

# ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ÁCIDO CLAVULÂNICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO.

Santos. D. Z. T.<sup>1</sup>, Gracindo. A.<sup>1</sup>, Fonseca. G. A.<sup>1</sup>, Cerri, M. O.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.

E-mail para contato: marcel@fcfar.unesp.br

**RESUMO** – Com o aumento de bactérias patogênicas resistentes a fármacos derivados de  $\beta$ -lactâmicos devido a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, muitos antibióticos tem se tornado ineficientes, gerando a necessidade de estudos para a inibição dessas enzimas. O ácido clavulânico produzido por *Streptomyces clavuligerus* consegue inibir essas enzimas, entretanto, ele é quimicamente instável na sua forma natural, sendo que esta estabilidade depende do pH e da temperatura. Esse projeto teve como objetivo a análise da estabilidade de ácido clavulânico quando armazenado após a sua produção. Ele foi armazenado em diferentes condições de temperatura, sendo que a que permitiu a sua maior conservação foi quando congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foram descobertos no início do século vinte o que representou um momento decisivo na luta contra bactérias patogênicas. Porém, o número de bactérias patogênicas resistentes a fármacos derivados de  $\beta$ -lactâmicos cresceu, devido à produção de enzimas  $\beta$ -lactamases por esses microrganismos, que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico originando um produto sem ação antibacteriana. Então começaram estudos para a descoberta de um inibidor dessas enzimas e, assim, chegou-se ao ácido clavulânico (AC), produzido por *Streptomyces clavuligerus*, uma bactéria filamentosa e estritamente aeróbica. Sendo assim, a produção de AC tem despertado um grande interesse nas indústrias farmacêuticas do mundo de entender a bioquímica e a genética da sua biossíntese, assim como, aperfeiçoar métodos de separação e purificação (Silva, C.S.; 2010).

Geralmente se encontra AC em formulações junto com outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos sensíveis à ação de  $\beta$ -lactamases, tais como penicilina e cefalosporina, isso porque sua atividade antibacteriana é baixa quando comparada com outros antibióticos (Rodrigues, K.C.S.; 2015).

O AC é um metabólico secundário, ou seja, sintetizado na fase estacionária e acredita-se que esteja envolvido com funções de sobrevivência na natureza. Apresenta estruturas moleculares mais complexas do que os compostos que o originam. É produzido por um processo fermentativo complexo e sofre a influência de vários parâmetros tais como pH, temperatura, agitação, aeração, além de fontes de carbono, nitrogênio e indutores adequados. O consumo das fontes de carbono e nitrogênio resulta no acúmulo de diferentes metabólitos no caldo fermentativo, ocasionando a degradação do AC. Sendo assim, essas fontes tem bastante influência na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* (Rodrigues, K.C.S.; 2015).

O AC é quimicamente instável na sua forma natural, pois ele contém um grupo carbonila ligado ao anel beta-lactâmico que é susceptível a hidrólise (Silva, C.S.; 2010), razão que explica seus processos de recuperação ter baixos rendimentos. Há uma menor degradação de AC em soluções aquosas do que em meio de fermentação, isso porque o meio tem outros componentes, tais como amônio (Rodrigues, K.C.S.; 2015). A taxa de degradação de AC é altamente dependente do pH, já que normalmente ocorre uma menor degradação em soluções ácidas. A estabilidade diminui também com o aumento da temperatura (Silva, C.S.; 2010). Entretanto, como o uso do AC muitas vezes não ocorre imediatamente após a sua produção, se torna importante a análise de condições de armazenamento mais adequadas para que ocorra a menor degradação possível.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado em criotubos na forma de células vegetativas a -70°C suspensas em solução crioprotetora contendo 20% v/v de glicerol.

### 2.2 Meios de cultura utilizados

Foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al.* (2005) composto por 15 g/L de glicerol; 10 g/L de peptona bacteriológica; 10 g/L de extrato de malte; 1 g/L de extrato de levedura; 21 g/L de tampão MOPS; 2,5 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,75 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1 mL/L de solução de sais.

O meio de cultura de crescimento teve a mesma composição do meio de cultura de produção, ambos baseados no meio proposto por Teodoro *et al.* (2006). Temos como composição desses meios 15 g/L de glicerol; 20 g/L de isolado proteico de soja; 21 g/L de tampão MOPS; 0,8 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,75 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1 mL/L de solução de sais.

O pH dos meios foi ajustado para 6,8 e a esterilização realizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

### 2.3 Metodologia analítica para determinação da concentração de AC

Para a determinação da concentração de ácido clavulânico foi utilizado o método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982), que consiste na leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 311 nm do produto da derivatização do ácido clavulânico com o reagente imidazol. As absorbâncias obtidas pelo método foram inseridas na Equação 1 para cálculo da concentração.

$$\text{Absorbância} = 0,0204 * \text{Concentração de AC} \quad (1)$$

## 2.4 Testes realizados

Foi realizado um cultivo para analisar a estabilidade de AC. O meio de reativação e de crescimento foram mantidos durante 24 horas a 30°C em béqueres de 250 mL sendo que somente 10% do volume foi utilizado e o de produção foi mantido por 72 horas a 28°C em béqueres de 500 mL também com 10% do volume utilizado, todos em Shaker a 250 RPM.

Imediatamente após o termino da produção amostras foram centrifugadas a 4°C e 3720 RPM durante 15 minutos para que o produto de interesse (sobrenadante) fosse separado das células e então foi realizada uma quantificação de AC (item 2.3).

O restante das amostras foram armazenadas em diferentes condições de temperatura: algumas foram congeladas imediatamente em freezer a temperatura de -18°C (amostras A), outras foram congeladas imediatamente em freezer a temperatura de -70°C (amostras B) e outras foram congeladas a temperatura de -18°C e após 24 horas transferidas para temperatura de -70°C (amostras C).

Após 4 dias foi feita a quantificação de AC das amostras congeladas em diferentes condições e posteriormente essas quantificações foram feitas de 7 em 7 dias durante 1 mês. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos testes, a partir das absorbâncias obtidas foi possível calcular a concentração de AC pela curva de calibração (Equação 1) nas diferentes temperaturas de conservação no decorrer dos dias, obtendo resultados que podem ser analisados na Figura 1 e na Tabela 1.

Figura 1 – Gráfico da concentração de ácido clavulânico armazenado em diferentes condições com o decorrer do tempo.

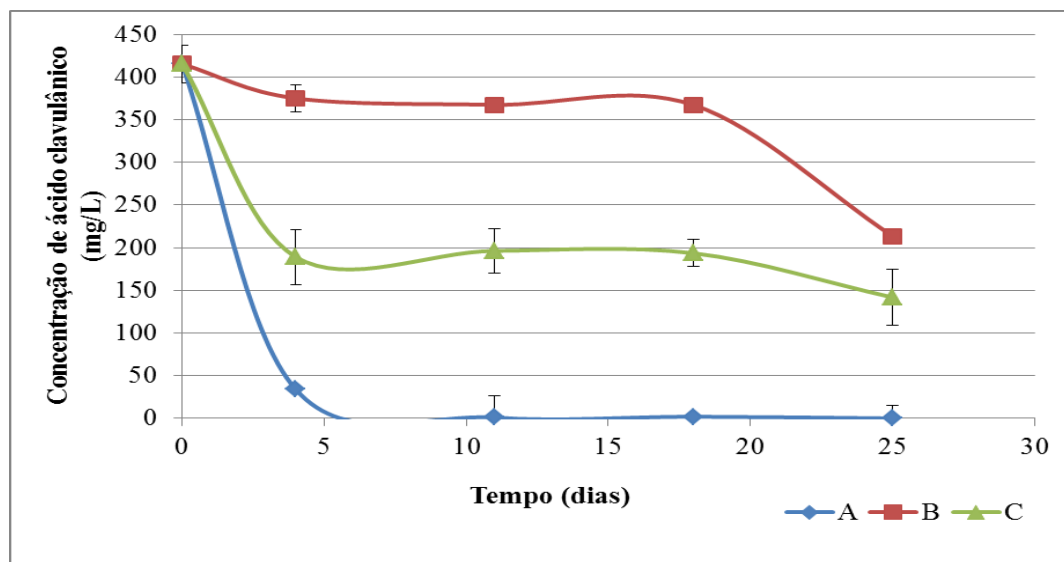


Tabela 1 – Porcentagem da concentração de AC com o decorrer do tempo.

Dias	% da concentração de AC		
	A	B	C
0	100,0	100,0	100,0
4	8,1	90,3	45,6
11	0,2	88,5	47,3
18	0,5	88,4	46,6
25	0,0	51,5	34,2

É possível observar pelo gráfico da Figura 1 que a condição de conservação que menos degrada AC com o tempo é a que, imediatamente após o término da produção, o AC foi armazenado a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  (amostras B). Até o quarto dia houve, de acordo com a Tabela 1, degradação de 9,7% mas, após isso, essa degradação se torna relativamente estável, sendo que até o décimo oitavo dia houve degradação de apenas 1,9 % a mais de AC. Entretanto, após esse período, essa degradação se torna bem acentuada, sendo que em uma semana foi degradado mais 12,5% de AC.

Quando armazenado diretamente em  $-18^{\circ}\text{C}$  (amostras A) a degradação de AC é muito rápida sendo que em de 4 dias é degradado cerca de 91,8% de AC como pode-se observar na Tabela 1, se tornando inviável o armazenamento a longo prazo nessa condição.

Ao ser realizada a transferência de AC de  $-18^{\circ}\text{C}$  para  $-70^{\circ}\text{C}$  em 24 horas (amostras C) houve uma maior conservação da concentração, mas ainda sim o decaimento de 54,4% da concentração nos primeiros 4 dias pode ser considerado muito acentuado e, só partir do sexto dia ela se manteve relativamente estável.

## 4. CONCLUSÃO

Observando os dados obtidos é possível concluir que, para garantir que ainda exista uma concentração de AC relativamente alta, ele deve ser armazenado em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Entretanto, a sua utilização deve ser realizada em cerca de 15 dias pois, após isso, há uma degradação ainda maior de AC. Ainda assim, por haver um decréscimo de aproximadamente 10% nos 4 primeiros dias de armazenamento, é interessante que sua utilização seja feita o quanto antes, ainda mais se objetiva-se a sua utilização em processos onde grandes concentrações são perdidas, como a purificação, ou em larga escala, onde o decréscimo da concentração de AC representa uma grande perda econômica.

## 5. REFERÊNCIAS

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

RODRIGUES, K.C.S. *Estudo da influência do pH e da temperatura na produção de ácido clavulânico por Streptomyces clavuligerus em biorreator convencional*. Universidade Federal de São João Del-Rei, Ouro Branco – MG, 2015.

ROSA, J.C.; BAPTISTA NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. *Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by Streptomyces clavuligerus*, **Bioproc Biosyst Eng**, v.27, p.99-104, 2005

SILVA, C.S. *Purificação do ácido clavulânico por processo de filtração tangencial, extração por sistemas de duas fases aquosas e re-extração com resina de troca iônica*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2010.

TEODORO, J.C.; BAPTISTA-NETO, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, I.L.; HOKKA, C.O.; BADINO-JR, A.C. *Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p.450-455, 2006.