	5,1	Sim	Branco	RMN- ¹ H	Não
5A- Clavulin®	5,1	Sim (óleo)	-	CCD	-
6A- Clavulin®	22,5	Sim	Branco	CCD	Sim

*este experimento foi ainda concentrado em evaporador rotativo após terminada a fase de precipitação.

Para o primeiro ensaio de precipitação realizado (1A) a análise do espectro de RMN-¹H mostrou que não havia sinais de AC no precipitado obtido. Provavelmente a baixa concentração do AC no solvente orgânico (3,7mg/mL) impossibilitou a precipitação do mesmo. Assim decidiu-se aumentar a sua concentração para o próximo experimento. O aumento da concentração favoreceu a reação de precipitação, ocorrendo a formação, no ensaio 2A, de um precipitado de amarelo intenso que com o passar do tempo tornou-se óleo. A análise em CCD mostrou que óleo obtido era o próprio ácido clavulânico (em sua forma de ácido).

Assim para o ensaio 3A, a concentração do AC foi novamente aumentada (16,7mg/mL) e obteve-se um precipitado branco que não pôde ser filtrado por ser muito fino. A solução-mãe foi então submetida a um processo de evaporação de solvente, na tentativa de forçar a aglomeração dos cristais formados, mas que resultou na formação de uma incrustação nas paredes do balão de vidro do evaporador rotativo. Observou-se assim que a formação desses pequeninos cristais estava associada a uma nucleação muito rápida, devido a elevada concentração tanto do AC como do 2-etil.

Dessa maneira verificou-se que a concentração do AC no solvente estaria interferindo na reação de precipitação estudada. A dificuldade encontrada residia no fato de se avaliar o quanto, e se era somente a concentração, a única variável a interferir no processo, uma vez que não há nenhuma informação neste sentido, pois não há nenhum artigo publicado em literatura.

Optou-se em realizar experimentos de precipitação para o AC proveniente do Clavulin®, para se conseguir avaliar o que poderia vir a acontecer quando se utiliza um meio

mais complexo, ou seja, com a presença de outras substâncias. Porém, ainda não tão complexo quanto o caldo de fermentação, uma vez que não se conhecia bem ainda quais eram as variáveis e como elas estavam interferindo na reação de precipitação. Por esse motivo optou-se por realizar o experimento 4A mantendo a concentração de AC próxima de 5,0mg/mL.

Para o ensaio 4A, a reação de precipitação ocorreu de maneira desejada, sendo obtido um precipitado de coloração branca e livre de incrustação, que foi analisado por RMN-¹H (Figura 5.4.1). Através dessa análise verificou-se que o clavulanato de potássio obtido apresentava elevada pureza, sem a presença dos sinais característicos para a amoxicilina, (que estão representados na Figura 5.4.2), e dos sinais de produto de degradação da amino cetona (mostrados previamente na Figura 5.1.1). Deve-se ressaltar que o AC proveniente do Clavulin® contém muito mais substâncias que poderiam interferir na reação de precipitação além da própria amoxicilina, presente no medicamento em quantidade 4 vezes superior a de AC.

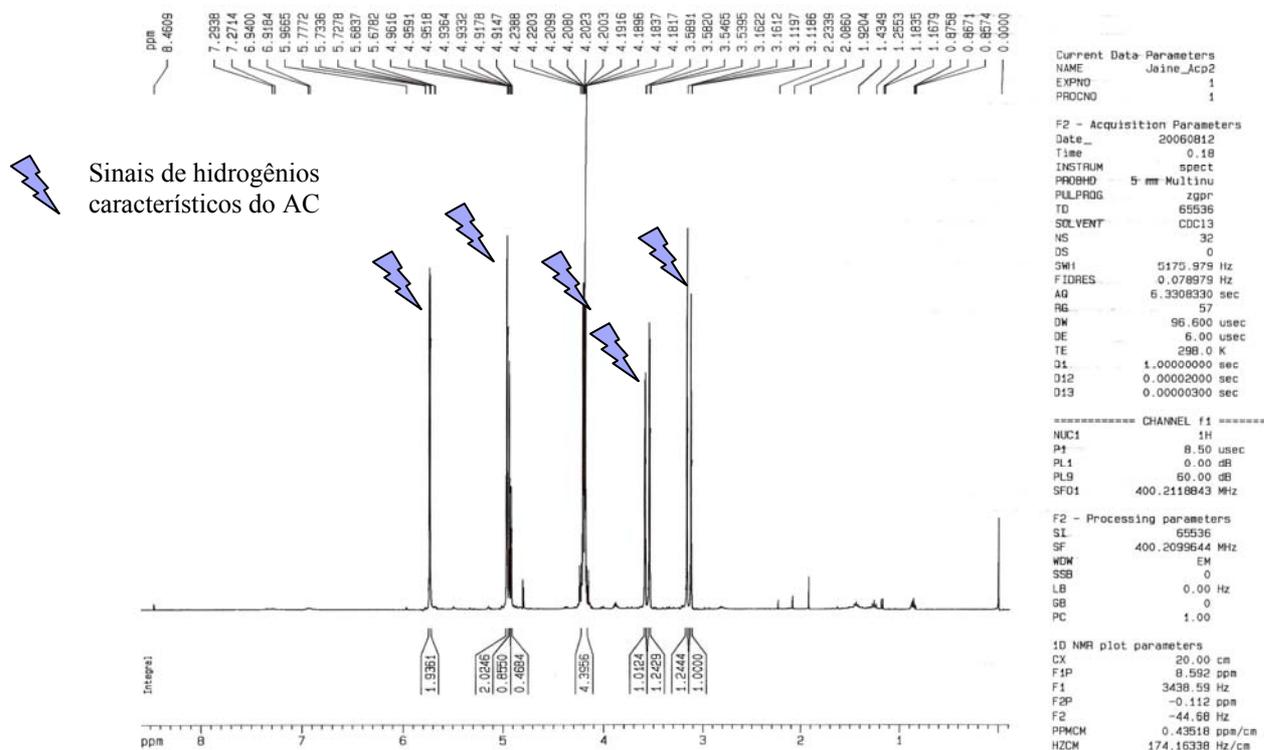


Figura 5.4.1 - Espectro de RMN-¹H do clavulanato de potássio precipitado, obtido no ensaio 4A - Clavulin®, sem traços de amoxicilina.

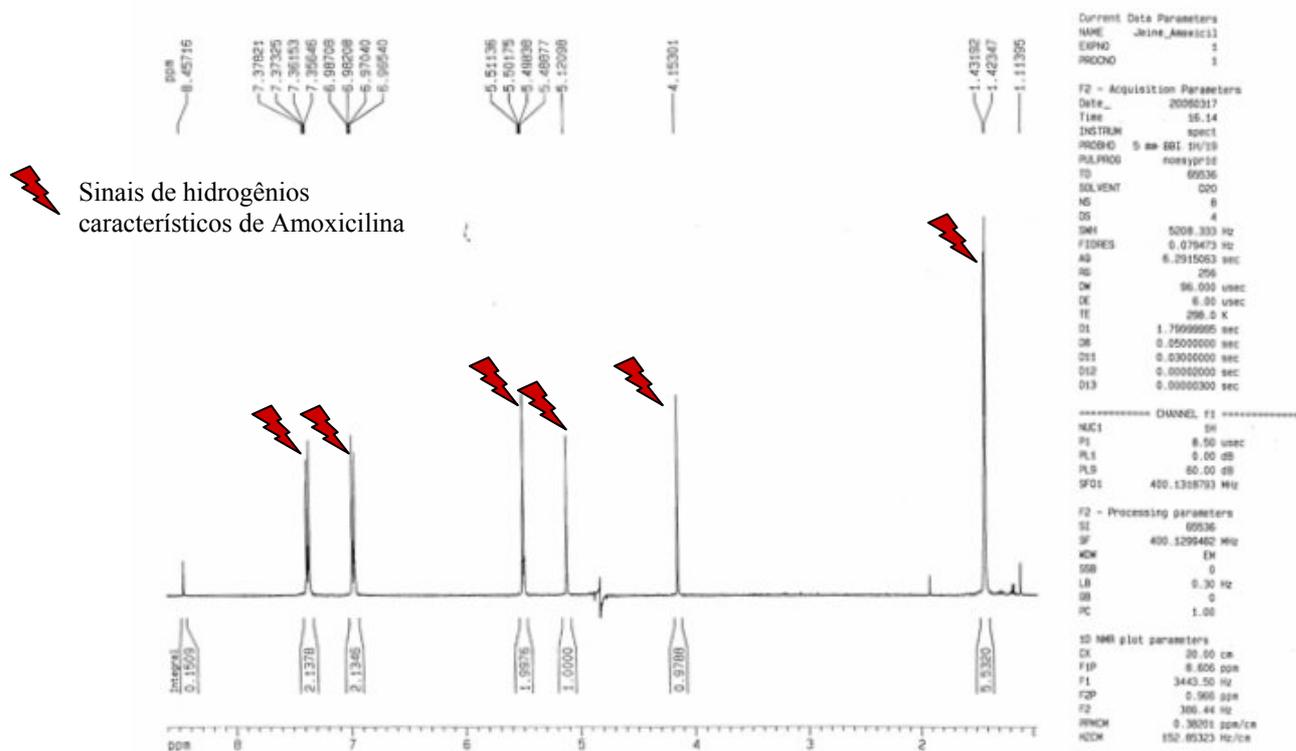


Figura 5.4.2 - Espectro de RMN-¹H para amoxicilina pura.

O ensaio 5A foi realizado na tentativa de se reproduzir o bom resultado obtido no experimento anterior (4A), porém sem sucesso. Houve a formação do óleo, indicando que a reação havia desestabilizado. Notou-se então a possível influência de outra variável; a quantidade adicionada de 2-etil. Para o experimento anterior (4A) apenas algumas gotas de 2-etil foram utilizadas, com auxílio de uma pipeta Pasteur, enquanto que para o ensaio 5A, foi utilizado 1mL (bureta). As patentes Yang *et al.* (1994) e Kim *et al.* (1995) descreveram que a quantidade a ser adicionada de 2-etilexanoato deveria ser na proporção estequiométrica de 1:1,5 de AC para a de 2-etil, ou seja sempre com excesso de 2-etil. Assim surgiu a necessidade de se realizar os cálculos estequiométricos para conhecer previamente qual o volume necessário de 2-etil que deveria ser adicionado para garantir a proporção de 1:1,5. Anteriormente, a adição deste era realizada até que ocorresse a formação de um precipitado (ou óleo), baseando-se apenas em aspectos visuais.

Posteriormente, observando os resultados obtidos acima e com a realização de alguns experimentos para a etapa de otimização da reação de precipitação direta (R₀), foi verificado que a melhor proporção para que ocorresse a reação de precipitação de maneira satisfatória, era a de 1:1 e não de 1:1,5 como apresentado pelas patentes acima. Quando era

adicionado 2-etilexanoato de potássio em excesso, ocorria a instabilidade da reação e o precipitado formado se transformava em óleo.

Um exemplo desse fato foi a observação realizada para o ensaio 2A, no qual se iniciou a precipitação do clavulanato de potássio, mas que terminou com a formação de um óleo marrom. Nesse ensaio a concentração de AC no solvente (6,9mg/mL) já era adequada para que ocorresse a correta precipitação do AC na forma de sal (conforme verificado pelo ensaio 4A, no qual a concentração era de 5,1mg/mL). Entretanto observando a Tabela 4.4.1 (Procedimento Experimental), verificaremos que o volume adicionado de 2-etil foi de 6mL, e pela estequiometria (1:1) o volume necessário seria de apenas, 0,33mL (2,5 molar). Desse modo, o excesso de 2-etil adicionado desestabilizou a reação.

Para o ensaio 6A optou-se por aumentar a concentração do AC e diminuir a concentração do 2-etil, na tentativa de tornar a etapa de nucleação mais lenta, para que não ocorresse a formação de muitos cristais de tamanho pequeno (como observado para o ensaio 3A). Com sucesso, foi obtido um precipitado branco que ficou parcialmente aderido ao vidro do recipiente (incrustação). A análise em CCD confirmou a presença de AC no precipitado, identificando-se assim a influência de mais uma variável para a reação estudada; a concentração de 2-etil.

Pelos resultados obtidos das amostras provenientes do medicamento Clavulin® concluiu-se que o procedimento de purificação adotado, a extração (acetato de etila) seguida da reação de precipitação foi altamente eficiente. A seletividade do solvente frente à amoxicilina aliada à baixa solubilidade da água neste, contribuíram de maneira fundamental para que a reação de precipitação ocorresse com a formação de clavulanato de potássio com elevada pureza.

Posteriormente, foi possível a adoção desse método para a realização dos ensaios de otimização das reações de precipitação estudadas (planejamento fatorial), garantindo assim a reprodutibilidade dos resultados, a disponibilidade do AC (Clavulin®) e ainda um baixo custo para a realização dos ensaios.

De uma maneira geral, os experimentos realizados foram importantes para a verificação da validade da reação de precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio, e também para se identificar algumas variáveis que interferem na reação descrita. Mais tarde, o volume a ser adicionado de 2-etilexanoato fixou-se definitivamente na proporção estequiométrica de 1:1 de AC para a de 2-etil e as variáveis concentração do AC no solvente orgânico e concentração molar do 2-etilexanoato foram melhor avaliadas (dentre outras) com o auxílio de uma estratégia seqüencial de planejamentos.

5.4.3.1 Ensaio para o caldo de fermentação

Para o caldo de fermentação foram realizados alguns experimentos com o intuito de se obter a precipitação do clavulanato de potássio, entretanto para muitos deles não houve a formação do precipitado desejado. Após a fermentação estes caldos haviam sido congelados em ultrafreezer a -70°C e assim permaneceram estocados por alguns meses, antes de se iniciar o trabalho de purificação e precipitação. Nessas condições a concentração de AC sempre se apresentava muito abaixo do esperado, isto é, bem inferior aos valores das concentrações obtidos logo após o término da fermentação ou ultrafiltração.

Houve a necessidade de um planejamento em relação à estocagem e ao trabalho de purificação. Optou-se por trabalhar a purificação do caldo micro ou ultrafiltrado logo após sua fermentação, evitando assim a degradação do AC.

Na Tabela 5.4.2 estão mostrados os resultados obtidos para as reações preliminares de precipitação utilizando o AC presente no caldo de fermentação com o 2-etilexanoato de potássio. Foram analisados para os precipitados obtidos a presença de incrustação nas paredes do recipiente utilizado, a coloração dos mesmos e a presença de AC através de uma das técnicas, CCD ou RMN- ^1H . A concentração inicial de AC no solvente orgânico (Conc. de AC) foi novamente exibida na Tabela 5.4.2 no intuito de facilitar a análise dos resultados obtidos.

Tabela 5.4.2 – Resultados obtidos para os ensaios preliminares para a precipitação do AC do caldo de fermentação.

Experimentos Origem da mostra	Conc.de AC (mg/mL)	Presença de AC	Coloração	Técnica utilizada	Incrustação
1C- caldo de fermentação	0,5	Não	Amarelo	RMN- ^1H	Não
2C- caldo de fermentação	3,5	Sim (óleo)	Marrom	CCD	-
3C- caldo de fermentação	5,5	Sim	Marrom	RMN- ^1H	Não

Na primeira tentativa de precipitação (ensaio 1C) houve a formação de uma substância que pela análise do espectro de RMN- ^1H (Figura 5.4.3) verificou-se que não era o clavulanato de potássio, pois não havia sinais dos hidrogênios do AC no espectro. Isso pode ter ocorrido devido à concentração do AC estar muito baixa no meio de fermentação utilizado (65,2mg/L), fazendo com que a concentração do AC no solvente (0,5mg/mL), mesmo após sua concentração ficasse abaixo da que era esperada.

Acredita-se que esta reduzida concentração possibilitou que outras substâncias (impurezas) ainda presentes no meio de fermentação concorressem com o AC, reagindo com o 2-etil ao invés dele. Nesse sentido aplicaram-se as providências com relação ao tempo de estocagem para se trabalhar com o caldo de fermentação (descritas anteriormente).

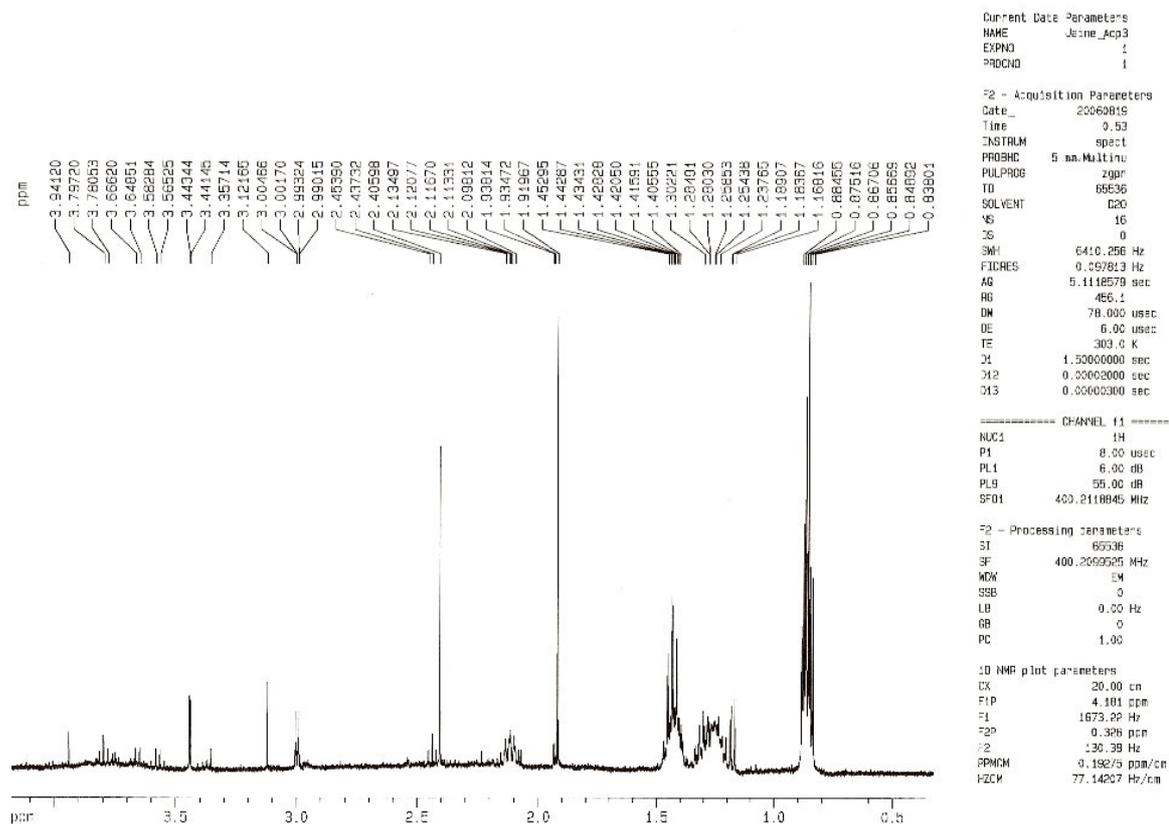


Figura 5.4.3 - Espectro de RMN-¹H de uma(s) substância(s) diferente(s) do AC, obtido no ensaio 1C - caldo de fermentação.

Para o segundo ensaio (2C), com uma maior concentração de AC no caldo (210,3mg/L), ocorreu a formação de um óleo de coloração marrom, que a análise em CCD mostrou se tratar do próprio AC. Acredita-se que essa formação de óleo estaria associada à baixa concentração do AC no solvente (3,5mg/mL), pois esta ainda permanecia abaixo da concentração na qual foi obtido o clavulanato de potássio com elevada pureza, ou seja, de 5,1 mg/mL, para o ensaio 4A anteriormente realizado (a partir da amostra com Clavulin®).

No terceiro ensaio realizado (3C), partindo-se de uma concentração inicial de AC no caldo em torno de 466,7mg/L, ocorreu finalmente a formação de um precipitado marrom escuro, que através da análise do espectro de RMN-¹H (Figura 5.4.4), foi possível a

identificação dos sinais característicos do AC, porém juntamente com a presença muitos outros sinais de impurezas.

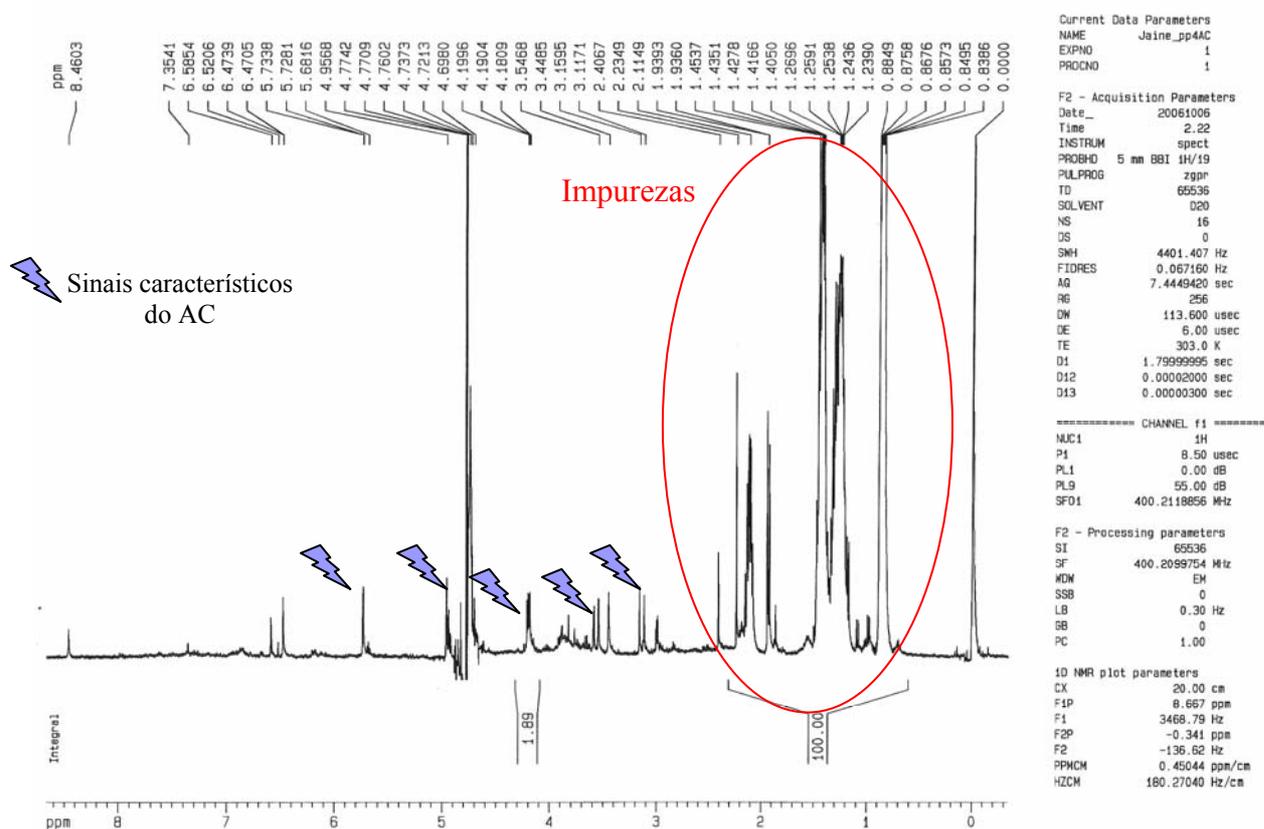


Figura 5.4.4 - Espectro de RMN-¹H do clavulanato de potássio precipitado, obtido no ensaio 3C - caldo de fermentação.

Ainda pode-se observar pelo espectro da Figura 5.4.4, que a intensidade dos sinais obtidos para as impurezas é maior do que a para os sinais de AC identificados. Isso significa que é muito grande a quantidade de impurezas que precipitaram juntamente com o clavulanato.

É preciso salientar de que ocorreu uma certa purificação do caldo, porém não na intensidade esperada. Pode-se verificar a purificação efetuada pelo emprego da etapa de extração com acetato de etila seguida pela etapa de precipitação, quando se compara o espectro de RMN-¹H obtido acima (Figura 5.4.4) com o espectro obtido para o mesmo caldo de fermentação que sofreu apenas a micro e ultrafiltração (Figura 5.4.5).

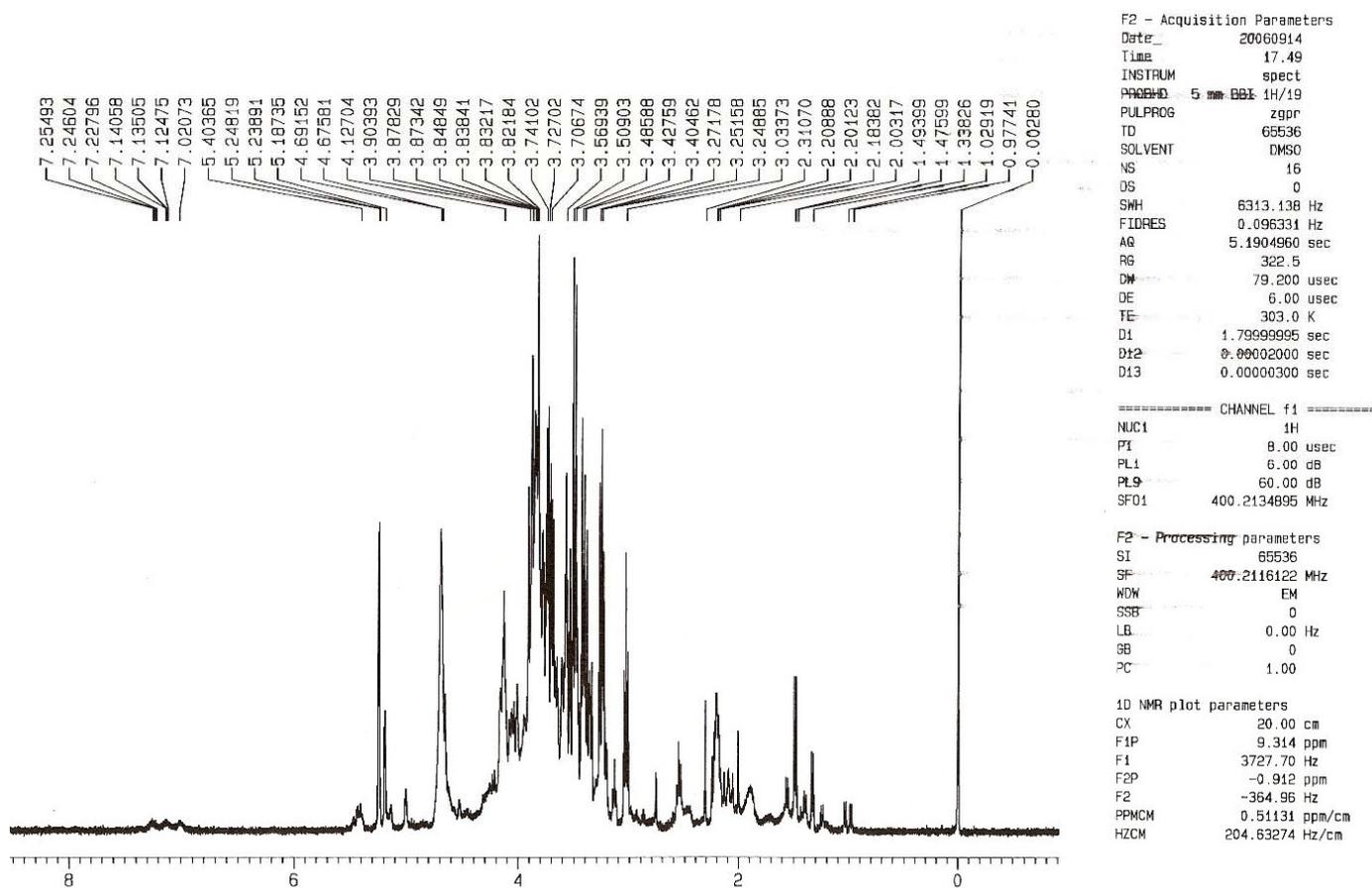


Figura 5.4.5 - Espectro de RMN- ^1H obtido para o caldo de fermentação após a ultrafiltração.

Pela análise do espectro da Figura 5.4.5 foi possível verificar uma grande quantidade de sinais de grande intensidade, provenientes das muitas impurezas que ainda se encontravam presentes após a etapa de ultrafiltração do caldo de fermentação. Assim concluiu-se que a metodologia empregada era adequada para ser utilizada na purificação do AC do caldo, mas que ainda era necessário melhorar as etapas de purificação que antecedem a de precipitação, propiciando que o clavulanato de potássio precipitado estivesse com uma pureza elevada, ou seja, apropriado para ser diretamente empregado na fabricação do medicamento.

5.4.3.2 Precipitação do clavulanato de potássio com a passagem por um intermediário estável

Visando melhorar as etapas de purificação que antecedem a etapa de precipitação para o caldo de fermentação, e também conferir ao AC maior estabilidade em sua manipulação, diminuindo assim a sua degradação durante essas etapas, foi selecionada, dentre outras aminas descritas em um grande número de patentes, a t-octilamina.

A seleção da reação de precipitação do AC com a t-octilamina baseou-se na vantagem proporcionada pela formação um intermediário de alta estabilidade (sal de amina do ácido clavulânico), possibilitando seu isolamento e sua posterior conversão em clavulanato de potássio (etapa final), com uma pureza muito elevada. Quando comparada a outras aminas, a t-octilamina apresenta além da formação de um intermediário não higroscópico, a vantagem de não gerar intermediários tóxicos durante a reação de precipitação (YANG *et al.*, 1994). Estes são muito difíceis de serem posteriormente separados do clavulanato de potássio, inviabilizando dessa maneira, a utilização destas reações para fins farmacêuticos.

Na Tabela 5.4.3 estão mostrados os resultados obtidos para as reações preliminares de precipitação do AC com a t-octilamina. Para os precipitados obtidos foram analisados a presença de incrustação nas paredes do recipiente utilizado, a coloração dos mesmos, o rendimento (Y) e a presença do sal de amina do AC através de uma das técnicas, CCD ou RMN-¹H.

Tabela 5.4.3 – Resultados obtidos para os ensaios preliminares da reação de precipitação do sal de amina do AC.

Experimentos Origem da mostra	Presença do sal de amina do AC	Coloração	Técnica utilizada	Y(%)	Incrustação
1T- clav/celulose	Sim	Branca	CCD	33,1	Não
2T- clav/celulose	Sim	Branca	RMN- ¹ H	84,7	Não

Foi observado que não houve a formação de incrustação em nenhum dos dois ensaios realizados. O precipitado obtido era cristalino e possuía a coloração branca em ambos os experimentos.

Para o ensaio 1T foi obtido um baixo rendimento de 33,1%. Após término do ensaio, descobriu-se que a quantidade de amina adicionada (0,15mL) não era suficiente para garantir a relação estequiométrica 1:1 (de AC para Amina), o que provavelmente levou a um baixo rendimento por falta de reagente. O ideal seria ter sido adicionado um volume de amina de 0,24mL. A análise realizada por CCD mostrou que havia AC no precipitado obtido. Para comprovar se que realmente houve falta de reagente foi realizado o ensaio 2T agora com o volume adequado para que ocorresse toda a reação de AC presente no solvente orgânico com a t-octilamina.

No ensaio 2T foi obtido um rendimento elevado de 84,7% para esta etapa, que foi calculado através da estequiometria para a reação do AC com a t-octilamina e considerando

que apenas 45% da massa inicial de AC migrou para o solvente orgânico, na etapa de extração (pela Tabela 5.2.1 mostrada anteriormente).

O precipitado foi analisado por RMN-¹H (Figura 5.4.6) e o espectro obtido confirmou a presença do sal de amina do AC, sem a presença de produtos de degradação (amino cetona), que estava presente na amostra utilizada (clavulanato/celulose).

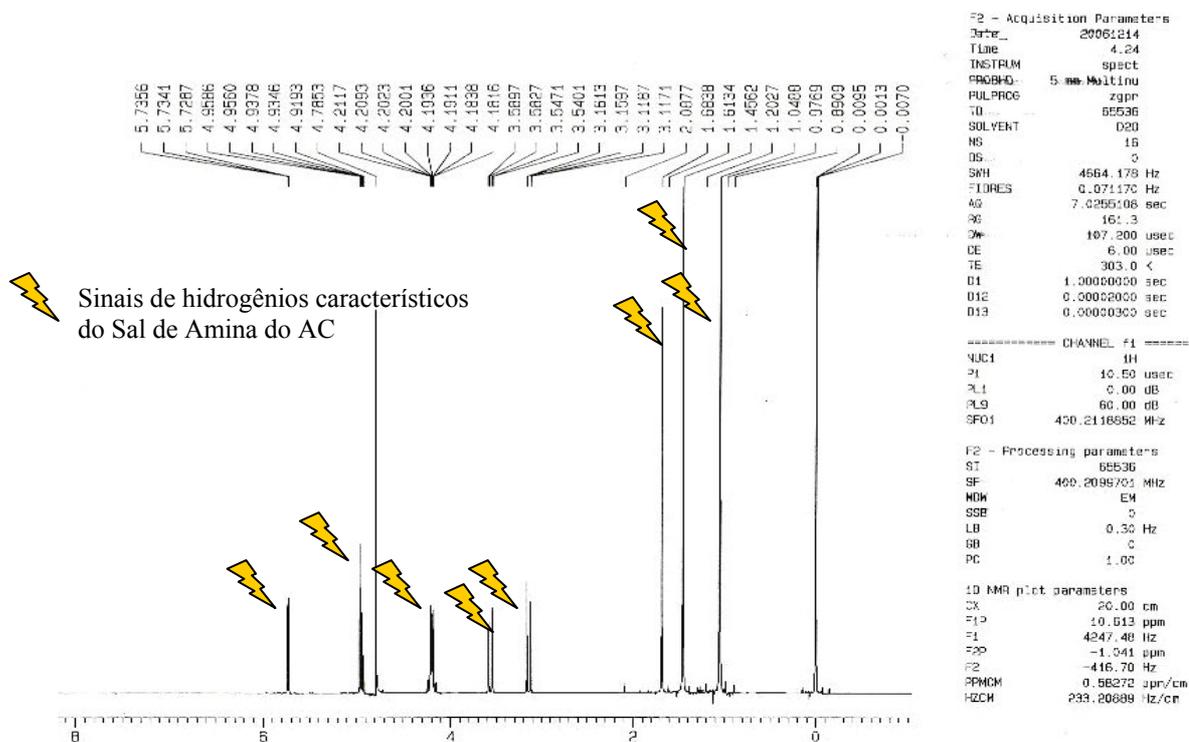


Figura 5.4.6 - Espectro de RMN-¹H obtido para a reação do AC com a t-octilamina, obtido no ensaio 2T – clav/celulose.

O resultado obtido para o ensaio 2T foi muito animador, pois além do rendimento elevado, os cristais formados apresentaram uma estabilidade muito grande e baixa higroscopia quando comparados aos cristais de clavulanato de potássio. Uma amostra do precipitado obtido e uma amostra do clavulanato de potássio (amostra clav/celulose), foram deixadas sobre a bancada por um período de 24 horas, a temperatura ambiente, e depois foram analisadas e fotografadas com ampliação de 1000X no microscópio óptico (Olympus modelo BX60) instalado no Laboratório de Controle Ambiental 1 do DEQ (UFSCar).

Na Figura 5.4.7 pôde-se observar que o precipitado da reação com a t-octilamina após transcorridas as 24 horas continuava estável e cristalino. Os cristais possuíam a forma de plaquetas, e em alguns casos as plaquetas se agrupavam de tal maneira formando rosetas (à direita da Figura 5.4.7).

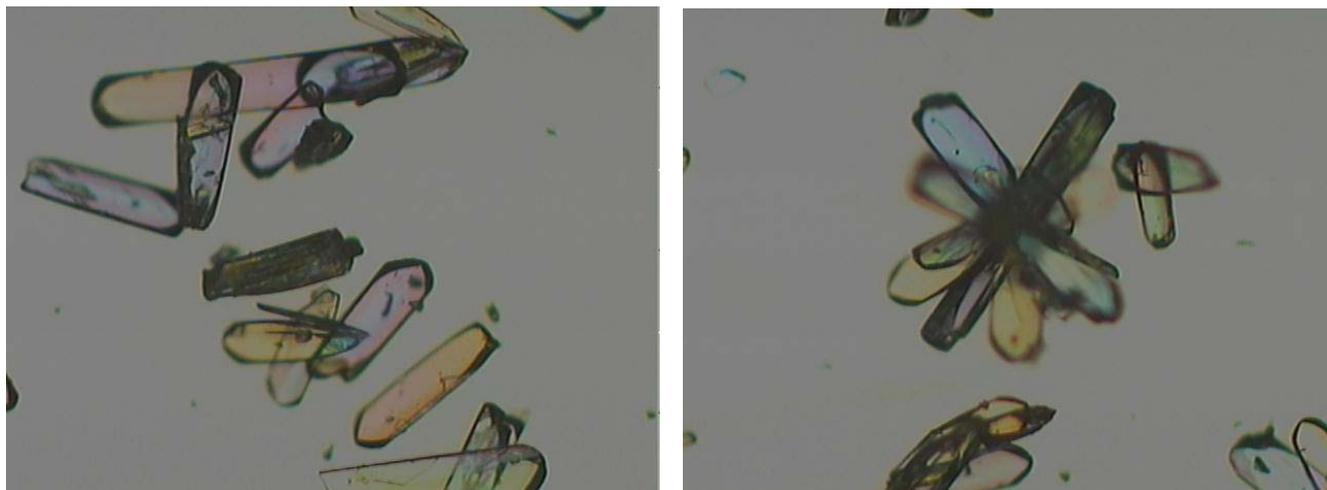


Figura 5.4.7 – Cristais do sal de amina do AC, obtidos na reação de precipitação do AC com a t-octilamina. Na foto à direita uma roseta formada por várias plaquetas unidas.

Para a amostra clavulanato/celulose após 24 horas, houve a formação de gotículas de óleo, indicando que o clavulanato de potássio mesmo com a presença da celulose, absorveu água da atmosfera e se transformou em ácido clavulânico. Na Figura 5.4.8 estão mostradas as fotos obtidas.

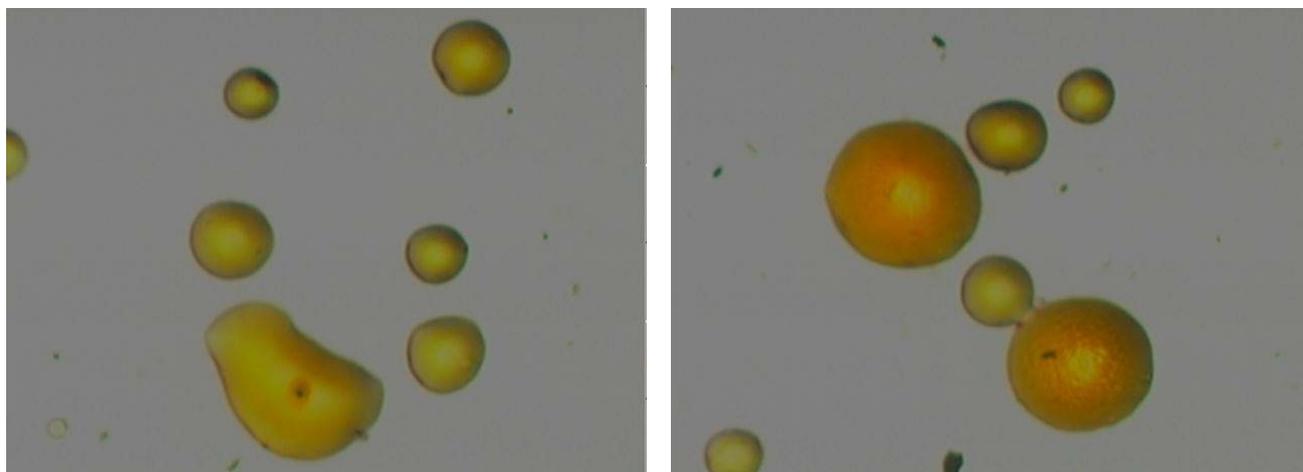


Figura 5.4.8 – Gotículas de óleo formadas após 24 horas de exposição da amostra clavulanato/celulose à temperatura ambiente.

Os cristais de sal de amina do AC formados ainda permaneceram expostos a temperatura ambiente por cerca de um mês após transcorrida essa análise e continuaram estáveis, sendo descartados sem que nenhuma mudança fosse observada neste período.

O sal de amina do AC, formado na reação anterior (t-octilamina com o AC), foi posteriormente reagido com o 2-etil para a precipitação do clavulanato de potássio. Foi obtido

nesta etapa um rendimento de 74,6%. A análise em RMN-¹H (Figura 5.4.9) confirmou a presença de AC no precipitado. A pureza obtida do clavulanato de potássio foi elevada, confirmando que a reação é adequada para ser utilizada como a etapa final do processo de purificação do AC.

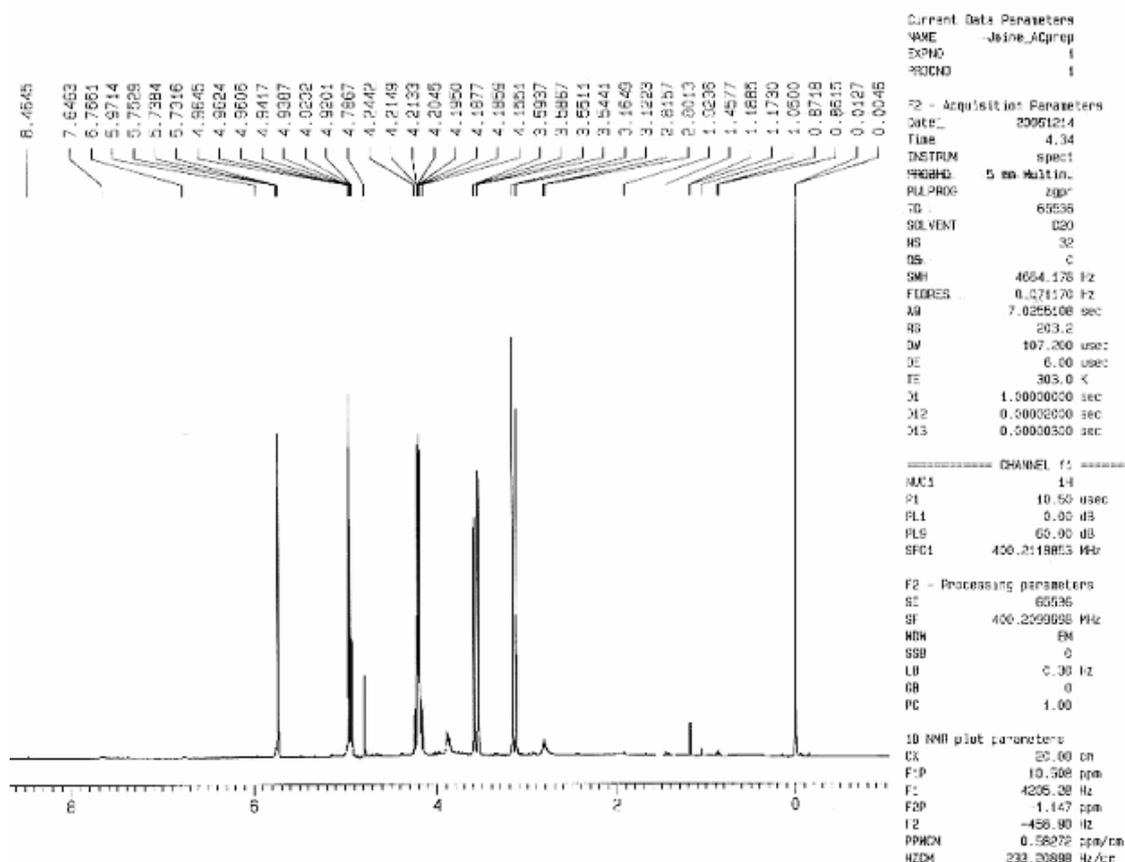


Figura 5.4.9 - Espectro de RMN-¹H obtido para a reação do sal de AC com o 2-etil, com a precipitação do clavulanato de potássio a partir do ensaio 2T (clav/celulose).

Através dos ensaios preliminares realizados para a precipitação do AC em clavulanato de potássio verificou-se a existência de muitas vantagens no emprego da etapa de precipitação ser a etapa final do processo de purificação do AC proveniente do caldo de fermentação, tais como:

- A obtenção de um produto, que após filtração está pronto para entrar na fabricação do medicamento;
- Não há necessidade de liofilização, nem evaporação de solvente, não permitindo desta maneira, que haja a degradação do produto final já com pureza adequada;
- Garantia de qualidade do produto final;

- Economia de energia quando comparada às técnicas que requerem liofilização ou evaporação de solventes.

5.5 Otimização das reações de precipitação

Pelos ensaios preliminares realizados para as reações de precipitação, foi observado que existia a necessidade de se estudar em maiores detalhes as variáveis que influenciaram estas reações, visando obter o clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação com elevado rendimento e pureza.

Para a realização desse estudo foi selecionado o planejamento fatorial. A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX *et al.*, 1978 *apud* RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Desse modo partiu-se do AC proveniente do medicamento Clavulin®, (pelas vantagens já apresentadas, tais como a garantia de reprodutibilidade dos resultados, a disponibilidade do AC e ainda um baixo custo para a realização dos ensaios) após a etapa de extração com acetato de etila (devido à sua seletividade e da baixa solubilidade da água neste solvente).

5.5.1 Reação direta de precipitação do AC (R_0)

Na Tabela 5.5.1 estão os resultados obtidos para o rendimento (Y) através reação direta do AC com o 2-etilexanoato de potássio (R_0), a presença ou não de incrustação nas paredes ou fundo do reator e na hélice do agitador (Incr.) e o estado da solução-mãe após filtração em filtros de papel (Sol.-mãe). Foi utilizado um esquema de um fatorial fracionado 2^{4-1} , incluindo 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios para avaliação das variáveis; temperatura (Temp.), concentração de AC (Conc. de AC), concentração de 2-etil (Conc. de 2-etil) e vazão de adição do 2-etil (vazão de 2-etil).

Tabela 5.5.1 – Valores codificados e reais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento (Y).

Ensaio	Temp (°C)	Conc. de AC (mg/ml)	Conc. de 2-etil (molar)	Vazão de 2-etil (gota/min)	Y (%)	Incr.	Sol.-mãe
1	-1 (8)	-1 (5)	-1 (0,5)	-1 (0,5)	30,00	Sim	Turva
2	1 (22)	-1 (5)	-1 (0,5)	1 (1)	27,62	Não	Turva
3	-1 (8)	1 (25)	-1 (0,5)	1 (1)	46,87	Pouco	Límpida
4	1 (22)	1 (25)	-1 (0,5)	-1 (0,5)	11,15	Sim muito	Límpida
5*	-1 (8)	-1 (5)	1 (2)	1 (1)	0,00	Óleo	-
6	1 (22)	-1 (5)	1 (2)	-1 (0,5)	46,69	Sim muito	Límpida
7	-1 (8)	1 (25)	1 (2)	-1 (0,5)	46,23	Sim muito	Límpida
8	1 (22)	1 (25)	1 (2)	1 (1)	32,44	Sim	Turva
9	0 (15)	0 (15)	0 (1,25)	0 (0,75)	37,88	Sim	Turva
10	0 (15)	0 (15)	0 (1,25)	0 (0,75)	35,75	Sim muito	Límpida
11	0 (15)	0 (15)	0 (1,25)	0 (0,75)	37,10	Sim muito	Límpida

* este ensaio foi repetido por três vezes, resultando sempre em óleo.

Observando a Tabela 5.5.1 podemos notar que na maioria dos ensaios ocorreu a incrustação, e que para alguns pontos esta ainda é mais severa. Quando se tenta retirar com uma espátula a incrustação formada nas paredes do reator, por exemplo, o simples atrito com os cristais é suficiente para fazer que retornem à forma de óleo, perdendo-se assim o produto final desejado, que seria o AC na sua forma de sal, (mais especificamente o clavulanato de potássio), e inviabilizando desta maneira a utilização deste composto no medicamento. Ainda nesses casos, existe a possibilidade de perda total do produto que voltou ao estado de óleo, uma vez que este para ser reaproveitado, terá que ser novamente diluído em água e refeito todo o processo anterior gerando muitas perdas, tanto de ordem econômica, pois significa gastos de energia, quanto de tempo, favorecendo a degradação do AC. Não se pode esquecer ainda, que a água exerce uma influência muito grande nas reações de precipitação e que a presença de apenas algumas gotas desta dentro do reator poderia inviabilizar toda a reação de precipitação. Disto decorre a dificuldade de se reaproveitar o AC que se tornou óleo durante a precipitação.

Pretende-se demonstrar com isso, que os pontos desejáveis são aqueles em que o rendimento seja elevado, mas com o mínimo de incrustação possível, que não haja a formação de óleo e ainda que a solução após filtração esteja límpida. Uma solução turva, na qual não há

decantação, mostra a formação de uma solução coloidal, na qual a supersaturação foi elevada, propiciando uma nucleação muito rápida e a formação de muitos núcleos de cristais, mas de tamanhos muito pequenos, que são instáveis e que também não servem para serem utilizados no medicamento como produto final, pois se tornariam óleo se essa solução coloidal fosse filtrada em poros muito menores.

Assim, pela Tabela 5.5.1, dentre todos os ensaios, o de número 3 é o que melhor preenche os quesitos desejados para esta etapa de precipitação. O seu rendimento foi o maior obtido (46,87%) e quando comparado com os ensaios 6 e 7 (46,69 e 46,23% respectivamente) que também apresentaram um rendimento semelhante, possui a vantagem de gerar um produto com menor incrustação do que esses últimos.

A Tabela 5.5.2 apresenta os efeitos dos fatores sobre o rendimento.

Tabela 5.5.2 – Estimativa dos efeitos para o rendimento (%) de clavulanato de potássio.

	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	Lim. de Conf. -90%	Lim. de Conf. 90%
Média	31,98	5,45	5,87	0,0011	21,39	42,56
Temp. (°C)	-1,30	12,77	-0,10	0,9223	-26,12	23,52
Conc. de AC (mg/ml)	8,10	12,77	0,63	0,5496	-16,73	32,92
Conc. de 2-etil (molar)	2,43	12,77	0,19	0,8554	-22,39	27,25
Vazão de 2-etil (gota/minuto)	-6,79	12,77	-0,53	0,6144	-31,61	18,04

Embora os resultados não apresentem variáveis estatisticamente significativas (Tabela 5.5.2), e o valor do erro padrão seja maior do que os valores dos efeitos, um olhar mais atento nos mostra que o processo está sob controle, pois os valores encontrados para os pontos centrais estão próximos, significando que o erro puro é muito baixo ($\pm 0,88$). Entretanto no ensaio 5 foi obtido um rendimento de 0,0 %, e isto com certeza prejudicou a análise estatística levando conseqüentemente a um erro padrão elevado, conforme encontrado. Contudo considera-se que o delineamento utilizado foi de grande utilidade para se conhecer realmente algumas condições onde a reação não ocorre da maneira desejada, condições até então desconhecidas. Mesmo não sendo estatisticamente significativos os efeitos das variáveis analisadas, nota-se que estas estão influenciando na estabilidade da reação estudada e por esse motivo decidiu-se continuar os estudos utilizando agora um DCCR.

Analisando os efeitos das quatro variáveis e cruzando com as observações sobre a incrustação e o estado da solução-mãe após filtração (Tabela 5.5.1), foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para três variáveis, (2^3 , incluindo 3

pontos centrais e seis pontos axiais), fixando apenas a temperatura em 22°C. Os valores das variáveis do ponto central basearam-se nas condições anteriores utilizadas para o ensaio 3, exceto para a variável vazão, sendo esta alterada para um valor menor, passando de 1 para 0,75 gota /minuto, na tentativa de promover um incremento no rendimento, uma vez que dois ensaios (6 e 7) apresentaram rendimentos em torno de 46% para baixas vazões de 2-etil (0,5gota/min).

Na Tabela 5.5.3 estão os resultados obtidos para reação direta do AC com o 2-etilexanoato de potássio, utilizando um DCCR para três variáveis. Ainda foi observado para os ensaios a presença ou não de incrustação (nas paredes ou fundo do reator e na hélice do agitador) e o estado da solução-mãe após filtração em filtros de papel (turva ou límpida).

Tabela 5.5.3 – Valores codificados e reais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento.

Ensaio	Conc. de AC (mg/ml)	Conc. de 2-etil (molar)	Vazão de 2-etil (gota/minuto)	Y (%)	Incr.	S-mãe
1	-1(15)	-1 (0,3)	-1 (0,5)	73,89	Sim	Límpida
2	1 (35)	-1 (0,3)	-1 (0,5)	0,00	Óleo	-
3	-1 (15)	1 (0,7)	-1 (0,5)	0,00	Óleo	-
4	1 (35)	1 (0,7)	-1 (0,5)	0,00	Óleo	-
5*	-1 (15)	-1 (0,3)	1 (1)	75,83	Sim	Límpida
6*	1 (35)	-1 (0,3)	1 (1)	0,00	Óleo	-
7	-1 (15)	1 (0,7)	1 (1)	58,59	Sim muita	Límpida
8	1 (35)	1 (0,7)	1 (1)	0,00	Óleo	-
9	-1,68 (8,2)	0 (0,5)	0 (0,75)	57,70	Sim muita	Límpida
10	1,68 (41,8)	0 (0,5)	0 (0,75)	0,00	Óleo	-
11	0 (25)	-1,68 (0,16)	0 (0,75)	16,92	Sim muita	Límpida
12	0 (25)	1,68 (0,84)	0 (0,75)	16,83	Sim muita	Límpida
13	0 (25)	0 (0,5)	-1,68 (0,33)	0,00	Óleo	-
14	0 (25)	0 (0,5)	1,68 (1,17)	51,40	Sim muita	Límpida
15	0 (25)	0 (0,5)	0 (0,75)	0,00	Óleo	-
16	0 (25)	0 (0,5)	0 (0,75)	0,00	Óleo	-
17	0 (25)	0 (0,5)	0 (0,75)	0,00	Óleo	-

*Os ensaios 5 e 6 foram realizados em duplicata. Para o ensaio 5 o valor do rendimento mostrado na tabela acima já é a média dos dois ensaios utilizados.

Pelos resultados obtidos na Tabela 5.5.3 é relevante citar que a alteração da vazão de 1 para 0,75 gota/minuto, (do ensaio 3 da Tabela 5.5.1), utilizada para os pontos centrais da

Tabela 5.5.3 provocou a instabilidade da reação levando à formação de óleo. Isto nos mostra que pequenas alterações nas condições estudadas podem provocar a instabilidade dessa reação de precipitação. Para a vazão, a faixa de estudos ficou muito limitada e dessa maneira pôde-se observar que é muito pequena a faixa de operação que satisfaz as condições necessárias para uma boa precipitação (sem incrustação e alto rendimento) para esta reação direta do AC com o 2-etil.

Na Figura 5.5.1 estão mostradas fotos que foram tiradas do reator encamisado para os ensaios nos quais a reação de precipitação não ocorreu da maneira desejada.

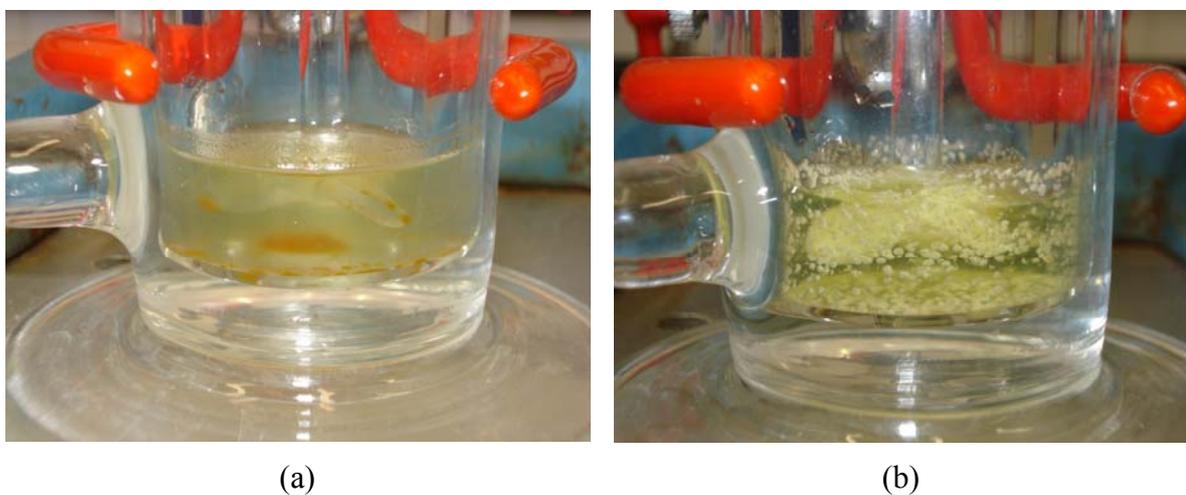


Figura 5.5.1 – Reação direta com o 2-etilexanoato de potássio: (a) Formação de óleo; (b); Formação de incrustação.

Ainda pela Tabela 5.5.3, notamos que agora as soluções coloidais não foram formadas, pois as soluções-mães encontram-se límpidas após a filtração, indicando que a diminuição na concentração do 2-etilexanoato de potássio foi significativa para a diminuição da supersaturação nestas reações. Entretanto a incrustação continuou presente nos ensaios em que houve a formação do precipitado.

Os melhores valores para o rendimento ocorreram para os ensaios 1 e 5, ambos no nível de menor concentração de AC (15mg/mL) e de 2-etilexanoato de potássio (0,3 molar).

Na Tabela 5.5.4 estão apresentados os efeitos dos fatores estudados sobre o rendimento (Y) da reação de precipitação.

É importante salientar que as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,1$) foram a concentração de AC e a vazão do 2-etil, conforme se suspeitava quando foi realizado

o planejamento anterior, entretanto lá, o ensaio 5 (óleo) prejudicou a análise da influência das variáveis.

Tabela 5.5.4 – Coeficientes de regressão para o rendimento de clavulanato de potássio.

	Coef. de regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Lim de Conf. -90%	Lim. de Conf. 90%
Média	-0,05	7,82	-0,01	0,9950	-14,87	14,77
x1 (L)	-22,36	3,67	-6,09	0,0005	-29,32	-15,40
x1 (Q)	10,37	4,04	2,57	0,0372	2,71	18,03
x2 (L)	-6,68	3,67	-1,82	0,1116	-13,64	0,28
x2 (Q)	6,14	4,04	1,52	0,1726	-1,52	13,80
x3 (L)	10,76	3,67	2,93	0,0220	3,80	17,72
x3 (L)	9,26	4,04	2,29	0,0558	1,60	16,92
x1.x2	11,39	4,80	2,37	0,0494	2,30	20,48
x1.x2	-7,57	4,80	-1,58	0,1589	-16,66	1,53
x2.x3	7,08	4,80	1,48	0,1836	-2,01	16,17

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão (Tabela 5.5.4) para o rendimento de clavulanato de potássio (Y), e verificar a validade desse modelo de Y (%) em função das variáveis estudadas através da análise de variância (ANOVA) (Tabela 5.5.5). O coeficiente de determinação igual a 90,74 % para o rendimento (Y) foi considerado razoável para esse tipo de reação.

Tabela 5.5.5 – ANOVA para o rendimento de clavulanato de potássio (Y).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	12639,87	9	1404,43	7,62	< 0,007
Resíduos	1289,89	7	184,27		
Total	13929,77	16			

% variação explicada (R^2) = 90,74%

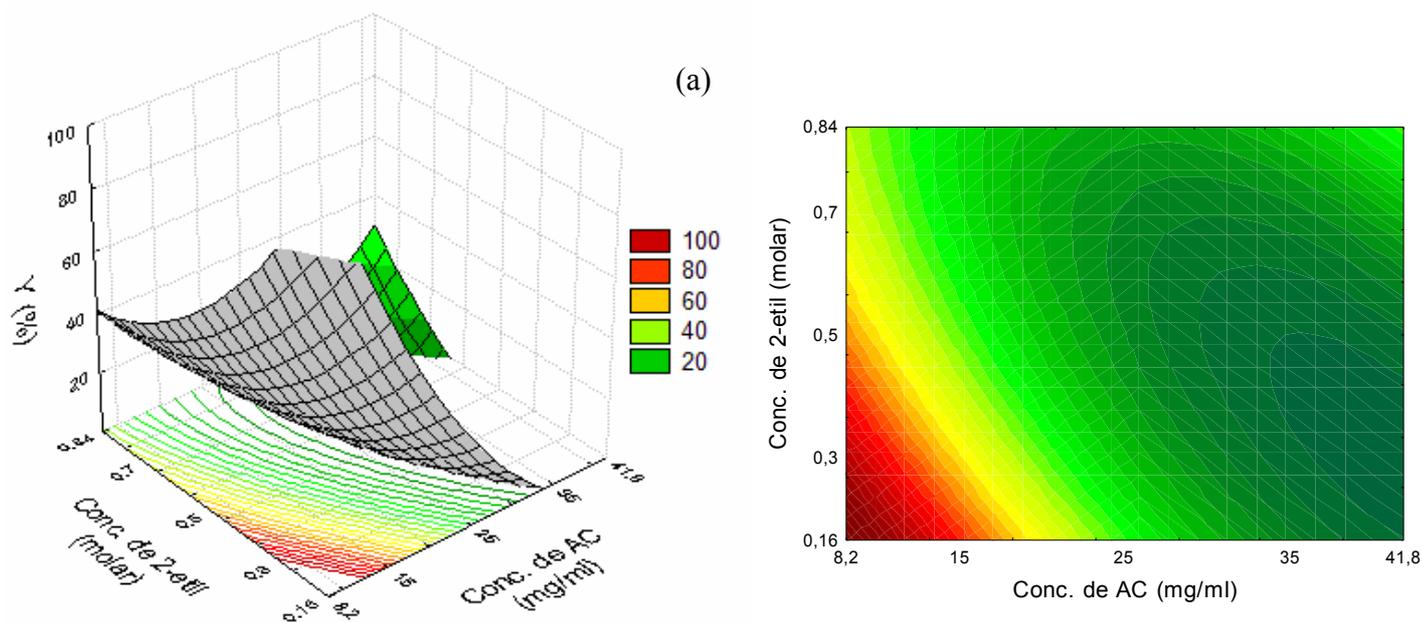
$F_{9; 7; 0,1} = 2,72$

A equação codificada de Y (%) em função dos coeficientes de regressão é:

$$Y(\%) = -0,05 - 22,36 x_1 + 10,37 (x_1)^2 - 6,68x_2 + 6,14(x_2)^2 + 10,76 x_3 + 9,26 (x_3)^2 + 11,39 x_1.x_2 - 7,57 x_1.x_3 + 7,08x_2.x_3.$$

Uma vez que foram muitos os ensaios neste planejamento em que houve a formação de óleo e conseqüente obtenção de 0,0% de rendimento, foi decidido pela utilização de todos os coeficientes de regressão, e não apenas dos estatisticamente significativos (p -valor $< 0,10$), para elaboração do modelo Y (%). Foi considerado que poderia ocorrer de algum coeficiente ser significativo e ter sido mascarado pelos ensaios em que não houve a formação de clavulanato de potássio e sim do óleo. Assim optou-se pela inclusão de todos, do que correr o risco de deixar alguma variável importante de fora.

O modelo foi considerado adequado para descrever as superfícies de respostas de Y(%). (Figura 5.5.2), obtidas com a utilização do software Statistica 5,6.



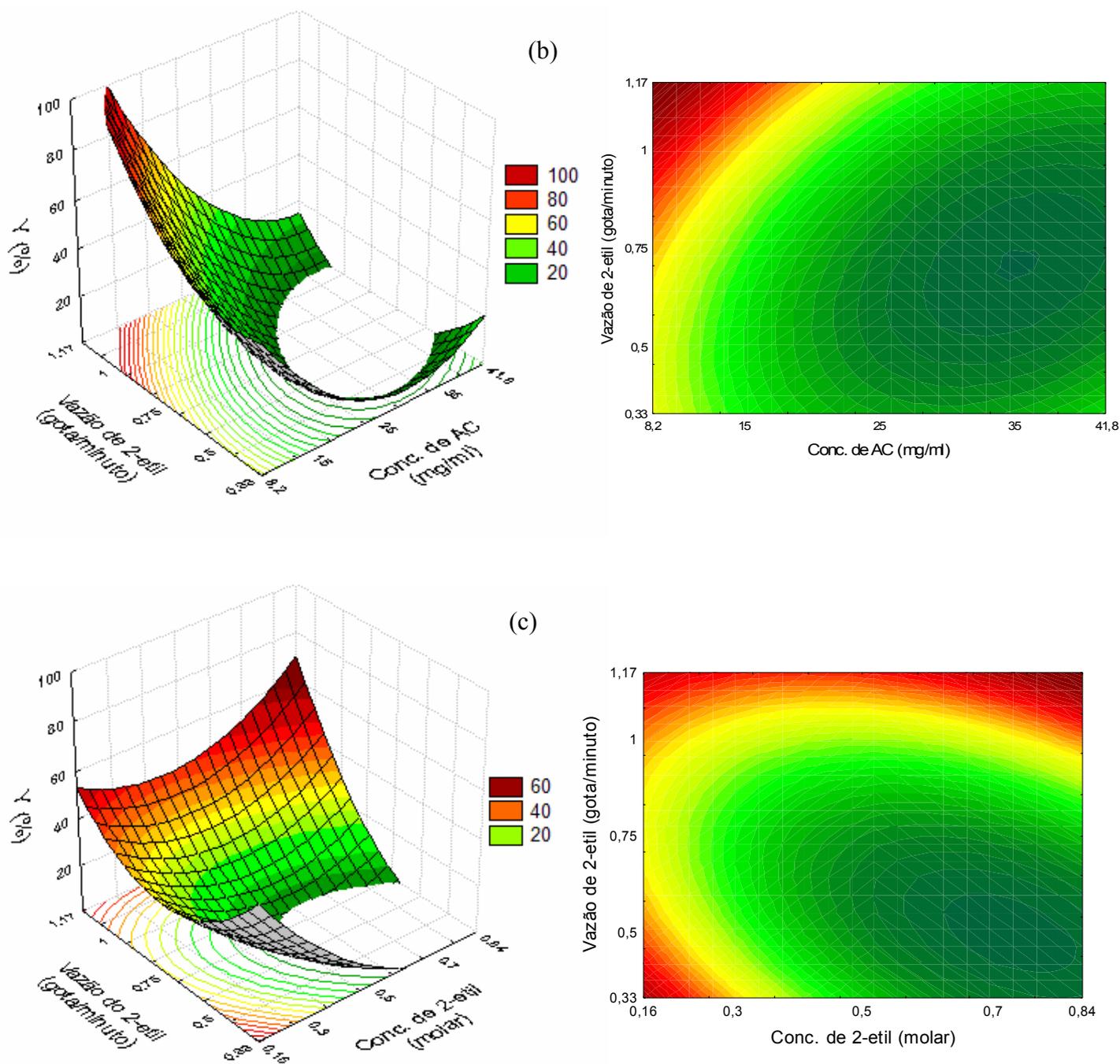


Figura 5.5.2 – Superfícies de respostas e curvas de contorno para Y (%) em função: (a) da concentração de 2-etil e de AC; (b) da vazão de 2-etil e da concentração de AC; (c) da vazão e da concentração de 2-etil.

Os valores máximos obtidos para Y(%) correspondem à concentração de ácido clavulânico em 15mg/ml, enquanto que um aumento nessa concentração acarretou na instabilidade da reação e conseqüente formação de óleo. Através da análise das superfícies de respostas foi possível verificar que a faixa de concentração estudada para o 2-etilexanoato de potássio (0,16 - 0,84 molar) favoreceu apenas as baixas concentrações de AC. Para se

comprovar essa observação foram realizados três experimentos (1, 2 e 3 da Tabela 5.5.6) variando-se a concentração em níveis intermediários do ensaio 5 onde se obteve $Y = 75\%$ ao ensaio 6 com $Y = 0\%$ (óleo).

Observou-se que para as concentrações intermediárias estudadas a reação não ocorreu de forma satisfatória resultando na formação de óleo. Isto nos permite ter uma idéia de quanto são estreitos os intervalos nos quais a reação ocorre de maneira desejada, dificultando desta forma a utilização deste tipo de reação em escala industrial.

Verificou-se ainda, que quando a concentração de um dos fatores, (AC ou 2-etil), é elevada, ocorre a turbidez da solução e conseqüente nucleação já na adição da primeira gota de 2-etilexanoato, mostrando que o sistema já está supersaturado. Uma grande supersaturação inicial pode fazer com que haja instabilidade na reação levando à formação de óleo logo nos primeiros minutos de adição, causando a perda do produto desejado.

Tabela 5.5.6 - Valores utilizados variando-se a concentração de AC. Os ensaios 5 e 6 pertencem ao planejamento fatorial descrito anteriormente e encontram-se representados apenas para efeitos de observação.

Ensaio	Conc. de AC (mg/ml)	Conc. de 2-etil (molar)	Vazão de 2-etil (gota/minuto)	Y (%)	Incr.
Ensaio5	15	0,3	1	75,83	Sim
1	20	0,3	1	0,00	Óleo
2	25	0,3	1	0,00	Óleo
3	30	0,3	1	0,00	Óleo
Ensaio6	35	0,3	1	0,00	Óleo

Para a vazão de adição do 2-etil, a análise das superfícies de respostas (Figura 5.5.2- b) demonstrou que quando a concentração do AC é baixa, (inferior a 25mg/ml) são preferíveis vazões de adição do 2-etilexanoato mais elevadas (acima de 0,75 gota/minuto). Em relação à vazão e a concentração de 2-etilexanoato, a Figura 5.5.2 (c) mostra que as melhores condições estão situadas nas bordas da parábola que possui um ponto de mínimo.

Embora muitos ensaios tenham resultado em óleo e, portanto, com rendimento igual a zero, este delineamento foi muito importante para se verificar a influência das variáveis presentes no processo, dando idéia de quanto a reação direta do ácido clavulânico com o 2-etilexanoato de potássio é complexa e de difícil execução em termos industriais, para que o precipitado, na forma de clavulanato de potássio, seja obtido em condições satisfatórias.

Pelo planejamento desenvolvido verificou-se que pequenas perturbações podem causar a instabilidade na reação levando à formação de óleo e conseqüente perda do produto desejado, bem como a incrustação sempre presente em maior ou em menor grau. Por essas razões foi decidido optar-se por uma reação de precipitação, através da passagem por um intermediário estável que possibilitasse uma maior estabilidade da reação e conseqüente ampliação das faixas operacionais, e preferencialmente na qual não houvesse incrustação, ou que essa fosse mínima.

Entretanto, a passagem por intermediário estável deveria atender ainda mais alguns quesitos além dos já mencionados; não gerar intermediários tóxicos ou higroscópicos e se possível ainda promover uma boa purificação para o caldo de fermentação. Nesse sentido os bons resultados preliminares encontrados para a reação do AC com a t-octilamina contribuíram para que essa reação indireta (R_1) fosse escolhida para ser melhor avaliada e se possível otimizada, através do emprego de um planejamento fatorial completo.

5.5.1.1 Ensaio para o caldo de fermentação

Depois de concluído o planejamento fatorial, foi realizado um experimento para o caldo de fermentação, utilizando as mesmas condições do ensaio 1 (DCCR), pois esse ensaio apresentou uma das melhores respostas para o rendimento (73,89%) e ainda pouca incrustação.

O rendimento obtido nessa etapa para o caldo foi de 69,53%. O rendimento global, ou seja, em relação à quantidade inicial do AC presente no caldo foi de 31,29%. Entretanto, é preciso salientar que a etapa de extração com solvente (incluída juntamente com a de precipitação no rendimento global), apresenta rendimento máximo de apenas 45% de toda massa de AC que aí estava presente, sendo desta forma a grande responsável pelo baixo rendimento global observado.

A análise de RMN (Figura 5.5.3) mostrou a presença de clavulanato de potássio juntamente com a de outras substâncias (impurezas) em pequena quantidade, presentes no precipitado. Acredita-se que algumas impurezas ainda presentes no caldo de fermentação possam ter interferido na reação de precipitação do clavulanato de potássio.

Entretanto, cabe ressaltar que foi realizado um experimento de precipitação para o caldo de fermentação anterior ao planejamento fatorial (ensaios preliminares). Esse experimento apresentou um rendimento muito baixo e pela análise de RMN realizada (Figura 5.4.4, exibida anteriormente) foi possível verificar que a intensidades dos sinais de hidrogênios para o ácido clavulânico é menor do que a intensidade dos sinais referentes as

impurezas presentes, ou seja, a quantidade de ácido clavulânico que precipitou foi inferior a quantidade de impurezas presentes. Isso sugere que as condições em que foi realizado esse experimento estavam longe das condições desejadas para o mesmo, favorecendo a concorrência de outras substâncias presentes no caldo de fermentação frente à reação de precipitação para o ácido clavulânico. A Figura 5.4.4 foi novamente apresentada no intuito de facilitar a comparação visual dos dois espectros.

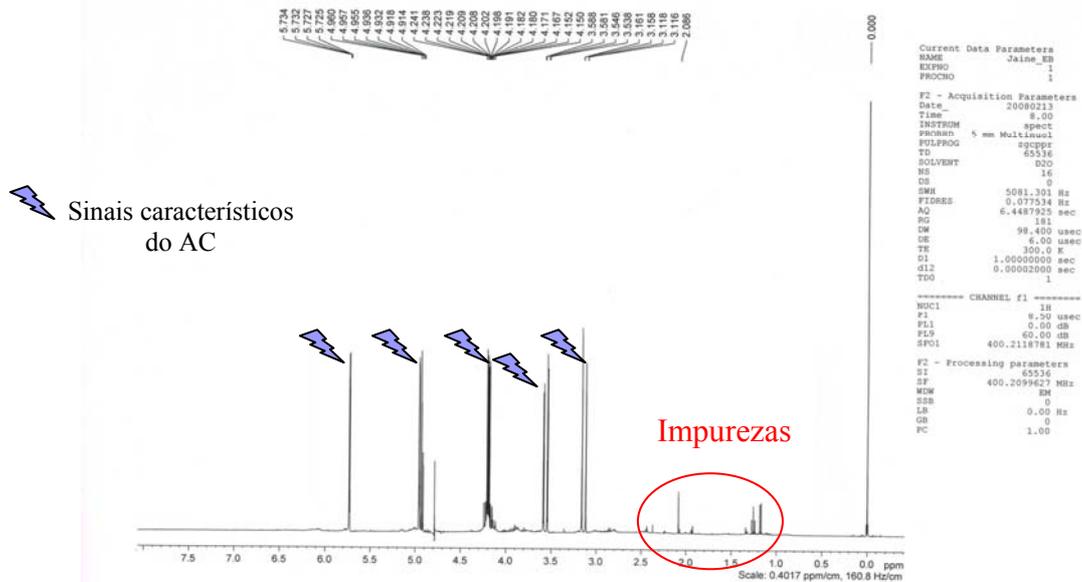


Figura 5.5.3 – Espectro de RMN-¹H do clavulanato de potássio precipitado do caldo de fermentação a partir da reação direta (R₀), utilizando o planejamento fatorial.

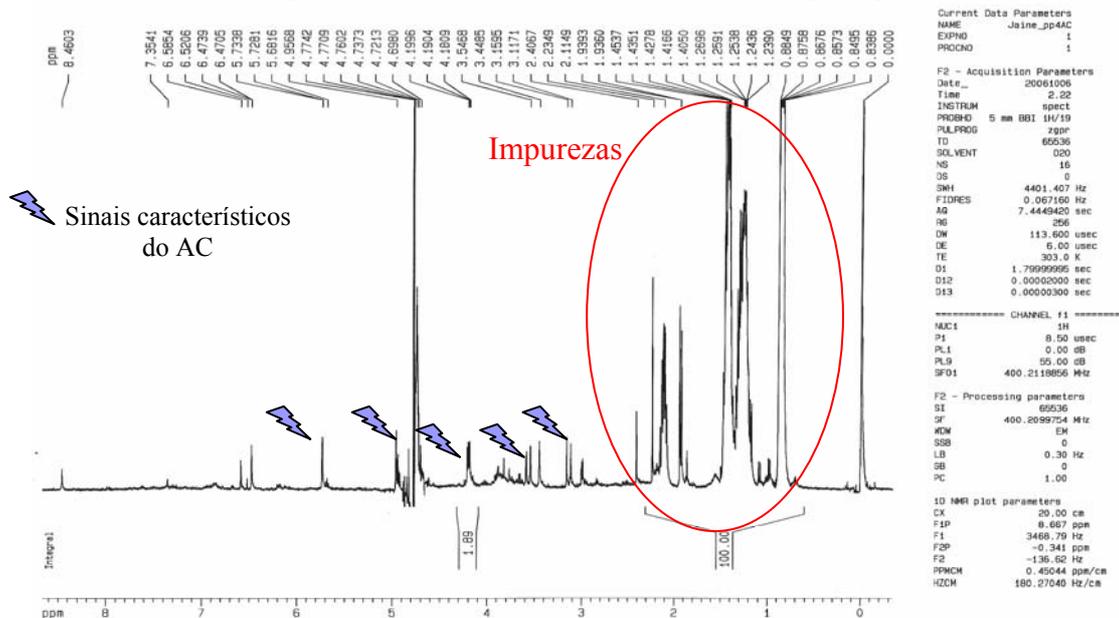


Figura 5.4.4 – Espectro de RMN-¹H do clavulanato de potássio precipitado do caldo de fermentação em ensaio sem a utilização o planejamento fatorial.

Como se observa, a partir dos dois espectros de RMN-¹H, o espectro apresentado na Figura 5.5.3, representa uma amostra mais pura de clavulanato de potássio em relação ao espectro seguinte (Figura 5.4.4), na qual o clavulanato havia sido precipitado a partir do caldo, sem realização de planejamentos experimentais. Com a utilização do planejamento foi possível favorecer a reação de precipitação para o ácido clavulânico frente às outras impurezas ainda presentes no caldo de fermentação, gerando melhores condições para que a reação de precipitação do AC ocorresse.

Ainda foi observado aglomeração do precipitado formado, ainda na solução-mãe e a coloração marrom, muito diferente da coloração anteriormente observada (de um branco levemente amarelado), para os ensaios realizados no planejamento fatorial. Acredita-se que essa diferença na coloração esteja associada às impurezas e pigmentos que ainda estivessem presentes no solvente orgânico, ou seja, na fase que antecede a reação de precipitação, pois no espectro de RMN (Figura 5.5.3) foram observados sinais de hidrogênios de impurezas. Sabe-se que mesmo ínfimas quantidades de impurezas podem alterar a coloração na formação dos cristais.

A forma dos cristais obtidos na reação de precipitação do AC com o 2-etil para o caldo de fermentação foi verificada a partir de fotos de microscopia eletrônica. Entretanto essa amostra estava misturada à celulose microcristalina (para retardar sua degradação), que poderia vir a ser confundida com os cristais de clavulanato, uma vez que a celulose microcristalina também pode apresentar cristais na forma de agulha, porém cerca de 100 vezes maiores do que os cristais de clavulanato de potássio. Nesse sentido a utilização do sistema BSE (que apresenta a imagem por diferença de peso atômico) foi de grande ajuda, pois foi verificado que os cristais de celulose não se destacavam neste sistema, ficando escuros e opacos, proporcionando dessa forma um contraste muito grande com os cristais de clavulanato que apareciam como de um branco cintilante, devido à presença do átomo de potássio em sua estrutura. Pequenas impurezas que podem ser encontradas devido ao processo de polimento do porta amostra e mesmo pequenos pedaços de celulose resultantes do filtro de papel utilizado, que poderiam confundir-se com a amostra devido ao pequeno tamanho dos cristais de clavulanato de potássio, tornam-se opacas com o uso do BSE e portanto são facilmente diferenciadas dos cristais desejados.

A Figura 5.5.4 ilustra o que foi discutido acima, comparando-se para a mesma amostra as fotomicrografias obtidas em MEV quando se utiliza o sistema SE (comumente utilizado, que fornece a imagem topográfica da amostra) e o sistema BSE. A ampliação utilizada foi de 100X.

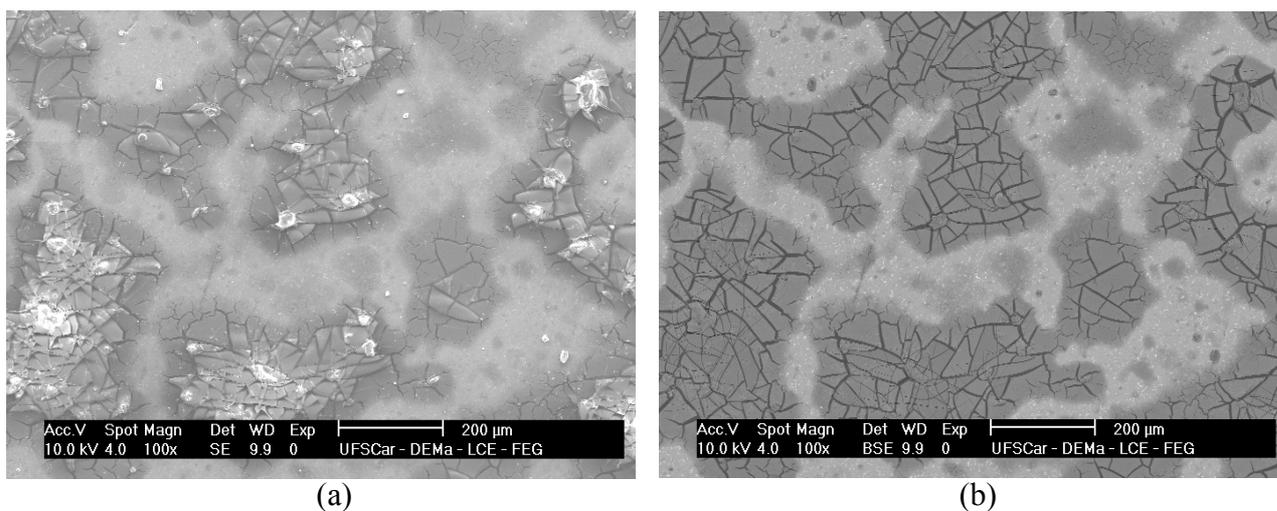


Figura 5.5.4 – Fotomicrografias obtidas com ampliação de 100X para: (a) Sistema SE; (b) Sistema BSE.

Na Figura 5.5.4 (b) pôde-se perceber nitidamente que os cristais de AC (cintilantes) estão agrupados exclusivamente em volta das aglomerações de celulose (opacos) o que não se encontra tão bem definido para a mesma Figura em (a).

As Figuras 5.5.5. e 5.5.6 e 5.5.7 foram obtidas da mesma amostra, utilizando-se o sistema BSE nas ampliações de 300X, 1000X e 10000X respectivamente.

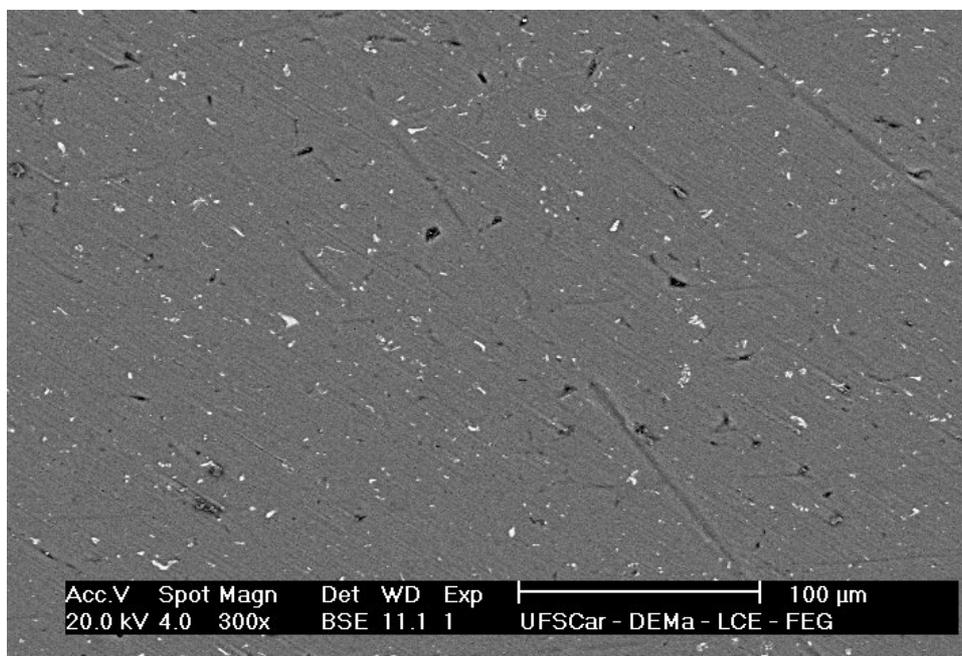


Figura 5.5.5 – Fotomicrografia obtida com ampliação de 300X, utilizando o sistema BSE, para a amostra precipitada do caldo de fermentação.

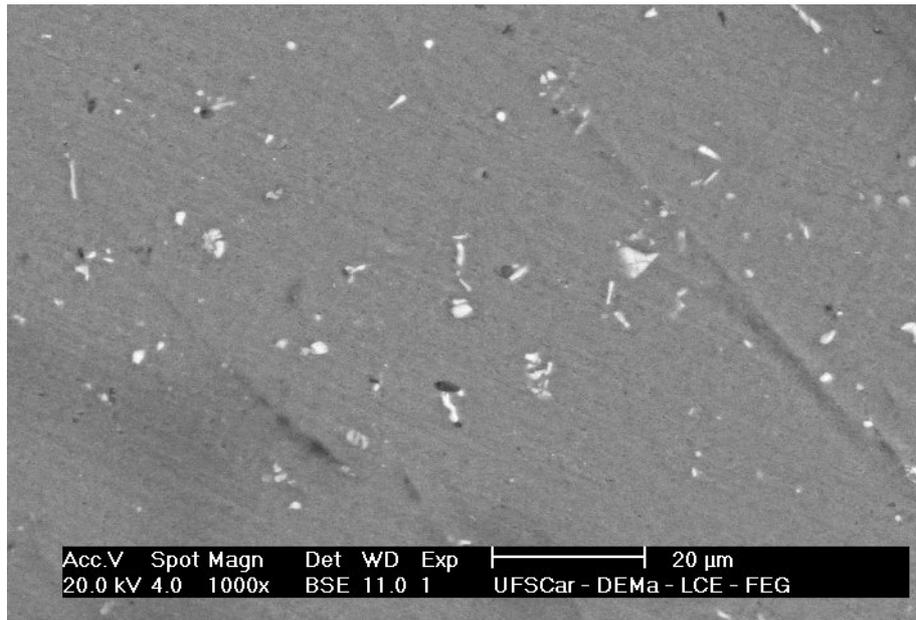


Figura 5.5.6 – Fotomicrografia obtida com ampliação de 1000X, utilizando o sistema BSE, para a amostra precipitada do caldo de fermentação.

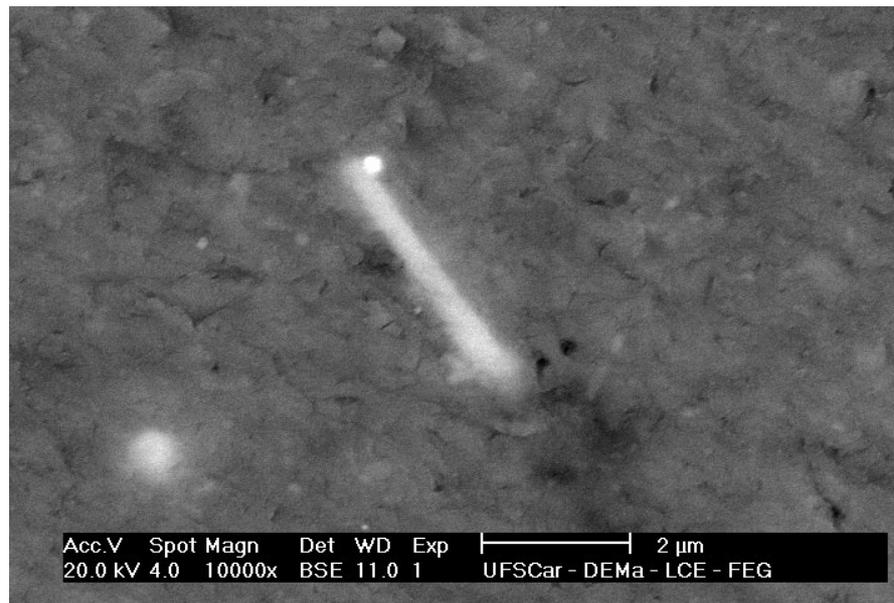


Figura 5.5.7 – Fotomicrografia obtida com ampliação de 10000X, utilizando o sistema BSE, para a amostra precipitada do caldo de fermentação.

Pelas Figuras 5.5.6 a 5.5.7 observou-se que os cristais do clavulanato de potássio precipitados a partir do caldo de fermentação possuíam a forma de agulhas, muito pequenas e finas, em concordância com o descrito pelas patentes Butterly *et al.* (1997) e Butterly *et al.* (2002).

5.5.2 - Reação indireta com a passagem por um intermediário estável – reação do AC com a t-octilamina (R₁).

Na Tabela 5.5.7 estão os resultados obtidos para reação do AC com a t-octilamina, utilizando um DCCR, totalizando 17 ensaios realizados, para três variáveis estudadas: temperatura (Temp.), concentração de ácido clavulânico (Conc. de AC) e vazão da amina adicionada (Vazão de amina).

Tabela 5.5.7 – Valores codificados e reais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento de sal de amina do ácido clavulânico (Y).

Ensaio	Temp. (°C)	Conc. de AC (mg/ml)	Vazão de amina (gota/min)	Y (%)
1	-1 (10)	-1 (10)	-1 (0,5)	94,49
2	1 (20)	-1 (10)	-1 (0,5)	84,45
3	-1 (10)	1 (20)	-1 (0,5)	76,69
4	1(20)	1 (20)	-1 (0,5)	59,07
5	-1(10)	-1 (10)	1 (1)	81,32
6	1(20)	-1 (10)	1 (1)	89,25
7	-1 (10)	1 (20)	1 (1)	73,81
8	1 (20)	1 (20)	1 (1)	76,43
9	-1,68 (6,6)	0 (15)	0 (0,75)	84,38
10	1,68 (23,4)	0 (15)	0 (0,75)	80,50
11	0 (15)	-1,68 (6,6)	0 (0,75)	93,57
12	0 (15)	1,68 (23,4)	0 (0,75)	69,52
13	0 (15)	0 (15)	-1,68 (0,33)	67,30
14	0 (15)	0 (15)	1,68 (1,17)	60,90
15	0 (15)	0 (15)	0 (0,75)	71,55
16	0 (15)	0 (15)	0 (0,75)	72,63
17	0 (15)	0 (15)	0 (0,75)	69,53

É importante ressaltar que para essas reações não houve a presença de incrustação e nem a formação de soluções coloidais. Os rendimentos para o sal de amina do AC obtidos foram elevados, quando comparados aos obtidos pela reação direta com o 2-etilexanoato de potássio (R₀).

Para as reações com a t-octilamina não houve a formação de óleo em nenhum ensaio estudado, mostrando dessa forma que a reação de precipitação R_1 encontra-se mais estável do que a reação estudada anteriormente (R_0).

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem para as variáveis codificadas (Tabela 5.5.8).

Tabela 5.5.8 – Coeficientes de regressão para o rendimento de sal de amina do AC.

	Coef. de regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Lim de Conf. -90%	Lim. de Conf. 90%
Média	71,03	1,76	40,32	< 0,0001	67,70	74,37
x1 (L)	-1,73	0,83	-2,09	0,0747	-3,30	-0,16
x1 (Q)	4,65	0,91	5,11	0,0014	2,93	6,38
x2 (L)	-7,61	0,83	-9,20	0,0000	-9,18	-6,05
x2 (Q)	4,34	0,91	4,76	0,0021	2,61	6,06
x3(L)	-0,34	0,83	-0,41	0,6930	-1,91	1,23
x3 (Q)	-1,83	0,91	-2,01	0,0846	-3,55	-0,10
x1.x2	-1,61	1,08	-1,49	0,1798	-3,66	0,44
x1.x3	4,78	1,08	4,42	0,0031	2,73	6,82
x2.x3	2,86	1,08	2,64	0,0333	0,81	4,90

O modelo com os valores codificados que representam o rendimento (Y) obtido de sal de amina do ácido clavulânico, foi elaborado utilizando-se os parâmetros estatisticamente significativos, ou seja, com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$).

Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. O coeficiente de determinação igual a 94,89 % foi considerado muito bom para este tipo de processo.

$$Y (\%) = 71,03 - 1,73 x_1 + 4,65 (x_1)^2 - 7,61 x_2 + 4,34 (x_2)^2 - 1,83 (x_3)^2 + 4,78 x_1.x_3 + 2,86 x_2.x_3$$

A ANOVA para o rendimento obtido do sal de amina do AC, considerando somente os termos estatisticamente significativos, está apresentada na Tabela 5.5.9. O F_{calc} é adequado ($p < 0,0001$) para descrever os dados e construir as superfícies de resposta gerada pelo modelo.

Tabela 5.5.9 – ANOVA para o rendimento de sal de amina do AC (Y).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	1628,960	7	232,71	23,86	0,00004
Resíduos	87,770	9	9,75		
Falta de Ajuste	82,845				
Erro Puro	4,926				
Total	1716,730	16			

% variação explicada (R^2) = 94,89% ; $F_{7,9,0,1}=2,51$.

A Figura 5.5.8 apresenta os resultados experimentais versus os resultados previstos pelo modelo ajustado, mostrando uma boa concordância entre eles.

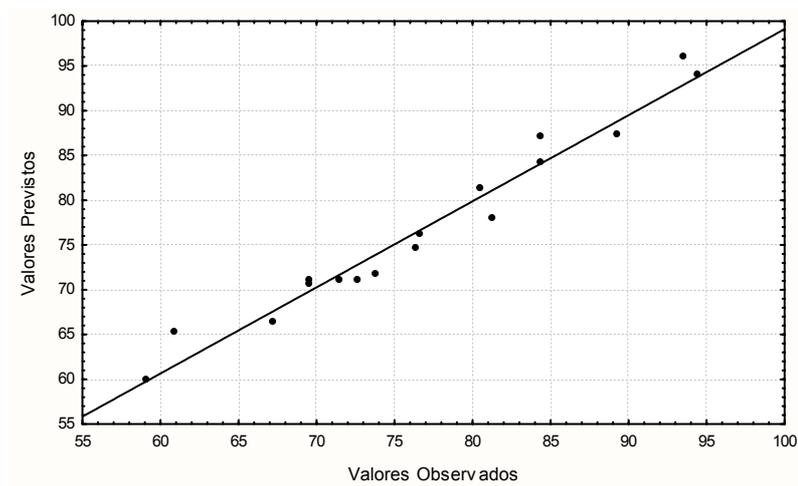


Figura 5.5.8 – Valores experimentais de Y (%) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.

A Tabela 5.5.10 apresenta os valores experimentais do rendimento obtido e dos valores previstos pelo modelo codificado, que foram validados pela ANOVA, bem como o desvio relativo de cada ensaio.

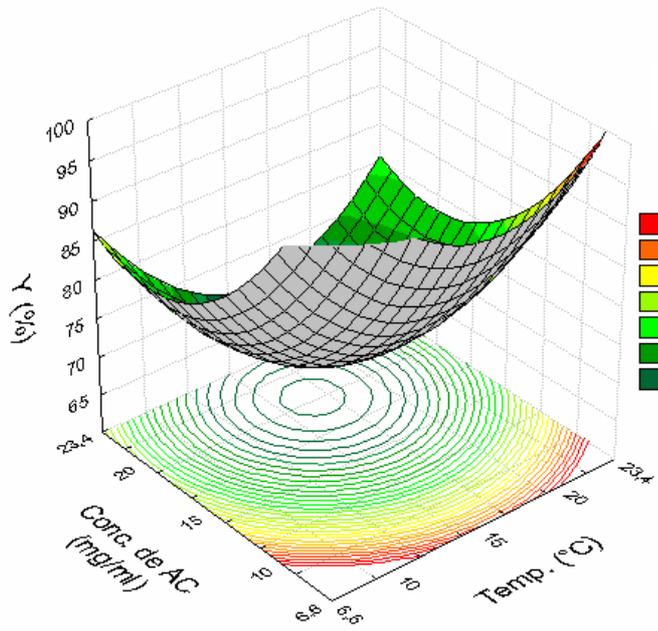
Tabela 5.5.10 – Valores do rendimento (Y) experimental e previsto pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	Y Experimental (%)	Y Previsto (%)	Desvio relativo (%)
1	94,49	95,17	-0,72
2	84,45	82,15	2,73
3	76,69	74,23	3,21
4	59,07	61,21	-3,62
5	81,32	79,89	1,76
6	89,25	85,99	3,65
7	73,81	70,39	4,64
8	76,43	76,49	-0,08
9	84,38	87,09	-3,21
10	80,50	81,27	-0,96
11	93,57	96,10	-2,71
12	69,52	70,51	-1,43
13	67,30	65,85	2,15
14	60,90	65,85	-8,13
15	71,55	71,03	0,72
16	72,63	71,03	2,20
17	69,53	71,03	-2,15

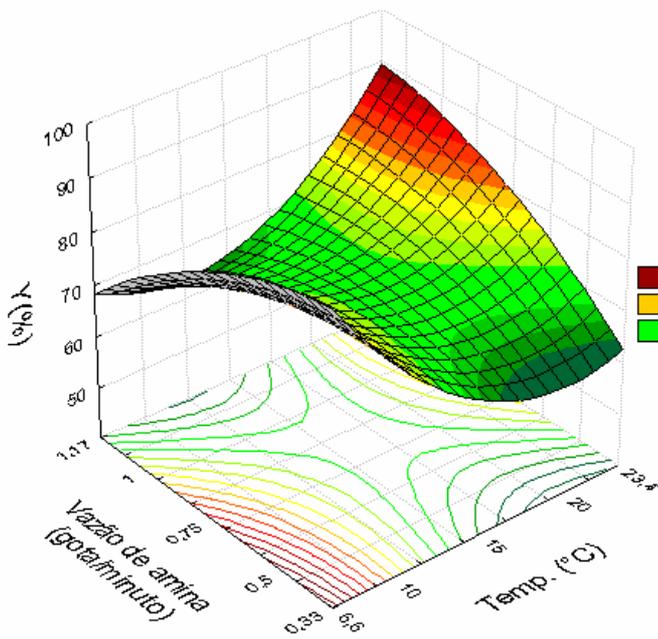
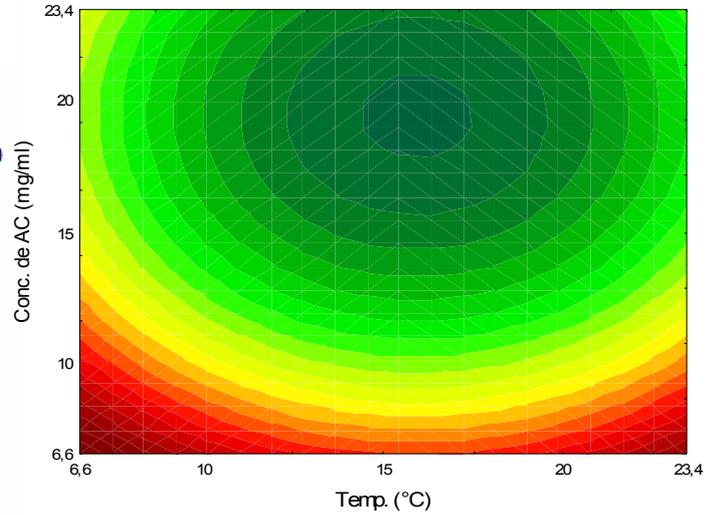
A variação dos desvios relativos é pequena (inferior a 10%), demonstrando assim que há apenas uma diferença mínima entre as respostas previstas pelo modelo em relação às obtidas experimentalmente, indicando um bom ajuste.

Através da análise das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 5.5.9) geradas pelo modelo, observamos que a região de maior rendimento está associada à baixas concentrações estudadas de AC. Os valores máximos obtidos para Y (%) foram 94,49 e 93,57% referentes aos níveis -1 e -1,68 que correspondem às concentrações de 10 e 6,6mg/mL respectivamente. Embora a vazão tenha se mostrado estatisticamente significativa seu efeito no rendimento é muito pequeno quando comparado com a variável da concentração de AC. Verificou-se, ainda para a vazão (Figura 5.5.9 - b), que seu efeito é mais observado quando associado à temperatura, sendo que para as faixas de menor temperatura (6,6 – 10°C) a melhor vazão está associada à região em torno do nível 1 ao -1,68 (1 a 0,33 gota/minuto), e no

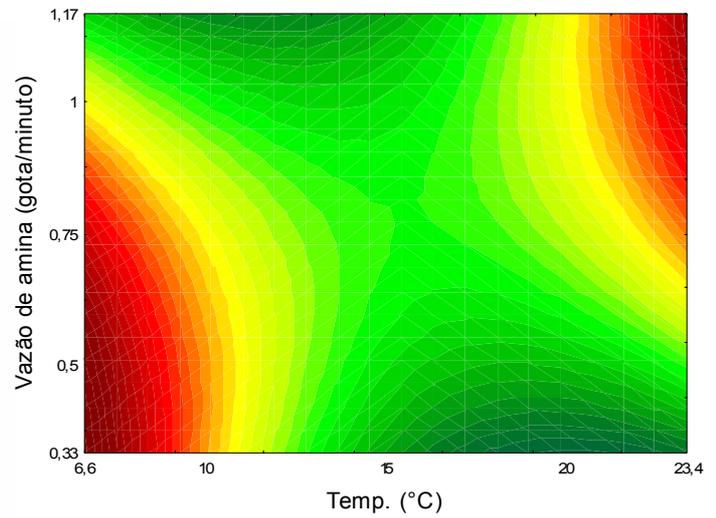
caso de altas temperaturas, uma vazão elevada (de 0,75 a 1,17 gota/minuto) é mais apropriada.



(a)



(b)



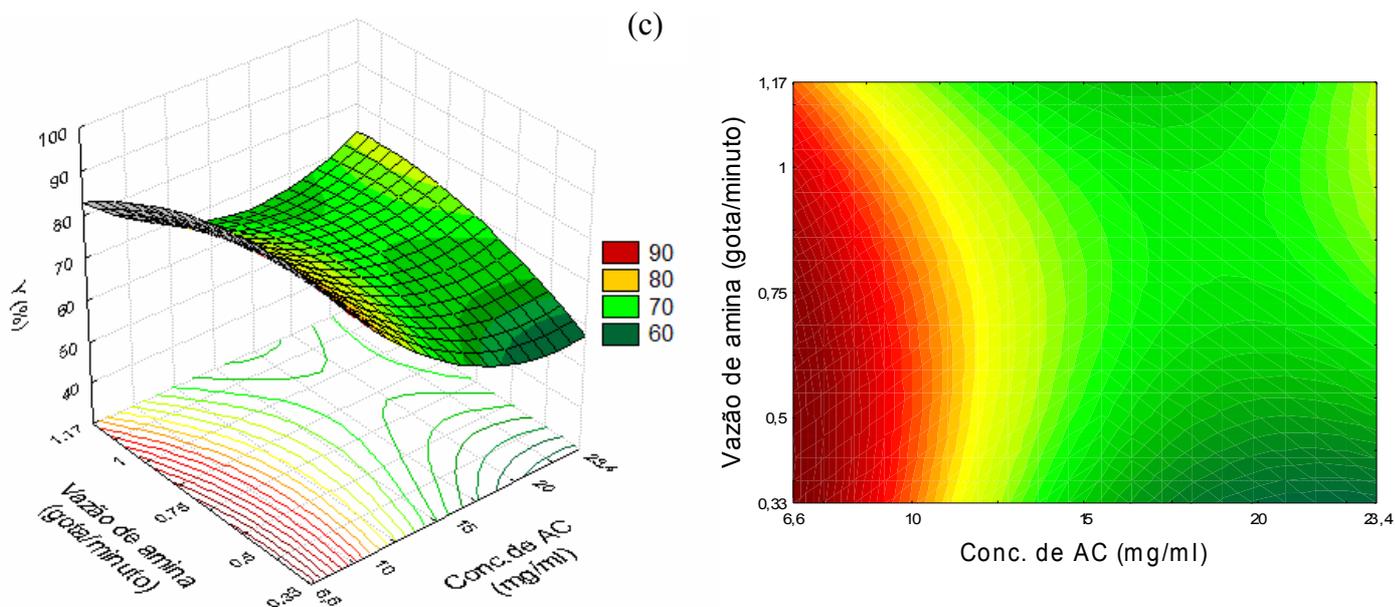


Figura 5.5.9 – Superfícies de resposta e curvas de contornos para Y (%) em função: (a) da Concentração de AC e da Temp.; (b) da Vazão de amina e da Temp.; (c) da Vazão de amina e da Concentração de AC.

Foi observado que houve uma grande diferença na reação de precipitação do AC através da passagem por um intermediário estável (R_1 com a t-octilamina), da reação direta (R_0) estudada anteriormente. A reação R_1 encontra-se mais estável, possibilitando que a reação de precipitação ocorra em intervalos maiores e ainda atingindo as metas desejadas, ou seja, com altos valores de rendimento e sem ocorrer incrustação, ou formação de óleo. Dessa maneira, essa reação encontra-se adequada para utilização em escala industrial.

Verificou-se também, que para esses ensaios, a nucleação só tinha início depois de adicionada pelo menos a metade do volume de amina necessário (calculado através da estequiometria). Isso pode conferir à reação estabilidade, pois significa que a supersaturação era menor nesse sistema, do que para R_0 quando a nucleação já ocorria, na maioria das vezes, com a adição da primeira gota de 2-etilexanoato.

5.5.2.1 Confirmação experimental das condições otimizadas

No planejamento experimental os ensaios foram realizados com um volume pequeno (em torno de 10mL), para garantir a não interferência da amoxicilina nos resultados, pois esta está presente no comprimido utilizado juntamente com o ácido clavulânico em quantidade 4 vezes superior ao AC. Embora tenha-se desenvolvido um método com ótimos resultados para se obter o AC puro a partir do comprimido (discutido anteriormente em maiores detalhes nos tópicos 5.5.3 – Precipitação do AC com o 2-etilexanoato de potássio – ensaios preliminares, e 5.5.2 – Extração do ácido clavulânico em diferentes solventes),

verificou-se que para se trabalhar com volumes maiores na etapa de precipitação (cerca de 50mL) era necessário partir de quantidades iniciais de comprimidos muito superiores às utilizadas naqueles ensaios. Por exemplo: para se obter uma concentração de AC de 20mg/mL em 50mL de solvente orgânico é necessário partir de uma quantidade inicial de AC de aproximadamente 2250mg (que equivale a quantidade de 18 comprimidos), para se realizar apenas um único experimento. Na reação R_2 na qual a existem valores de concentrações de sal de amina do AC superiores a 20mg/mL a quantidade necessária de comprimidos é bem maior. Traços de amoxicilina poderiam ser encontrados se a quantidade de comprimidos aumentasse muito, pois como verificado o acetato de etila apesar de seletivo para o AC ainda carrega mesmo que seja um mínimo de amoxicilina que quando presente em maior quantidade poderia estar aí sim interferindo nas reações de precipitação para o AC.

Assim para os ensaios realizados com volume de 50mL foi utilizado o AC proveniente da amostra clavulanato/celulose. Foram realizados três ensaios nas mesmas condições empregadas para o ensaio 11 do DCCR.

Os rendimentos encontrados para o sal de amina do AC precipitado, foram de 93,56, 97,51 e 94,89% e a média destes de 95,32% ($\pm 1,64$), ligeiramente superior ao observados para o ensaio 11 (93,57%), validando experimentalmente os resultados obtidos no planejamento completo.

5.5.2.2 Ensaio para o caldo de fermentação

Depois de concluído o planejamento fatorial, foi realizado um experimento para o caldo de fermentação, utilizando as mesmas condições do ensaio 11 (DCCR), pois esse ensaio apresentou uma das melhores respostas para o rendimento (93,57 %).

O rendimento obtido nessa etapa foi de 80,21 %. O espectro de RMN (Figura 5.5.10) mostrou que não há presença significativa de outras substâncias (impurezas), na amostra analisada. Porém, outras substâncias ainda presentes no caldo de fermentação, como pigmentos, podem ter interferido em pequena escala na reação de precipitação do sal de amina do AC, mas sem terem precipitado juntamente com ele. Isto demonstra que a reação R_1 com a t-octilamina possui maior seletividade quando comparada a R_0 (reação direta), (pois nessa última uma grande quantidade de impurezas precipitou juntamente com o clavulanato de potássio), promovendo uma purificação através da formação do intermediário estável.

O sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação ainda foi comparado com o sal de amina obtido no ensaio 11 (a partir do Clavulin®) do planejamento fatorial (Figura 5.5.11). Observou-se, a partir da comparação desses dois espectros de RMN-

^1H , que não há entre os dois experimentos diferença significativa quanto à pureza dos precipitados obtidos (sal de amina do AC). Dessa maneira pôde-se comprovar a grande seletividade da reação com a t-octilamina para o AC presente no caldo de fermentação e a importância da utilização do planejamento fatorial para designar as melhores condições, nas quais essa reação de precipitação possa ocorrer com elevado rendimento.

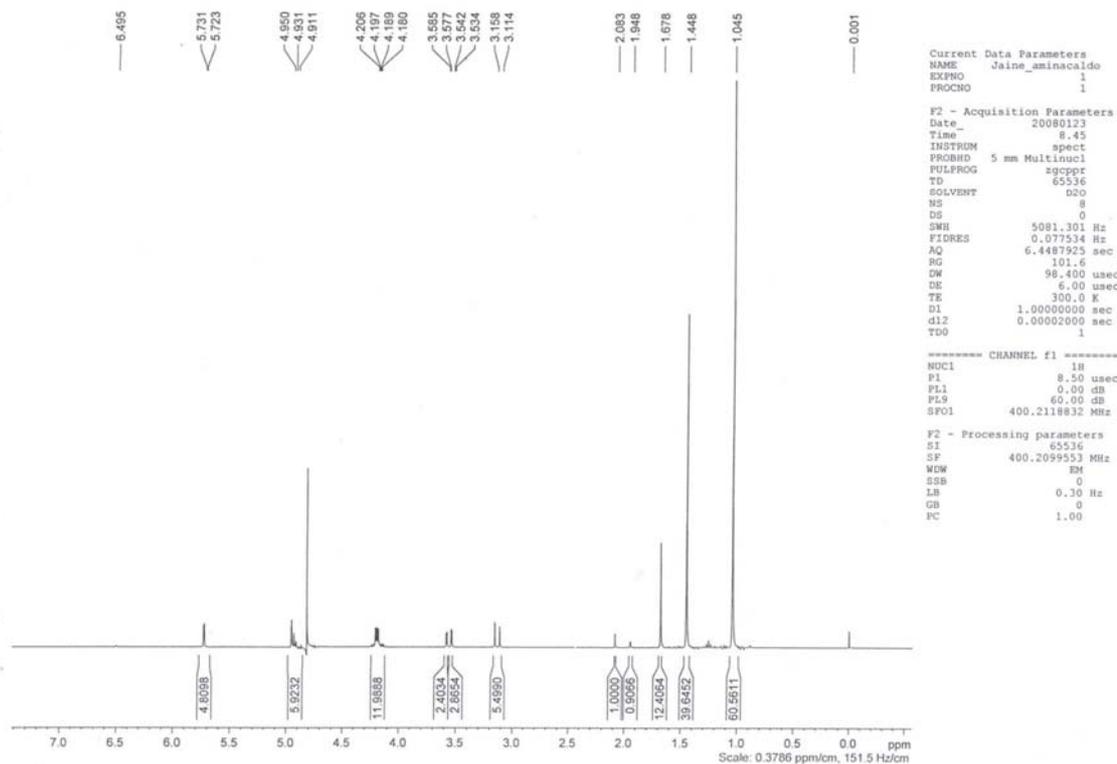


Figura 5.5.10– Espectro de RMN - ^1H do sal de amina do AC precipitado do caldo de fermentação a partir da reação do AC com a t-octilamina, utilizando as mesmas condições do ensaio 11 do planejamento fatorial.

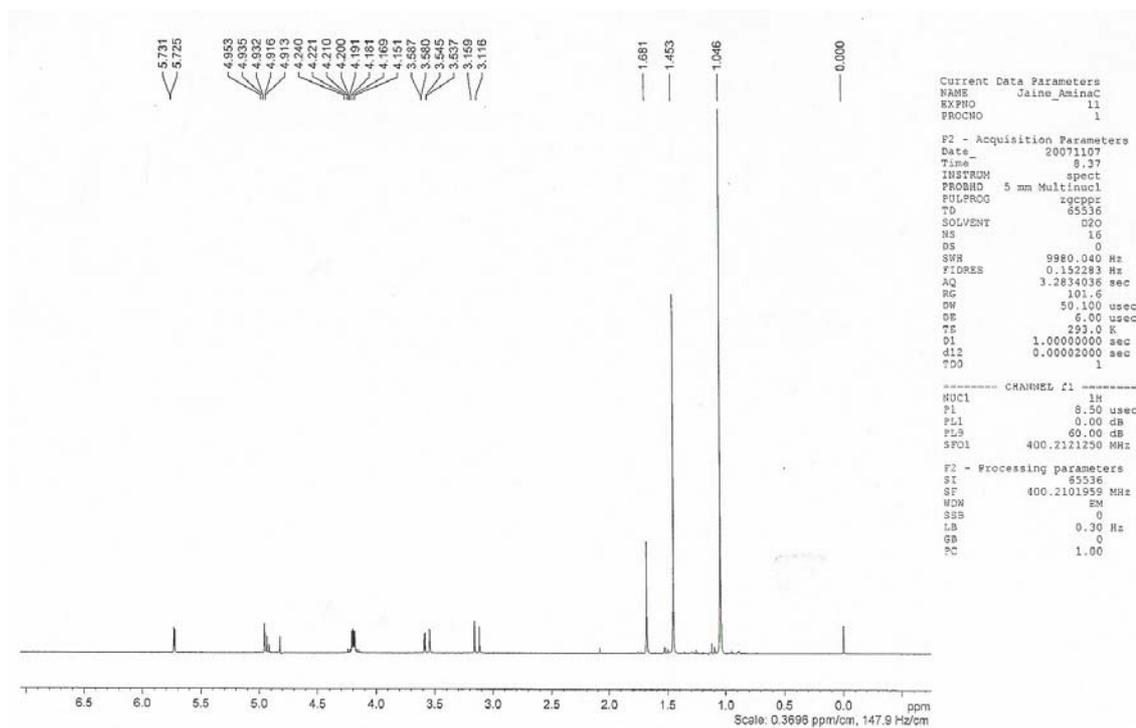


Figura 5.5.11 – Espectro de RMN ^1H do sal de amina do AC precipitado do Clavulin a partir da reação do AC com a t-octilamina para o ensaio 11 do planejamento fatorial.

O sal de amina de AC precipitado do caldo de fermentação mostrou-se muito estável e não higroscópico.

A forma dos cristais obtidos nessa reação para o caldo de fermentação foi verificada a partir de fotos de microscopia eletrônica (Figura 5.5.12).

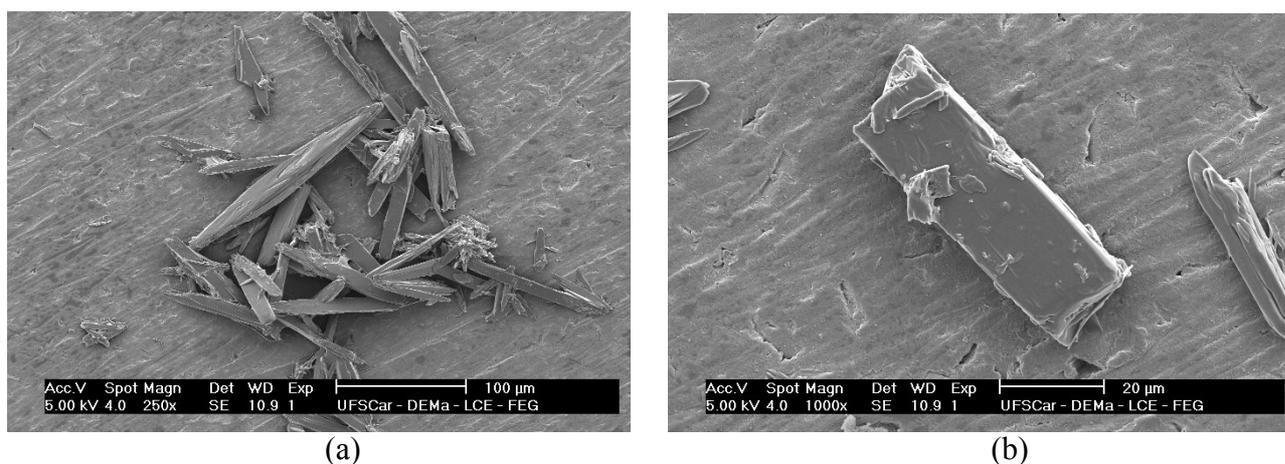


Figura 5.5.12 - Fotomicrografias para o ensaio com o caldo de fermentação, obtidas utilizando-se Sistema SE: (a) com ampliação de 250X; (b) com ampliação de 1000X.

Pela Figura 5.5.12 observou-se que os cristais do sal de amina de AC precipitados a partir do caldo de fermentação apresentavam-se na forma de plaquetas e pouco aglomerados.

Ainda foi realizada uma comparação desses com os cristais de amina obtidos do caldo de fermentação com os obtidos anteriormente no planejamento fatorial a partir do Clavulin®. As fotomicrografias (Figura 5.5.13) foram obtidas em MEV, utilizando-se uma ampliação de 800X.

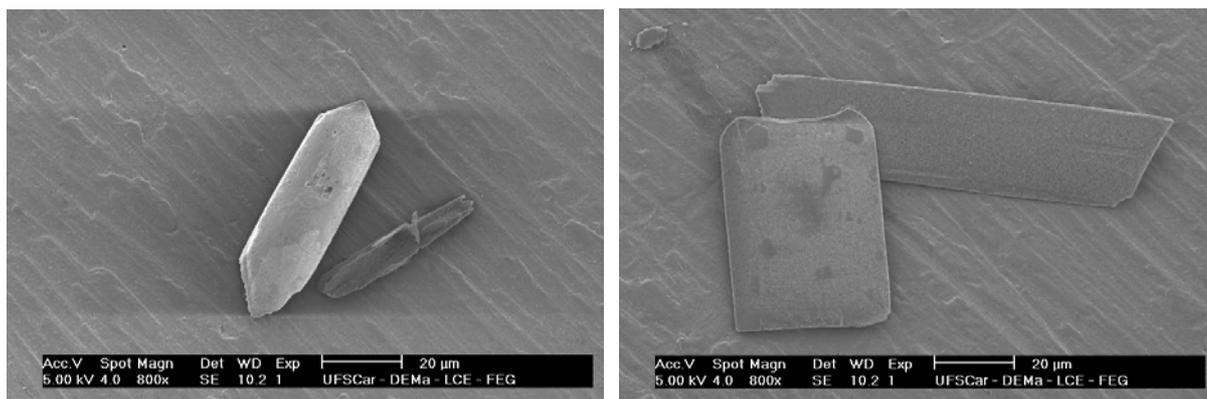


Figura 5.5.13 – Fotomicrografias para o ensaio 11 (DCCR) obtidas utilizando-se Sistema SE com ampliação de 800X.

Observando a Figura 5.5.13 nota-se que os cristais de sal de amina do AC obtidos para o ensaio 11 (DCCR) a partir da amostra de Clavulin®, são mais bem formados e não há sinais de aglomeração. Desse modo acredita-se, que as impurezas ainda presentes no caldo de fermentação possam ser as responsáveis pela diferença na formação dos cristais observados.

A escolha da t-octilamina revelou ser muito adequada para a reação indireta com o AC, e os resultados encontrados foram excelentes, dentro das condições estudadas.

Através do planejamento experimental utilizado conseguiu-se otimizar a reação e ainda verificou-se que esta ocorre satisfatoriamente sob condições mais extensas do que para a reação direta (R_0), propiciando sua utilização em escala industrial. Foi observado ainda que não houve a formação de incrustação, de óleo ou soluções coloidais indicando uma grande estabilidade do intermediário formado (sal de amina do AC). Quanto à toxicidade da t-octilamina, a literatura indica que não há formação de intermediários tóxicos para essa reação (YANG *et al.*, 1994).

Para o caldo de fermentação o uso da reação indireta promoveu ainda uma purificação e propiciou que altos rendimentos fossem obtidos a partir de baixas concentrações iniciais de AC no caldo.

5.5.3 Reação indireta com a passagem por um intermediário estável – reação do sal de amina do AC com o 2-etil (R₂).

Na Tabela 5.5.11 estão os resultados obtidos para reação do sal de amina do AC com o 2-etilexanoato de potássio, utilizando um DCCR, totalizando 17 ensaios para as três variáveis estudadas: temperatura (Temp.), concentração do sal de amina do AC (Conc. de sal do AC) e concentração do 2-etilexanoato de potássio (Conc.de 2-etil). A vazão de adição do 2-etil utilizada foi 0,75, ou seja, de 1 gota a cada 90 segundos.

Tabela 5.5.11 – Valores codificados e originais das variáveis de estudo e resposta em termos do rendimento de clavulanato de potássio (Y).

Ensaio	Temp. (°C)	Conc. de sal do AC (mg/ml)	Conc. de 2-etil (molar)	Y (%)
1	-1 (15)	-1 (15)	-1 (0,4)	83,68
2	1 (25)	-1 (15)	-1 (0,4)	85,33
3	-1 (15)	1 (35)	-1 (0,4)	87,80
4	1 (25)	1 (35)	-1 (0,4)	89,42
5	-1 (15)	-1 (15)	1 (1)	80,30
6	1 (25)	-1 (15)	1 (1)	87,23
7	-1 (15)	1 (35)	1 (1)	91,81
8	1 (25)	1 (35)	1 (1)	94,25
9	-1,68 (11,6)	0 (25)	0 (0,7)	74,70
10	1,68 (28,4)	0 (25)	0 (0,7)	81,42
11	0 (20)	-1,68 (8,2)	0 (0,7)	80,09
12	0 (20)	1,68 (41,8)	0 (0,7)	92,55
13	0 (20)	0 (25)	-1,68 (0,2)	91,99
14	0 (20)	0 (25)	1,68 (1,2)	94,72
15	0 (20)	0 (25)	0 (0,7)	85,16
16	0 (20)	0 (25)	0 (0,7)	89,40
17	0 (20)	0 (25)	0 (0,7)	88,72

Observou-se que para essas reações não houve a formação de incrustação nas paredes ou fundo do reator e tão pouco na hélice do agitador (Figura 5.5.14). É preciso salientar que sobre a hélice não há incrustação, mas clavulanato de potássio acumulado por decantação. Uma melhor comparação pode se feita, comparando-se a Figura 5.5.14, na qual não há incrustação, com a Figura 5.5.15, obtida do ensaio de número nove da reação direta (R_0), na qual há muita incrustação.

Também não foi observado formação de soluções coloidais. Os rendimentos para o clavulanato de potássio, obtido para a reação indireta com a passagem por um intermediário estável – R_2 , foram elevados quando comparados aos obtidos pela reação direta com o 2-etil (R_0).

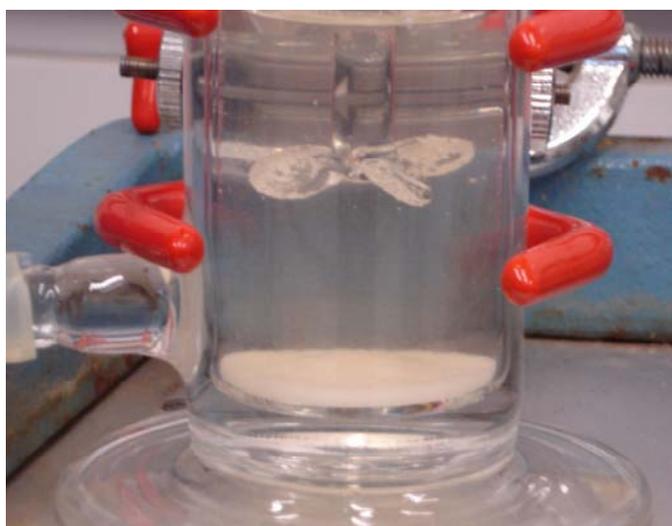


Figura 5.5.14 – Reação indireta com o 2-etil (R_2) sem a formação de incrustação.

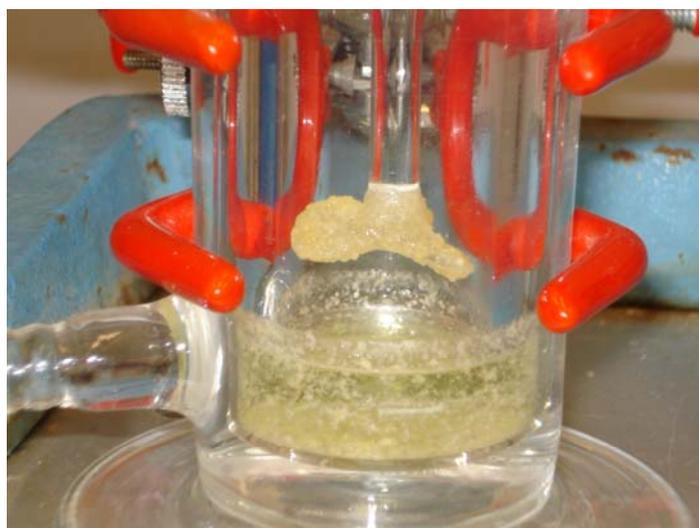


Figura 5.5.15 – Reação direta com o 2-etil (R_0) com a formação de incrustação.

Ainda, para a reação estudada, não houve a formação de óleo em nenhum dos ensaios realizados, mostrando dessa forma que a reação de precipitação R_2 também encontra-se muito mais estável do que a reação direta. (R_0).

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem para as variáveis codificadas (Tabela 5.5.12). Para a reação de precipitação estudada foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores do que 10%, ou seja, $p < 0,1$. Assim os termos não significativos foram incorporados aos resíduos para cálculo da ANOVA, apresentados na Tabela 5.5.13. O valor de F_{calc} encontrado para a regressão (24,71) é altamente significativo ($p < 0,00001$). A porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo de 91,82 foi muito boa, demonstrando que este é adequado para descrever os resultados através das superfícies de resposta.

Tabela 5.5.12 – Coeficientes de regressão para o rendimento de clavulanato de potássio.

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. 90%
Média	87,65	1,04	84,13	< 0,0001	85,68	89,63
x1(L)	1,75	0,49	3,58	0,0089	0,83	2,68
x1(Q)	-3,06	0,54	-5,68	0,0008	-4,08	-2,04
x2 (L)	3,49	0,49	7,14	0,0002	2,57	4,42
x2(Q)	-0,14	0,54	-0,25	0,8070	-1,16	0,88
x3(L)	0,88	0,49	1,79	0,1168	-0,05	1,80
x3(Q)	2,35	0,54	4,37	0,0033	1,33	3,37
x1.x2	-0,56	0,64	-0,88	0,4061	-1,78	0,65
x1.x3	0,76	0,64	1,19	0,2718	-0,45	1,97
x2.x3	1,29	0,64	2,02	0,0834	0,08	2,50

Tabela 5.5.13 – ANOVA para o rendimento de clavulanato de potássio.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	457,76	5	91,55	24,71	< 0,00001
Resíduo	40,76	11	3,71		
Falta de ajuste	30,39				
Erro puro	10,37				
Total	498,52	16			

% variação explicada (R^2) = 91,82%

F_{5;11;0,1} = 2,45

O modelo com os valores codificados que representam o rendimento (Y) obtido de clavulanato de potássio, foi elaborado utilizando-se somente os parâmetros estatisticamente significativos.

$$Y (\%) = 87,48 + 1,75 (x_1) - 3,02 (x_1)^2 + 3,49 (x_2) + 2,39 (x_3)^2 + 1,29 x_1.x_3$$

A Figura 5.5.16 apresenta os resultados experimentais versus os resultados previstos pelo modelo ajustado, mostrando uma boa concordância entre eles.

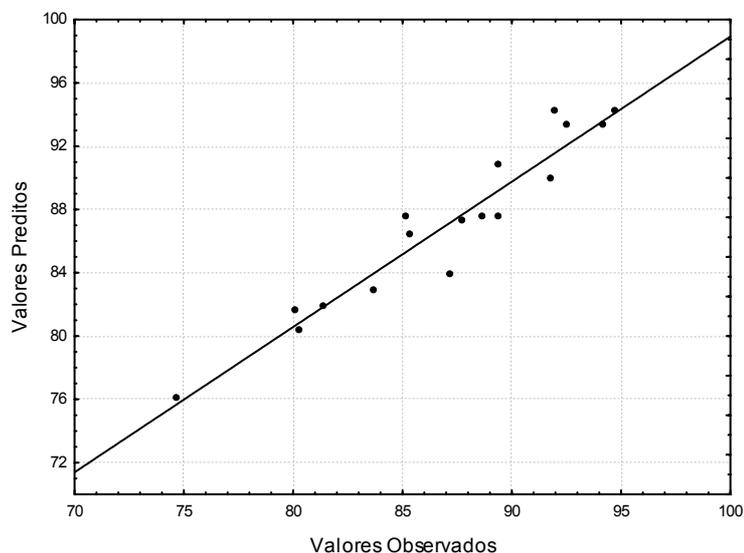


Figura 5.5.16 – Valores experimentais de Y (%) em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.

A Tabela 5.5.14 apresenta os valores experimentais do rendimento obtido e dos valores previstos pelo modelo codificado, que foram validados pela ANOVA, bem como o desvio relativo de cada ensaio.

Tabela 5.5.14 – Valores do rendimento (Y) experimental e previsto pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	Y Experimental (%)	Y Previsto (%)	Desvio relativo (%)
1	83,68	82,90	0,93
2	85,33	86,40	-1,25
3	87,80	87,30	0,57
4	89,42	90,80	-1,54
5	80,30	80,32	-0,02
6	87,23	83,82	3,91
7	91,81	89,88	2,10
8	94,25	93,38	0,92
9	74,70	76,02	-1,76
10	81,42	81,90	-0,59
11	80,09	81,62	-1,91
12	92,55	93,34	-0,86
13	91,99	94,23	-2,43
14	94,72	94,23	0,52
15	85,16	87,48	-2,72
16	89,40	87,48	2,15
17	88,72	87,48	1,40

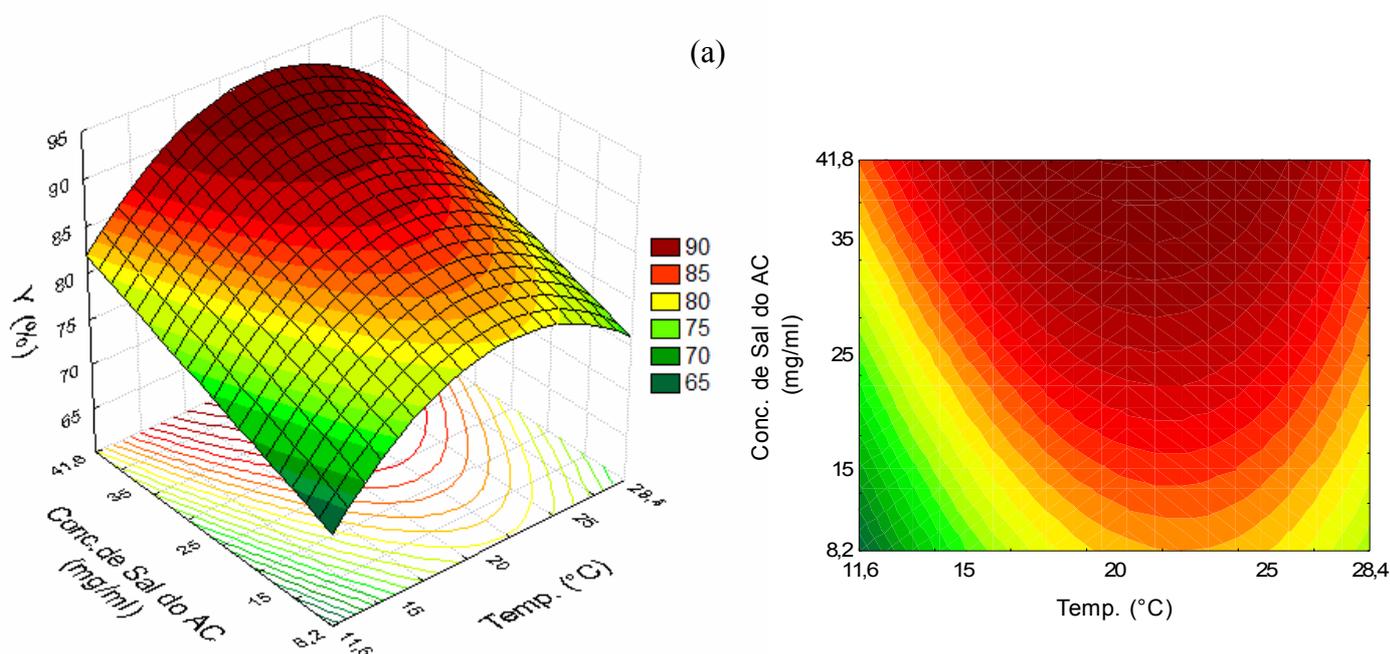
Observa-se que a variação dos desvios relativos é bem pequena (inferiores a 5%), demonstrando assim que as diferenças são mínimas entre as respostas obtidas experimentalmente e as previstas pelo modelo, indicando um excelente ajuste deste.

Através da análise das superfícies de resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo (Figura 5.5.17) através do software Statistica 5,6, observa-se que concentrações elevadas do sal de amina do AC favorecem o rendimento de clavulanato de potássio. Os valores máximos obtidos para Y (%) foram de 94,72, 94,25 e 92,55% referentes aos níveis 0, 1 e 1,68 que correspondem às concentrações de 25, 35 e 41,8mg/ml respectivamente. Um maior rendimento está associado a uma faixa de temperatura ao redor de 20°C, ou melhor, no intervalo entre 15 e 25°C. Ainda para elevada concentração do sal de amina do AC, uma maior concentração de 2-etil é desejável. O maior rendimento encontrado (94,72%)

corresponde ao nível 1,68 para o 2-etil, ou seja, no qual a concentração do 2-etil é a mais elevada (1,2 molar), (Figura 5.5.17 c).

Temperaturas inferiores a 15°C quando associadas às baixas concentrações de sal de amina (menores que 15mg/ml), resultam em um decréscimo no rendimento. Verificou-se, pela análise da Figura 5.5.17 (b), que ainda no intervalo de temperatura de 15 a 25°C, o rendimento da reação de precipitação é favorecido, atingindo 91,99 e 94,72% nos níveis mais extremos para o 2-etil, (-1,68 e 1,68 respectivamente) que correspondem a menor e a maior concentrações do 2-etil (0,2 e 1,2 respectivamente).

Pela análise das superfícies de respostas verificou-se que a melhor faixa de temperatura para a reação de precipitação estudada está ao redor dos 20°C. Essa temperatura foi mantida durante toda a adição do 2-etil (que variou em cada ensaio, devido à variação da concentração inicial do sal de amina do AC) e também durante o tempo de indução de 45 minutos após finda a adição do 2-etil. Essa informação fornecida pelo planejamento fatorial é muito importante, pois significa (em escala industrial) um menor gasto com energia, mantendo um rendimento final elevado de clavulanato de potássio. Para a uma reação similar a patente Cook e Wilkins (1995) descreveu que a temperatura após adição do 2-etil (15 minutos) a solução-mãe foi mantida a 5°C por uma hora e meia, obtendo um rendimento final de 91,72 %. O ensaio 14 realizado a 20°C e com tempo de indução de apenas 45 minutos e mantido nessa mesma temperatura durante todo o tempo, obteve um rendimento de 94,72 % de clavulanato de potássio, sendo inclusive o maior rendimento observado no planejamento fatorial.



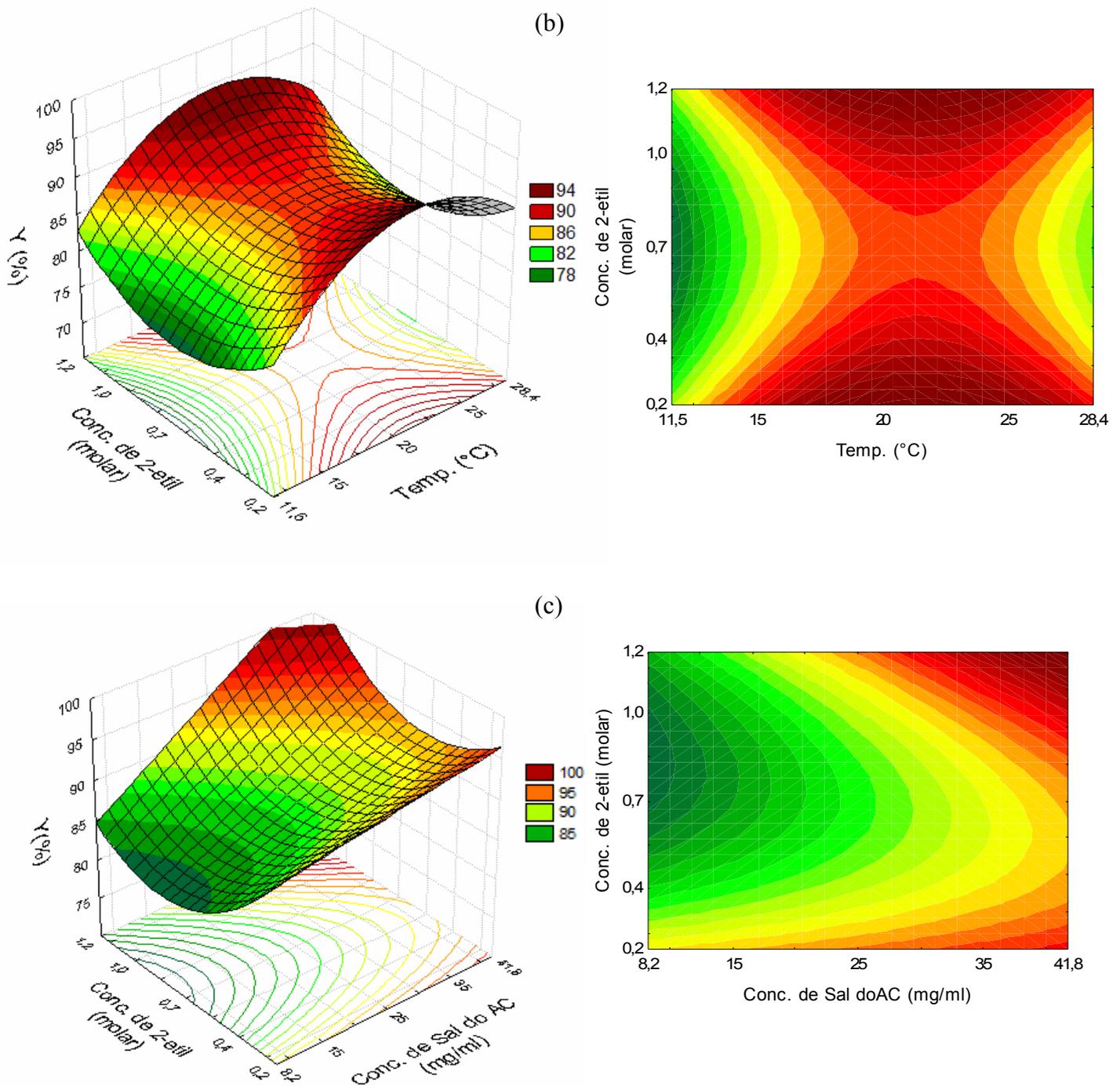


Figura 5.5.17 – Superfícies de resposta e curvas de contornos para Y (%) em função: (a) da Conc. de sal do AC e da Temp.; (b) da Vazão de 2-etil e da Temp.; (c) da Vazão de 2-etil e da Conc. de sal do AC.

A reação estudada apresentou as mesmas vantagens que a reação R₁ (amina) frente à reação R₀ (reação direta); maior estabilidade da reação, permitindo que esta ocorra satisfatoriamente em todo o intervalo estudado e ainda sem a presença de incrustação e sem a formação de óleo ou de soluções coloidais. Foi observado que a nucleação não ocorria na adição das primeiras gotas do 2-etilexanoato, mas após um tempo de adição que variou de 10 a 30 minutos dependendo da concentração inicial do sal de amina do AC e da concentração de 2-etil adicionado (diferentemente do que ocorreu nos ensaios para a reação direta, que turvou logo na adição das primeiras gotas de 2-etil).

As vantagens observadas mostraram que a escolha da passagem por um intermediário estável (sal de amina do AC - R₁) e sua posterior conversão a clavulanato de potássio (R₂), foi uma experiência muito bem-sucedida, gerando excelentes resultados. Os problemas comumente encontrados para as reações de precipitação (aglomeração, formação de soluções coloidais e incrustação dos cristais) que estiveram presentes na reação direta (R₀) foram devidamente solucionados com a adoção dessa medida e ainda foram obtidos rendimentos elevados, mostrando que as reações R₁ e R₂ foram otimizadas, através dos planejamentos utilizados.

5.5.3.1 Confirmação experimental das condições otimizadas

Foram realizados três ensaios nas mesmas condições empregadas para o ensaio 5 do DCCR com volume de 50mL cada, utilizando o AC proveniente da amostra clavulanato/celulose. Embora esse ensaio não tenha apresentado o maior rendimento encontrado dentre os demais ensaios efetuados no DCCR, ele foi escolhido por apresentar uma das menores concentrações do sal de amina do AC (15mg/mL), ou seja, uma menor massa inicial de sal de amina do AC era necessitada, facilitando desse modo em termos operacionais a execução destes experimentos.

Os rendimentos encontrados de 78,5, 76,3 e 77,9% e a média destes de 77,6 % ($\pm 0,93$) para o clavulanato de potássio foram ligeiramente inferiores aos observados para o ensaio 5 (80,3%). Acreditamos que essa variação seja muito pequena, assim estes foram considerados adequados, validando experimentalmente os resultados obtidos no planejamento completo.

5.5.3.2 Ensaios para confirmação do tempo de indução

No planejamento fatorial utilizado, após terminada adição de 2-etil, a solução-mãe permanecia mantida sob mesma temperatura e agitação por um período de 45 minutos, esse período em que ocorre o crescimento dos cristais formados foi chamado de tempo de indução.

As patentes, Yang *et al.* (1994) e Cook e Wilkins (1995) descreveram ensaios nos quais os tempos de indução utilizados eram bem maiores chegando a 1,5 a 2 horas. Por esse motivo decidiu-se avaliar se o tempo de 45 minutos empregado estaria proporcionando um máximo rendimento para a reação de precipitação estudada.

Assim baseando-se nas condições empregadas para os ensaios do ponto central do DCCR foram realizados 2 ensaios variando-se apenas o tempo de indução de 1,5 hora e 2 horas.

Os rendimentos obtidos para esses ensaios foram de 89,1 e 87,3 % de clavulanato de potássio, e estão muito próximos da média dos valores de 87,76% observados para os ensaios do ponto central obtidos com tempo de indução de 45 minutos.

As reações de precipitação são governadas por uma das etapas, nucleação ou crescimento. Se a etapa de nucleação predomina o resultado é a formação de um precipitado contendo um grande número de partículas, caso o crescimento seja predominante, um número pequeno de partículas é produzido. Na segunda etapa é esperado que o tempo de indução exerça uma maior influência do que para a etapa na qual predomine a nucleação. Assim podemos concluir que para dentro da faixa que compreende as condições avaliadas para a reação de precipitação do clavulanato de potássio, a etapa predominante é a da nucleação com a formação de muitos cristais de tamanho reduzido, e que neste caso o tempo de indução utilizado encontra-se adequado.

A Figura 5.5.18 mostra as fotomicrografias obtidas em MEV, utilizando-se uma amostra do precipitado obtido no ensaio 17 (ponto central).

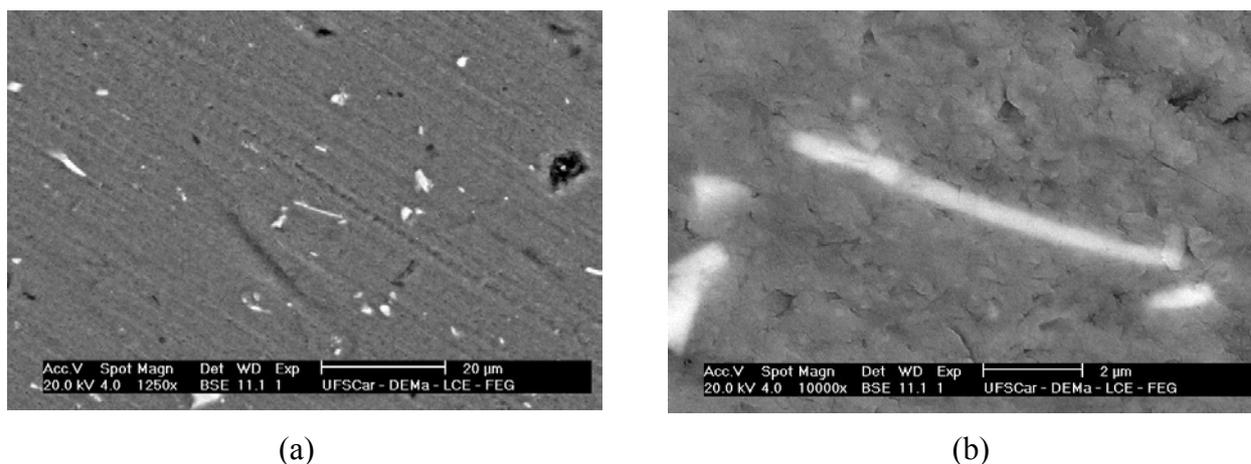


Figura 5.5.18 - Fotomicrografias para o ensaio 17 (DCCR) obtidas utilizando-se Sistema BSE: (a) com ampliação de 1250X; (b) com ampliação de 10000X.

Observando a Figura 5.5.18 nota-se que os cristais de clavulanato de potássio obtidos para o ensaio 17 (DCCR) a partir da amostra de Clavulin®, são muito pequenos, finos e em formato de agulha. Geralmente, soluções muito supersaturadas possuem uma taxa de nucleação elevada, gerando muitos cristais de tamanho pequenos e acarretando na formação de agulhas ou plaquetas. Este é o caso da reação de precipitação estudada.

5.5.3.3 Ensaio para o caldo de fermentação

Depois de concluído o planejamento fatorial, foi realizado um experimento para o caldo de fermentação, utilizando as mesmas condições do ensaio 17 (DCCR), pois este ensaio apresentou uma das melhores respostas para a estabilidade dos cristais formados (discutido em tópico posterior).

O rendimento obtido nessa etapa foi de 72,37 %. O rendimento global encontrado foi de 32,57%. É preciso salientar que o rendimento global está associado à quantidade inicial do AC presente no caldo de fermentação que foi submetido à extração com solvente (acetato de etila) e posterior passagem pela etapa de precipitação com a formação do intermediário estável (sal de amina do AC), que em seguida foi convertido a clavulanato de potássio. Considerando, na melhor das hipóteses, que o rendimento obtido na etapa de extração é de apenas 45% da massa inicial de AC, consegue-se observar que o pelo baixo rendimento global verificado é sem dúvida devido a essa etapa de extração com solvente orgânico. As duas reações de precipitação empregadas (R_1 e R_2) apresentaram rendimentos elevados em várias condições investigadas, mostrando dessa maneira que foi possível otimiza-las através do emprego do planejamento fatorial e ainda propiciando a precipitação do clavulanato de

potássio com uma pureza elevada, a partir do AC presente no caldo de fermentação, atingindo-se assim o objetivo desta tese. A Figura 5.5.19 mostra o espectro obtido para o precipitado formado na reação R₂ para o caldo de fermentação.

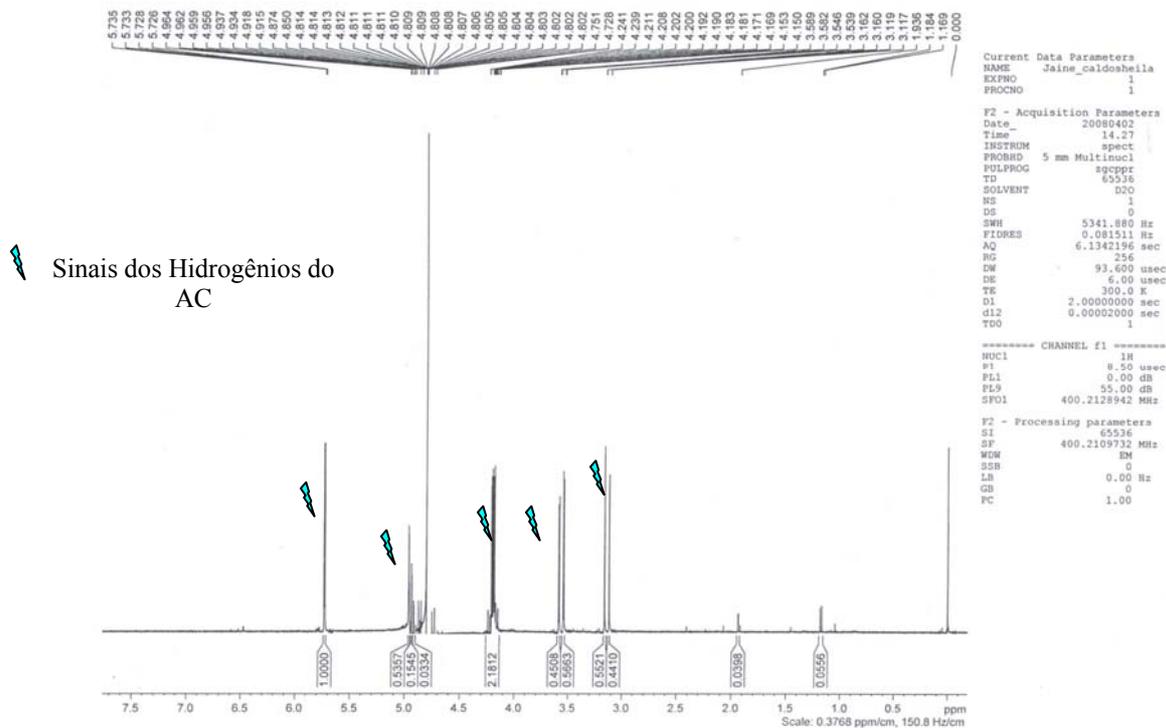


Figura 5.5.19 – Espectro de RMN ¹H do clavulanato de potássio precipitado do caldo de fermentação através da reação indireta R₂.

A análise do espectro de RMN (Figura 5.5.19) mostrou a presença de clavulanato de potássio (sinais de AC), com uma pureza elevada e ainda livre da presença da amino cetona (um dos produtos de degradação).

As fotomicrografias dos cristais de clavulanato precipitados (Figuras 5.5.20, 21 e 22) foram obtidas da mesma amostra, utilizando-se o sistema BSE nas ampliações de 500X, 1500X e 10000X respectivamente.

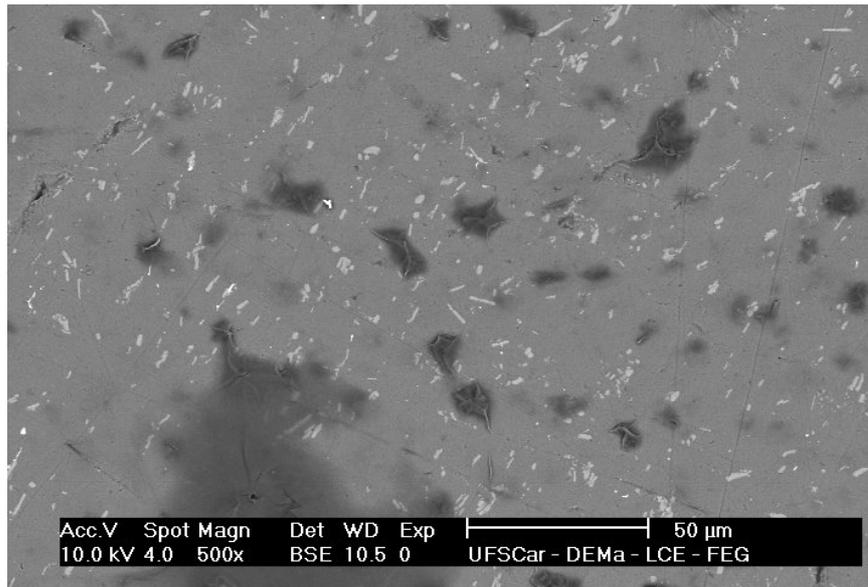


Figura 5.5.20 - Fotomicrografia do ensaio para o caldo obtida utilizando-se Sistema BSE com ampliação de 500X.

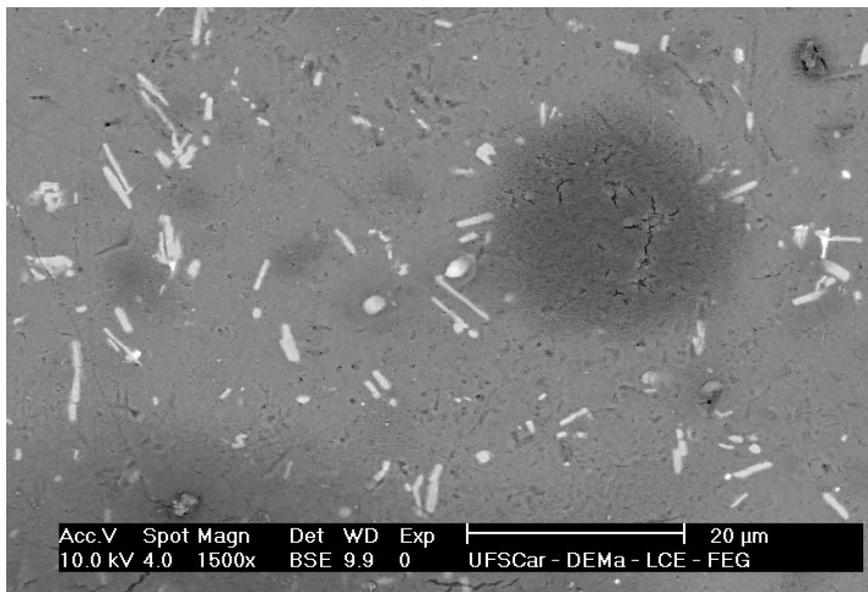


Figura 5.5.21 – Fotomicrografia do ensaio para o caldo obtida utilizando-se Sistema BSE com ampliação de 1500X.



Figura 5.5.22 – Fotomicrografia do ensaio para o caldo, obtida utilizando-se Sistema BSE com ampliação de 10000X.

Pelas fotomicrografias obtidas em MEV (Figuras 5.5.20 a 22) observou-se que os cristais de clavulanato de potássio precipitados a partir do AC presente no caldo de fermentação possuíam a forma de agulhas, muito pequenas e finas, mas não apresentavam aglomeração. Cristais muito semelhantes a esses foram obtidos para o ensaio 17 (DCCR) a partir da amostra de Clavulin® (Figura 5.5.18 já exibida anteriormente), certificando dessa maneira, de que a reação de precipitação para o caldo de fermentação (reproduzida nas mesmas condições do ensaio 17) ocorreu de maneira muito satisfatória.

Ainda para essa reação não foi observada a presença de incrustação e tampouco a formação de colóides, indicando que a reação encontra-se adequada para ser reproduzida em escala industrial.

Pelos resultados obtidos acima confirmou-se que a reação indireta com a passagem por um intermediário estável (R_1 e R_2) é mais adequada para ser utilizada como a etapa final do processo de purificação do AC do caldo de fermentação do que a reação direta (R_0), e também frente a todos os demais métodos anteriormente estudados.

5.5.3.4 Verificação da estabilidade para os cristais formados

A estabilidade dos cristais durante o período de secagem e armazenamento, também foi analisada. Foi verificado a utilização da celulose para o armazenamento e o empedramento dos cristais (caking) armazenados com celulose.

Os cristais de clavulanato de potássio, provenientes dos ensaios realizados para o planejamento fatorial das reações R_0 e R_2 , foram armazenados com celulose a temperatura de 5°C.

Sabe-se que o AC é um óleo extremamente higroscópico e altamente instável e que quando exposto ao ambiente possui uma velocidade de degradação muito elevada. Por isso é desejado o seu armazenamento na forma de sal de potássio, sendo o clavulanato de potássio o sal mais estável dentre os sais possíveis de serem utilizados em medicamentos. Todavia os cristais formados apresentavam ainda uma certa higroscopicidade. Sem a adição da celulose, verificou-se que havia uma incorporação de água no precipitado que progressivamente ia retornando a sua forma ácida, ou seja, a de óleo. O óleo formado possibilita também que ocorra a degradação do AC, inviabilizando dessa forma o seu emprego no medicamento.

Desse modo a celulose passou a ser utilizada para todos os experimentos, sendo adicionada diretamente após a etapa de filtração dos cristais precipitados.

O empedramento dos cristais armazenados com celulose foi verificado nos ensaios realizados para a reação de precipitação R_2 (DCCR).

A tendência de alguns materiais cristalinos de empedrar é atribuída a uma pequena quantidade de dissolução que ocorre na superfície do cristal seguida de evaporação desse solvente. Isso faz com que os cristais fiquem fortemente unidos (empedrados). A causa do empedramento pode variar para diferentes materiais, geralmente está associada, ao tamanho e forma dos cristais, conteúdo de umidade, a pressão na qual o produto está armazenado, variações de temperatura e umidade durante o tempo de estocagem e o próprio tempo de estocagem. Todos esses fatores podem contribuir para tornar o produto cristalino granular em sólidos empilhados (MULLIN, 1993).

Foi observado para os cristais formados o aparecimento de grumos sólidos e compactos, durante o tempo de estocagem e que geralmente estavam associados a também uma mudança de coloração dos precipitados.

Assim a Tabela 5.5.15 foi realizada baseando-se na observação efetuada para os precipitados obtidos para a reação R_2 (DCCR) depois de transcorridos 100 dias de armazenamento a 5°C e com adição de celulose na proporção aproximada de 1:1. O rendimento (Y) obtido para esses ensaios foi re-exibido para facilitar as comparações.

Tabela 5.5.15 – Observações efetuadas para os precipitados obtidos para R₂ (DCCR), após 100 dias de armazenamento a 5°C e com adição de celulose (1:1).

Ensaio	Y(%)	Presença de Empedramento	Mudança de Coloração
1	83,68	Levemente	Levemente
2	85,33	Levemente	Levemente
3	87,80	Levemente	Levemente
4	89,42	Não	Não
5	80,30	Levemente	Levemente
6	87,23	Levemente	Levemente
7	91,81	Sim	Sim
8	94,25	Intensa	Intensa
9	74,70	Levemente	Levemente
10	81,42	Intensa	Intensa
11	80,09	Levemente	Levemente
12	92,55	Não	Não
13	91,99	Levemente	Levemente
14	94,72	Levemente	Levemente
15	85,16	Não	Não
16	89,40	Não	Não
17	88,72	Não	Não

Pela observação da Tabela 5.5.15 suspeitou-se que o empedramento pudesse estar relacionado com a inclusão de solvente nos cristais formados. O crescimento muito rápido de uma das faces (características de agulhas) pode fazer com que haja um encapsulamento de solvente em sua estrutura durante esse crescimento acelerado, por esse motivo, estes cristais tornam-se mais quebradiços na etapa de secagem uma vez que ocorre a evaporação desse solvente retido, aumentando assim a sua área de exposição e consequentemente causando um maior empedramento.

Contudo é preciso ressaltar que Mullin (1993) cita que o procedimento adequado para tratamento dos cristais seria a execução da filtração e de posterior secagem desses em atmosfera inerte e só então a celulose seria adicionada (para o armazenamento). No entanto a etapa de filtração e posterior secagem dos cristais (em dessecador), realizadas nos experimentos desta tese ocorreu em atmosfera ambiente e não controlada, pois a técnica

descrita envolve a utilização de câmaras de atmosfera controlada, não disponíveis no laboratório.

Dessa maneira a não utilização de atmosfera controlada também pode ter contribuído para o aparecimento do empedramento observado. Entretanto notou-se que para alguns ensaios, realizados nas mesmas condições de filtração e de adição de celulose, não houve o aparecimento de empedramento, e o produto cristalino manteve-se granular mesmo após transcorridos 100 dias de armazenamento. Isso pode ser explicado pela variação das condições empregadas para os ensaios realizados para o DCCR, que permitiram uma melhor formação dos cristais de clavulanato de potássio, sem a inclusão de solvente e com a formação de cristais de tamanhos mais uniformes, acarretando com isso uma maior estabilidade para o precipitado do produto final.

Se para outras substâncias o aparecimento do empedramento confere apenas problemas de ordem mecânica, no sentido de que esses terão que passar por uma etapa a mais para triturar os grumos formados antes da sua utilização, para o clavulanato de potássio um aumento na absorção de umidade e conseqüente formação de um empedramento maior pode estar favorecendo que junto a isto ocorra também a sua degradação.

No intuito de verificar se o precipitado de clavulanato de potássio estava de fato estável (e se havia degradação) foram realizadas análises em RMN-¹H (Figuras 5.5.23 e 5.5.24) para os ensaios 10 e 17, para os quais foi observado um empedramento muito intenso e o não aparecimento de empedramento, respectivamente.

A análise em RMN do espectro obtido para o ensaio 10 mostrou que não havia sinais de AC no precipitado, indicando assim que houve uma completa degradação durante o tempo de estocagem. É importante salientar que a presença de AC no precipitado na época em que ocorreu a reação havia sido confirmada por CCD, certificando de que o precipitado obtido realmente era clavulanato de potássio.

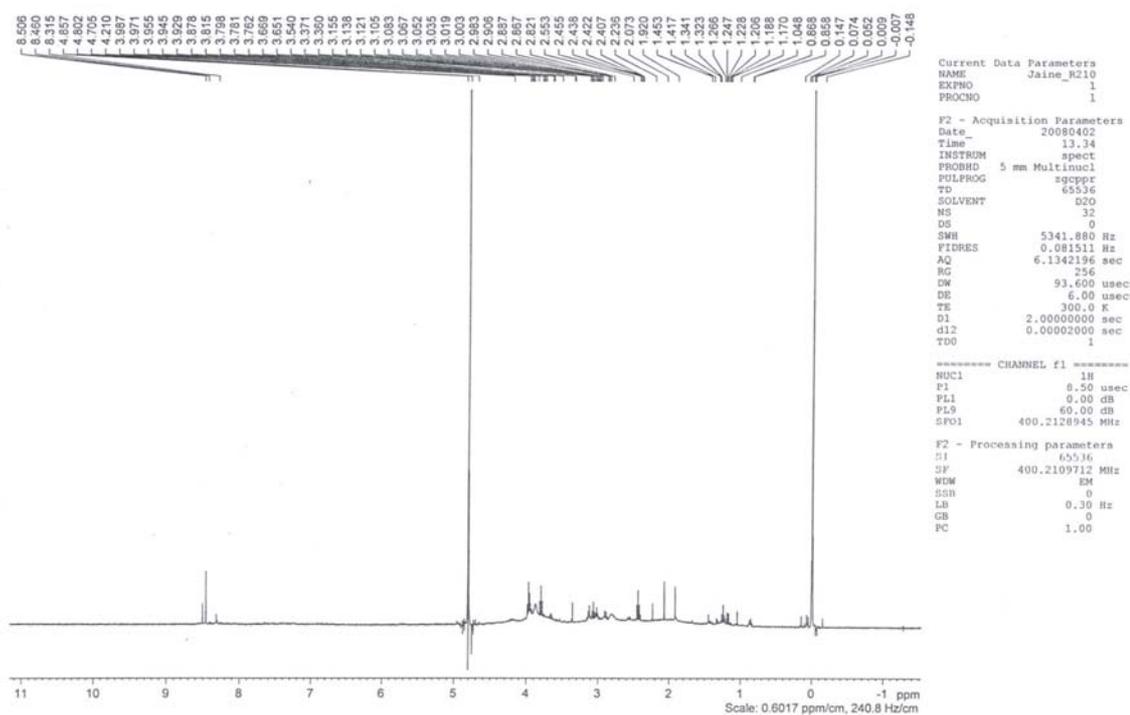


Figura 5.5.23 – Espectro de RMN ^1H do clavulanato de potássio precipitado a partir do ensaio 10 (DCCR), depois de 100 dias de armazenamento.

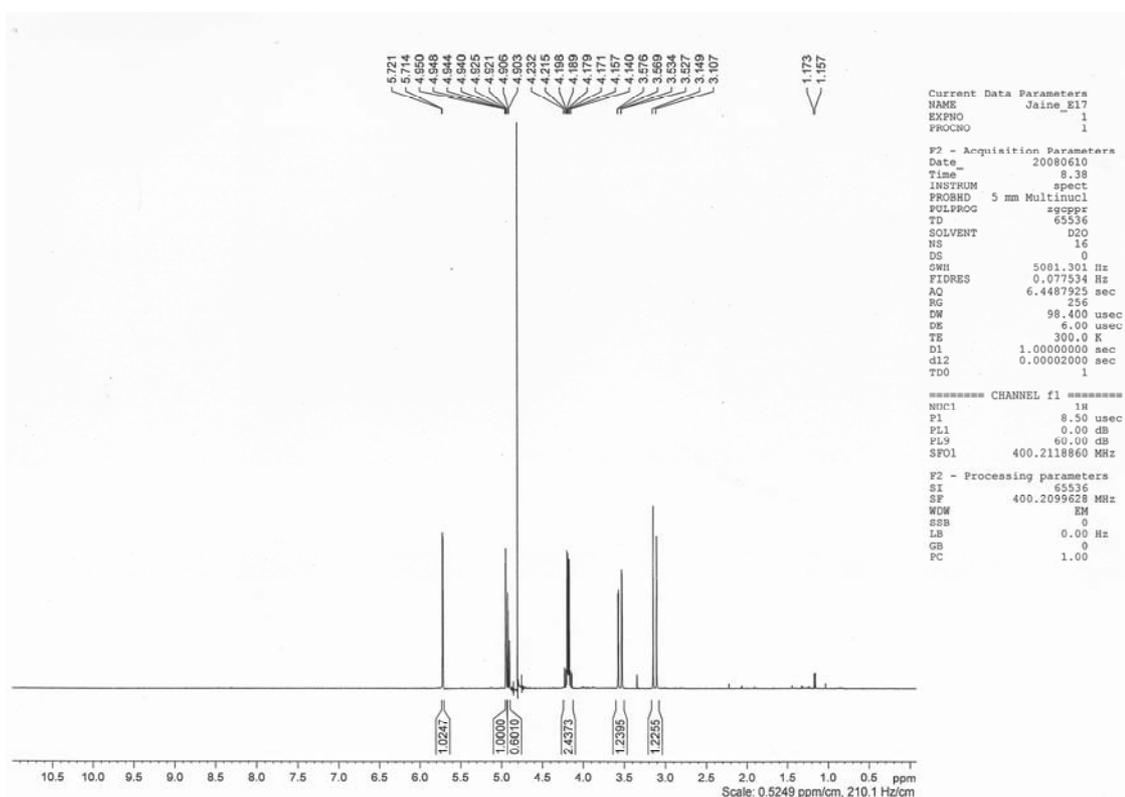


Figura 5.5.24 – Espectro de RMN ^1H do clavulanato de potássio precipitado a partir do ensaio 17 (DCCR), depois de 100 dias de armazenamento.

Pela análise do espectro da Figura 5.5.24 verificou-se que o clavulanato de potássio presente na amostra, mesmo depois de transcorridos 100 dias de armazenamento a 5°C continuava com elevada pureza e não apresentava sinais de degradação (amino cetona), confirmando dessa maneira a estabilidade dos cristais obtidos no ensaio 17 (ponto central) e a suspeita inicial de que precipitados nos quais ocorreu um maior empedramento podem apresentar menor tempo de armazenamento devido ao favorecimento da reação de degradação.

Assim a utilização do planejamento fatorial mostrou-se muito vantajosa permitindo não só a otimização da reação empregada, mas também a obtenção de rendimentos elevados associados às condições que promoveram uma maior estabilidade para os cristais formados durante seu armazenamento.

6 CONCLUSÕES

Através dos planejamentos desenvolvidos para a reação direta de precipitação estudada do AC com o 2-etilexanoato de potássio (R_0), verificou-se que pequenas variações nas condições iniciais podem causar a instabilidade nessa reação levando a formação de óleo e conseqüente perda do produto desejado, bem como a incrustação sempre presente em maior ou em menor grau. Foram observados valores de 73,89 e 75,83% para o rendimento de clavulanato de potássio (para os ensaios 1 e 5 do DCCR respectivamente).

Para o caldo de fermentação foram reproduzidas condições do ensaio 1 (DCCR) possibilitando a obtenção de um rendimento de 69,53% nesta etapa e de 31,29% para o rendimento global. Entretanto é preciso salientar que a etapa de extração com solvente (incluída juntamente com a de precipitação no rendimento global), apresenta rendimento máximo de apenas 45% de toda massa de AC que aí estava presente, sendo dessa forma a grande responsável pelo baixo rendimento global observado.

Para a reação indireta de precipitação, através da passagem por um intermediário estável com a reação do AC com a t-octilamina (R_1), e posterior conversão desse intermediário a clavulanato de potássio através da reação do sal de amina do AC formado com o 2-etilexanoato de potássio (R_2), foi verificado que não houve a formação de incrustação, de óleo ou soluções coloidais, e que essas reações ocorrem satisfatoriamente sob condições mais extensas do que para a reação direta (R_0), propiciando a sua utilização em escalas maiores.

Através do planejamento experimental utilizado conseguiu-se otimizar a reação R_1 obtendo-se rendimentos de 94,49 e 93,57% para os ensaios 1 e 11 do DCCR.

Ainda para a reação R_1 foi observada uma grande estabilidade do intermediário formado (sal de amina do AC) inclusive quando exposto ao ambiente por um período prolongado.

A utilização dessa reação (R_1) para o AC presente no caldo de fermentação promoveu uma boa purificação, indicando uma grande seletividade proporcionada pelo emprego da t-octilamina.

A reação indireta R_2 também foi otimizada através do planejamento fatorial empregado, obtendo-se rendimentos de 94,72 e 94,25% para os ensaios 14 e 8 respectivamente (DCCR).

O emprego da reação indireta com a passagem por um intermediário estável já nas condições otimizadas pelo planejamento fatorial para o AC presente no caldo de fermentação, propiciou a precipitação do clavulanato de potássio com uma pureza elevada e com a obtenção de bons rendimentos para cada etapa que compreendeu uma reação específica, R_1 e R_2 , sendo os valores encontrados de 80,21 e 72,37%, respectivamente. O valor encontrado para o rendimento global foi de 32,57%. Observou-se que a responsabilidade pelo baixo rendimento global verificado é sem dúvida a etapa de extração com solvente orgânico, mais especificamente o acetato de etila.

Finalmente, o emprego do planejamento fatorial para a reação indireta mostrou-se muito vantajoso, pois proporcionou a obtenção de rendimentos elevados associados às condições que promoveram uma maior estabilidade para os cristais de clavulanato de potássio formados, favorecendo dessa maneira o seu emprego em escala industrial.

7 SUGESTÕES

Em vista das conclusões obtidas neste trabalho pode-se fazer as seguintes sugestões:

No intuito de melhorar os rendimentos obtidos para as reações de precipitação do AC proveniente do caldo de fermentação, poderia ser incluída uma etapa cromatográfica após a ultrafiltração e anteriormente à etapa de extração com solvente orgânico, que promovesse uma maior purificação do caldo, com a retirada de pigmentos e impurezas com baixo peso molecular cuja presença estaria ainda diminuindo o rendimento das reações de precipitação posteriormente empregadas.

Uma vez que a etapa de extração com solvente orgânico figurou como a etapa limitante do processo de purificação empregado para o AC, um estudo utilizando o planejamento fatorial para extrações realizadas com a combinação de dois ou mais solventes poderia ser empregado na tentativa de se aumentar o K_p e o rendimento para essa etapa. Um aumento do K_p seria uma vantagem muito interessante industrialmente, pois embora neste trabalho a manipulação da concentração do AC inicial no solvente orgânico tenha sido obtida utilizando como artifício a evaporação do acetato de etila, (evitando-se dessa maneira a necessidade de se partir de soluções muito concentradas de AC a partir do Clavulin[®], que poderiam acarretar na influência da amoxicilina), para a indústria esta opção não é vantajosa.

Assim a obtenção da concentração inicial no solvente teria que ser garantida através de alternativas como uma pré-concentração da solução aquosa anteriormente à etapa de extração, através de técnicas cromatográficas ou osmose reversa, ou através da utilização de uma mistura de solventes que proporcionasse um aumento no K_p , ou seja, aumentando a concentração de AC na fase orgânica, possibilitando dessa maneira partir da concentração inicial de AC adequada para iniciar a reação de precipitação.

Também se sugere que seja feito um estudo para a recuperação dos sub-produtos gerados na reação de precipitação do clavulanato de potássio a partir do sal de amina do AC.

Ainda, um estudo da cinética de cristalização e a verificação da influência das impurezas provenientes do caldo de fermentação na formação dos cristais de clavulanato de potássio, também seriam de grande interesse.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGGALEY, K.H.; BROWN, A.G.; SHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavans. **Natural Product Reports**, v.14, n.4, p.309-333, 1997.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O. Kinetic studies of clavulanic acid recovery by ion-exchange chromatography. **Bioseparation**, v.10, p.221-227, 2002.

BARRERO, E. Avaliação de Substâncias Bioativas. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2001, Brasília, **Anais...** Brasília: MCT, 2001.

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 (SINAFERM), 13º, 2000, Teresópolis, **Anais...** Rio de Janeiro: UFRJ, 2000.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G. C. HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p. 31-36, 2004.

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

BOX, S. J. Process for the preparation of clavulanic acid. British Patent 1563103, 1980.

BRITES, L.M.; HIRATA, D.B.; PASOTTO, M.B.; HOKKA, C.O. Clavulanic acid extraction from cultivation medium by organic solvent and aqueous two phase system. In: XX CONGRESSO MERCOSUL DE ENGENHARIA QUÍMICA (EMPROMER), 20º, 2005, Costa Verde. **Anais...** Rio de Janeiro: UFRJ, 2005.

BRITO, A. B. N. **Estudo da cristalização da lctose em diferentes solventes**. 2007. 132 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

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

BROWN, A. G.; CORBETT, D. F.; GOODACRE, J.; HARBRIDGE, J. B.; HOWARTH, T. T.; PONSFORD, R. J.; STIRLING, I. Clavulanic acid and its derivatives. Structure elucidation of clavulanic acid and the preparation of dihydroclavulanic acid, isoclavulanic acid, esters and related oxidation products. **Journal of Chemical Society Perkins Transitions I**, p.635-649, 1984.

BUTERLLY, P. G.; KEOHANE, G.J.; KOSAL, E. F. Improved process for the preparing potassium clavulanate. WO Patent 47301, 1997.

BUTTERLY, P. G.; GILROY, J. K.; KOSAL, E. F. Process for preparing potassium clavulanate. US Patent 0004595A1, 2002.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis and fermentation. In: VANDAME, E. J. **Biotechnology of Industrial Antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984. v.22, p225-235, 1984.

BUYNAK, J.D. Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p.930-940, 2005.

CAPUDER, E. Preparation of clavulanate salts. US Patent 6180782B1, 2001.

CARDOSO, J. P. Process for the isolation of a pharmaceutically acceptable alkali metal salt of clavulanic acid. WO Patent 42858, 1998.

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

COOK, M.A.; CURZONS, A. D.; WILKINS, R.B. Clavulanic acid amine salts, their preparation and use. US Patent 574903, 1987.

COOK, M. A.; WILKINS, R. B. Process for the preparation of clavulanic acid. WO Patent 25557, 1993.

COOK, M. A.; WILKINS, R. B. Process for the preparation of clavulanic acid. EP Patent 0672699A1, 1995.

COOK, M. A. Process for the precipitation of potassium clavulanate. WO Patent 05142, 1997.

CONDOTTA, R. **Estudo do processo de precipitação do fosfato bicálcico**. 2002. 148 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. The β -lactam antibiotics: past, present and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 5-19, 1999.

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

FLEMING, I. D.; NOBLE, D.; NOBLE, H. M.; WALL, W. F. β -lactam antibiotic in purified form. British Patent 1543563, 1979.

FONSECA, L. A. **Antibióticos na clínica diária**. 2. ed. Rio de Janeiro: EPUME, 1986. 427 p.

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.

FUKASE, H.; HASEGAWA, T.; HATANO, K.; IWASAKI, H.; YONEDA, M. C-2801X, a new cephamycin-type antibiotic II. Isolation and characterization. **The Journal of antibiotics**, p. 113-120, 1975.

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

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

HOWARTH, T. T.; BROWN, A. Clavulanic acid, a novel β -lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus*; X-ray crystal structure analysis. **J.C.S. Chem. Comm**, 1976.

KERKHOF, P.T. Improved process for the preparation of salts and esters of clavulanic acid. WO Patent 04028, 2000.

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

KNOWLES, J.R. Penicillin resistance: the chemistry of the β -lactamase inhibition. **Accounts of Chemical Research**, v.18, p.97-107, 1985.

LIRAS, P. & RODRÍGUEZ-GARCIA, A. Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p.467-475, 2000.

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

MAYER, A. F.; 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.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de Soluções, reagentes e solventes; padronização, preparação, purificação**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltd, 1981. 627 p.

MULLIN, J.W. **Crystallization**, 3. ed. London: Butterworth-Heinemann Ltd, 1993. 527 p.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 3. ed. Tradução de Patrícia Josephine Vouex. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. 604 p.

NABAIS, A.M.A., CARDOSO, J.P. Ultrafiltration of fermented broths and solvent extraction of antibiotics. **Bioprocess Engineering**, p.215-224, 1995.

NÝVLT, J., **The Kinetics of Industrial Crystallization**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985. 350 p.

NÝVLT, J., HOSTOMSKÝ, J., GIULIETTI, M. **Cristalização**. São Carlos: EdUFSCAR/IPT, 2001. 160 p.

ORTIZ, S. C. A; HOKKA, C. O.; BADINO JÚNIOR, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 40, 1071-1077, 2007.

PUENTES, J. L. F.; VALLE, M. A. M.; MALDONADO, F.S.; IZARD, T. O.; PIA, L. C.; SOUSA-FARO, J. M. F. Preparation of clavulanic acid and its salts and esters. EP Patent, 1998.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 325 p.

SILVA, C. S.; JACINTO, J. S.; CASTRO, S. A.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Aspectos gerais da microfiltração e ultrafiltração na separação de ácido clavulânico de caldos de fermentação. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 16., Curitiba. **Proceedings...** Curitiba: UFPR, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Tradução de Marco Tadeu Grassi. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006. p.298-317.

SÖHNEL, O.; GARSIDE, J. **Precipitation**: Basic principles and industrial applications. 3. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd, 1992. 391 p.

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

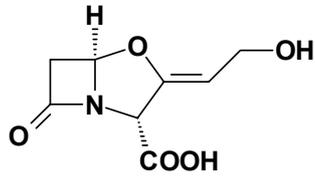
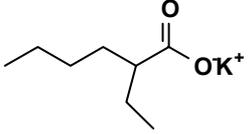
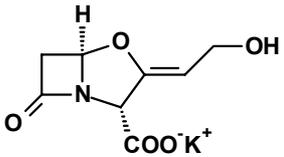
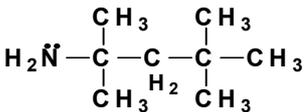
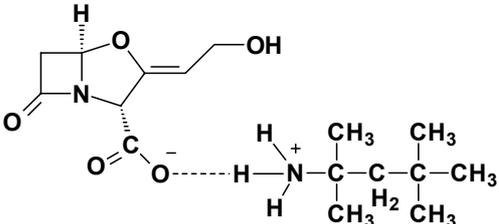
WEBER, P. G. Diamine salts of clavulânico acid. WO Patent 22873, 1994.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1551-1470, 2005.

YANG, H. S.; CHOI, N. H.; LEE, S. C.; HAM, Y. B.; MIN, K. B. Process for the purification of crude clavulanic acid. EP Patent 0594099A1, 1994.

APÊNDICE A
(Cálculo estequiométrico e memória de cálculo)

Valores Aproximados da Massa Molecular (MM)

 <p>Ácido clavulânico</p>	<p>MM = 199 g/mol</p>
 <p>2-etilexanoato de potássio</p>	<p>MM = 182 g/mol</p>
 <p>Clavulanato de potássio</p>	<p>MM = 237 g/mol</p>
 <p>t-octilamina</p>	<p>MM = 129 g/mol</p>
 <p>Sal de amina do AC</p>	<p>MM = 328 g/mol</p>

Cálculo Estequiométrico Reação Direta de Precipitação do AC (R₀)

Exemplo para o Ensaio 1 do Planejamento Fracionado:

Ácido Clavulânico

massa inicial = **250** mg (equivalente a 2 comprimidos de 125 mg cada)

Na Extração com o Acetato de Etila o rendimento é de 45%:

massa presente no solvente = $250 \cdot 0,45 = 112,50$ mg ou 0,1125 g

MM=199 g/mol
 $n = m/MM$
 $n = 0,000565326$ mol

2-etilexanoato de potássio

$n = 0,000565326$ mol
 MM=182 g/mol como $n = m/MM$ temos:
 $m = 0,102889$ g ou $m = 102,89$ mg

Mas para o 2-etil trabalha-se com molaridade (W) então:

$W = m/MM \cdot V(L)$

$W =$ **0,5** entrar com a molaridade desejada (0,5; 2,0; 1,25)

$V(L) =$ 0,001131 L ou

$V(mL) =$ **1,13** ml ou arredondando: **1,15 mL** :
 é o Volume necessário de 2-etil na concentração escolhida para reagir todo o AC presente no solvente orgânico

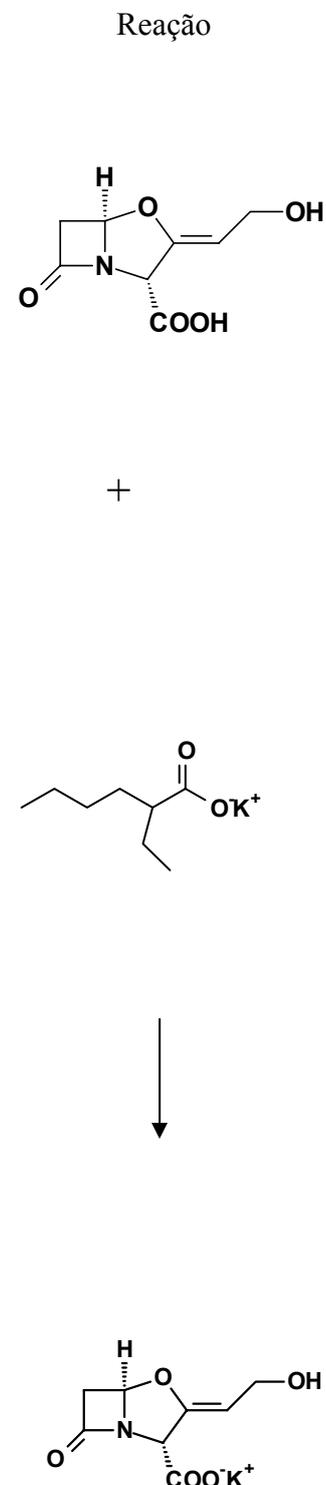
Clavulanato de potássio

$n = 0,000565326$ mol
 MM=237 g/mol como $n = m/MM$ temos:
 $m = 0,133982$ g

Massa Teórica (estequiométrica) $m =$ **133,98** mg

Massa Experimental $m =$ **40,19** mg (Ensaio 1)

Rendimento Final $Y =$ **30,00** %



Cálculo Estequiométrico
Reação Indireta com a passagem por um intermediário estável
Reação do AC com a t-octilamina (R₁)

Exemplo para o Ensaio 1 do Planejamento Completo:

Reação

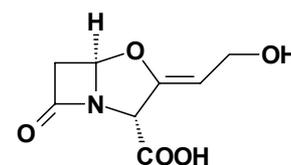
Ácido Clavulânico

massa inicial = 250 mg (equivale a 2 comprimidos de 125 mg cada)

Na Extração com o Acetato de Etila o rendimento é de 45%:

massa presente no solvente = $250 \times 0,45 = 112,50$ mg ou 0,1125 g

MM=199 g/mol
 $n = m/MM$
 $n = 0,000565326$ mol



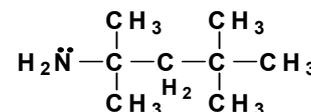
+

t-octilamina

$n = 0,000565326$ mol
 MM=129 g/mol
 $n = m/MM$
 $m = 0,072927$ g

Entretanto a amina utilizada possui pureza de 95% então:

$m = 0,072927 / 0,95 = 0,076765$ g ou 76,8 mg
 $d = m/V$ e $d = 0,805$ g/ml
 $V = m/d$
 $V = 0,095$ mL ou arredondando: 0,10 mL
 é o Volume necessário de t-octilamina para reagir com todo o AC presente no solvente orgânico



↓

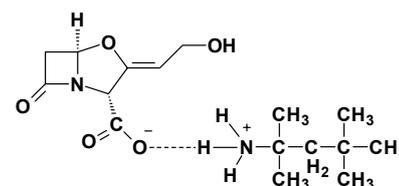
Sal de amina do AC

$n = 0,000565326$ mol
 MM=328 g/mol
 $n = m/MM$
 $m = 0,185427$ g

Massa Teórica m= 185,43 mg
 (estequiométrica)

Massa Experimental m= 175,22 mg (Ensaio 1)

Rendimento Final Y= 94,49 %



Cálculo Estequiométrico
Reação Indireta com a passagem por um intermediário estável
Reação do sal de amina do AC com o 2-etil (R₂)

Exemplo para o Ensaio 1 do Planejamento Completo:

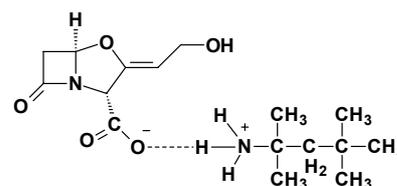
Reação

Sal de Amina do AC

massa inicial = 150 mg

MM= 328 g/mol
 $n=m/MM$

$n= 0,000457317$ mol



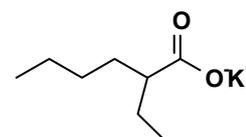
2-etilexanoato de potássio

$n=0,000457317$ mol
 MM=182 g/mol como $n=m/MM$ temos:
 $m=0,083232$ g ou $m= 83,23$ mg

Mas para o 2-etil trabalha-se com molaridade (W) então:

$W=m/MM * V(L)$
 $W= 0,4$ entrar com a molaridade desejada
 $V(L)= 0,001143$ L ou
 $V(ml)= 1,143$ mL ou arredondando: **1,15 mL:**
 é o Volume necessário para reagir com todo o sal de amina do AC

+



↓

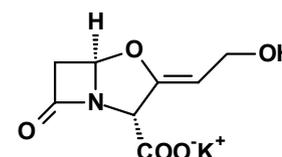
Clavulanato de potássio

$n=0,000457317$ mol
 MM=237 g/mol como $n=m/MM$ temos:
 $m=0,108384$ g

Massa Teórica $m= 108,38$ mg
 (estequiométrica)

Massa Experimental $m= 90,69$ mg (Ensaio 1)

Rendimento Final $Y= 83,68$ %



Cálculo da Concentração Inicial de AC no Solvente Orgânico

Através deste cálculo é possível prever a quantidade de comprimidos necessária para se atingir a concentração inicial de AC desejada, bem como o volume final de solvente orgânico, no caso o acetato de etila, obtido após sua concentração no evaporador rotativo.

Pelo exemplo adotado na reação direta, R_0 , (Ensaio 1) a concentração inicial desejada seria de 5mg/mL, portanto:

1 comprimido = 125 mg de AC

Para a concentração de AC = 5 mg/mL

Número de comprimidos utilizados = 2 unidades

Entretanto a massa extraída é de apenas 45% da massa inicial de AC, logo:

Massa extraída = Número de comprimidos * 125 * 0,45

Assim: $2 * 125 * 0,45 = 112,5$ mg

Como: Concentração = Massa extraída / volume logo:

Volume de acetato de etila = 22,5 mL é o volume final do solvente (após sua concentração) necessário para que a concentração inicial de AC a partir de 2 comprimidos seja de 5mg/mL.

Obs: Volumes muito inferiores a 10 mL não são apropriados para se trabalhar no reator encamisado, preferindo-se volumes iguais ou superiores a este. O número mínimo de comprimidos foi estipulado em 2, pois a massa obtida partindo-se de apenas 1 comprimido é muito reduzida, podendo neste caso, pequeninas perdas de massa ocasionar grandes variações no rendimento final, comprometendo desta forma o ensaio realizado.

Reação Direta de Precipitação do AC (R₀)

Planejamento Fracionado

$$2^{4-1} = 8+3pc = 11 \text{ ensaios}$$

Ensaio	Temp. (°C)	Conc. de AC (mg/mL)	Conc. de 2-etil (molar)	Vazão de 2-etil (gota/min)	Quantidade de Comprimidos	Vol. de Acetato de etila (mL)	Vol. de 2-etil estequiometria (mL)	Massa teórica estequiometria (mg)	Massa experimental (mg)	Y (%)
1	8	5	0,5	0,5	2	22,5	1,15	133,98	40,19	30,00
2	22	5	0,5	1,0	2	22,5	1,15	133,98	37,00	27,62
3	8	25	0,5	1,0	5	11,25	2,85	334,96	157,01	46,87
4	22	25	0,5	0,5	5	11,25	2,85	334,96	37,35	11,15
5	8	5	2,0	1,0	2	22,5	0,30	133,98	0,00	0,00
6	22	5	2,0	0,5	2	22,5	0,30	133,98	62,56	46,69
7	8	25	2,0	0,5	5	11,25	0,75	334,96	154,86	46,23
8	22	25	2,0	1,0	5	11,25	0,75	334,96	108,67	32,44
9	15	15	1,25	0,75	3	11,25	0,70	200,97	76,13	37,88
10	15	15	1,25	0,75	3	11,25	0,70	200,97	71,85	35,75
11	15	15	1,25	0,75	3	11,25	0,70	200,97	74,56	37,10

Reação Direta de Precipitação do AC (R₀)

Planejamento Completo (DCCR)

$$2^3 = 8 + 3pc + 6pa = 17 \text{ ensaios}$$

Ensaio	Conc. de AC (mg/mL)	Conc. de 2-etil (molar)	Vazão de 2-etil (gota/min)	Quantidade de Comprimidos	Vol. de Acetato de etila (mL)	Vol. de 2-etil estequiometria (mL)	Massa teórica estequiometria (mg)	Massa experimental (mg)	Y (%)
1	15	0,3	0,5	3	11,25	2,85	200,97	148,49	73,89
2	35	0,3	0,5	7	11,25	6,60	468,94	0,0	0,0
3	15	0,7	0,5	3	11,25	1,25	200,97	0,0	0,0
4	35	0,7	0,5	7	11,25	2,85	468,94	0,0	0,0
5	15	0,3	1,0	3	11,25	2,85	200,97	152,39	75,83
6	35	0,3	1,0	7	11,25	6,60	468,94	0,0	0,0
7	15	0,7	1,0	3	11,25	1,25	200,97	117,75	58,59
8	35	0,7	1,0	7	11,25	2,85	468,94	0,0	0,0
9	8,2	0,5	0,75	2	13,72	1,15	133,98	77,31	57,70
10	41,8	0,5	0,75	8	10,77	4,55	535,93	0,0	0,0
11	25	0,16	0,75	5	11,25	8,85	334,96	56,68	16,92
12	25	0,84	0,75	5	11,25	1,70	334,96	56,37	16,83
13	25	0,5	0,33	5	11,25	2,90	334,96	0,0	0,0
14	25	0,5	1,17	5	11,25	2,90	334,96	172,17	51,40
15	25	0,5	0,75	5	11,25	2,90	334,96	0,0	0,0
16	25	0,5	0,75	5	11,25	2,90	334,96	0,0	0,0
17	25	0,5	0,75	5	11,25	2,90	334,96	0,0	0,0

Reação Indireta com a passagem por um intermediário estável – Reação do AC com a t-octilamina (R₁)

Planejamento Completo (DCCR)

$$2^3 = 8 + 3pc + 6pa = 17 \text{ ensaios}$$

Ensaio	Temp. (°C)	Conc. de AC (mg/mL)	Vazão de amina (gota/min)	Quantidade de Comprimidos	Vol. de Acetato de etila (mL)	Vol. de amina estequiometria (mL)	Massa teórica estequiometria (mg)	Massa experimental (mg)	Y (%)
1	10	10	0,5	2	11,25	0,10	185,43	175,22	94,49
2	20	10	0,5	2	11,25	0,10	185,43	156,60	84,45
3	10	20	0,5	4	11,25	0,20	370,85	284,40	76,69
4	20	20	0,5	4	11,25	0,20	370,85	219,06	59,07
5	10	10	1,0	2	11,25	0,10	185,43	150,80	81,32
6	20	10	1,0	2	11,25	0,10	185,43	165,50	89,25
7	10	20	1,0	4	11,25	0,20	370,85	273,72	73,81
8	20	20	1,0	4	11,25	0,20	370,85	283,44	76,43
9	6,6	15	0,75	3	11,25	0,15	278,14	234,70	84,38
10	23,4	15	0,75	3	11,25	0,15	278,14	223,90	80,50
11	15	6,6	0,75	2	17,00	0,10	185,43	173,51	93,57
12	15	23,4	0,75	5	12,00	0,25	463,57	322,27	69,52
13	15	15	0,33	3	11,25	0,15	278,14	187,20	67,30
14	15	15	1,17	3	11,25	0,15	278,14	169,40	60,90
15	15	15	0,75	3	11,25	0,15	278,14	199,00	71,55
16	15	15	0,75	3	11,25	0,15	278,14	202,00	72,63
17	15	15	0,75	3	11,25	0,15	278,14	193,40	69,53

Reação Indireta com a passagem por um intermediário estável – Reação do sal de amina do AC com o 2-etil (R₂)

Planejamento Completo (DCCR)

$$2^3 = 8 + 3pc + 6pa = 17 \text{ ensaios}$$

Ensaio	Temp. (°C)	Conc. de sal do AC (mg/mL)	Conc. de 2-etil (molar)	Massa de Sal do AC (mg)	Vol. de Isopropanol (mL)	Vol. de 2-etil estequiometria (mL)	Massa teórica estequiometria (mg)	Massa experimental (mg)	Y (%)
1	15	15	0,4	150	10	1,15	108,38	90,69	83,68
2	25	15	0,4	150	10	1,15	108,38	92,48	85,33
3	15	35	0,4	350	10	2,70	252,90	222,05	87,80
4	25	35	0,4	350	10	2,70	252,90	226,14	89,42
5	15	15	1,0	150	10	0,50	108,38	87,03	80,30
6	25	15	1,0	150	10	0,50	108,38	94,54	87,23
7	15	35	1,0	350	10	1,10	252,90	232,19	91,81
8	25	35	1,0	350	10	1,10	252,90	238,36	94,25
9	11,6	25	0,7	250	10	1,10	180,64	134,94	74,70
10	28,4	25	0,7	250	10	1,10	180,64	147,08	81,42
11	20	8,2	0,7	82	10	0,40	59,25	47,45	80,09
12	20	41,8	0,7	418	10	1,85	302,03	279,53	92,55
13	20	25	0,2	250	10	3,85	180,64	166,17	91,99
14	20	25	1,2	250	10	0,65	180,64	171,10	94,72
15	20	25	0,7	250	10	1,10	180,64	153,83	85,16
16	20	25	0,7	250	10	1,10	180,64	161,49	89,40
17	20	25	0,7	250	10	1,10	180,64	160,26	88,72

APÊNDICE B

(Reação de formação do 2-etilexanoato de potássio)

Reação de Formação do 2-etilexanoato de potássio

Preparação do sal 2-etilexanoato de potássio

Este sal é preparado a partir do ácido 2-etilexanoico e hidróxido de potássio dissolvido em isopropanol. A reação que ocorre, na proporção 1:1, é uma reação ácido-base, originando o sal.

Reação:

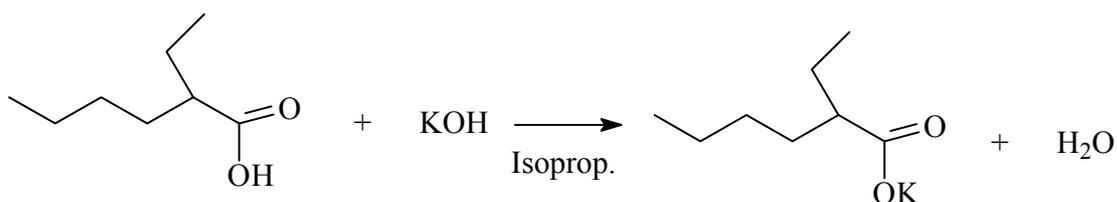


Figura B1 - Reação de neutralização do ácido 2-etilexanoico.

Para a preparação de 400mL de 2-etilexanoato de potássio, dissolve-se cerca de 56,2 g de hidróxido de potássio em 400mL de isopropanol, em seguida adiciona-se 120g de ácido 2-etilexanoico, mantendo a agitação por meia hora.

Após a reação é necessário retirar a água formada no meio reacional, deixando no máximo 1%. Para tanto se adiciona ao volume de 400mL inicial cerca de 1,4 L de isopropanol. Este volume é reduzido para 400mL através do evaporador rotativo a vácuo, com o banho aquecido a 60°C .

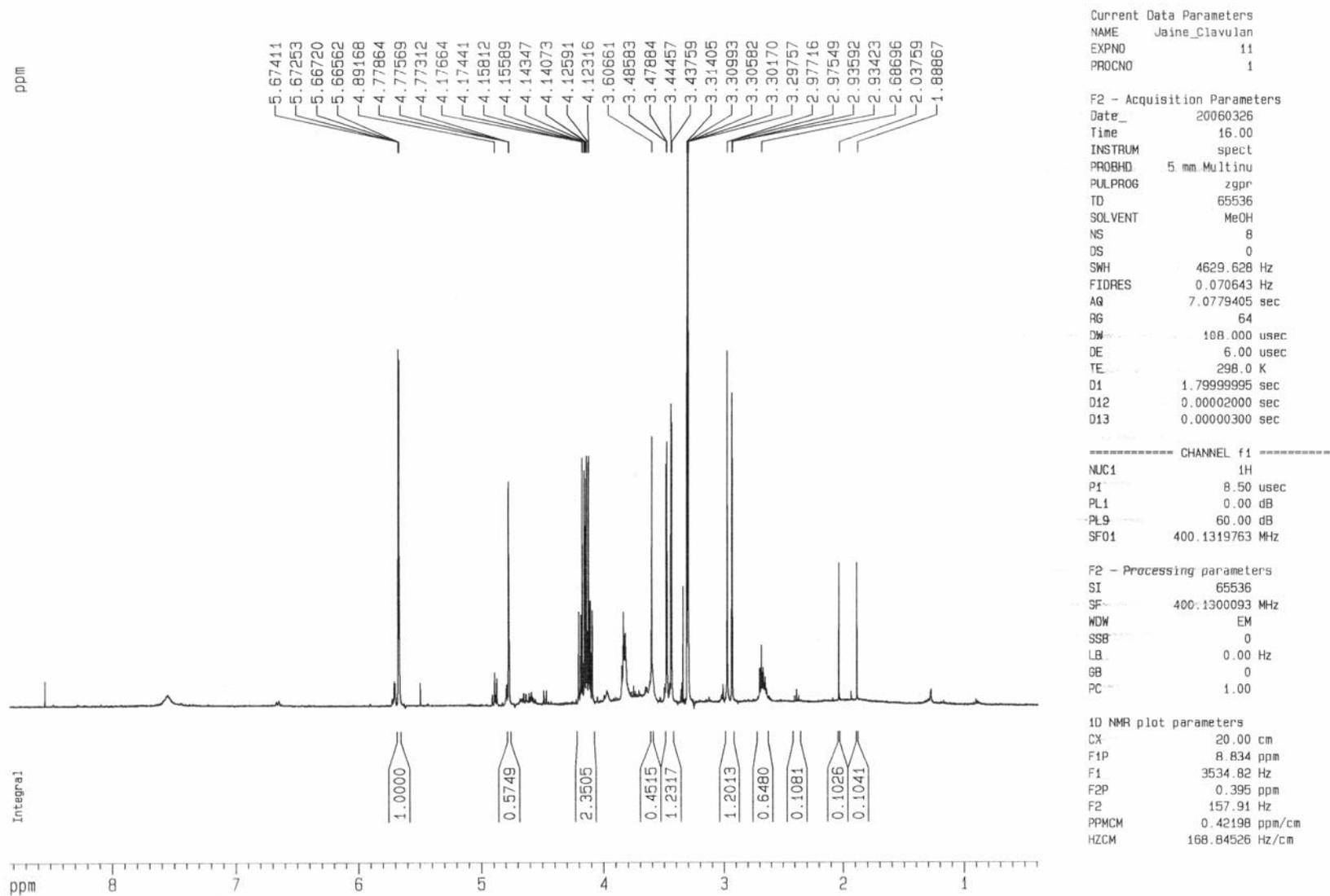
Após a redução do volume, a solução preparada tem que ser submetida a um teste de pH, para a verificação do mesmo. Assim 10mL de solução são adicionados a 20mL de metanol e a algumas gotas de fenolftaleína sob agitação. A coloração violeta indica que um excesso de base, sendo necessário a titulação com HCl 0,1M até o desaparecimento da coloração. Caso não haja coloração, indica um excesso de ácido sendo necessária a neutralização com uma solução de hidróxido de potássio (45%). Neste caso o excesso de ácido não poderá ser tolerado se acima de 3%.

A solução formada nas condições acima descrita possui concentração molar de 2,0. Para concentrações inferiores (utilizadas nos planejamentos fatoriais) foram realizadas diluições desta solução inicial com isopropanol.

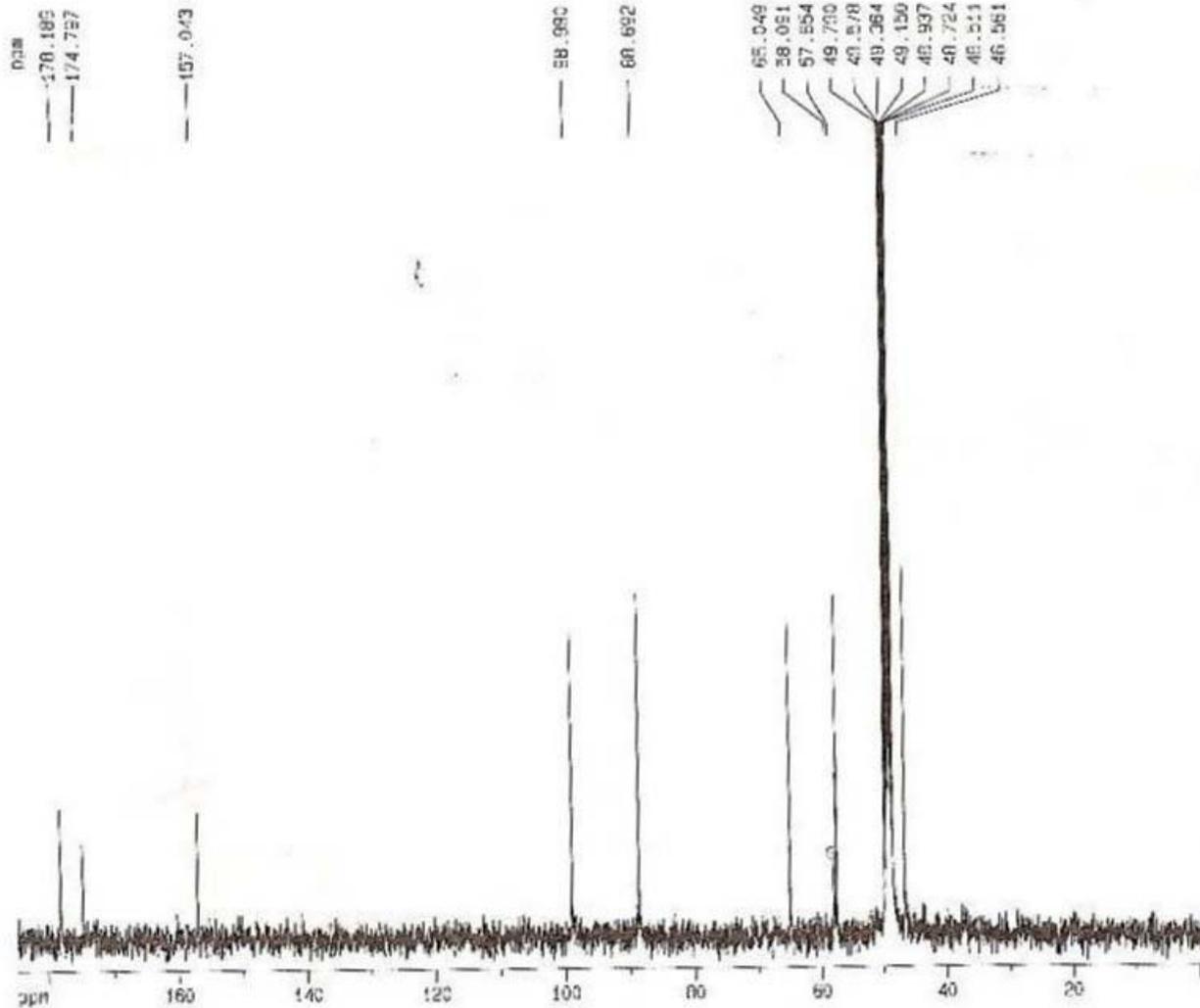
APÊNDICE C

(Tabelas de deslocamento químico, correlações e espectros de RMN)

**1 - Espectros de RMN do clavulanato de potássio proveniente
da amostra clavulanato/celulose obtido através de
Cromatografia em coluna pré-empacotada Sep Pak diol**



Espectro 1: RMN-¹H do clavulanato de potássio a partir da amostra clavulanato/celulose (MeOH-d₄, 400MHz).



```

Current Data Parameters
NAME: Jaina_Giovan
EXPNO: 2
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_  20160326
Time   15.45
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm HULM1H1
PULPROG zgpg30
TD      32768
SOLVENT MECH
NS      1440
DS      4
SWH     23640.882 Hz
FIDRES  0.721426 Hz
AQ      0.550032 sec
RG      18384
SM      21.250 usec
DE      5.00 usec
TE      298.2 K
D1      0.1000000 sec
D11     0.0300000 sec
D12     0.0000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13C
P1       6.00 usec
PL1     -3.00 dB
SFO1    100.626035 MHz

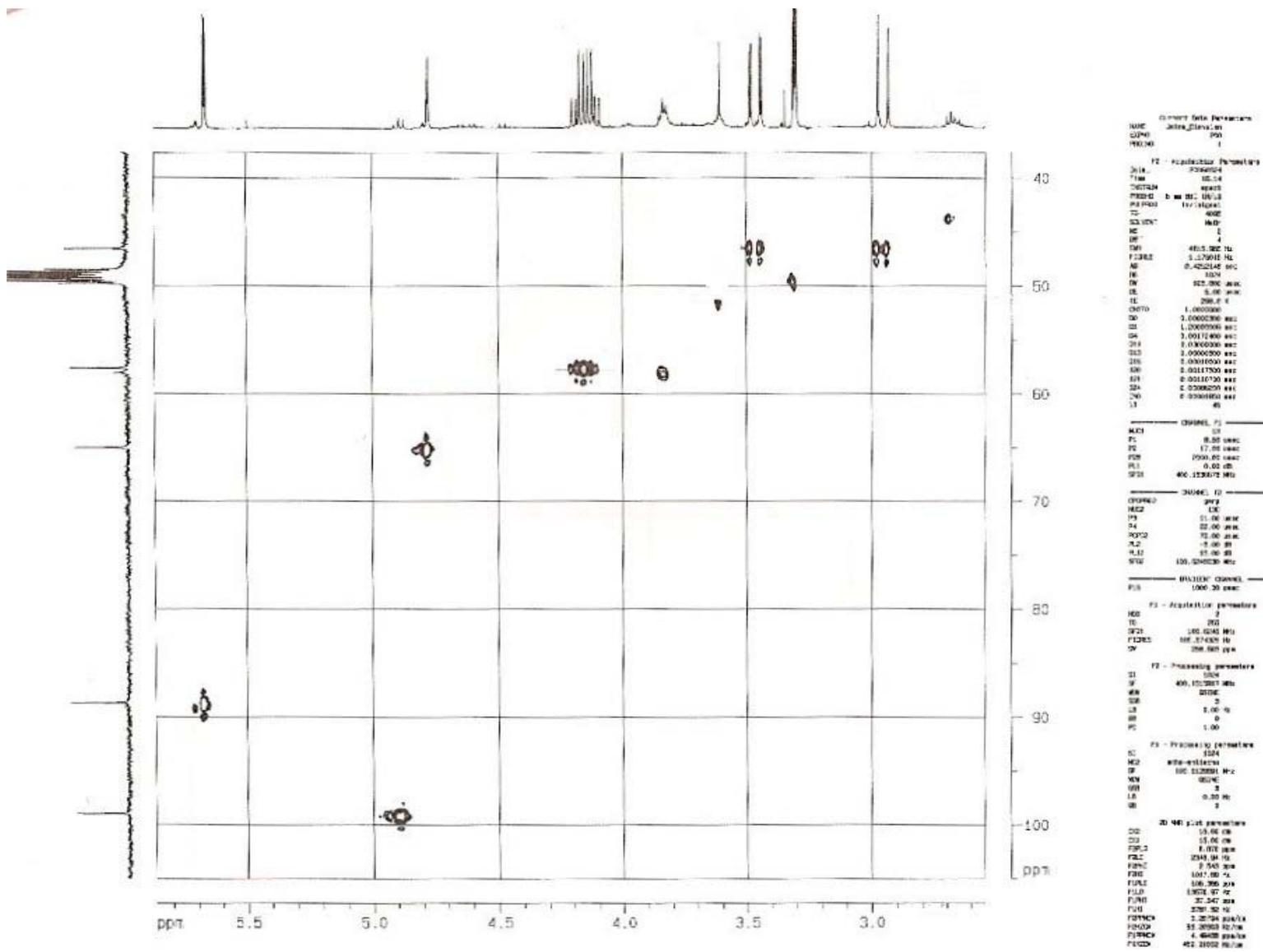
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
P2       120.00 usec
PL2      0.00 dB
PL12    19.00 dB
PL13    13.30 dB
SFO2    400.146300 MHz

F2 - Processing parameters
SI      32768
SF      100.6130100 MHz
AQW     EH
SFO     0
RG      3.00 Hz
GB      0
PC      1.40

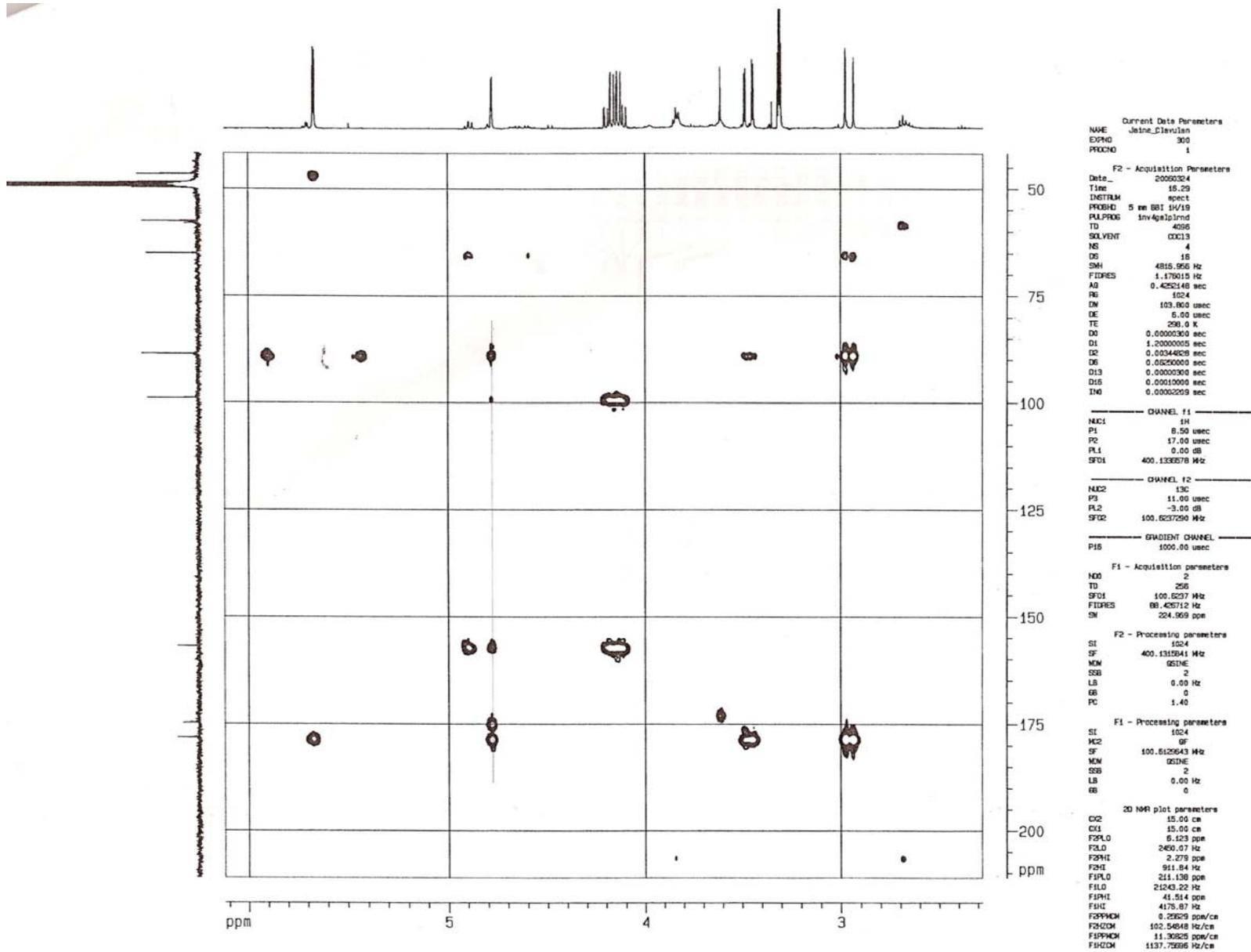
SU HR 212 parameters
CX      20.00 cm
FIP     124.057 ppm
F1      16000.00 Hz
F2P     -1.131 ppm
F2      -112.50 Hz
PPM2    9.29292 ppm/cm
F2CH    0.75.29380 Hz/cm

```

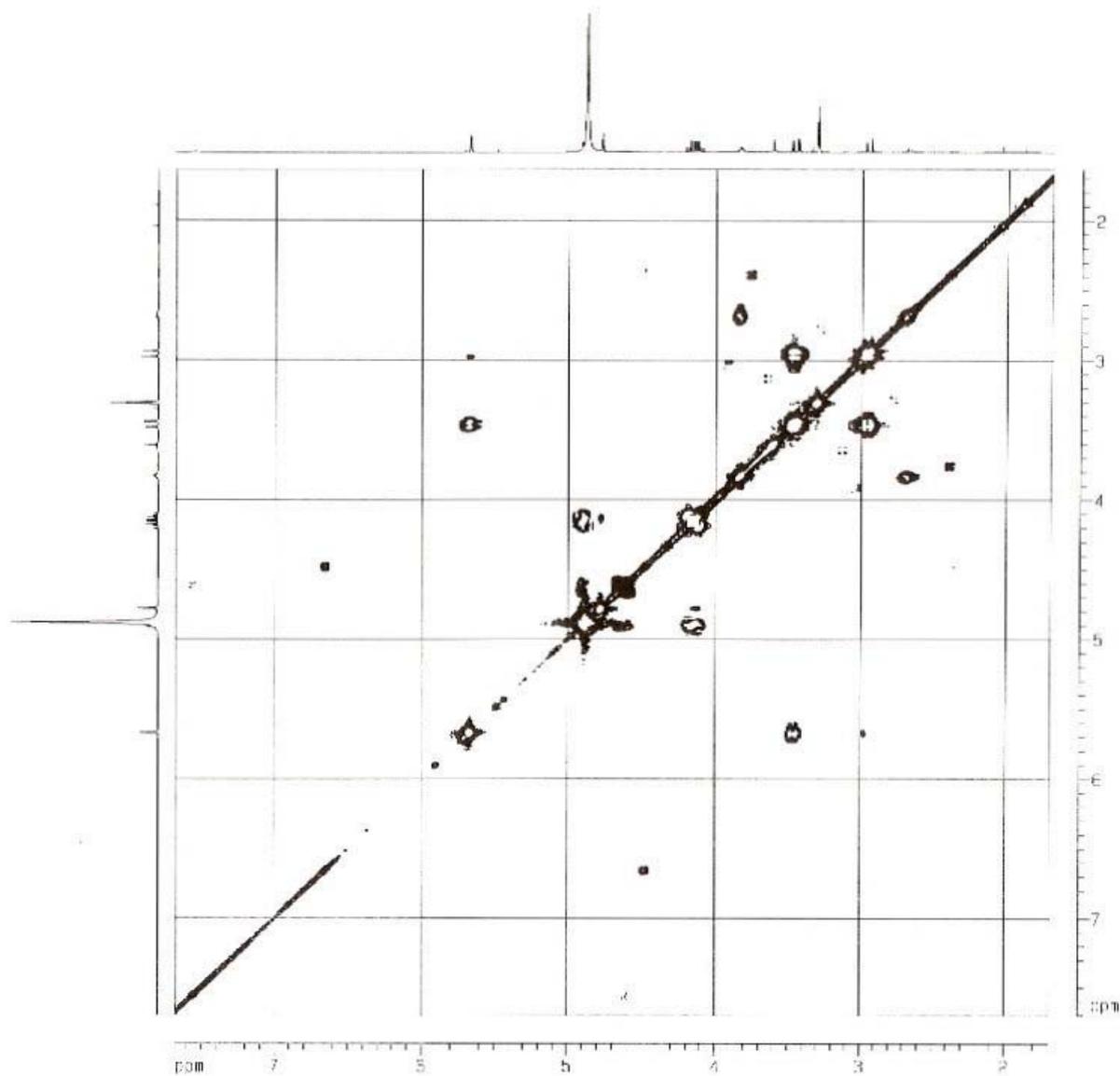
Espectro 2: RMN-¹³C do clavulanato de potássio a partir da amostra clavulanato/celulose (MeOH-d₄, 100MHz).



Espectro 3: RMN-HSQC (^1H - ^{13}C) do clavulanato de potássio a partir da amostra clavulanato/celulose (MeOH- d_4 , 400MHz).



Espectro 4: RMN-HMBC (^1H - ^{13}C) do clavulanato de potássio a partir da amostra clavulanato/celulose (MeOH- d_4 , 400MHz).



COSY65

```

Current Data Parameters
NAME       Jovane_Div4
EXPNO     130
PROCNO     1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20090228
Time      17.38
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H/1H
PULPROG   zgpg30
PC        6000
SOLVENT   H2O
AQ        4
SI        32
SF        400.1464000 MHz
FIDRES    1.106729 Hz
AQ        0.4507434 sec
RG        650
AQ        11.5000000 sec
CE        6.00 dB
TE        300.2 K
DQ        0.0000000 sec
DE        1.0000000 sec
DI        0.0000000 sec
DS        0.0010000 sec
EB        0.0000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         0.0000000 sec
PL1        0.00 dB
SFO1       400.1464000 MHz

----- CHANNEL f2 -----
FID
P2         1000.0000000 sec

F1 - Acquisition Parameters
EXPNO     1
F2        250
SFO1      400.1464000 MHz
FIDRES    17.095346 Hz
SI        11.3000000

F2 - Processing parameters
SI        1024
SF        400.1464000 MHz
WDW        EM
SSB        0
RB        0.00 Hz
GB        0.00
PC        1.00

F3 - Processing parameters
SI        1024
WDW        EM
SF        400.1464000 MHz
GB        0
STW        0
LI        0.00 Hz
SC        0

2D NMR plot parameters
SI        45.00 cm
SF        15.00 cm
FIDRES    7.8000000 cm
F2F1RES   3975.46 Hz/cm
F2F1RES   800.0000000 cm
F1F2RES   7.7000000 cm
SI        300.0000000 cm
SI        4.0000000 cm
SI        504.00 Hz/cm
SI        0.0000000 cm/cm
SI        170.0000000 Hz/cm
SI        0.4000000 cm/cm
SI        0.0000000 Hz/cm

```

Espectro 5: RMN-COSY (^1H - ^1H) do clavulanato de potássio a partir da amostra clavulanato/celulose (MeOH- d_4 , 400MHz).

Através da análise destes cinco espectros foi possível construir a Tabela 1 com os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos para o clavulanato de potássio.

Tabela 1: Deslocamentos químicos δ (ppm) e J (Hz) de RMN para o ácido clavulânico.

Posição	δ ^1H (m ; J)	δ ^{13}C	HMBC	COSY
1 (N)	-	-		-
2 (CH)	4,78 (<i>dd</i> ; 1,18; 1,03)	65,1	88,7; 157,0; 174,8; 178,2; 99,0 fraco	4,12 (8); 4,89
3 (C sp^2)	-	157,0	-	-
4 (O)	-	-	-	-
5(CH)	5,67 (<i>dd</i> ; 0,63; 2,13)	88,7	46,6; 178,2	3,46; 2,95
6 a,b (CH ₂) [*]	3,46 (<i>dd</i> ; 2,8; 13,7) 2,95 (<i>dd</i> ; 0,67; 15,8)	46,6	88,7; 178,2 65,1; 88,7; 178,2	2,95; 5,67 3,46; 5,67
7 (CO)	-	178,2	-	-
8 (CH sp^2)	4,89 ^{**}	99,0	65,1; 157,0	4,12 (8); 4,78
9 (CH ₂ -OH)	4,18 (<i>ddd</i> ; 0,85; 7,42; 12,2) 4,12 (<i>ddd</i> ; 1,1; 6,99; 12,3)	57,7	99,0; 157,0	4,78; 4,89
10 (COOH)	-	174,8	-	

*Valores intercambiáveis

** Parcialmente encoberto pelo sinal da HDO

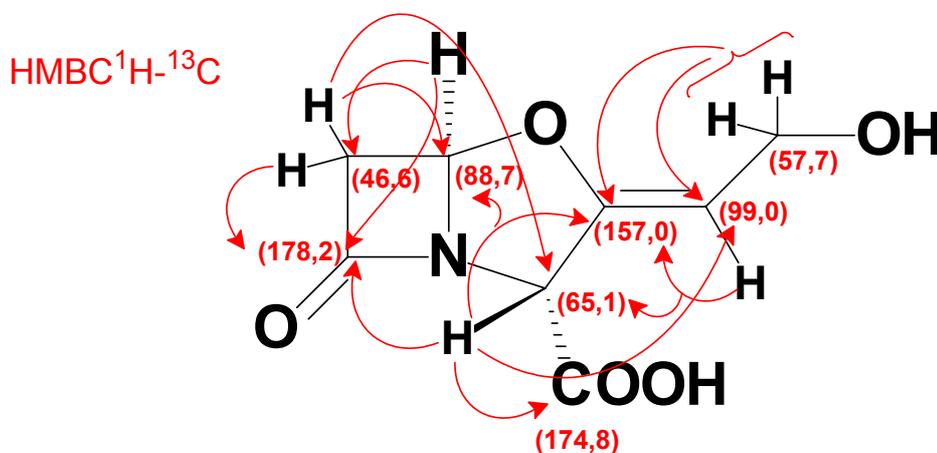


Figura 1: Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C .

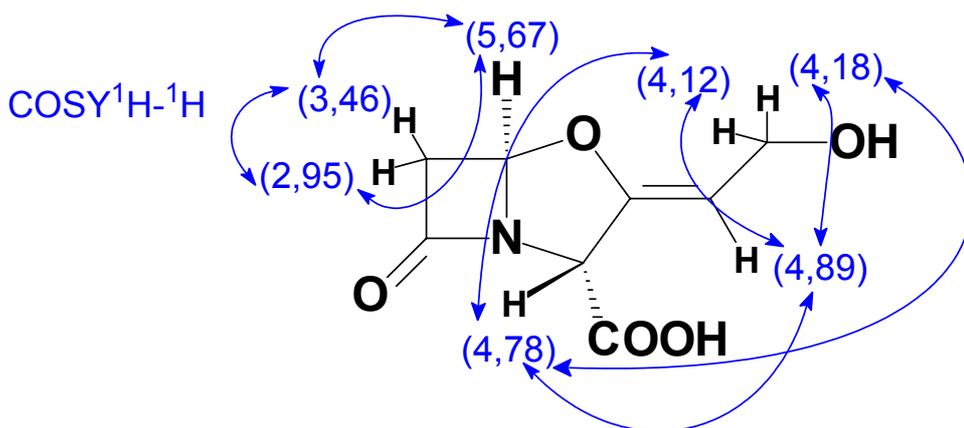


Figura 2: Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H .

Os sinais nos espectros de RMN- ^1H (δ 4,12 e 4,18) e RMN- ^{13}C (δ 57,5) para o grupo CH_2 -9 e os carbonos em δ 178,2 e em δ 174,8 evidenciam a presença de um grupo hidroxila ligado ao grupo CH_2 e dois grupos carbonílicos diferentes.

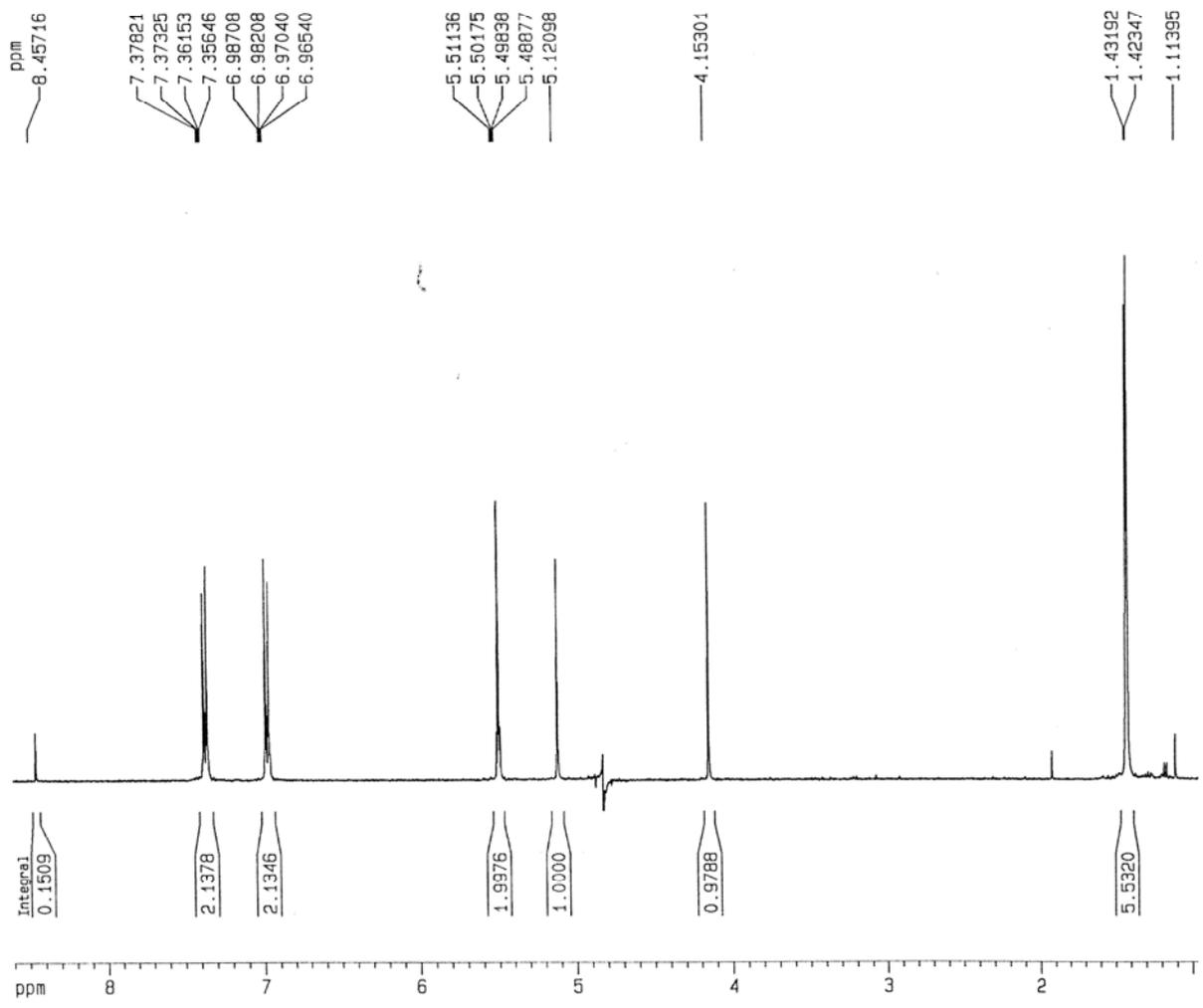
A análise do espectro RMN- ^{13}C indicou a presença de uma dupla ligação entre o C-3 quaternário δ 157,0 (BBD) e o CH-8 δ 99,0 (BBD).

O espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H mostrou correlações entre CH_2 -6 (δ 2,95 e 3,46) e CH-5 (δ 5,67) indicando a proximidade entre os hidrogênios vizinhos do anel beta lactâmico; entre CH_2 -9 (δ 4,12 e 4,18) e CH-8 (δ 4,89); bem como o acoplamento homoalílico entre CH_2 -9 e CH-2 (δ 4,78) e o acoplamento alílico entre CH-8 e CH-2 indicando a união da cadeia lateral hidroxietilideno ao anel oxazolidina.

No espectro HMBC ^1H - ^{13}C foram observadas correlações a longa distância entre CH-2 e C-3 (δ 157,0), C-8 (δ 99,0), C-10 (δ 174,8) e C-7 (δ 178,2); entre CH-5 e C-6 (δ 46,6) e C-7; entre CH_2 -6 e C-7, C-5 e C-2; entre os hidrogênios metilênicos CH_2 -9 e C-8 e C-3 e finalmente entre o hidrogênio metínico CH-8 e C-2 (δ 65,1) e C-3, confirmando, assim, a presença dos dois anéis condensados e da cadeia lateral com dupla ligação e um grupo hidroxila. Assim foram atribuídos os sinais de ^1H e ^{13}C ao clavulanato de potássio sem ambigüidade.

A presença de potássio só poderia ter sido identificada através da análise por EM, a qual não foi obtida devido ao fato de o aparelho se encontrar em manutenção na época do experimento.

2 - Espectros de RMN da amoxicilina obtida a partir da amostra padrão de amoxicilina (Sigma)



Current Data Parameters
 NAME Jaine_Amoxicil
 EXPNO 1
 PROCNO 1

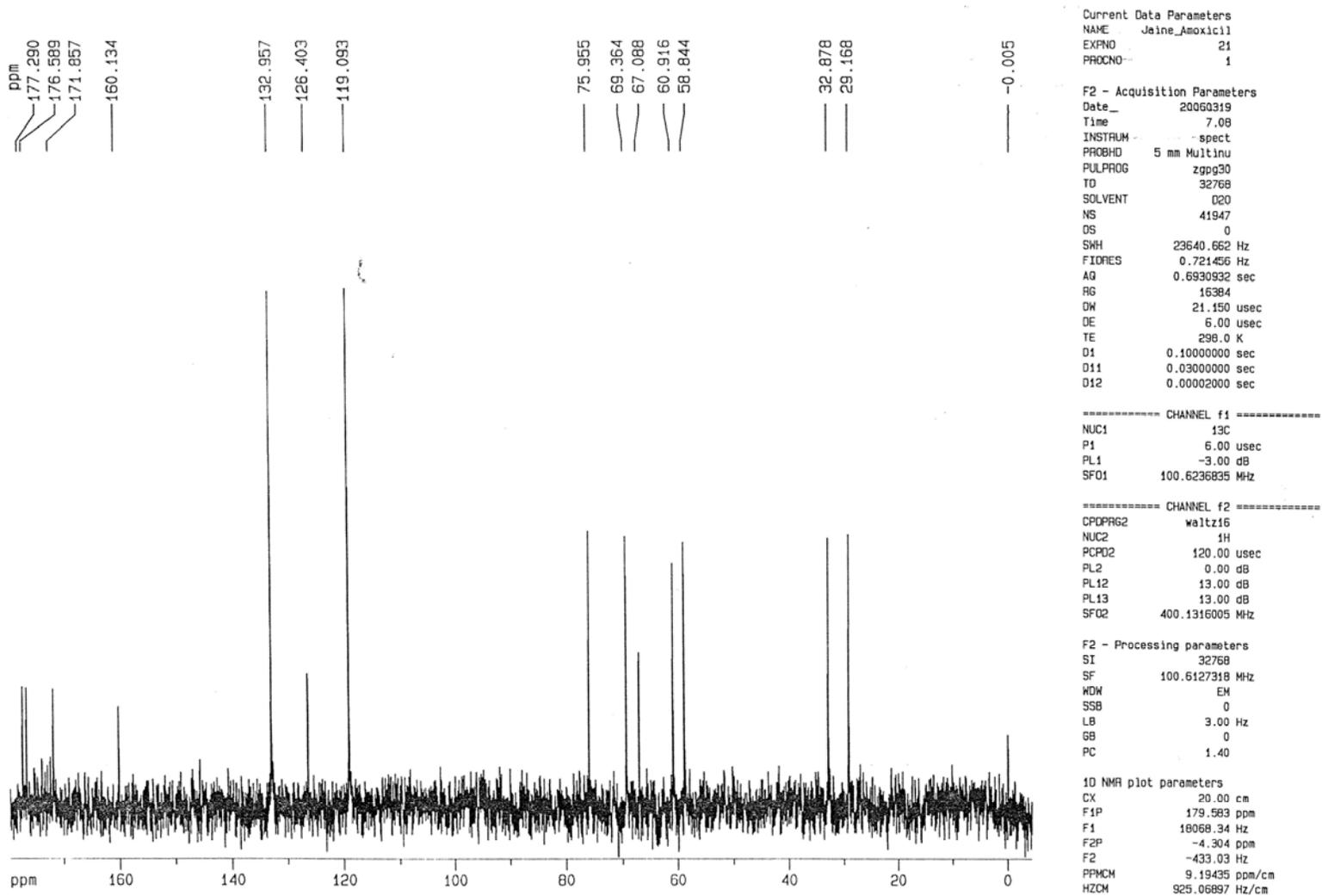
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20060317
 Time 16.14
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H/19
 PULPROG noesyprid
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 8
 DS 4
 SWH 5208.333 Hz
 FIDRES 0.079473 Hz
 AQ 6.2915063 sec
 RG 256
 DW 96.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 O1 1.79999995 sec
 O8 0.05000000 sec
 O11 0.03000000 sec
 O12 0.00002000 sec
 O13 0.00000300 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 8.50 usec
 PL1 0.00 dB
 PL9 60.00 dB
 SFO1 400.1318793 MHz

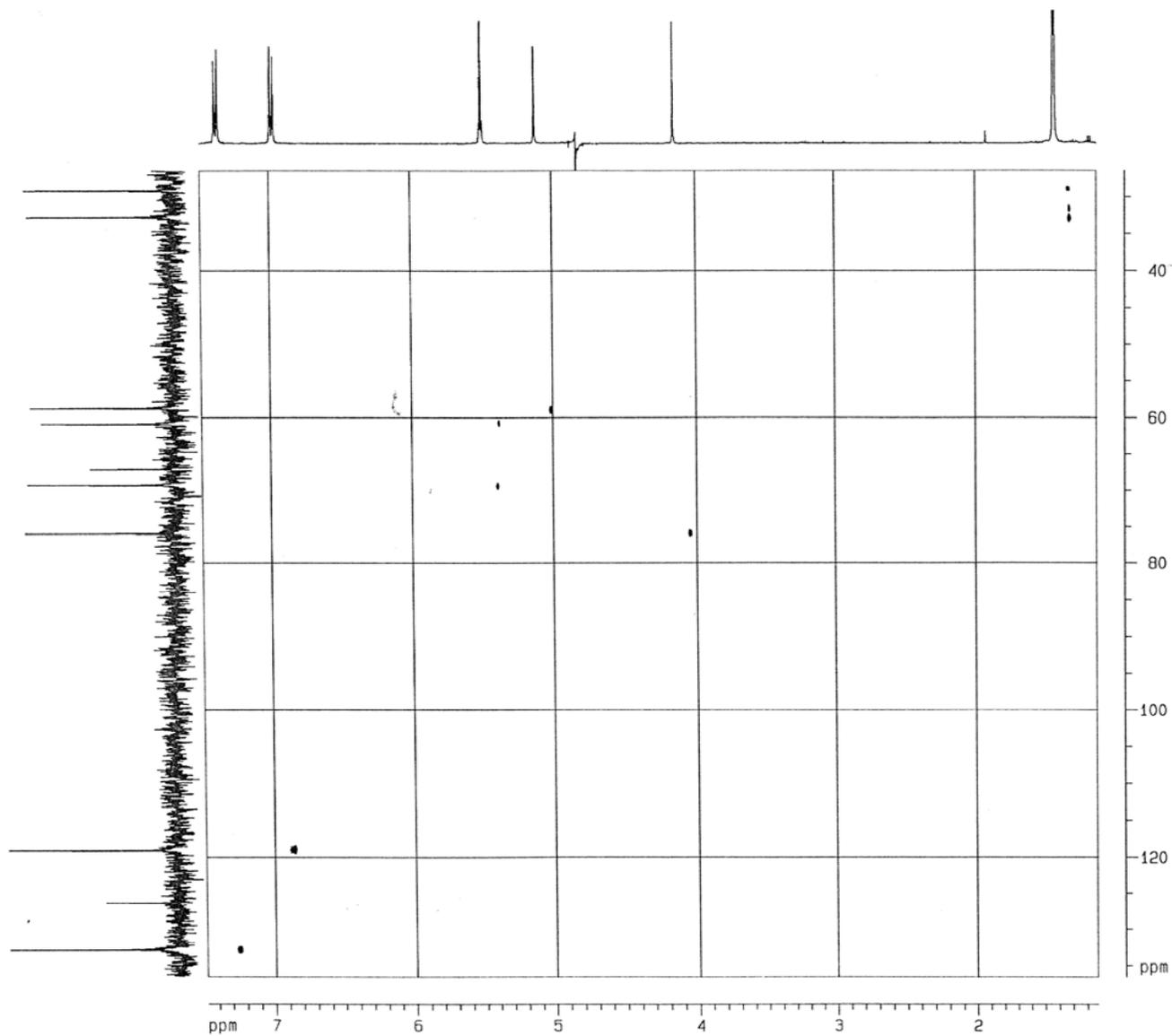
F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1299482 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 8.606 ppm
 F1 3443.50 Hz
 F2P 0.966 ppm
 F2 386.44 Hz
 PPMCM 0.38201 ppm/cm
 HZCM 152.85323 Hz/cm

Espectro 6: RMN-¹H da amoxicilina a partir da amostra padrão (D₂O, 400MHz).



Espectro 7: RMN-¹³C da amoxicilina a partir da amostra padrão (D₂O, 100MHz).



```

Current Data Parameters
NAME      Jmsa_jms111
EXPNO    200
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20050517
Time      18.27
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H/13
PULPROG   invtag1
TD        4096
SOLVENT   D2O
NS        2
DS        4
SWH       5306.333 Hz
FIDRES    1.271666 Hz
AQ        0.3823660 sec
RG         1024
DX        80.000 usec
DE         8.00 usec
TE        298.0 K
DQ100     1.0000000
DQ        0.0000000 sec
D1        1.2000000 sec
D4        0.0017000 sec
D11       0.0300000 sec
D13       0.0000000 sec
D15       0.0001000 sec
d20       0.0017000 sec
d21       0.00110700 sec
d24       0.0008000 sec
IN0       0.0001800 sec
IS        45

----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        8.00 usec
P2        17.00 usec
P2B       2000.00 usec
PL1       0.00 dB
SFO1      400.1318703 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   gpgp
NUC2      13C
P3        11.00 usec
P4        22.00 usec
PCPD2     70.00 usec
PL2       -3.00 dB
PL12      13.00 dB
SFO2      100.6248330 MHz

----- GRADIENT CHANNEL -----
P1B       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
NUC       2
TD        256
SFO1     100.6248330 MHz
FIDRES    106.674205 Hz
SW        259.863 ppm

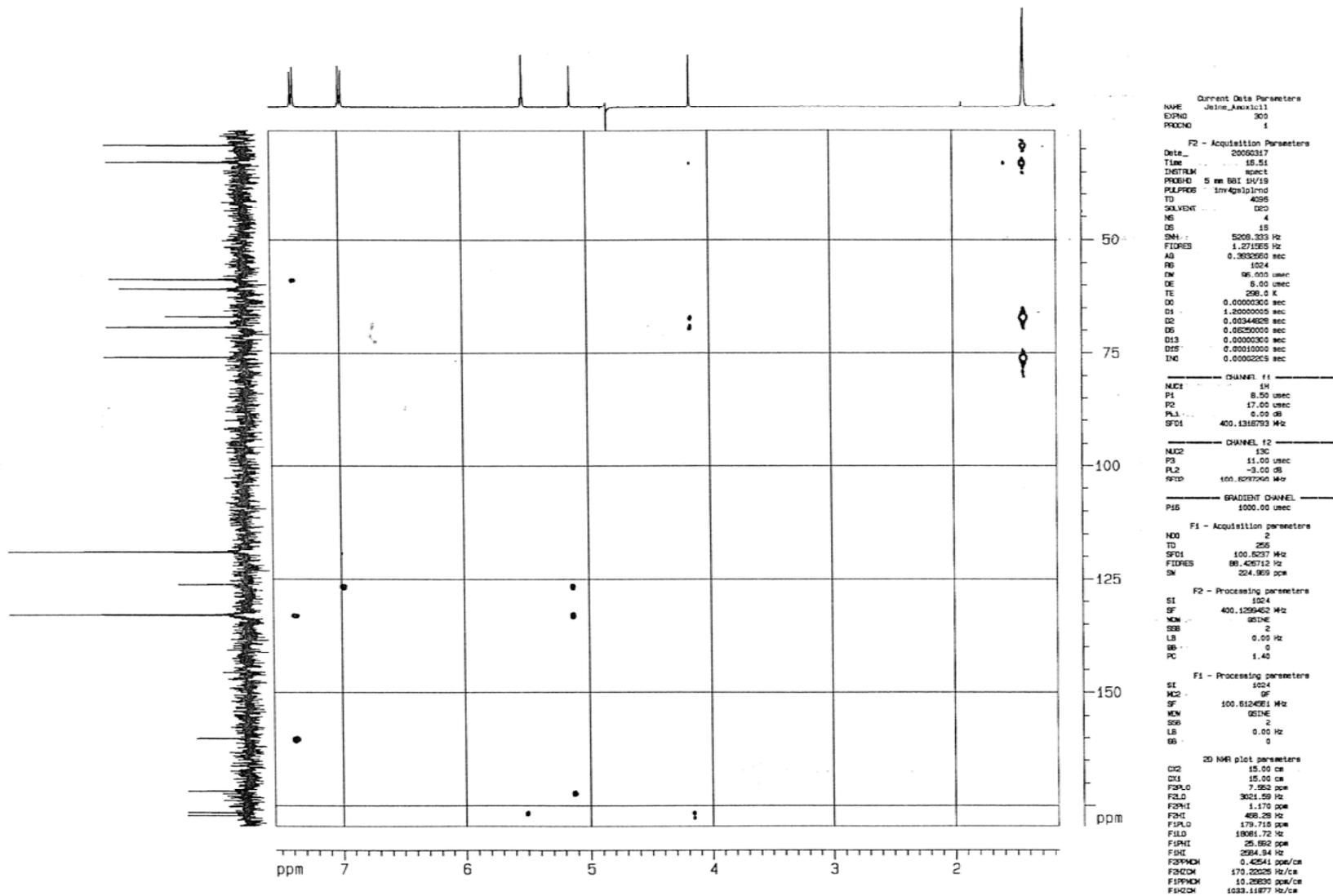
F2 - Processing parameters
SI        1024
SF        400.1308900 MHz
WDW       GEMME
SSB       3
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

F1 - Processing parameters
SI        1024
AQ2       echo-antischo
SF        100.624787 MHz
WDW       GEMME
SSB       3
LB        0.00 Hz
GB        0

2D NMR plot parameters
CZ2       15.00 cm
CZ1       15.00 cm
F0P10     7.464 ppm
F0L0      2984.38 Hz
F0P11     1.128 ppm
F0L1      451.25 Hz
F1P10     136.834 ppm
F1L0      13747.00 Hz
F1P11     25.405 ppm
F1L1      2661.78 Hz
F0P10M    0.36224 ppm/cm
F0L10M    108.84672 Hz/cm
F1P10M    7.34621 ppm/cm
F1L10M    739.02026 Hz/cm

```

Espectro 8: RMN-HSQC (^1H - ^{13}C) da amoxicilina a partir da amostra padrão (D_2O , 400MHz).



Espectro 9: RMN-HMBC (^1H - ^{13}C) da amoxicilina a partir da amostra padrão (D_2O , 400MHz).

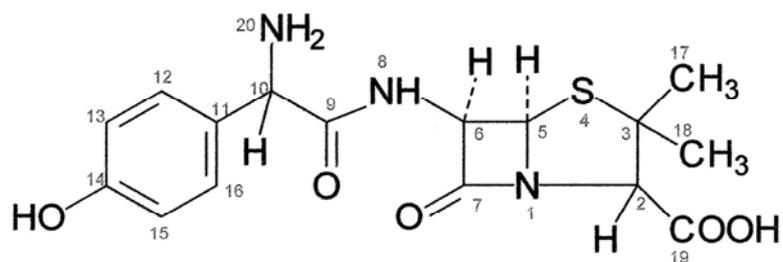


Figura 3: Fórmula estrutural da Amoxicilina.

Através da análise dos espectros 6 a 9 foi possível construir a Tabela 2 com os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos para a amoxicilina.

Tabela 2: Deslocamentos químicos δ (ppm) e J (Hz) de RMN para a amoxicilina.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J=Hz)	HMBC
1 (N)			
2 (CH)	75,9	4,15 (s)	32,9; 67,1; 69,4; 176,6; 177,3
3 (C)	67,1	-	
4 (S)			
5 (CH)	69,4	5,50 (d, 3,84)	176,6
6 (CH)	60,9	5,50 (d, 3,84)	176,6
7 (CO)	176,6	-	
8 (NH)			
9 (CO)	171,8	-	
10 (CH)	58,8	5,12 (s)	132,9; 126,4; 171,8
11 (C)	126,4	-	
12, 16 (CH)	132,9	7,36 (dd, 1,98; 4,69)	58,8; 132,9; 160,1
13, 15 (CH)	119,1	6,97 (dd, 2,0; 4,67)	126,4
14 (C)	160,1	-	
17 (CH ₃)	32,9*	1,42*(s)	29,2; 32,9; 67,1; 75,9
18 (CH ₃)	29,2*	1,43*(s)	29,2; 32,9; 67,1; 75,9
19 (COOH)	177,3	-	
20 (NH ₂)			

* podem estar trocados

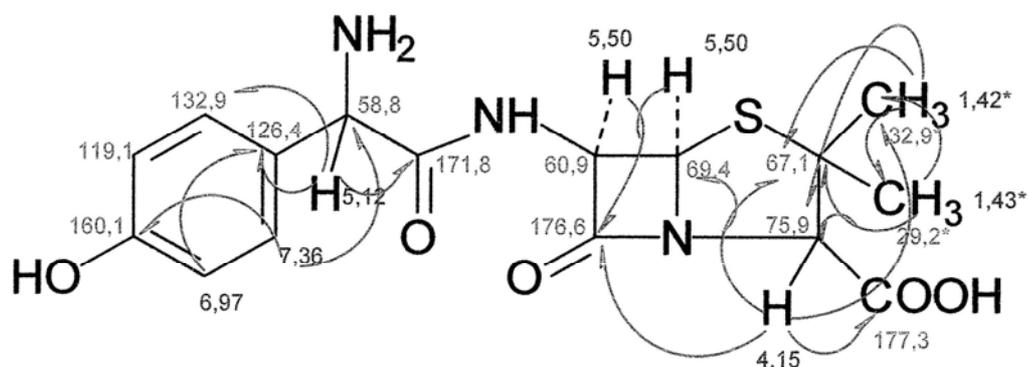
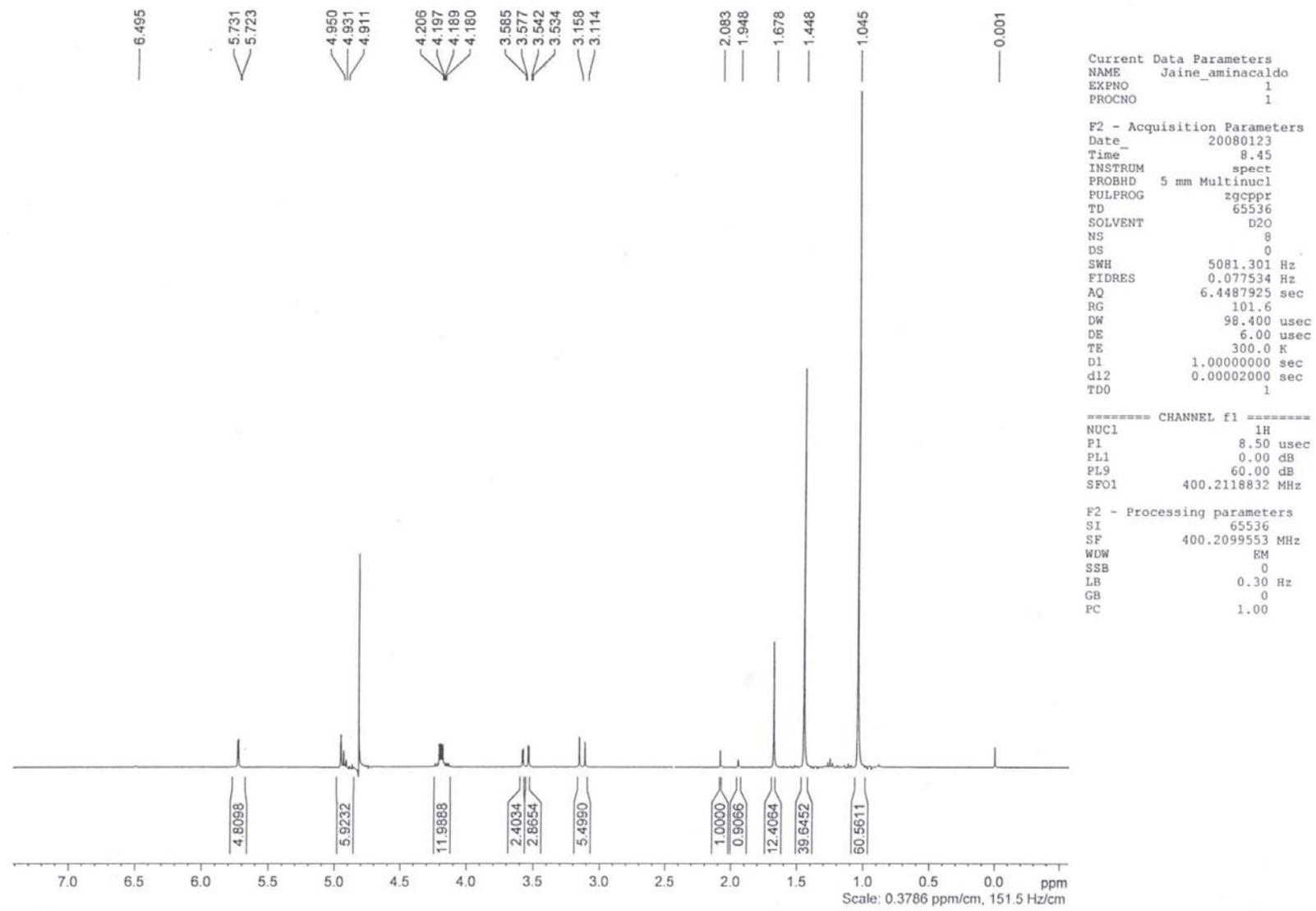
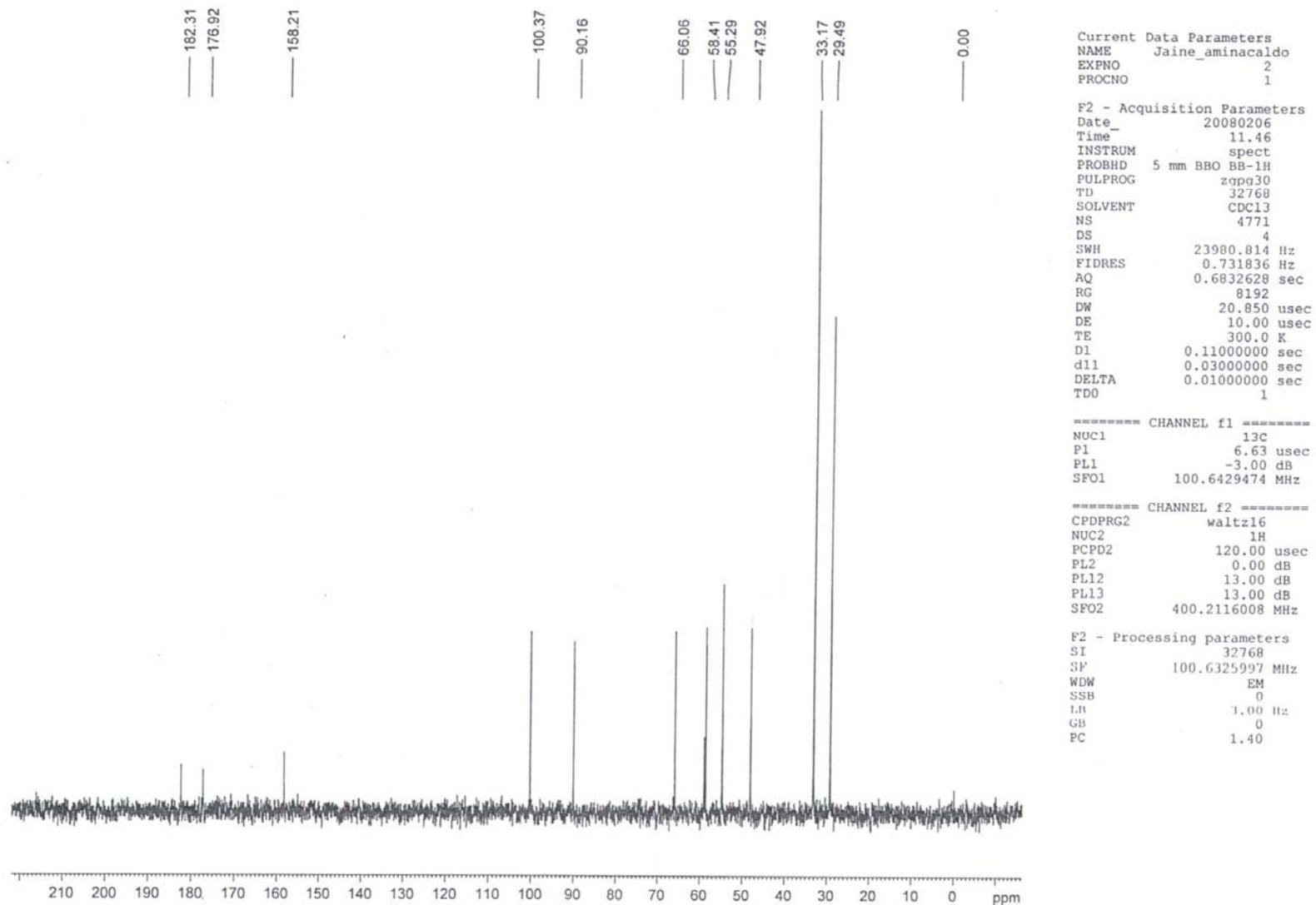


Figura 4: Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C .

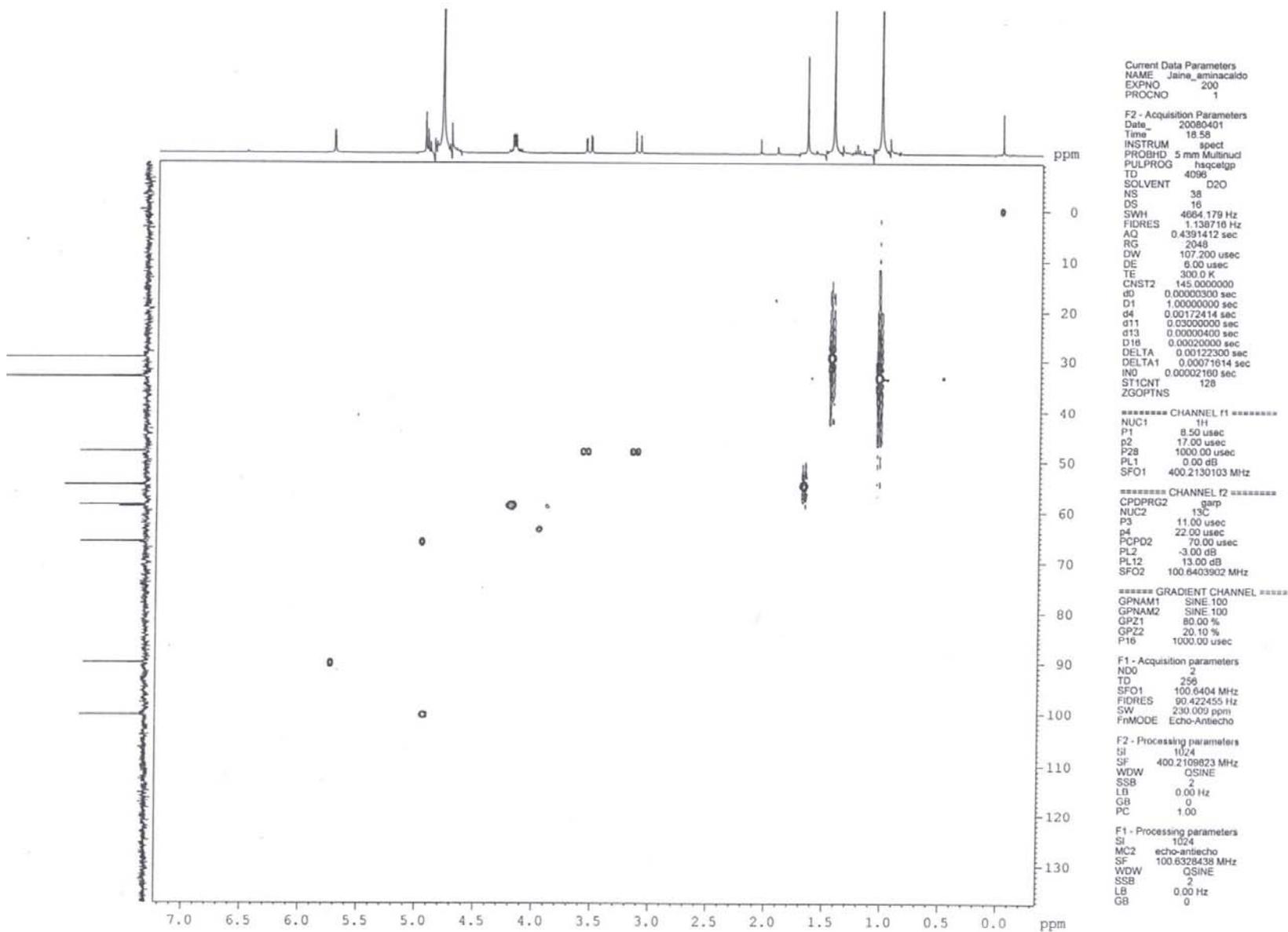
3 - Espectros de RMN do sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação através da Reação Indireta R₁ – AC com a t-octilamina



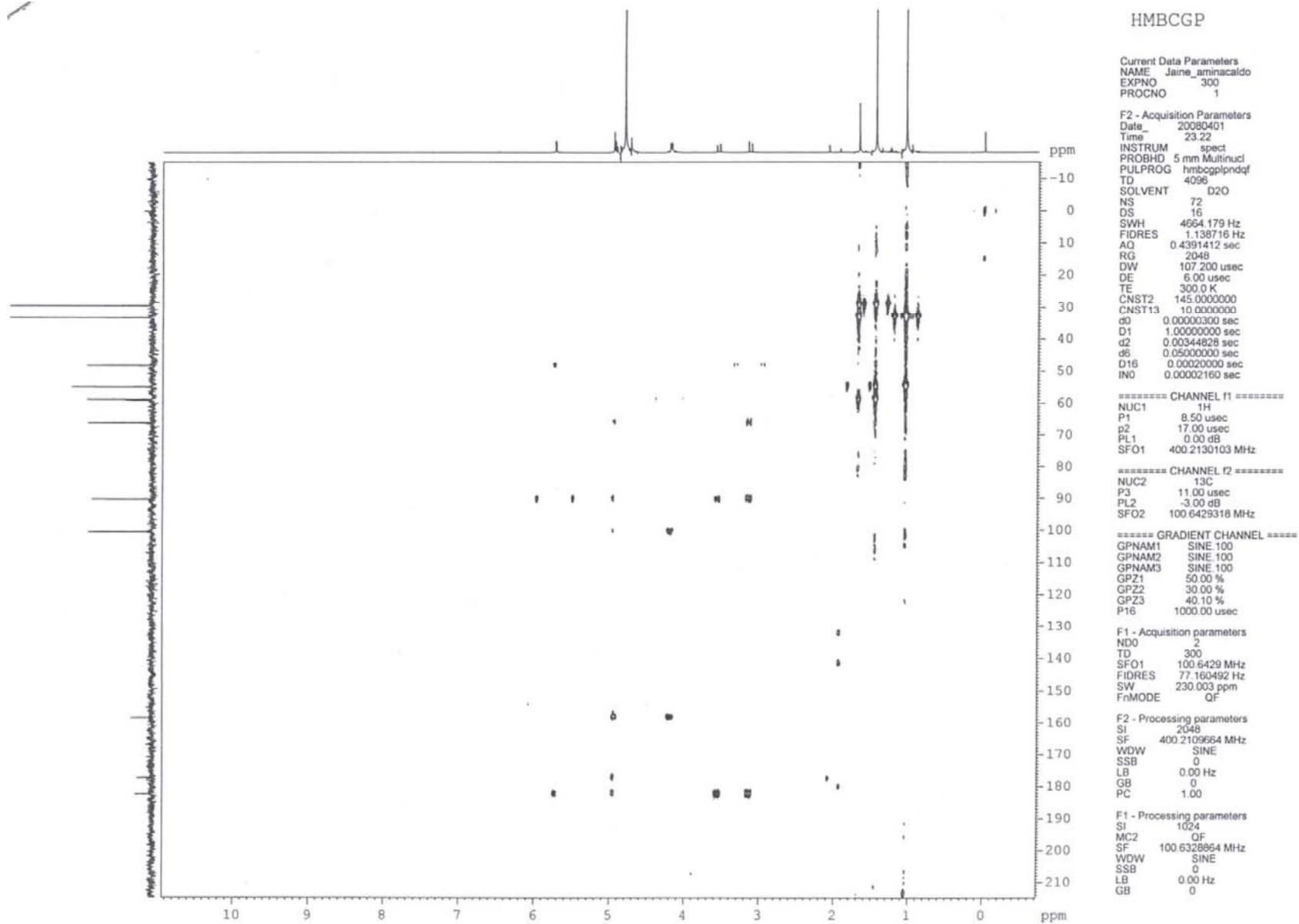
Espectro 10: RMN-¹H do sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação (D₂O, 400MHz).



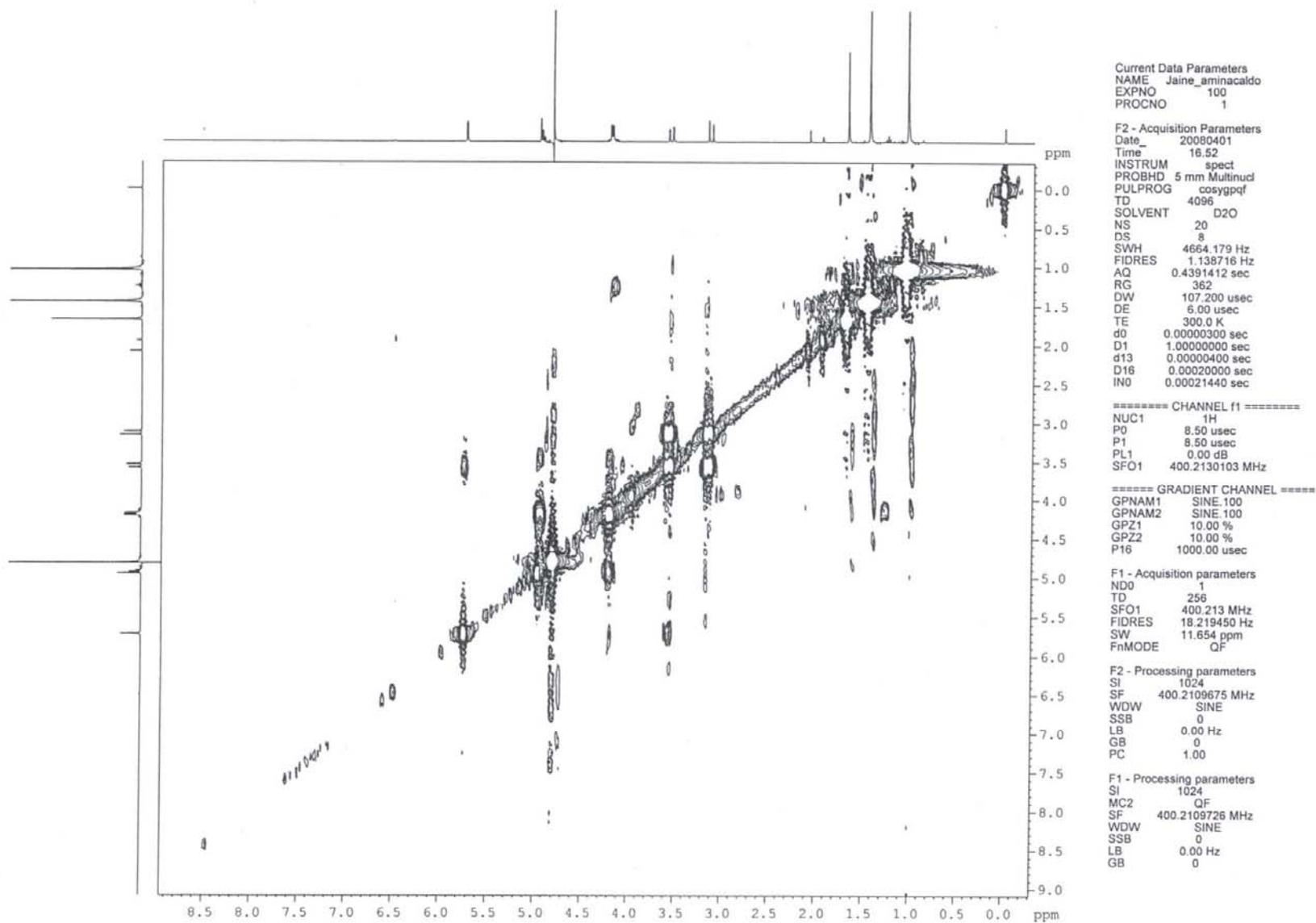
Espectro 11: RMN-¹³C do sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação (D₂O, 100MHz).



Espectro 12: RMN-HSQC (^1H - ^{13}C) do sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação (D_2O , 400MHz).



Espectro 13: RMN-HMBC (^1H - ^{13}C) do sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação (D_2O , 400MHz).



Espectro 14: RMN-COSY (^1H - ^1H) do sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação (D_2O , 400MHz).

Através da análise dos espectros 10 a 14 foi possível construir a Tabela 4 com os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos para o sal de amina do AC precipitado a partir do caldo de fermentação através da Reação Indireta R₁.

Tabela 4: Deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos do intermediário estável AC/amina, precipitado a partir do caldo de fermentação.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> , J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (BBD, HSQC)	HMBC	COSY
1 (N)	-	-	-	
2 (CH)	4,95 (<i>s</i>)	66,1	4,93; 3,14	
3 (Csp ²)	-	158,2	4,93; 4,19	
4 (O)	-	-	-	
5 (CH)	5,73 (<i>d</i> , 3,2)	90,2	4,95; 3,56; 3,14	3,56
6 (CH ₂)	3,56 (<i>dd</i> ; 3,2; 17,2) 3,14 (<i>d</i> ; 17,6)	47,9	5,73	5,73; 3,14 3,56
7 (CO)	-	182,3	4,95; 5,73; 3,56; 3,14	
8 (CH)	4,93	100,4	4,95; 4,19	4,19
9 (CH ₂)	4,19 (<i>m</i>)	58,4	-	4,93
10 (COOH)	-	176,9	4,95	
11 (Csp ³)	-	58,6 (<i>q</i>)	1,45; 1,68	
12 (CH ₂)	1,68 (<i>s</i>)	55,3	1,45; 1,05	
13 (Csp ³)	-	-	-	
14 (3CH ₃)	1,05 (<i>s</i>)	33,2	1,68	
15 (2CH ₃)	1,45 (<i>s</i>)	29,5	1,68	

Através da análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais observou-se a presença dos sinais dos hidrogênios da unidade de clavulanato em δ 5,73, 4,95, 3,56, 3,14, 4,93 e 4,19 juntamente com os sinais dos hidrogênios referentes a unidade t-octilamina em δ 1,68, 1,05, 1,45 indicaram a presença do sal AC/amina formado. Foi possível observar sinais de hidrogênios desblindados referentes ao anel β -lactâmico em δ 5,73 sendo um dubleto que integra para 1H, posicionado entre os dois anéis e vizinho ao oxigênio do anel oxazolidina. Em δ 4,95 e 4,93, observou-se sinais de hidrogênios vizinho ao carbono carboxílico (C-10) e ligado a um carbono sp² da dupla ligação (C-8), respectivamente. Em δ 4,19 observou-se um multipletto integrando para 2H ligados a um carbono sp³, mas apresentando-se desblindado por se situar entre um carbono carbinólico e uma dupla ligação. Além destes hidrogênios, também observou-se um duplo dubleto em δ 3,56 e um dubleto em δ 3,14 referentes aos dois hidrogênios do C-6 sp³ do anel β -lactâmico, vizinho a carbonila. Em δ 1,68, 1,45 e 1,05 observou-se

hidrogênios singletos de carbonos sp^3 referentes a unidade da t-octilamina ligada ao clavulanato.

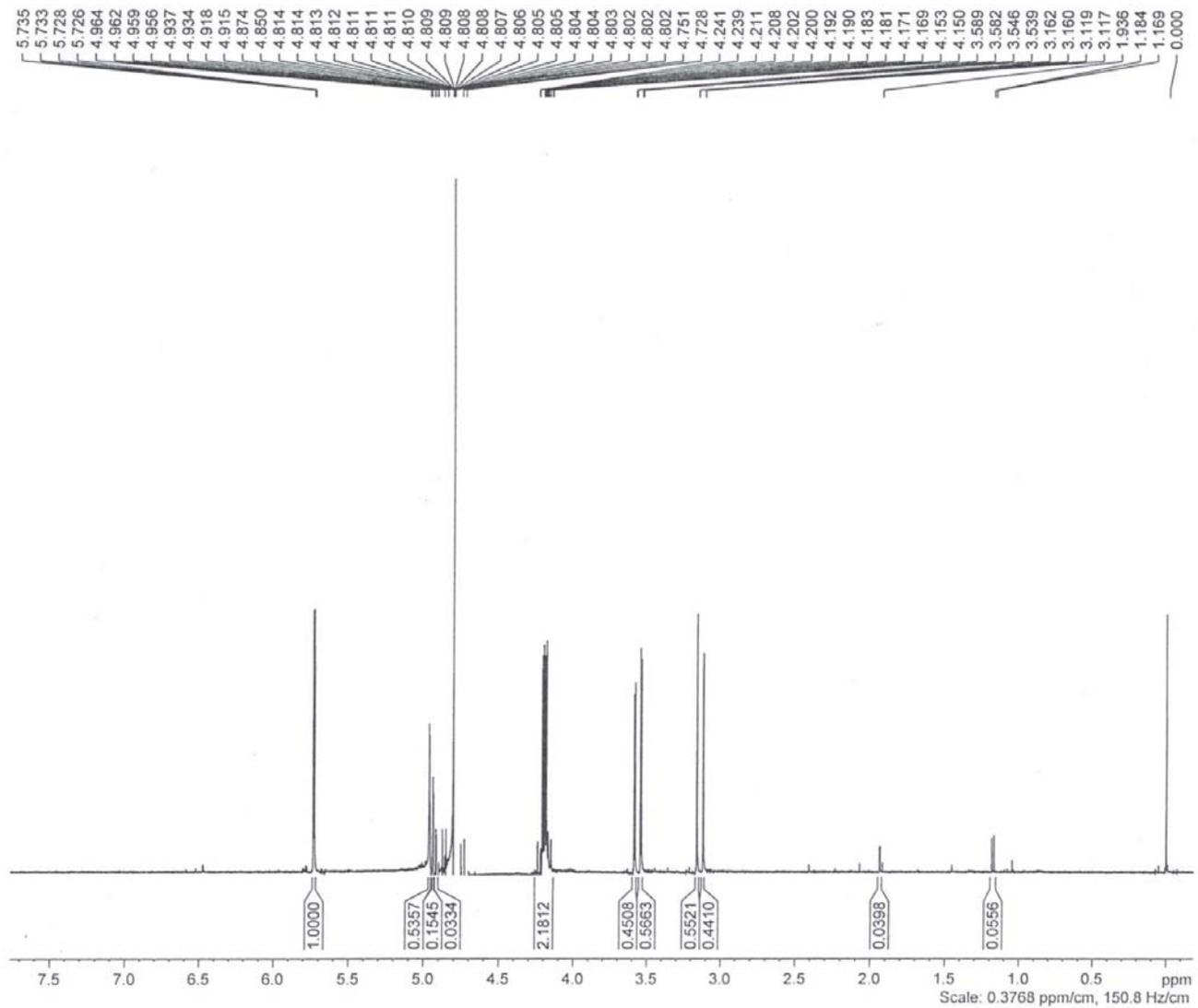
No espectro de RMN- ^{13}C foi possível distinguir 15 átomos de carbonos. Na verdade, a molécula apresenta 16 átomos de carbono, sendo que um dos carbonos quaternários (C-13), do tipo sp^3 , não foi observado talvez devido ao seu longo tempo de relaxação. Foram observados 4 carbonos com hidridação sp^2 em δ 182,3 (carbonila do anel β -lactâmico, C-7), δ 176,9 (carbonila do grupo carboxila, C-10), δ 158,2 e 100,4 (carbonos da dupla ligação da cadeia lateral ao grupo oxazolidina C-3 e C-8). Foram observados também seis carbonos entre δ 90,2 e 47,9 referentes a carbonos sp^3 juntamente com os cinco grupos metila, sendo dois dos seus carbonos em δ 29,5 e três deles em δ 33,2.

O H-5 em δ 5,73 acoplando com o H-6 em δ 3,56 indicou a presença do anel β -lactâmico observado através do espectro de RMN bidimensional COSY (1H - 1H). Neste espectro também foi possível observar acoplamentos entre H-8 e H-9 e entre os dois hidrogênios metilênicos H-6.

No espectro HMBC foram observadas correlações a longa distância entre C-2 e CH_2 -6 e CH-8; entre C-3 e CH_2 -9 e CH_2 -8; entre C-5 e CH_2 -6 e CH-2; entre C-7 e os hidrogênios dos carbonos C-6, C-5 e C-2 para a estrutura derivada do clavulanato, bem como as correlações entre os CH_3 -14 dos três grupos metila (δ 33,2) da amina com os hidrogênios metilênicos do CH_2 -12 e também os grupos metila dos CH_3 -15 (δ 29,6) acoplando com os hidrogênios CH_2 -12, para a estrutura t-octilamina.

Não foi possível observar correlações entre o núcleo clavulanato e o núcleo amina no experimento HMBC, porém as integrais no espectro de RMN- 1H indicaram a proporção exata de átomos de H presentes na molécula estudada.

4 - Espectros de RMN do clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação através da Reação Indireta R₂ – sal de amina do AC com o 2-etilexanoato de potássio



```

Current Data Parameters
NAME      Jaine_caldosheila
EXPNO     1
PROCNO    1

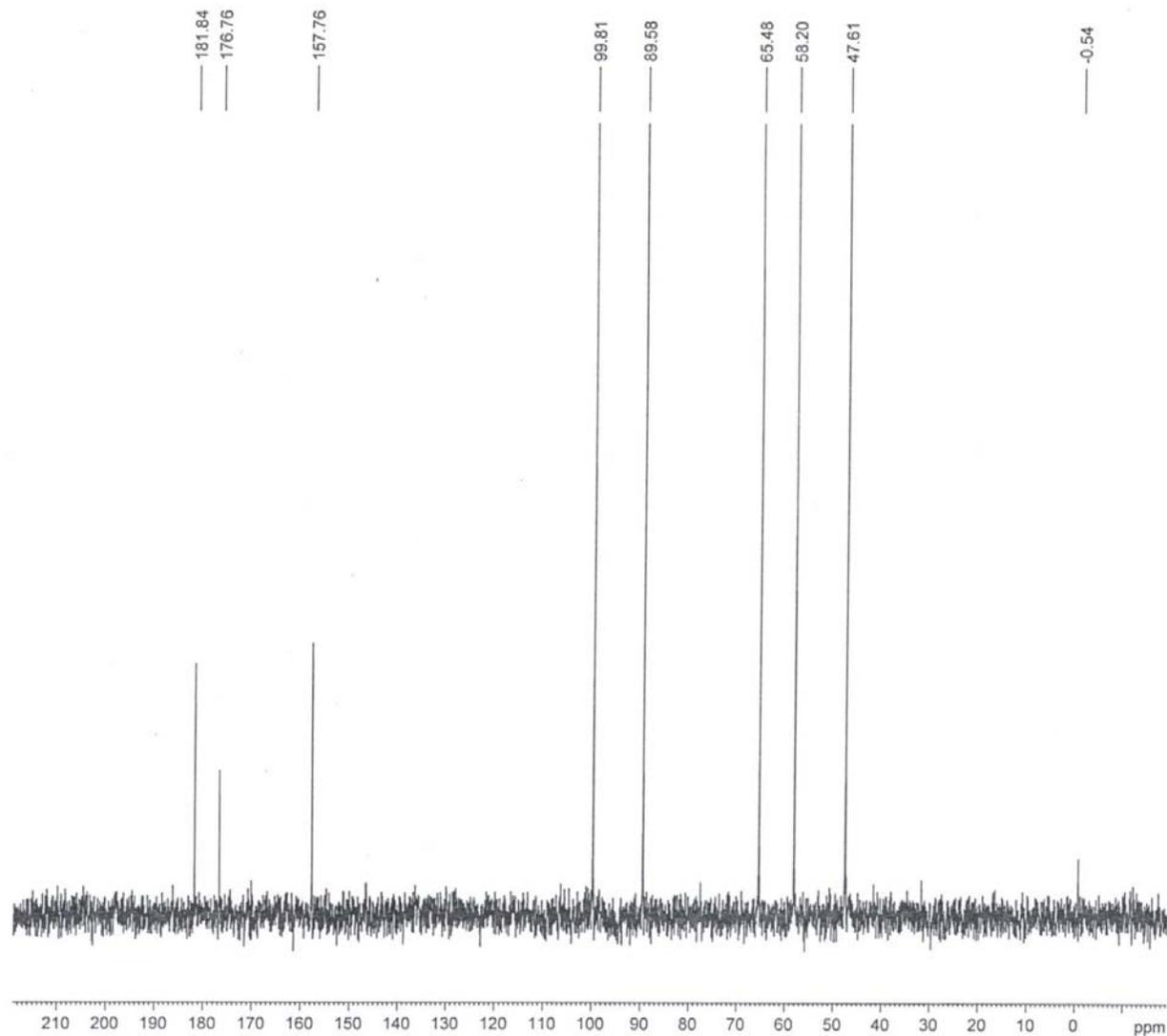
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080402
Time      14.27
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Multinucl
PULPROG   zgcprr
TD         65536
SOLVENT   D2O
NS         1
DS         0
SWH        5341.880 Hz
FIDRES     0.081511 Hz
AQ         6.1342196 sec
RG         256
DW         93.600 usec
DE         6.00 usec
TE         300.0 K
D1         2.00000000 sec
d12        0.00002000 sec
TDO        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         8.50 usec
PL1        0.00 dB
PL9        55.00 dB
SFO1       400.2128942 MHz

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         400.2109732 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

```

Espectro 15: RMN-¹H do clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação (D₂O, 400MHz).



Current Data Parameters
 NAME Jaine_caldosheila
 EXPNO 2
 PROCNO 1

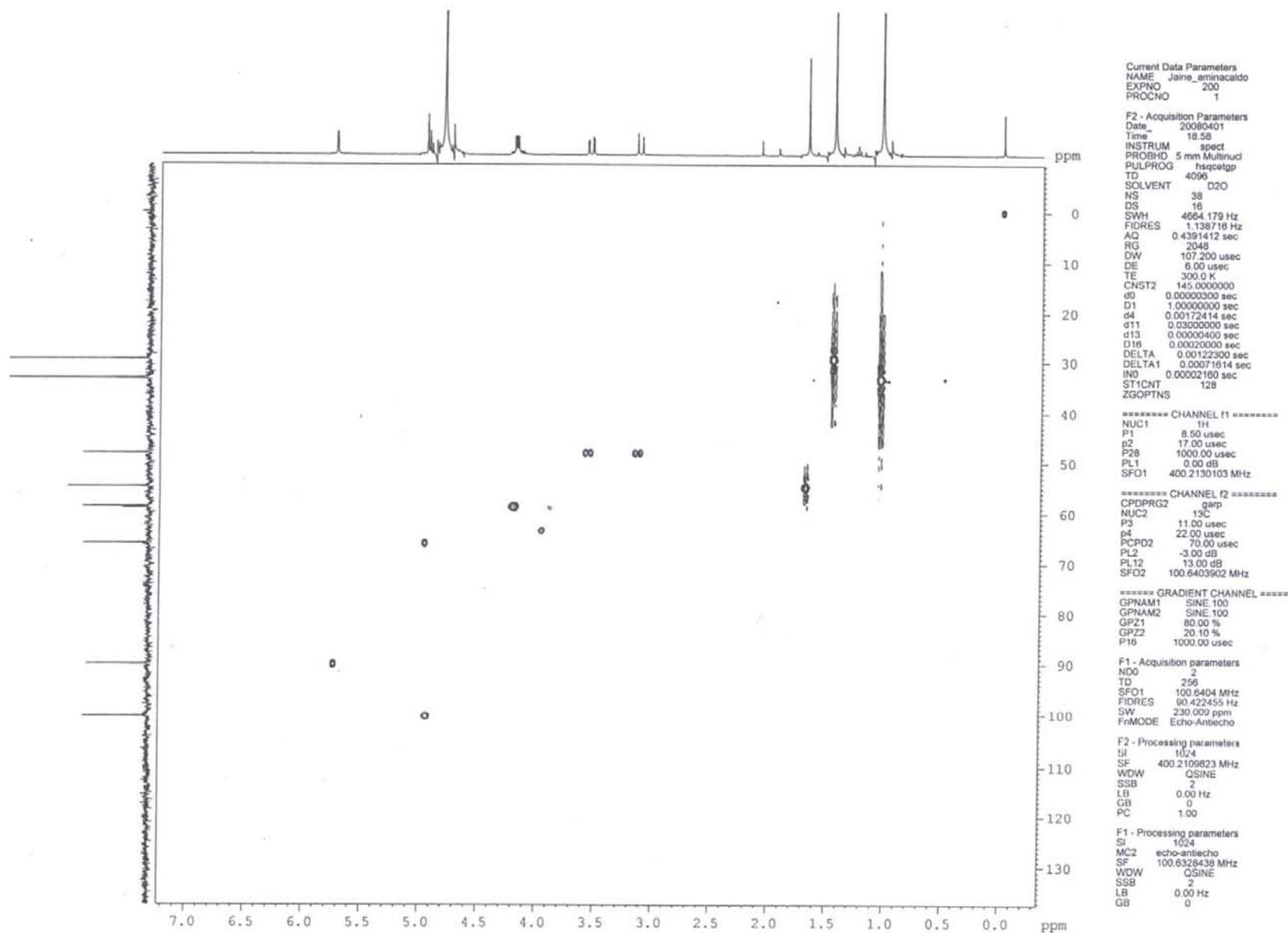
F2 - Acquisition Parameters
 Date 20080409
 Time 11.18
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT D2O
 NS 6703
 DS 4
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.731836 Hz
 AQ 0.6832628 sec
 RG 8192
 DW 20.850 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.11000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.01000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 6.63 usec
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 100.6429474 MHz

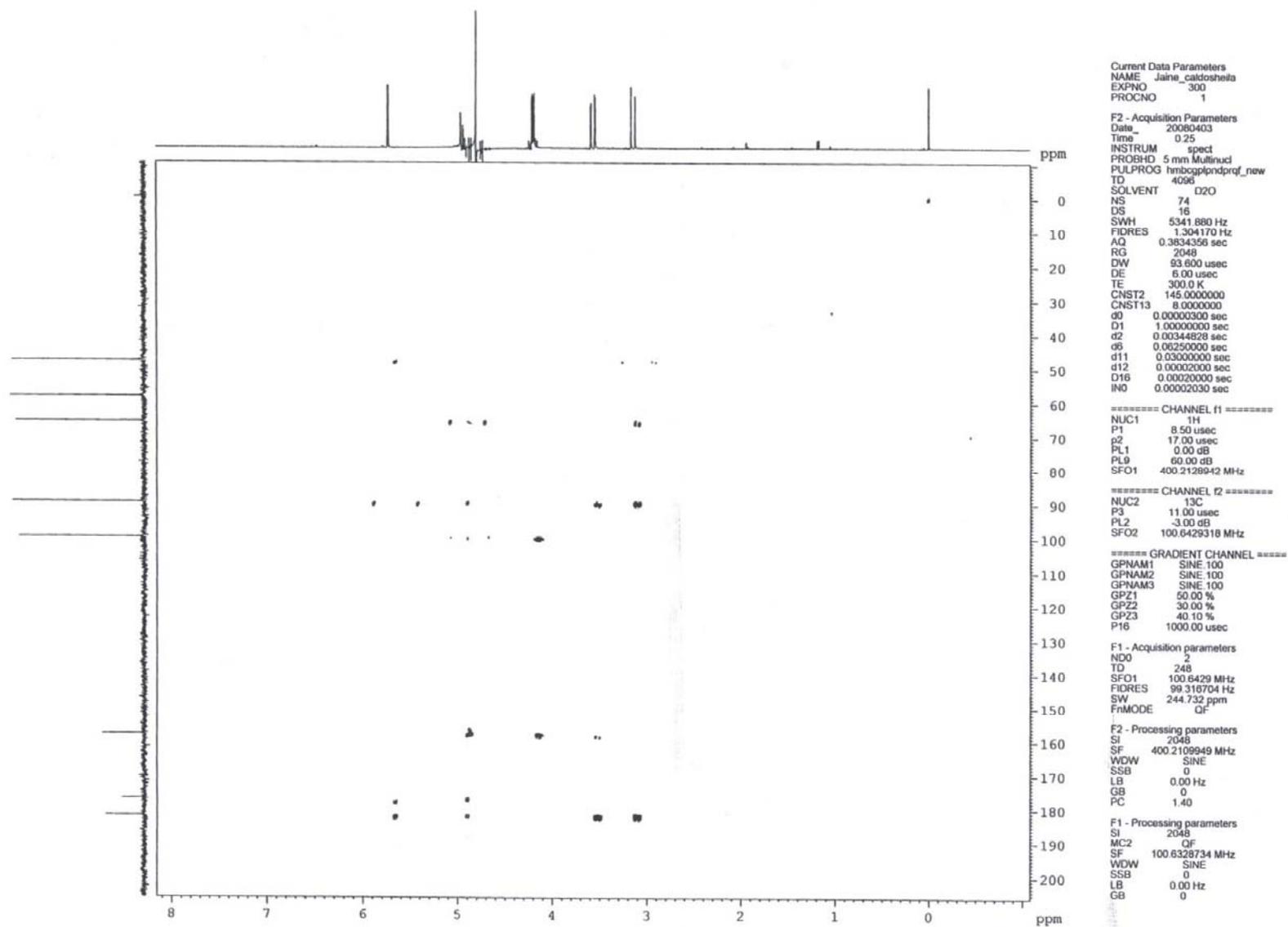
===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 120.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 13.00 dB
 PL13 13.00 dB
 SFO2 400.2116008 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6329055 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

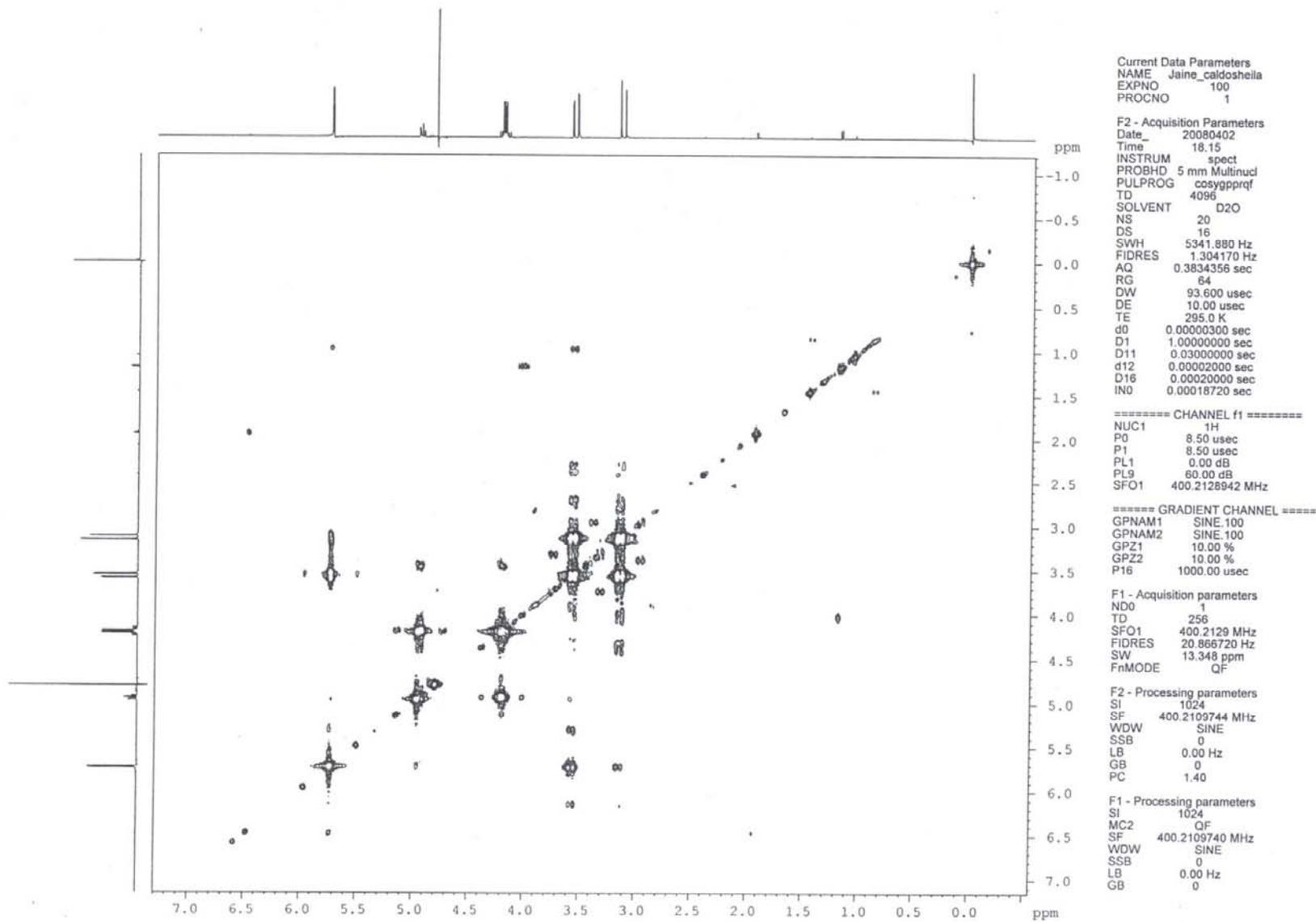
Espectro 16: RMN-¹³C do clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação (D₂O, 100MHz).



Espectro 17: RMN-HSQC (^1H - ^{13}C) do clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação (D_2O , 400MHz).



Espectro 18: RMN-HMBC (^1H - ^{13}C) do clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação (D_2O , 400MHz)



Espectro 19: RMN-COSY (^1H - ^1H) do clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação (D_2O , 400MHz).

Através da análise dos espectros 15 a 19 foi possível construir a Tabela 5 com os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos para o clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação através da Reação Indireta R₂.

Tabela 5: Deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos do clavulanato de potássio precipitado a partir do caldo de fermentação.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> ; <i>J</i>)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	COSY
1 (N)	-	-		-
2 (CH)	4,96 (<i>dd</i> ; 0,8; 1,2)	65,5	3,13; 4,92	4,20
3 (C sp ²)	-	157,8	4,92; 4,96; 3,55(longe)	-
4 (O)	-	-	-	-
5(CH)	5,73 (<i>dd</i> ; 0,8; 2,8)	89,6	4,96; 4,92; 3,55; 3,13	3,55; 3,13
6 a,b (CH ₂)*	3,55 (<i>dd</i> ; 2,8; 17,2) 3,13 (<i>dd</i> ; 0,8; 17,2)	47,6	5,73	3,13; 5,73 3,55; 5,73
7 (CO)	-	181,8	5,73; 4,96; 3,55; 3,13	-
8 (CH sp ²)	4,92	99,8	4,96; 4,20	4,20
9 (CH ₂ -OH)	4,20 (<i>m</i>)	58,2	-	4,96; 4,92
10 (COOH)	-	176,8	5,73; 4,96 ou 4,92	

*Valores intercambiáveis

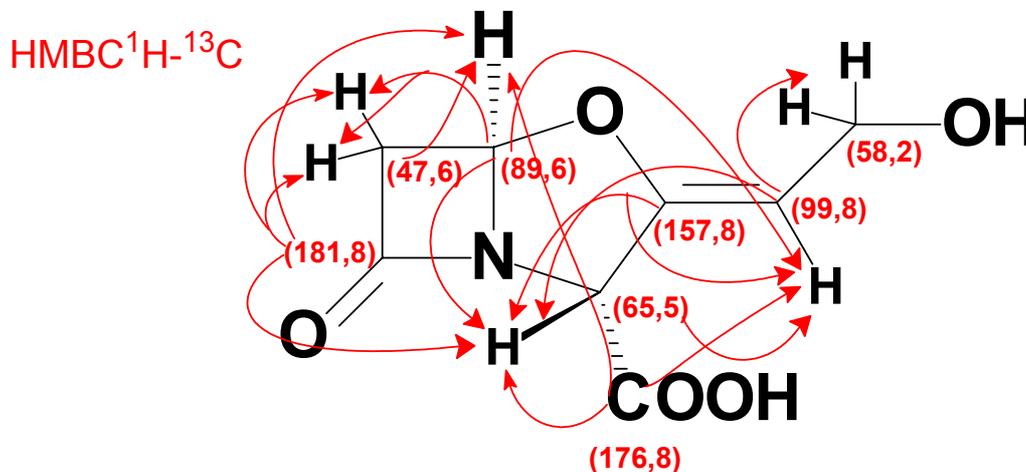


Figura 5: Correlações observadas no espectro HMBC ¹H-¹³C

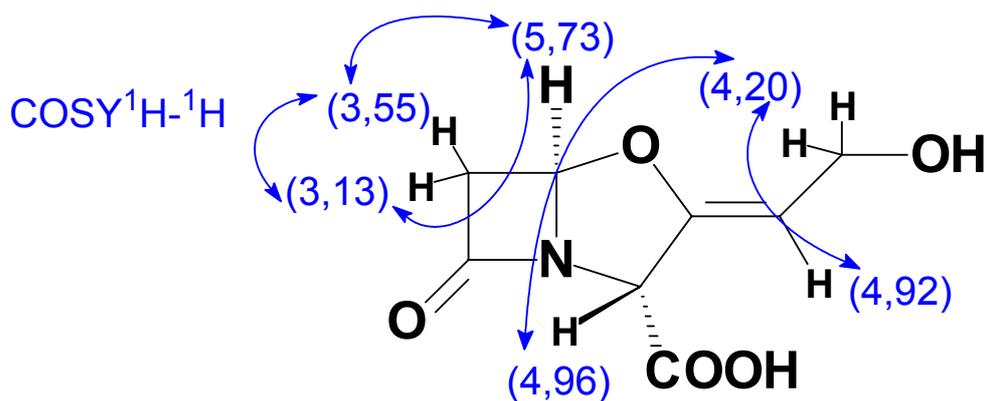


Figura 6: Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H .

O espectro de RMN- ^1H apresentou 6 sinais de hidrogênios: dois duplos dubletos em δ 5,73 e em δ 4,96; dois multipletos em δ 4,92 e 4,20 e dois duplos dubletos em δ 3,55 e 3,13 estes dois referentes aos hidrogênios do grupo metilênico do anel β -lactâmico CH_2 -6, que acoplam entre si com uma constante alta de 17,2 Hz. O hidrogênio CH-5, localizado entre o anel β -lactâmico e o anel oxazolidina acopla com um dos hidrogênios CH_2 -6 em δ 3,13 e com o CH-2 δ 4,96.

A análise do espectro de RMN- ^{13}C (BBD) indicou a presença de 8 átomos de carbonos, sendo 4 deles com hibridação sp^2 em δ 181,8, 176,8, 157,8 e 99,8, os dois primeiros referentes a dois átomos de carbonos carbonílico e carboxílico, respectivamente; os outros dois em δ 157,8 e 99,8 referentes aos carbonos da dupla ligação. Os demais átomos de carbonos situados entre δ 89,6 e 47,6 apresentam hibridação sp^3 , apresentando-se desblindados devido à proximidade de heteroátomos.

O espectro de RMN COSY ^1H - ^1H apresentou correlações entre CH_2 -6 (δ 3,55 e 3,13) e CH-5 (δ 5,73); entre CH_2 -9 (δ 4,20) e CH-8 (δ 4,92); bem como o acoplamento homoalílico entre CH_2 -9 e CH-2 (δ 4,96).

No espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C foram observadas correlações a longa distância entre o hidrogênio CH-2 e o carbono C-3 (δ 157,8), C-8 (δ 99,8), C-10 (δ 176,8) e C-7 (δ 181,8); entre o hidrogênio CH-5 e C-6 (δ 47,6) e C-7; entre CH_2 -6 e C-7 e C-5 (δ 89,6); entre os hidrogênios metilênicos CH_2 -9 e C-8; e, finalmente entre o hidrogênio metínico CH-8 e C-2 (δ 65,5), C-3 e C-10. Neste espectro também foi possível observar um acoplamento em W a longa distância entre o CH-8 e o C-5. Assim foi possível atribuir os sinais de hidrogênios e carbonos para o clavulanato de potássio sem ambigüidade.

**Comparação entre os deslocamentos químicos de H e C do AC e do AC/amina,
ambos obtidos a partir do caldo de fermentação:**

A Tabela 6 mostra os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos átomos de carbono do clavulanato de potássio e do sal de amina do AC, ambos obtidos a partir do caldo de fermentação por *Streptomyces clavuligerus*. Nota-se grande similaridade entre as partes da estrutura referente ao clavulanato para ambos os sais.

Tabela 6: Deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos do intermediário estável AC/amina e do clavulanato de potássio, precipitados a partir do caldo de fermentação

Posição	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz) ClavK	$\delta^{13}\text{C}$ ClavK	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz) (Clav/amina)	$\delta^{13}\text{C}$ (Clav/amina)
1 (N)	-	-	-	-
2 (CH)	4,96 (dd; 0,8; 1,2)	65,5	4,95 (s)	66,1
3 (Csp ²)	-	157,8	-	158,2
4 (O)	-	-	-	-
5 (CH)	5,73 (dd; 0,8; 2,8)	89,6	5,73 (d, 3,2)	90,2
6 (CH ₂)	3,55 (dd; 2,8; 17,2) 3,13 (dd; 0,8; 17,2)	47,6	3,56 (dd; 3,2; 17,2) 3,14 (d; 17,6)	47,9
7 (CO)	-	181,8	-	182,3
8 (CH)	4,92	99,8	4,93	100,4
9 (CH ₂)	4,20 (m)	58,2	4,19 (m)	58,4
10 (COOH)	-	176,8	-	176,9
11 (Csp ³)			-	58,62
12 (CH ₂)			1,68 (s)	55,3
13 (Csp ³)			-	-
14 (3CH ₃)			1,05 (s)	33,2
15 (2CH ₃)			1,45 (s)	29,5

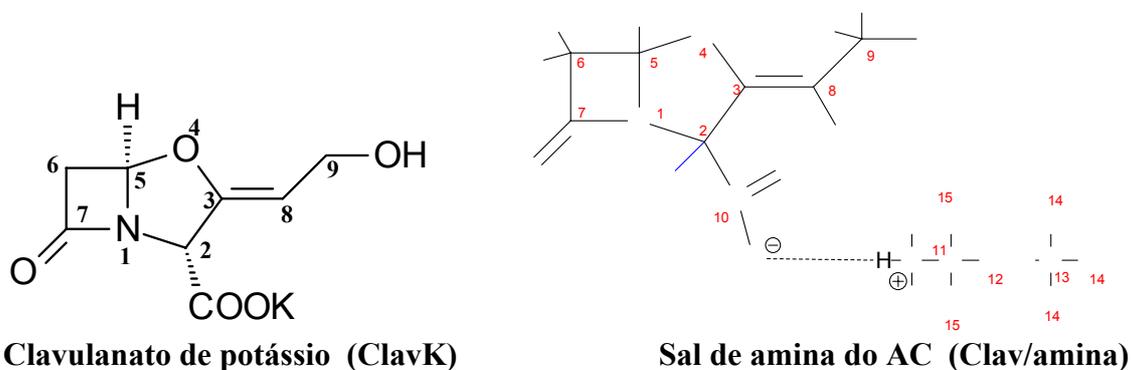


Figura 7: Estruturas dos sais; clavulanato de potássio e sal de amina do AC.