



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA OBTIDOS A PARTIR DE CULTIVOS DE *Streptomyces clavuligerus* EM MEIO COMPLEXO

Aluna: Maritza Catalina Condori Bustamante

Orientador: Professor Dr. Marlei Barboza Pasotto

Banca Examinadora

Prof. Dr. Professor Dr. Marlei Barboza Pasotto

Prof. Dr. Álvaro Batista Neto

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

São Carlos - SP

2009

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

C746sc

Condori Bustamante, Maritza Catalina.

Separação de compostos com atividade antibacteriana obtidos a partir de cultivos de *Streptomyces clavuligerus* em meio complexo / Maritza Catalina Condori Bustamante. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
99 f.

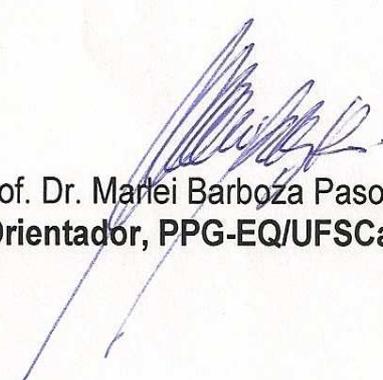
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Engenharia bioquímica. 2. Cefamicina C. 3. Antibióticos. 4. Compostos bioativos - separação. 5. *Streptomyces clavuligerus*. I. Título.

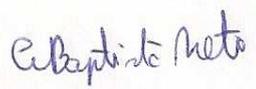
CDD: 660.63 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MARITZA CATALINA CONDORI BUSTAMANTE** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE AGOSTO DE 2009.

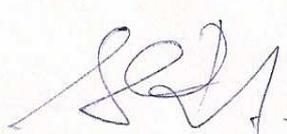
BANCA EXAMINADORA:



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



Dr. Álvaro Batista Neto
Verdartis / Ribeirão Preto



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.
PPG-EQ/UFSCar

Este trabalho foi desenvolvido com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

*Para minha pequena
Sami Sayarumi,
pela mudança na minha vida e
para meu amado esposo Víctor
Anthony por seu apoio incondicional
em todo momento, agradeço à vida
por ter-te.
Amor obrigada!*

Agradecimientos

Agradezco especialmente a mi orientador, Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto, por la gran ayuda en la elaboración de este trabajo de tesis, las discusiones para el enriquecimiento del trabajo, su gran incentivo en el desarrollo del proyecto, por su amistad, compañerismo y sobre todo su paciencia durante todo este período.

Al prof. Dr. Carlos Osamu Hokka, y al prof. Dr. Alberto Colli Badino personas que creyeron en mi persona brindándome la oportunidad de poder continuar mis estudios profesionales, aquí en Brasil, continuando así lo que fue iniciado en la Universidad Nacional Federico Villarreal.

A la Dra. Jaine H. Hortolan Luiz de Oliveira por las sugerencias y críticas constructivas en el desarrollo del presente trabajo, por su paciencia, invaluable amistad así por sus conversaciones y consejos.

Al Dr. Álvaro Baptista Neto, por el apoyo en el desenvolvimiento de este trabajo así como sugerencias constructivas.

A la Dra. Ana Claudia Granato, por su ayuda y consejos, durante el desenvolvimiento de este trabajo.

A los colegas de laboratorio Clóvis Sacardo, Liliane Maciel de Oliveira, Luciana Brites, Carolina, Cecilia e Sergio; por su enorme ayuda y por transmitir sus experiencias en el desenvolvimiento experimental y sugerencias para el desarrollo de la tesis.

A mi familia, ellos son las personas más queridas, que siempre me apoyaron mi esposo Víctor Anthony, por su amor, cariño e confianza y a mi pequeña Sami Sayarumi, la razón de mi vida que acabó de llegar para completar nuestra felicidad.

A mis suegros Liliana y Antonio por sus palabras de aliento, por sus sabios consejos, su apoyo y confianza.

A mi abuelita Consuelo, y a mi abuelito Tomas (q.e.p.d) por ser las personas que siempre creyeron en mí y me dieron la fuerza para seguir adelante, por ustedes estoy donde estoy, queridos abuelitos.

A mi hermana Daly, por su apoyo incondicional en todo momento vivido y por su dinamismo.

A mi papá Gaspar, y a mis tíos Lucila, Manuel, Eufemia y José, por sus palabras de aliento.

A mis profesores de la Universidad Federico Villarreal: Mario Mallaupoma, Arminda Tirado, por su apoyo para llegar en realizar mis estudios de post-grado.

Al técnico Amadeus, y a todos aquellos que de algún modo recibí apoyo técnico.

A mis amigos: Maribel, Abigail, Onías, Amanda, Ana María, Andressa, José por su amistad sincera, unidos en momentos malos y buenos y durante todo este tiempo.

Quiero reservar este espacio para agradecer a las personas que de alguna manera participaron de la elaboración de este trabajo de maestría.

A Dios, por concederme la vida y una familia maravillosa.

Resumo

A cefamicina C é uma cefalosporina natural produzida por *Streptomyces clavuligerus* de grande importância na indústria farmacêutica, esta é um antibiótico beta-lactâmico que atua como um inibidor da síntese da parede celular. Além de possuir atividade contra bactérias Gram-negativas, a cefamicina C é resistente à ação de enzimas beta-lactamases responsáveis pela resistência à ação das penicilinas. Tendo em vista as restritas informações na literatura sobre as etapas do processo industrial de produção da cefamicina C, torna-se indispensável o estudo dos processos de produção e separação deste antibiótico para que seja possível disponibilizar sua tecnologia ao setor produtivo. O presente trabalho buscou desenvolver protocolos alternativos para isolar e purificar compostos que apresentam atividade antibacteriana produzidos por *Streptomyces clavuligerus* DSM 738 como a cefamicina C e penicilinas.

A seqüência de etapas de purificação utilizadas nesta dissertação constou de: 1) Microfiltração do caldo para a separação de células e sólidos insolúveis; 2) Ultrafiltração para a separação de subprodutos de alto peso molecular, como proteínas e enzimas; 3) Utilização de processo de adsorção com resina não iônica para clarificação do caldo e finalmente a hipótese de trabalho desta dissertação foi de aplicar um processo de adsorção por troca iônica para a separação de compostos com atividade antibacteriana, os quais podem ser a Cefamicina C e a Penicilina N. Cabe ressaltar que a cefamicina C não está disponível no mercado, sendo restrita às indústrias que detém a tecnologia de produção. Se utilizou o método biológico teste de atividade bacteriológica com a bactéria *Escherichia coli* ESS contra beta-lactâmicos totais.

Análises realizada por RMN mostram que a utilização da microfiltração e ultrafiltração são fundamentais como etapas iniciais de purificação. A segunda etapa de purificação com resina não iônica (Amberlite XAD-4) mostrou sua eficiência na retenção de pigmentos, e por fim, com este caldo clarificado, foi possível separar duas frações majoritárias e bem definidas com atividade antibacteriana, através da utilização da resina de troca aniônica (QXL da Amershan), utilizando como eluentes NaCl e CH₃COONa. As análises realizadas por RMN-¹H mostraram que a primeira fração pode representar a molécula de uma cefalosporina, tal como é a cefamicina C, dentre outros compostos.

Abstract

The cephamycin C is a natural cephalosporin produced by *Streptomyces clavuligerus*, of great importance in the pharmaceutical industry; it is a β -lactam antibiotic that acts as an inhibitor of the cellular wall synthesis. Besides some activity against Gram-negative bacteria, the cephamycin C is resistant to the action of β -lactamase enzymes responsible for the resistance to penicillin. The information available in the literature, on the stages of the industrial production process of cephamycin C is scarcely found, studying the production process and the antibiotic separation is essential to provide technology to the production section. The present study aimed to develop alternative protocols to isolate and purify composites produced by *Streptomyces clavuligerus* DSM 738, such as the cephamycin C and penicillin, which present antibacterial activity.

The sequence of purification stages proposed in this work consisted of: 1) Microfiltration of the broth for the separating cells and insoluble solids; 2) Ultrafiltration for the separation of high molecular weight sub products, such as proteins and enzymes; 3) Use of adsorption process with non ionic resin for the broth clarification; and 4) Finally, the hipotese this work, the adsorption process by ionic exchange, for the separation of composites with antibacterial activity, such as cephamycin C and Penicillin N. On the other hand, cephamycin C is not available in the market, being restricted to the industries that possess the production technology. The biological method of choice for the bacteriological activity test was the *Escherichia coli* ESS bacteria against all β -lactams.

RMN-¹H analysis showed that the use of the microfiltration and ultrafiltration are essential as first purification stages. The second purification stage with non ionic resin (Amberlite XAD-4) showed to be efficient on retaining pigments, finally, with this clarified broth, it was possible to separate two major and well defined fractions with antibacterial activity, by the use of an anion exchange resin (QXL of Amershan), utilizing NaCl and CH₃COONa as mobile phase. Analysis by RMN-¹H showed that the first fraction can represent a cephalosporin molecule, such as cephamycin C, among others compounds.

SUMÁRIO

Lista de Figura.....	5
Lista de Tabelas.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Antibióticos.....	13
2.2 Streptomyces clavuligerus.....	14
2.3 Antibióticos beta-lactâmicos.....	14
2.4 Beta-lactamases.....	23
2.5 Reatividade de Anel Beta-lactâmico.....	24
2.5.1 Hidrolise Enzimática.....	24
2.5.2 Alterações dos Sítios Alvo ou Modificação dos Sítios de Ligação.....	24
2.6 Rota Biossintética.....	26
2.6.1 Cefamicina C.....	28
2.6.2 Penicilina N.....	30
2.7 Processos de Separação e Purificação.....	31
2.8 Processo de Adsorção.....	35
2.8.1 Tipos de Adsorção.....	37
2.9 Processo de Separação e Purificação da Cefamicina C.....	39
2.9.1 Aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Materiais.....	45
3.1.1 Caldo de fermentação.....	45
3.1.2 Microrganismo.....	45

3.1.3	Membranas	45
3.1.4	Resinas.....	46
3.2	Equipamentos utilizados.....	47
3.2.1	Cromatógrafo CLAE	47
3.2.2	Speed Vac	47
3.2.3	Espectrofotômetro UV/Vis.....	47
3.2.4	Ultrafreezer.....	47
3.2.5	Incubadora	48
3.2.6	Autoclave.....	48
3.2.7	Banho de água	48
3.2.8	Bombas	48
3.2.9	pHmetro	48
3.2.10	Colunas	48
3.2.11	Reagentes.....	49
3.3	Métodos	50
3.3.1	Metodologia de análise de determinação de antibióticos beta-lactâmicos totais por bioensaio.....	50
3.3.2	Análise de uma cefalosporina, “cefamicina C”, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	51
3.3.3	Técnicas Finas de Detecção Molecular	52
	Ressonância magnética Nuclear RMN.....	52
	Espectrometria de Massa (EM).....	52
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	53
4.1	Tratamento do caldo com Amberlite XAD-4	54
4.2	Purificação Utilizando Resina de Troca Iônica QXL.....	55
4.3	Caldo obtido por cultivo em batelada.....	56
4.3.1	Eluição com cloreto de sódio	56
	Experimento 1	56
	Experimento 2.....	57
	Experimento 3.....	57

4.3.2	Eluição com acetato de sódio	58
	Experimento 1	58
	Experimento 2	58
4.4	Caldo obtido por cultivo em batelada alimentada	59
4.4.1	Eluição com cloreto de sódio	59
	Experimento 1	59
	Experimento 2	60
	Experimento 3 – Bioensaio das frações tratadas com diferentes pH.....	61
4.4.2	Eluição com acetato de sódio	62
	Experimento 1	63
	Experimento 2	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
5.1	Tratamento do caldo com Amberlite XAD-4	64
5.2	Purificação Utilizando a Resina de Troca Iônica QXL	65
5.3	Caldo obtido por cultivo em batelada.....	65
5.3.1	Eluição com cloreto de sódio (NaCl)	65
	Experimento 1	65
	Experimento 2	67
	Experimento 3	70
5.3.2	Eluição com acetato de sódio CH ₃ COONa	75
	Experimento 1	75
	Experimento 2	77
5.4	Caldo obtido por cultivo em batelada alimentada	80
5.4.1	Eluição com cloreto de sódio NaCl	80
	Experimento 1	80
	Experimento 2	82
	Experimento 3 - Bioensaio mudando o pH das frações que apresentaram atividade.....	83
5.4.2	Eluição com acetato de sódio CH ₃ COONa	85
	Experimento 1	85

Experimento 2	87
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Lista de Figura

Figura 2.1. Penicilinas e cefalosporinas, geradas a partir dos aminoácidos essenciais. (O’ Sullivan et al., Jensen et al., e Demain et al.).....	15
Figura 2.2. Características anfotéricas dos compostos beta-lactâmicos.....	16
Figura 2.3. Estruturas principais das penicilinas e das cefalosporinas. O anel beta-lactâmico mais o anel tiazolidínico formam um núcleo penam, em penicilinas. O anel beta-lactâmico mais o anel diidrotiazina formam o núcleo cefem em cefalosporinas.	17
Figura 2.4. (a) Fórmula estrutural das penicilinas, (b) penicilina N apresenta uma cadeia aminoadipil	17
Figura 2.5. (a) Penicilina G e (b) Penicilina V.	18
Figura 2.6. (a) Fórmula estrutural geral das cefalosporinas. (b) cefalosporina C.	19
Figura 2.7. Fórmula estrutural dos carbapenens.....	20
Figura 2.8. Fórmulas estruturais de: (a) ácido clavulânico. (b) Amoxicilina e (c) Ampicilina.	21
Figura 2.9. Fórmula estrutural de um (a) monobactama e do (b) aztreonam.	22
Figura 2.10. Hidrólise das penicilinas pela enzima beta-lactamase nucleófilo serina.	25
Figura 2.11. O grupo carbonila da amida do antibiótico beta-lactâmico acila um grupo amino da enzima.....	25
Figura 2.12. Biossíntese das penicilinas, cefalosporinas C e cefamicina C. Os nomes dos genes são mostrados em <i>itálico</i> , e os nomes das enzimas em letras maiúsculas (Brakhage, 1998).....	27
Figura 2.13. Fórmula estrutural da cefamicina C.	29
Figura 2.14. Derivados da cefamicina C: Cefoxitin e Cefminox.	30
Figura 2.15. Estrutura da penicilina N ou ácido aminodesacetoxicefalosporânico amino penicilina.	31
Figura 2.16. . Fotografia de uma coluna de leito fixo, coluna preenchida com material adsorbente.....	36
Figura 2.17. Esquema do processo de troca aniônica. Representação do equilíbrio dinâmico da troca aniônica entre a fase estacionária e os íons da fase móvel (A. Fallon et al.,1990)).	39

Figura 2.18. Isolamento de cefamicinas A e B (Miller et al., 1972).	41
Figura 2.19. Isolamento da cefamicina C.	42
Figura 2.20. Cromatograma obtido de uma ampílicina dissolta(A) e cafeina (B). Detectado a temperatura ambiente e um detecção em UV a 254 nm. Margosis, 1982.....	43
Figura 2.21. Separação de uma mistura de antibióticos cefalosporínicos numa coluna microporosa. Com uma taxa de fluxo de 50 ul/min UV de 254 nm. Picos 1 – Cefalexin 2 – Cefoxitin 3 – Cefadrin 4 – Cefaloglicin 5 – Cefalofin. White e Laufer, 1984.	44
Figura 3.1. Materiaís utilizados no bioensaio contra <i>E. Coli</i> , placas de Petri contendo o ágar.	51
Figura 4.1. Diagrama resumindo a metodologia experimental adotada na pesquisa, utilizando o caldo de fermentação em batelada.	53
Figura 4.2. Organograma do processo de obtenção da cefamicina C utilizando o caldo de fermentação em batelada alimentada.	54
Figura 4.3. Adsorção: tratamento do caldo fermentado com Amberlite XAD-4.	55
Figura 4.4. Sistema utilizado para a determinação dos diferentes parâmetros.....	59
Figura 4.5. Montaje do sistema de cromatografia de troca aniônica, coluna empacotada, banho termostático e controlador de temperatura.	60
Figura 4.6. Frações coletadas em tubos Falcon para posterior analeses por bioensaio e CLAE.	60
Figura 5.1. Espectro de RMN- ¹ H do caldo ultrafiltrado. Intensidade contra deslocamento químico em ppm.....	64
Figura 5.2. Resultado do experimento 1: diâmetro de halo de inibição em função do número de frações. Dessorção realizada em resina QXL. I - aplicação da amostra, II - lavagem com água; III - eluição com solução de NaCl 0,5 % m/v; IV - eluição com solução de NaCl 1,0 % m/v; V- eluição com solução de NaCl 1,5 % m/v e VI - eluição com solução de NaCl 5,0 % m/v.....	65
Figura 5.3. Espectro 2, RMN- ¹ H da fração 10. Obtida da lavagem com água.....	66
Figura 5.4. Espectro 3, RMN- ¹ H da fração 25 obtida da eluição com 0,5 % m/v de NaCl. ...	67
Figura 5.5. Experimento 2 diâmetro de halo de inibição (mm) em função do número de frações Cromatografia realizada com a resina QXL; I - aplicação da amostra, II - lavagem com água, e eluição com NaCl a diferentes concentrações: III - NaCl 0,2 % m/v; IV - NaCl 0,4 % m/v; V - NaCl 0,6 % m/v; VI - NaCl 0,8 % m/v; VII – NaCl 1,0% m/v; VIII – NaCl 1,5% m/v e IX – NaCl 5,0% m/v.	68

Figura 5.6. Espectro 4, RMN- ¹ H da fração 22, aplicação da amostra do Experimento1. Obtida da eluição com 0,4 % de NaCl. (D ₂ O, 400 MHZ).	69
Figura 5.7. Espectro 5, RMN- ¹ H da fração 27, aplicação da amostra do Experimento1 (seção 5.5.1.1.) frações reunidas 23 - 29. Obtida da eluição com 0,4 % de NaCl. (D ₂ O, 400 MHZ).....	69
Figura 5.8. Espectro 6, RMN- ¹ H da fração 58, aplicação da amostra do Experimento1, obtida da eluição com 1,0 % de NaCl. (D ₂ O, 400 MHZ).	70
Figura 5.9. Resultado do experimento 3 diâmetro de halo de inibição em função do número de frações. I - aplicação da amostra, II - eluição com água, e eluição com solução de NaCl a diferentes concentrações:	71
Figura 5.10. Espectro 7, RMN- ¹ H da fração 27, eluída com 0,2 % de NaCl. (D ₂ O, 400 MHZ). Com aplicação de uma amostra obtida das frações 7 – 18 reunidas do Experimento1.	72
Figura 5.11. Espectro 8, RMN- ¹ H da fração 30, eluída com 0,2 % de NaCl. (D ₂ O, 400 MHZ). Com aplicação de uma amostra obtida das frações reunidas 7 - 18 do Experimento1.	73
Figura 5.12. Espectro 9, RMN- ¹ H da fração 38. Obtida da eluição com 0,3 % de NaCl. (D ₂ O, 400 MHZ). Com aplicação de uma amostra obtida das frações reunidas 7 - 18 do Experimento1.	74
Figura 5.13. Espectro 10, RMN- ¹ H da fração 84, pertencente ao intervalo IX. Obtida da eluição com 1,25 % de NaCl. (D ₂ O, 400 MHZ).	74
Figura 5.14. Experimento 1 com acetato de sódio diâmetro de halo de inibição em função do número de frações. Observa-se I – aplicação da amostra, II – lavagem com água, e eluição com NaOAc a diferentes concentrações: III – 0,4 % m/v; IV – 0,6 % m/v; V – 0,8 % m/v; VI – 1,0 % m/v; VII – 1,5 % m/v; VIII – 2,5 % m/v e IX – 5,0 % m/v.	75
Figura 5.15. Espectro de massas da amostra 27 eluída com 0,6% m/v NaCl.....	76
Figura 5.16. Ampliação do Espectro de massas da amostra 27 na faixa de íons de interesse (Cef).	77
Figura 5.17. Absorbância em função do tempo ($\lambda = 254 \text{ nm}$) da cromatografia realizada com acetato de sódio, em resina QXL e eluída com um gradiente degrau de H ₂ O:NaOAc 1:1.....	78
Figura 5.18. Cromatograma dos volumes injetados através de um gradiente degrau de H ₂ O : NaOAc.....	79

Figura 5.19. Diâmetro de halo de inibição em função do tempo do processo para diferentes concentrações de NaOAc. Cromatografia realizada com a resina QXL e eluída com concentrações diferentes desta sal e realizada através de um gradiente degrau de H ₂ O : NaOAc.....	80
Figura 5.20. Resultado do diâmetro de halo de inibição em função do tempo do processo. O intervalo I - aplicação da amostra, II - lavagem, e a eluição em III - NaCl 0,1 % m/v; IV - NaCl 0,3 % m/v; V - NaCl 0,5 % m/v; VI - NaCl 1,3 % m/v; VII - NaCl 5,0 % m/v.....	81
Figura 5.21. Variação da área e da concentração de NaCl com o tempo.....	82
Figura 5.22. Resultado do Experimento 5; variação do diâmetro de halo de inibição em função do tempo de processo. Cromatografia realizada com a resina QXL. O intervalo I - aplicação da amostra, II - lavagem, e a eluição com solução de NaCl a diferentes concentrações: III - NaCl 0,1 % m/v; IV - NaCl 0,3 % m/v; V - NaCl 0,5 % m/v; VI - NaCl 1,3 % m/v; VII - NaCl 5,0 % m/v.....	82
Figura 5.23. Leituras obtidas no CLAE do experimento 5, com $\lambda = 254$ nm.....	83
Figura 5.24. Variação do diâmetro do Halo em função do pH.. As linhas sólidas mostram o comportamento linear desses pontos.....	84
Figura 5.25. Experimento 1 usando acetato de sódio. Diâmetro de halo de inibição em função do tempo do processo. I – aplicação da amostra, II – eluição com água, e eluição com NaOAc a diferentes concentrações: III – 0,4 % m/v; IV – 0,5 % m/v; V – 0,6 % m/v; VI – 1,5 % m/v; VII.....	86
Figura 5.26. Variação da área obtida por cromatografia e variação da concentração de NaOAc em função do tempo. Cromatograma dos volumes injetados do CLAE do experimento 1 ($\lambda = 254$ nm).....	86
Figura 5.27. Experimento 2, diâmetro de halo de inibição em função do tempo de processo. Cromatografia realizada com a resina QXL da Amershan. I – aplicação da amostra, II – eluição com água, e eluição com NaOAc a diferentes concentrações: III – 0,2 % m/v; IV – 0,3 % m/v; V – 1,5 % m/v; VI – 2,5 % m/v; VII – 3,5 % m/v; VIII – 5,0 % m/v.....	87
Figura 5.28. Cromatograma dos volumes injetados do CLAE do experimento 2 ($\lambda = 254$ nm). Áreas do picos e de concentração de NaOAc (% m/v) em função do tempo.	88

Lista de Tabelas

Tabela 2-1. Classificação das beta-lactamases, representam o maior desafio clínico, os beta-lactamases da serina (Baggaley et al., 1997).....	23
Tabela 2-2. Métodos cromatográficos para a purificação de produtos biológicos (adaptada de Blanch & Clark, 1997).	38
Tabela 3-1. Composição do meio Ágar nutriente para a E. coli ESS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas por microrganismos que em baixas concentrações combatem o crescimento de outros microrganismos patogênicos. Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de fungos filamentosos e bactérias do grupo actinomicetos (Madigan, 2004).

As enfermidades infecciosas tiveram influência de forma determinante na evolução da História do Homem e continuam sendo a principal causa da mortalidade no mundo. A partir da Segunda Guerra Mundial, centenas de agentes antimicrobianos foram descobertos e ao longo dos anos foram desenvolvidos compostos mais potentes, seguros e efetivos, não só contra bactérias, mas também contra vírus, fungos e parasitas.

Entretanto, os seres humanos na ambição de melhorar as condições de vida, modificaram o meio ambiente de tal forma que cada vez se torna mais fácil a instalação de microrganismos patogênicos, geralmente em comunidades vulneráveis. Como resultado, o uso indiscriminado dos antibióticos tornou-se um fator relevante para o crescente problema global relacionado ao avanço da resistência bacteriana aos antibióticos (Shinohara et al., 2004).

Devido a isso, iniciou-se a procura de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos por triagens a partir de fontes naturais, como fermentação de microrganismos e de extratos de plantas, que levou ao descobrimento de muitos compostos clinicamente usados no tratamento de doenças.

O primeiro antibiótico natural descoberto foi a penicilina por Alexander Flemming em 1928. A partir dos estudos sobre estafilococos descobriu-se, casualmente, a destruição de colônias de bactérias pela ação de um fungo o qual pertencia ao gênero *Penicillium*, do qual se deriva o nome penicilina, dando-se início a uma nova etapa na história da humanidade.

Este antibiótico beta-lactâmico continua sendo o mais importante composto depois de mais de 80 anos de uso e, assim como seus derivados, é usado contra agentes antibacterianos com poucos efeitos colaterais (Méndez et al., 1980).

No entanto, existe um grande número de patógenos capazes de produzir enzimas chamadas beta-lactamases, dentre os quais se destacam: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus vulgaris*. Essas enzimas degradam esses

antibióticos ao hidrolisar o anel beta-lactâmico, gerando uma substância inativa contra doenças.

Os compostos beta-lactâmicos são os mais importantes antibióticos para uso clínico como agentes antimicrobianos. O papel importante destes compostos é a toxicidade seletiva como inibidores da biogênese do peptidoglicano na parede celular bacteriana de organismos patogênicos. (Rodriguez et al., 2008).

Pelo menos 70 dos aproximadamente 100 antibióticos usados no tratamento de infecções humanas são derivados de substâncias produzidas pelo gênero *Streptomyces* (Prasad et al. 1999). As espécies do gênero *Streptomyces* são bactérias miceliais que crescem na terra com um ciclo de vida complexo, produzindo uma extraordinária diversidade de metabólitos secundários, biologicamente ativos, com significação médica e industrial (Harrison et al., 1971).

Durante as pesquisas na busca de novos antibióticos foram isolados de microrganismos capazes de produzir inibidores de beta-lactamases, dentre eles, o actinomiceto *Streptomyces clavuligerus* (Coleman et al., 1994). Culturas desse microrganismo produziram metabólitos secundários, tais como cefamicina C e penicilina N.

Uma interessante e especial propriedade das cefamicinas é sua excepcional resistência à degradação por beta-lactamases. A cefamicina C é importante no mercado mundial por ser matéria prima para a produção de antibióticos utilizados no tratamento de infecções. Outro composto de importância mundial é o ácido clavulânico que associado a outros beta-lactâmicos, como a ampicilina e amoxicilina, permitem que estes antibióticos recuperem sua eficácia e amplie o espectro de ação.

As cefamicinas isoladas no início da década de 70 pela Merck & Co Inc. e pela Eli Lilly & Co, pertencem a uma importante classe de compostos com atividade antibiótica de amplo espectro contra bactérias, incluindo um grande número de microrganismos resistentes a cefalosporinas e penicilinas. O crescente interesse das indústrias farmacêuticas pelos vários antibióticos beta-lactâmicos nas últimas décadas tem exigido o aperfeiçoamento dos métodos de produção através da modificação das características do processo de produção, linhagem microbiológica e das técnicas de separação e de purificação. A separação desses antibióticos, pode envolver vários métodos de extração e purificação que têm um importante papel no custo do processo (Ghosh et al., 1996).

A presente dissertação de mestrado buscou desenvolver um protocolo alternativo para purificar e separar compostos bioativos produzidos por *Streptomyces clavuligerus*.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho de dissertação foi, a partir de uma sequência de operações unitárias quais sejam: microfiltração, ultrafiltração e adsorção não específica de caldo de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* DMS 738, utilizar a adsorção por cromatografia de troca iônica para separar compostos com atividade biológica contra a bactéria *Escherichia coli* ESS. Para isso, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Isolamento e purificação, dos compostos presentes na solução obtida, aplicando-se a adsorção por troca iônica em coluna de leito fixo utilizando a resina QXL;
- Avaliação de diferentes eluentes na separação de compostos bioativos;
- Avaliação das características químicas dos compostos separados no processo de adsorção por troca iônica;
- Verificação da estabilidade dos compostos separados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibióticos

Em 1928, Alexander Fleming observou que o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* era inibido por colônias de fungos que haviam contaminado a placa de Petri. O fungo foi identificado como *Penicillium notatum*, e o componente ativo, posteriormente isolado, foi denominado como penicilina (Arnold et al., 1999). De início, a descoberta não despertou interesse até a eclosão da Segunda Guerra Mundial, em 1939. A partir dessa situação, com a finalidade de evitar perdas desnecessárias dos soldados, foram então ampliadas as pesquisas com relação à produção deste composto. Em 1940, um grupo de cientistas da Universidade de Oxford, chefiado por Howard Florey e Erns Chain, retomou as pesquisas de Fleming e conseguiram produzir penicilina para fins terapêuticos em escala industrial, inaugurando uma nova época para a medicina, denominada a era dos antibióticos.

Reações inibidoras similares entre colônias em meio sólido são comumente observadas em microbiologia e o mecanismo de inibição é conhecido como antibiose. Os antibióticos são relativamente difíceis de serem descobertos, e poucos possuem valor medicinal ou comercial, sendo produzidos principalmente por fungos filamentosos e por bactérias do grupo actinomicetos (Madigan, 2004), sendo estas bactérias gram-positivas e gram-negativas. Cerca de 60 % do total de antibióticos produzidos no mundo são antibióticos beta-lactâmicos (Ghosh et al., 1996).

Muitos antibióticos exibem efeitos colaterais tóxicos em seres vivos e o uso na área clínica requer que eles sejam monitorados com precisão em fluidos biológicos. Semelhantemente as determinações precisas de produção de antibióticos em caldos de fermentação microbianos é um aspecto crítico no processo industrial. No passado, os antibióticos eram monitorados em fluidos biológicos realizando-se várias diluições e medindo a ação inibitória em vitro. Tais técnicas de ensaio consomem tempo e não permitem a quantificação das perdas destes metabólitos ativos (Nilsson-Ehle et al., 1983).

2.2 *Streptomyces clavuligerus*

Os actinomicetos do gênero *Streptomyces* têm grande habilidade para produzir metabólitos secundários sendo responsáveis pela produção de mais de 80% dos antibióticos utilizados. Dentre este grupo, a espécie *Streptomyces clavuligerus* produz mais de 20 metabólitos secundários, incluindo muitos antibióticos beta-lactâmicos como cefamicina C, isopenicilina N, penicilina N, ácido clavulânico, deacetoxicefalosporina C e outros.

O *Streptomyces clavuligerus* (Coleman et al., 1994) é um grupo de bactérias que forma filamentos ramificados, com características de bactérias e fungos (Borém, 1998). Por tanto, é uma espécie da bactéria gram-positiva que foi primeiramente descrita por Higgens e Kastner (1971), ao isolar uma amostra de solo de América do Sul. O nome do actinomiceto refere-se à forma de sua esporulação com rolamento de extremidades em forma de ramos “clavula” e do sufixo “igerus”, sendo seus esporos cinza com tons esverdeados.

Segundo Coleman (1994) *Streptomyces clavuligerus* é uma espécie da bactéria Gram-positiva que foi primeiramente descrita por Higgens e Kastner (1971), ao isolar uma amostra de solo de América do Sul. O nome do actinomiceto refere-se à forma de sua esporulação com rolamento de extremidades em forma de ramos “clavula” e do sufixo “igerus”, sendo seus esporos cinza com tons esverdeados. Esta bactéria cresce em forma filamentos ramificados, e possui características de bactérias e fungos (Borém, 1998). Uma importante característica é que esta espécie não é capaz de assimilar glicose como fonte de carbono, pois não possui um sistema de transporte de glicose (Ives e Bushell, 1997). Além disso, possui todas as enzimas do ciclo de uréia, o que é incomum para um procarionte.

Em 1973, Brown detectou um potente efeito inibidor de um caldo de *Streptomyces clavuligerus*, do qual um composto foi isolado e identificado como ácido clavulânico, e sua molécula registrada em 1976. Alguns actinomicetos produtores de compostos beta-lactâmicos descritos na literatura são: *Streptomyces catleya*, *Streptomyces lactamdurans* (Kern et al., 1980); Inamine et al., (1976).

2.3 Antibióticos beta-lactâmicos

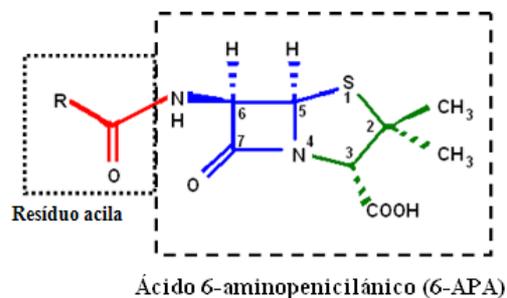
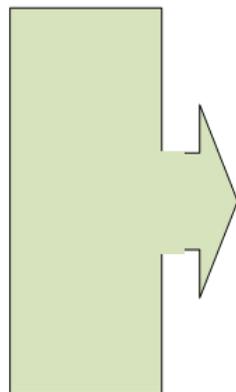
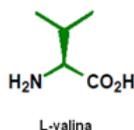
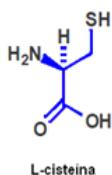
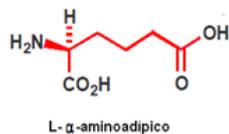
Os antibióticos beta-lactâmicos são peptídeos modificados que atuam como inibidores da biossíntese do peptidoglicano em bactérias procariontes, afetando a integridade da célula (Liras et al., 1999). São denominados beta-lactâmicos por apresentarem na sua

estrutura molecular um anel de mesmo nome e vem sendo utilizados como matéria-prima na produção via síntese química de antibióticos semi-sintéticos (Vandamme et al,1984).

Uma grande variedade destes compostos pertencentes à mesma família de moléculas foi descoberta nas últimas três décadas. (Liras et al., 2006). O grande sucesso dos beta-lactâmicos no tratamento de infecções é devido a sua alta eficiência e baixa toxicidade (Brakhage et al, 1998), sendo de grande interesse clínico. Qualquer alteração no anel beta-lactâmico destes compostos resulta na perda de atividade antibacteriana. Produzidos tanto por eucariontes como procariontes, a estrutura básica da maioria de compostos beta-lactâmicos é formada por três aminoácidos como precursores: ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), L-cisteína e L-valina, ligados entre si, e formando por ciclização a estrutura do anel beta-lactâmico. A estrutura da penicilina é formada pelo Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) mais um resíduo acila e a estrutura das cefalosporinas formada pelo Acido 7-aminocefalosporínico (7-ACA) (Figura 2.1).

• PENICILINAS

AMINOACIDOS
ESSENCIAIS



• CEFALOSPORINAS

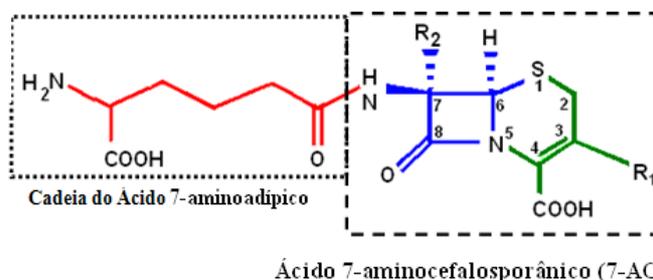


Figura 2.1. Penicilinas e cefalosporinas, geradas a partir dos aminoácidos essenciais. (O’ Sullivan et al., Jensen et al., e Demain et al.).

Os compostos beta-lactâmicos são geralmente de natureza aromática podem-se comportar como um ácido ou como uma base, pois o grupo amino presente na sua estrutura

em solução aquosa com um pH abaixo do ponto isoelétrico se comporta como um ácido, e o grupo carboxílico do anel beta-lactâmico se comporta como ânion em solução aquosa neutra, o que os torna compostos anfotéricos (Figura 2.2).



Figura 2.2. Características anfotéricas dos compostos beta-lactâmicos.

De acordo com a estrutura química, os antibióticos beta-lactâmicos podem ser classificados em cinco subclasses. Todos esses grupos, com exceção dos monobactâmicos, possuem um sistema de anéis bicíclicos. Segundo a estrutura as classes se dividem em penicilinas, cefalosporinas, clavams, carbapenems e monobactâmicos (O'Sullivan et al., 1980). No ano 2006 Liras e colaboradores separaram estes compostos em dois grupos majoritários: compostos beta-lactâmicos convencionais e não convencionais.

Os compostos convencionais são:

➤ Penicilinas

A estrutura deste composto consiste em um núcleo bi cíclico "penam" formado por um anel beta-lactâmico condensado a um anel de cinco membros que contém um átomo enxofre conhecido como tiazolidina (Figura 2.3). Ligado ao grupo amino na posição seis do núcleo há um grupo amino. O núcleo da penicilina também é chamado de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).

O arranjo bi cíclico de anéis é fundamental para a atividade, conferindo uma grande tensão ao sistema: quanto maior a tensão, maior a atividade e também a instabilidade.

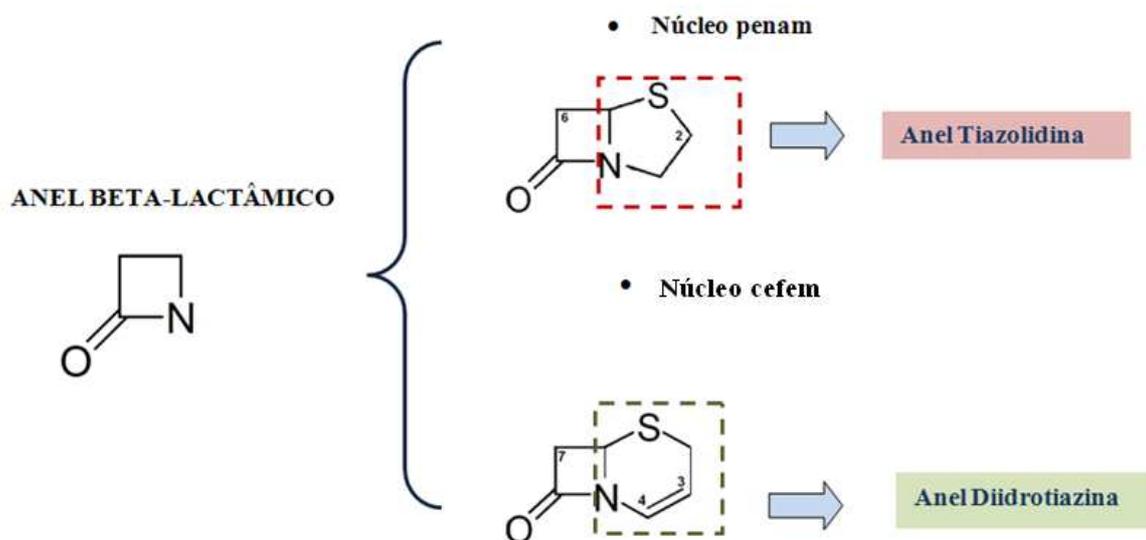


Figura 2.3. Estruturas principais das penicilinas e das cefalosporinas. O anel beta-lactâmico mais o anel tiazolidínico formam um núcleo penam, em penicilinas. O anel beta-lactâmico mais o anel diidrotiazina formam o núcleo cefem em cefalosporinas.

Uma modificação ou alteração vinculada na cadeia aminoácida, ligada ao carbono seis do anel beta-lactâmico (Figura 2.4) resulta em compostos com diferentes propriedades antibacterianas e farmacológicas. Existem quatro classes de penicilinas: penicilinas padrão, penicilinas antiestafilocócicas (ou penicilinas penicilase-resistentes, resistente à ação da penicilinase produzidas pelo *Staphylococcus aureus*), aminopenicilinas (administrável por via oral, ativas contra Gram-negativas: *E. coli*) e carboxipenicilinas (ativas contra *Pseudomonas aeruginosa* e menos ativas contra Gram-positivas).

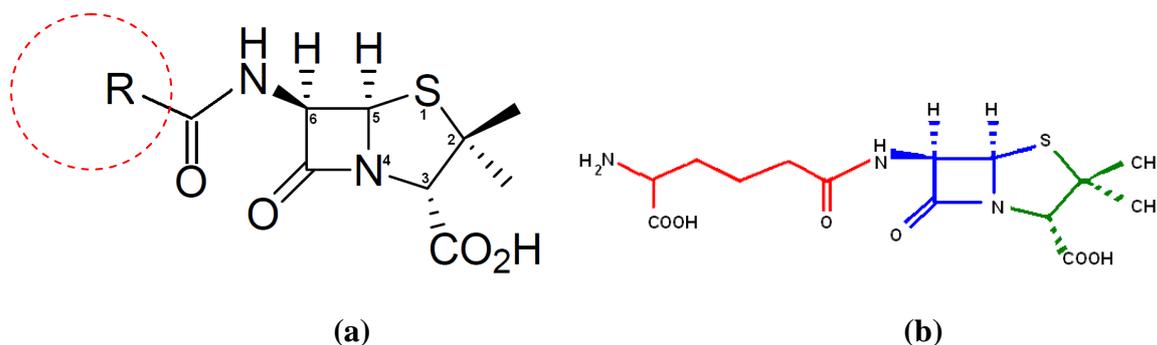


Figura 2.4. (a) Fórmula estrutural das penicilinas, (b) penicilina N apresenta uma cadeia aminoácida.

As penicilinas padrão são representadas pela penicilina G ou benzilpenicilina (Figura 2.5 (a)) e pela penicilina V (Figura 2.5 (b)). A penicilina G revolucionou o tratamento de uma grande variedade de infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, as

quais, até o momento, não possuíam tratamento. Este antibiótico exibe baixa absorção quando administrado por via oral, por ser inativado pelo suco gástrico no estômago.

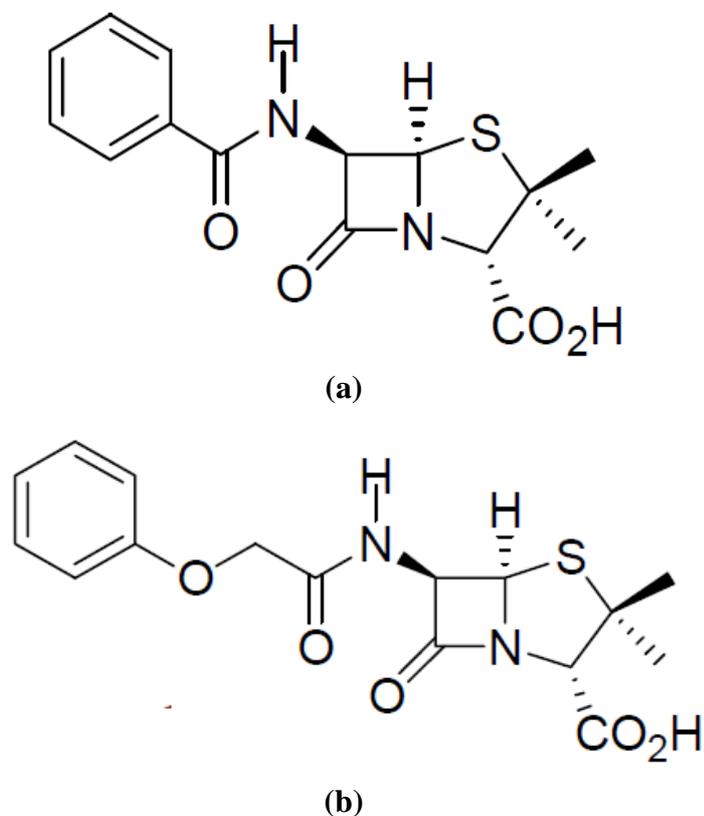


Figura 2.5. (a) Penicilina G e (b) Penicilina V.

Logo se aperfeiçoaram os métodos naturais de obtenção dos primeiros antibióticos, surgindo os antibióticos sintetizados no laboratório e, com isso, iniciou-se a fase industrial da produção de antibióticos. A penicilina V foi desenvolvida para suplantiar a desvantagem da benzilpenicilina. Existem outras penicilinas naturais ou intermediárias isoláveis como a isopenicilina N ou penicilina N.

➤ Cefalosporinas

As cefalosporinas são moléculas que contêm um núcleo “cefem” formado por um anel beta-lactâmico e um anel de seis membros, chamado dihidrotiazina. (Figura 2.3).

As cefalosporinas são produzidas por diferentes espécies de actinomicetos ou bactérias filamentosas e fungos, apresentando um modo de ação comum, como também precursores biossintéticos semelhantes (Aharonowitz et al., 1992).

Uma modificação das cefalosporinas dão lugar as cefamicinas. Apresenta-se na Figura 2.6 (a) a estrutura geral de uma cefalosporina. O núcleo principal de uma cefalosporina é chamado ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), e os diferentes grupos R1, R2 e R3 ligados à molécula produzem uma variedade de diferentes cefalosporinas. As modificações na posição sete do anel beta-lactâmico determinam o espectro antibacteriano, e a mudança na posição três do anel diidrotiazínico modificam a farmacocinética e o metabolismo do medicamento (Pumarola 1987).

A cefalosporina foi descoberta em 1949 e sua estrutura quimicamente caracterizada como cefalosporina C em 1955 (Figura 2.6 (b)) sendo originalmente, isolada do fungo *Cephalosporium acremonium* (Newton et al., 1955). Esta cefalosporina apresenta forte atividade contra certas bactérias Gram-negativas (Demain et al, 1999).

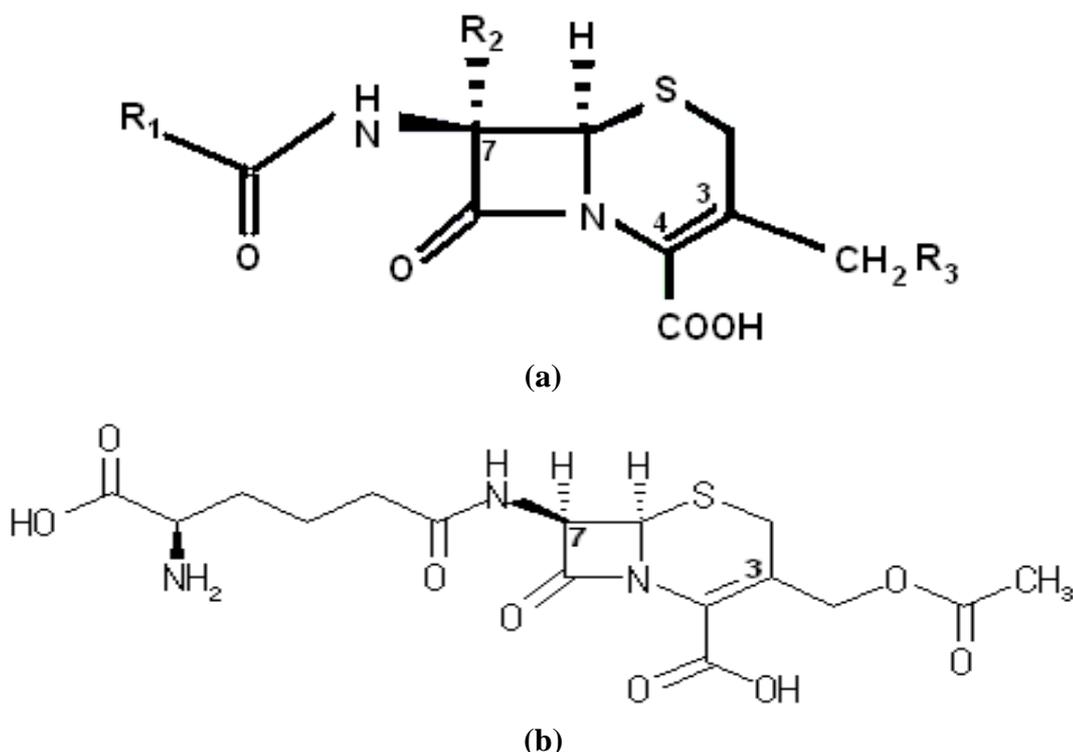


Figura 2.6. (a) Fórmula estrutural geral das cefalosporinas. (b) cefalosporina C.

Outras cefalosporinas como as cefabacinas são produzidas por bactérias Gram-negativas e freqüentemente apresentam um grupo formilo (-CHO) ligado ao carbono sete (Liras et al., 2006).

Além dos compostos beta-lactâmicos clássicos, muitas estruturas de compostos beta-lactâmicos não-convencionais foram descobertos e caracterizados desde 1970. Estes antibióticos também geram um grande interesse científico e industrial, e por isso os processos

produtivos, a rota biossintética e mecanismos genéticos envolvidos na biossíntese pelos microrganismos produtores estão sendo atualmente investigados. Como exemplo pode-se citar os carbapenems, as clavamas e os monolactâmicos. Devido à natureza do segundo anel, os precursores e a rota biossintética destes compostos são diferentes das clássicas penicilinas e cefalosporinas, o que sugere que esses compostos devem ter uma origem evolutiva diferente (Liras 2006).

➤ Carbapenems

Produzidos por diferentes gêneros de *Streptomyces* como a *Streptomyces cattleya* e *Streptomyces olivaceus* (O' Sullivan). Ligado ao anel beta-lactâmico está presente o anel penem. Este anel possui cinco membros e contém um átomo de carbono na posição um, substituindo o átomo de enxofre, comumente encontrado nos antibióticos beta-lactâmicos convencionais (Figura 2.7).

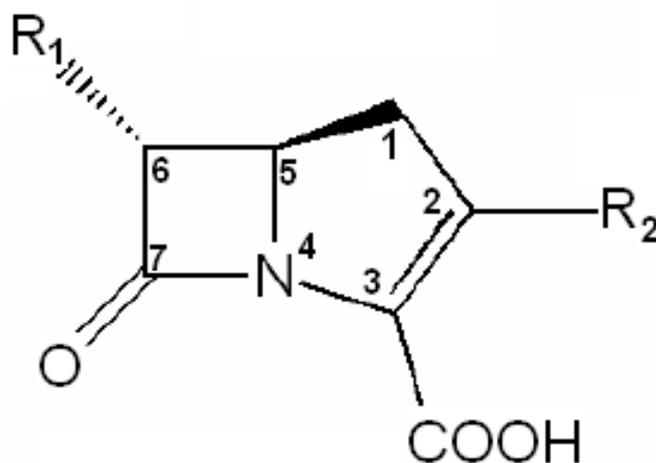


Figura 2.7. Fórmula estrutural dos carbapenems.

Os carbapenems possuem amplo espectro de ação, são estáveis frente à maioria das beta-lactamases e capazes de inibir a biossíntese de peptidoglicano, sendo a tienamicina um modelo de estrutura desta família.

De todos os antibióticos beta-lactâmicos, os carbapenems possuem o espectro de atividade mais amplo e por isso são utilizados no tratamento de infecções polimicrobianas, dispensando, assim, a utilização de dois ou mais antibióticos (Kropp et al., 1985). Existem dois carbapenems disponíveis: o imipenem e meropenem.

➤ Clavamas

As clavamas geralmente têm uma estrutura de anel bicíclico, sendo semelhante ao anel das penicilinas.

Na molécula do ácido clavulânico, produzido por *Streptomyces clavuligerus*, e em outras clavamas, o segundo anel é denominado oxazolidínico, que inclui oxigênio (Figura 2.8 (a)) em vez de um átomo do enxofre como ocorre em compostos beta-lactâmicos clássicos. Este composto é o mais conhecido inibidor das beta-lactamases bacterianas, sendo utilizado em conjunto com outros antibióticos como a amoxicilina, ampicilina e ticarcilina (Figura 2.8 (b) e (c)).

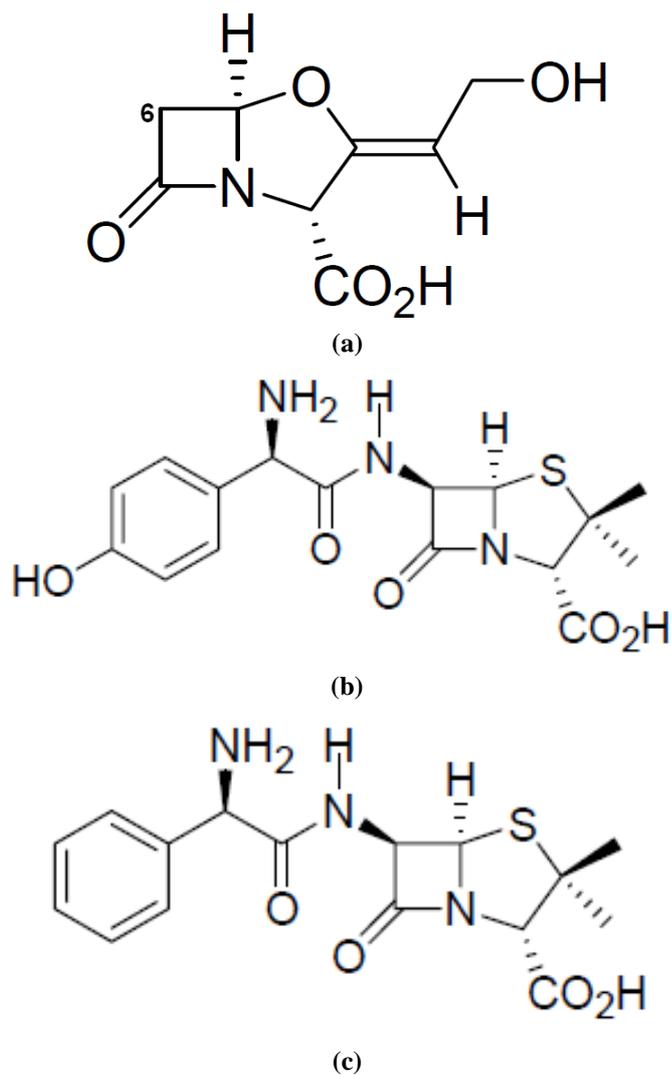


Figura 2.8. Fórmulas estruturais de: (a) ácido clavulânico. (b) Amoxicilina e (c) Ampicilina.

➤ Monobactâmicos

O nome monobactâmicos é a forma abreviada para beta-lactâmicos monocíclicos, e são produzidos principalmente pelas bactérias *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas acidophila*, *Acetobacter sp.* Os monobactâmicos consistem em um único anel beta-lactâmico, ligado ao grupo ácido sulfônico e diferentes cadeias laterais. O único monobactâmico disponível comercialmente é o Aztreonam, um monobactam sintético (Figura 2.9), ativo contra bacilos aeróbios Gram-negativos. Diferente de outros beta-lactâmicos, estes compostos não possuem nenhuma atividade contra bactérias Gram-positivas e tampouco contra organismos anaeróbicos. Podem ser utilizados em indivíduos com alergias a penicilinas e à cefalosporinas.

Outro monobactâmico, a Nocardicina, é produzida por actinomicetos como a *Nocardia uniformis* e *Flexibacter alginolyticus* (Aoki et al., 1976 e O'Sullivan et al.).

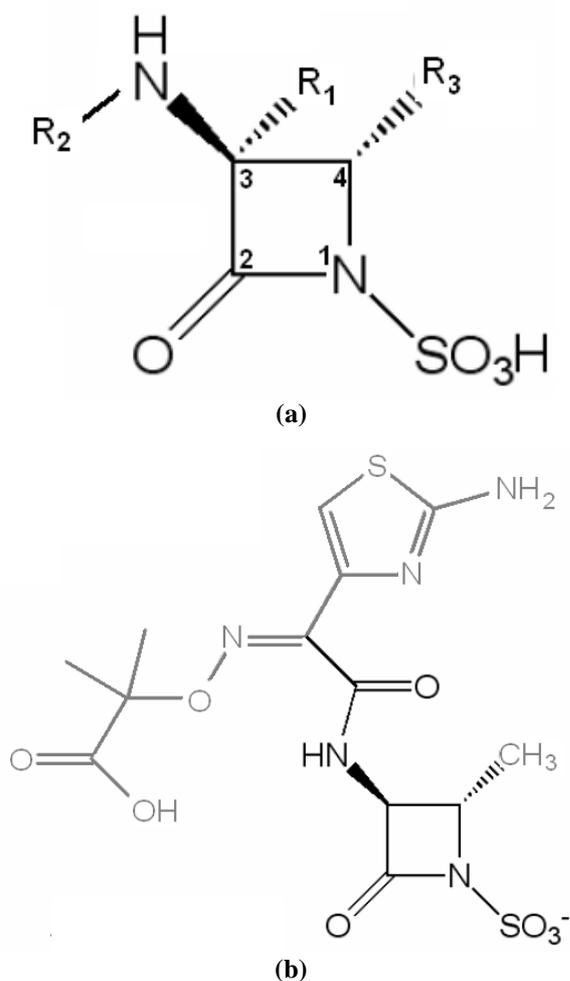


Figura 2.9. Fórmula estrutural de um (a) monobactama e do (b) aztreonam.

2.4 Beta-lactamases

As beta-lactamases denominadas inicialmente penicilinases, são enzimas potencialmente ativas contra diferentes antibióticos beta-lactâmicos, hidrolisando a ligação C-N do anel beta-lactâmico de penicilinas e cefalosporinas. Foram classificadas (Tabela 2-1) de acordo com a preferência pelo substrato, pelo mecanismo de ação e por outros parâmetros bioquímicos (Baggaley et al., 1997).

Tabela 2-1. Classificação das beta-lactamases, representam o maior desafio clínico, os beta-lactamases da serina (Baggaley et al., 1997).

CLASSES	BETA-LACTAMASES	SITIO ATIVO	AÇÃO	M.O Produtores
A	Penicilinases	Serina	Seletivas para penicilinas, a hidrólise do anel produz derivados de ácido penicilóico.	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
B	Metalo-enzimas	Metal (Zn)	Emprega um íon metálico de Zn ²⁺ ; o local ativo deles pode ser inibido por compostos quelantes. São de crescente importância.	<i>Bacillus cereus</i>
C	Cefalosporinases	Serina	Seletivas contra cefalosporinas, hidrolisando o anel.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>
D	Oxaciloinases	Serina	Representam o maior desafio clínico.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>

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

- A hidrólise enzimática do anel beta-lactâmico pela enzima beta-lactamase. É o mais importante dos três mecanismos e ocorre com os estafilococos, gonococos, enterobactérias e *Bacteróides fragilis*. Existem muitas beta-lactamases que diferem em termos de especificidade pelo substrato.
- O segundo mecanismo mais importante da resistência é a alteração dos sítios-alvo, denominados proteínas ligantes da penicilina (PBP). Alterações em uma proteína específica ligante das penicilinas constituem o principal mecanismo de resistência nos estafilococos.

- Um terceiro mecanismo de resistência consiste na permeabilidade reduzida das membranas celulares das bactérias Gram-negativas.
- Outras como a hiperprodução de beta-lactamases.

2.5 Reatividade de Anel Beta-lactâmico

A união (O=C-N) dos antibióticos beta-lactâmicos é uma amida excepcionalmente reativa. A carbonila da amida se comporta como uma cetona que possui alta sensibilidade a ataques nucleofílicos capazes de acilar uma diversidade destes reagentes nucleofílicos. É este o sítio, onde estes compostos são atacados pelas enzimas beta-lactamases.

A considerável tensão no anel de quatro membros parece ser a força impulsora da grande reatividade. O anel se abre e libera a tensão quando acila um nucleófilo. A abertura do anel beta-lactâmico é acompanhada pela perda total de atividade.

2.5.1 Hidrólise Enzimática

É amplamente aceito que a hidrólise enzimática dos compostos beta-lactâmicos é uma reação semelhante às primeiras etapas das reações de formação das acil-enzimas. A hidrólise das penicilinas, cefalosporinas e derivados inicia-se com o ataque nucleofílico sobre o carbono carbonílico do anel beta-lactâmico, com a seguinte formação de um intermédio tetraédrico, seguida da abertura do anel. Pode-se observar este mecanismo na

Figura 2.10.

2.5.2 Alterações dos Sítios Alvo ou Modificação dos Sítios de Ligação

Os antibióticos beta-lactâmicos se ligam a enzimas que participam da síntese da parede celular, chamadas PBPs (*Penicillin Binding Proteins*) ou Proteínas ligadoras de penicilina.

O objetivo dos antibióticos beta-lactâmicos é acilar as PBPs, o ataque nucleofílico sobre o anel beta-lactâmico é um modelo adequado desta reação enzimática, tratando-se de uma das reações mais estudadas, dentre as PBPs, encontram-se as transpeptidases. Atuando sobre estas enzimas a última etapa da síntese do peptidoglicano não

ocorre, impedindo a reação da transpeptidação. Isto é possível devido à semelhança estrutural entre compostos beta-lactâmicos e a D-alanina terminal da enzima.

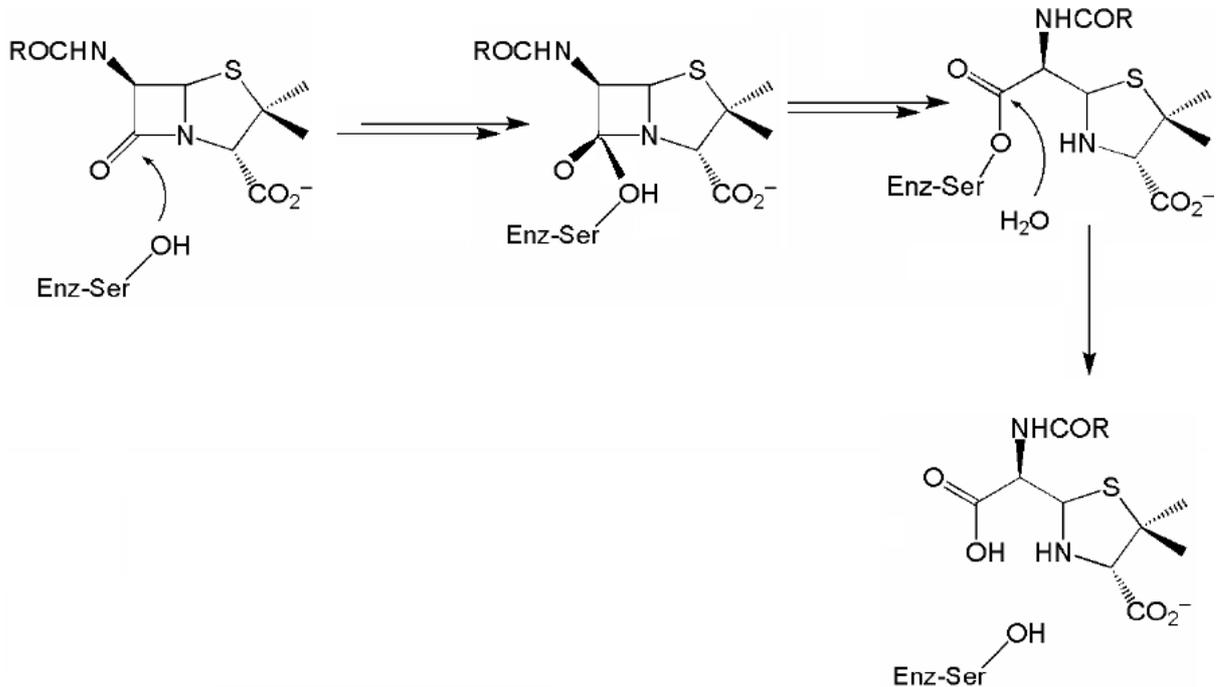


Figura 2.10. Hidrólise das penicilinas pela enzima beta-lactamase nucleófilo serina.

Na Figura 2.11 é mostrado como o grupo carbonila da amida do antibiótico beta-lactâmico acila um grupo amino da enzima que atua na síntese da parede celular. A enzima acilada fica inativa e conseqüentemente, a parede celular não se forma e a bactéria entra em ciclo lítico e morre.

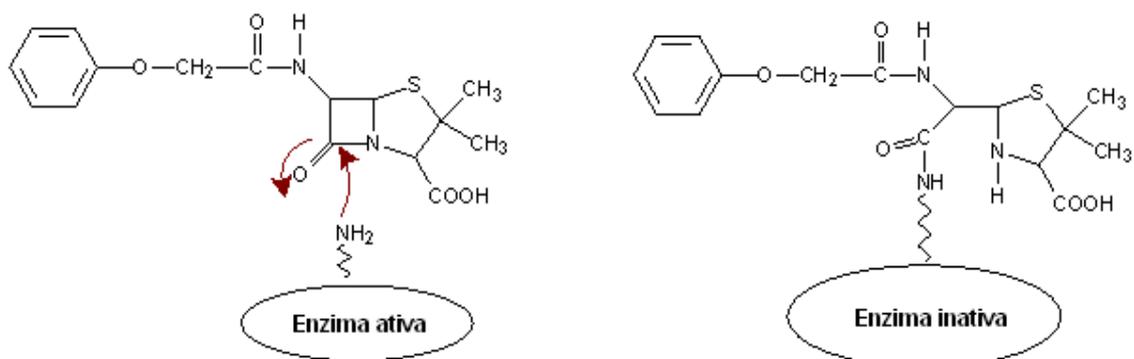


Figura 2.11. O grupo carbonila da amida do antibiótico beta-lactâmico acila um grupo amino da enzima.

2.6 Rota Biossintética

Compreender a biossíntese e genética molecular destes compostos tem sido um desafio para microbiologistas ao longo das últimas décadas. A expressão de agrupamentos de genes dos antibióticos é controlado por diferentes famílias de proteínas reguladoras. O estudo e compreensão da rota biossintética também é importante para a engenharia de processos de separação, uma vez que o conhecimento dos produtos provenientes da rota podem auxiliar na escolha das condições de operação.

Os mecanismos de regulação do metabolismo secundário em *Streptomyces* parece ser um processo complexo que opera a diferentes níveis. Existe um esquema geral (Figura 2.12) da rota biossintética das penicilinas e cefalosporinas, que foi elaborado a partir de dados obtidos de vários microrganismos produtores destes antibióticos. Nenhum microrganismo é capaz de realizar toda a série de reações mostradas, mas todos eles são capazes de realizar uma série de passos metabólicos iniciais até isopenicilina N, o intermediário comum para a formação da maior parte dos antibióticos beta-lactâmicos (Demain et al., 1982).

Dependendo do composto a ser sintetizado, são requeridos diferentes passos. Por exemplo, a biossíntese da penicilina requer passos simples, mas a biossíntese da cefalosporina C e cefamicina C requerem passos mais sofisticados (Santamarta et al., 2002).

No primeiro ciclo de reação da biossíntese, penicilinas e cefalosporinas têm os primeiros dois passos em comum. Os aminoácidos precursores ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), L-cisteína e L-valina são ativados com ATP e condensados, formando o tripeptídeo linear L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV). Este intermediário foi primeiramente encontrado em 1960 como um componente intracelular de *Penicillium chrysogenum* (Arnstein, 1960). A reação é catalisada por uma única enzima multifuncional, designada ACV sintetase (ACVS).

O tripéptídeo linear (ACV) é oxidado, fechando o anel, permitindo a formação da isopenicilina N (IPN). Este passo é realizado pela enzima chamada isopenicilina N isomerase ou ACV ciclase (Kern et al. 1980). A IPN é uma estrutura bicíclica que apresenta o anel beta-lactâmico, unido ao anel tiazolidina de cinco membros, anel bicíclico característico de todas as penicilinas.

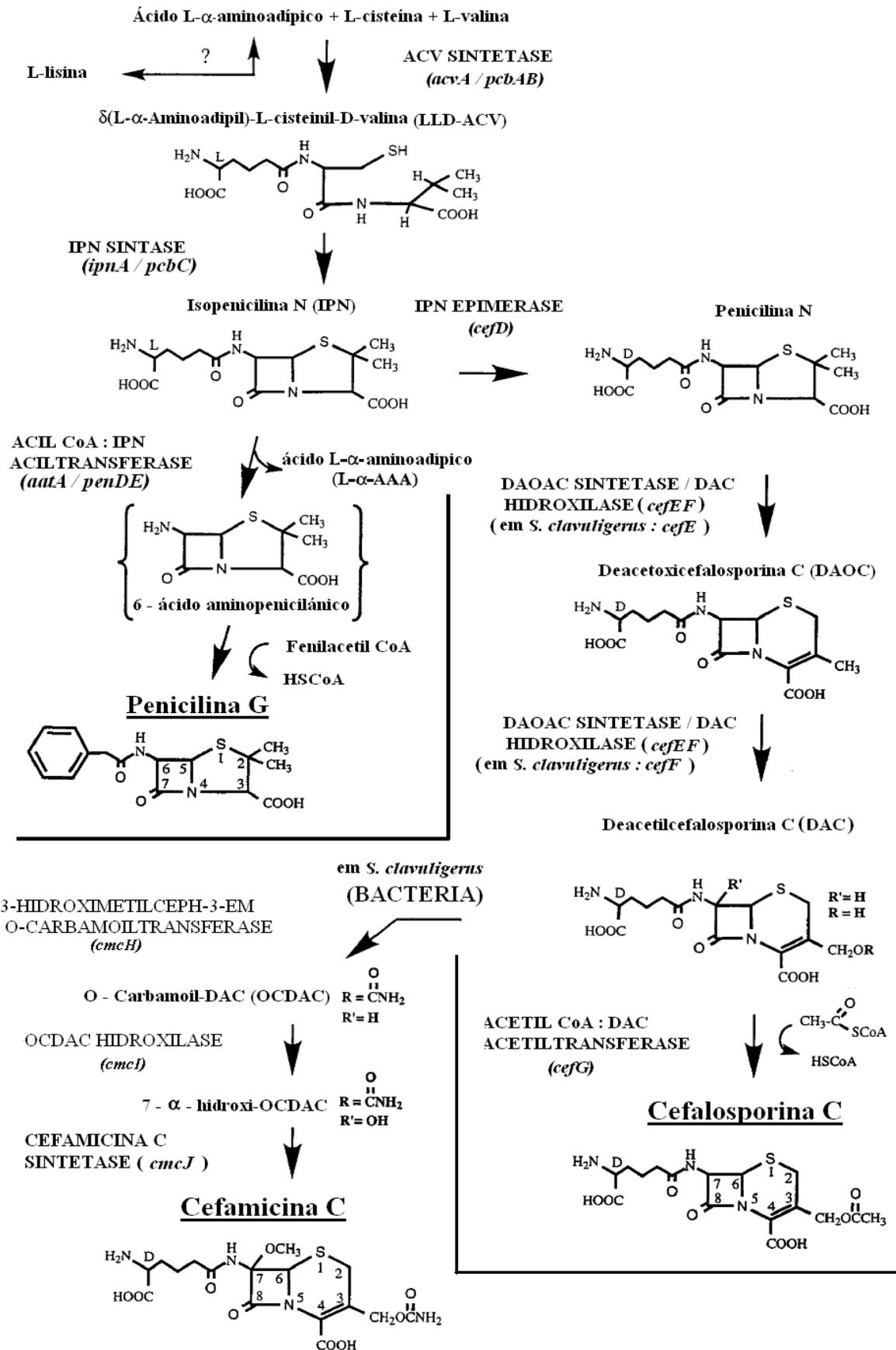


Figura 2.12. Biossíntese das penicilinas, cefalosporinas C e cefamicina C. Os nomes dos genes são mostrados em *itálico*, e os nomes das enzimas em letras maiúsculas (Brakhage, 1998).

A IPN possui atividade antibiótica fraca, e é o primeiro passo intermediário bioativo das penicilinas e cefalosporinas é dizer o precursor dos antibióticos contendo o núcleo penam. Na formação da penicilina G, a cadeia lateral L- α -aminoadipil da IPN é trocada por um grupo acil hidrofóbico (Queener et al., 1982). Já na biossíntese das cefamicinas e cefalosporinas, a IPN dá lugar à penicilina N, reação catalisada por uma enzima chamada IPN epimerase (IPNE). Depois, a penicilina N é convertida em deacetoxicefalosporina C (DAOC), mediante a expansão oxidativa do anel, em que o anel tiazolidina dá origem a um anel de seis membros, anel diidrotiazina, característico de todas as cepem. Esta reação é catalisada pela DAOC sintase (DAOCS), também chamada expandase. A DAOC é hidrolisada, ocorrendo a hidroxilação catalizada pela DAC hidrolase, formando a deacetilcefalosporina C (DAC).

Para biossíntese da cefalosporina C ocorre a acetilação da DAC por meio da enzima denominada DAC acetiltransferase ou cefalosporina C sintetase, estudada melhor no fungo *Acremonium chrysogenum*.

Já na biossíntese da cefamicina C, a DAC recebe um grupo carbamoil, formando a O-carbamoildeacetilcefalosporina C (OCDAC), passo catalisado por uma carbamoil transferase. Então, o C-7 é hidroxilado e na etapa final, o grupo hidroxila no C-7 é metilado para formar a cefamicina C (7-metoxicefalosporina C). A reação é catalisada pela enzima chamada cefamicina C sintetase.

Não se sabe quando ocorre a substituição no C-3, e que é justamente esta substituição que distingue as cefamicinas naturais das sintéticas.

Em 1980, Kern e colaboradores sugeriram que a expansão do anel é a etapa limitante na síntese da cefamicina C.

2.6.1 Cefamicina C

As cefamicinas (Fukase et al., 1975) são derivadas das cefalosporinas pela substituição do hidrogênio na posição 7 α do anel bicíclico, por um grupo metoxila (Figura 2.13).

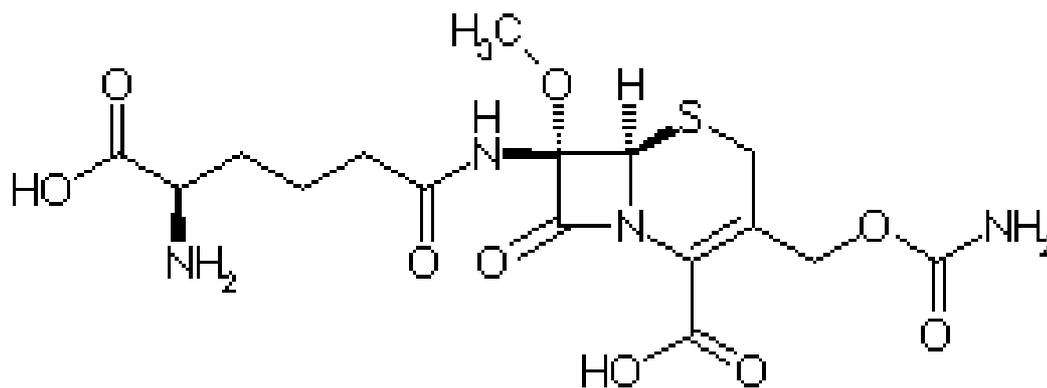


Figura 2.13. Fórmula estrutural da cefamicina C.

De esta forma, a cefamicina C, também chamada 7-metoxicefalosporina, é uma cefalosporina que apresenta dois grupos no carbono sete: uma cadeia aminoadipil, idêntica à da penicilina, e um grupo metoxila.

A descoberta da cefamicina C pela Merck, em inícios de 1970, conduziu ao desenvolvimento da pesquisa de cefalosporinas em procariontes. Este composto beta-lactâmico produzido por uma variedade de actinomicetos, bactérias filamentosas denominadas *Streptomyces clavuligerus* (Higgins et al., 1971). Além deste actinomiceto também foi estudado a produção destes antibióticos por *Streptomyces lipmanii* por Nágaraajan (1972) e por Stapley et al. (1972). Segundo a patente N^o4495348, é produzido por estirpes de *Streptomyces clavuligerus* e de *Streptomyces lactandurans* em meio de cultura com nutrientes em condições aeróbias.

Historicamente, a primeira característica identificada da cefamicina C foi como inibidor de síntese de parede celular (Daust et al., 1973). Foram obtidos três tipos de cefamicinas: A, B, e C, sendo as cefamicinas A e B antibióticos menos potentes que a cefamicina C. Este último mostra uma atividade antibacteriana de amplo espectro (Stapley et al., 1972).

Descobriu-se que a presença do grupo 7 α metoxila sobre o anel beta-lactâmico torna um antibiótico mais ativo contra microrganismos Gram-negativos e patógenos anaeróbios, e mais resistentes contra a hidrólise pela maioria das enzimas beta-lactamases (Stapley et al., 1979). Este grupo atua como estabilizador da estrutura do anel beta-lactâmico, reduzindo a sensibilidade às beta-lactamases (Omstead et al., 1985).

A pesar do seu amplo espectro de atuação, ela não é ativa contra microrganismos Gram-positivos. Este composto não é usado clinicamente, mas é empregado como matéria-prima para a síntese de muitos medicamentos. A modificação química da

molécula proporcionou um aumento no espectro de atividade antibiótica. A troca da cadeia lateral aminoadipil na posição 7 β da cefamicina por um grupo tienilacetil proporcionou o efeito desejado, o que resultou no composto semi-sintético beta-lactâmico Cefoxitin. O Cefoxitin, produzido pela Merck & Co In., é amplamente usado no tratamento de infecções e na prevenção de infecções pós-operatórias por bactérias resistentes à penicilina. O Cefminox é também um composto derivado da cefamicina C e é considerado um antibiótico de terceira geração. Foi obtido por uma modificação na posição 7 β e uma metoxilação da posição 7 α por Iwamatsu et al. (1983), no Japão. Este composto é mais ativo que outras cefamicinas contra enterobactérias e *Bacteróides fragilis*, exibindo propriedades farmacocinéticas favoráveis. Contudo, muitas dificuldades são encontradas no processo químico da 7 α -metoxilação (Kim et al.,2000). As estruturas químicas destes compostos são apresentadas na Figura 2.14

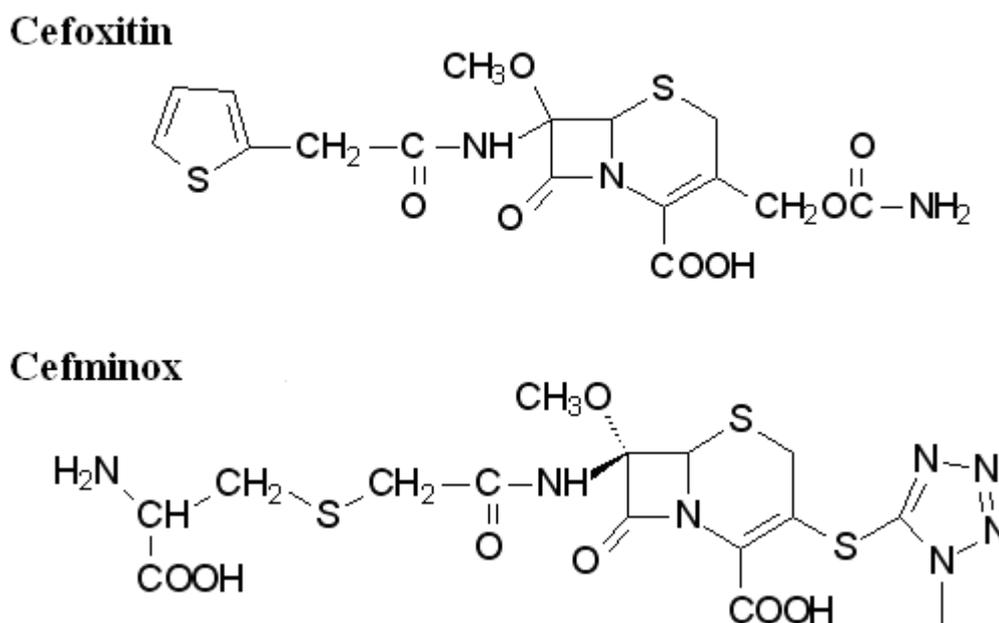


Figura 2.14. Derivados da cefamicina C: Cefoxitin e Cefminox.

Outros derivados da cefamicina C são: Mefoxitin, Mefoxin e Foxtil.

A cefamicina C, devido a sua natureza, apresenta um comportamento anfotérico, com um ponto isoeletrico pH= 3,5.

2.6.2 Penicilina N

Em 1962, Miller e colaboradores observaram que *Streptomyces sp* eram capazes de produzir penicilina N. Este composto foi chamado inicialmente de cefalosporina N

e apresentava atividade contra Gram-negativos. Mais tarde, demonstrou-se que se tratava de uma penicilina com uma cadeia lateral aminocarboxibutilo, sendo logo renomeada como penicilina N (Figura 2.15). Este composto se mostrou como um estimulador da produção de cefalosporinas segundo a rota de biossintética (Kosaka e Demain, 1976).

A penicilina N faz parte da rota biossintética no processo de formação de cefalosporina C e cefamicina C.

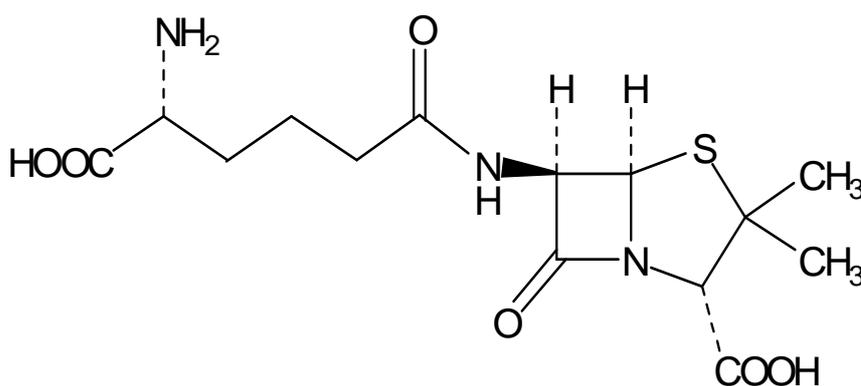


Figura 2.15. Estrutura da penicilina N ou ácido aminodesacetoxicefalosporânico amino penicilina.

A enzima isopenicilina epimerase é responsável pela conversão da isopenicilina N em penicilina N (Jensen et al., 1993). Segundo a Patente 6642020, até o momento não se obteve uma melhoria genética com a finalidade de incrementar a produção da penicilina N, dado ao baixo valor comercial. Algumas características que desestimulam o avanço nas pesquisas deste composto são:

- a) Baixa atividade antimicrobiana frente às penicilinas hidrofóbicas (G ou V), penicilinas semi-sintéticas e cefalosporinas.
- b) Baixa utilidade como composto intermediário na preparação de 6-APA, devido a sua reduzida estabilidade, assim como suas propriedades físico-químicas de solubilidade e ácido-bacisidade que complicam enormemente seu isolamento.
- c) A impossibilidade de eliminar sua cadeia lateral com as acilases da penicilina G ou V convencionais.

2.7 Processos de Separação e Purificação

Existem muitos problemas na análise dos compostos beta-lactâmicos em meios de fermentação complexos. Entre eles, pode-se citar: (i) a seletividade de um determinado

ensaio químico é insuficiente para determinar um único composto beta-lactâmico, devido à presença de uma mistura destes compostos. (ii) os procedimentos de ensaio envolvem reações químicas que não são seletivas apenas para os compostos beta-lactâmicos, assim, os outros constituintes do caldo podem contribuir no resultado atuando como interferentes, tornando-se difícil a separação, e mais ainda sua purificação.

No processo de separação e purificação de antibióticos a partir de caldos de fermentação são requeridos uma série de operações unitárias com uma seqüência bem definida para que o processo seja eficiente.

Lee e seus colaboradores em 1997, relatam um processo de separação e purificação de cefalosporina C que envolve uma série de etapas, tais como filtração e centrifugação para separação de células, e técnicas de extração por solvente e/ou adsorção, para posterior purificação por troca iônica do antibiótico.

A maior parte dos processos de bioseparação consiste em quatro passos básicos que ocorrem seqüencialmente (Ward, 1991), descritos a seguir.

a. **Remoção de insolúveis:** os processos mais utilizados são a filtração (microfiltração e ultrafiltração) e/ou centrifugação. Nessa etapa não ocorre grande concentração do produto nem grande melhora na sua qualidade, porém ocorre o descarte de células se o produto for extracelular ou a recuperação das mesmas se o produto for intracelular ou a própria célula.

b. **Isolamento de produto:** denominado de isolamento primário, remove produtos com propriedades não comuns comparado com o produto desejado, com aumento significativo da concentração. As principais operações são: extração com solvente ou duas fases aquosas e adsorção.

c. **Purificação:** nesta etapa ocorre alta concentração do produto. São utilizadas técnicas de cromatografia, eletroforeses, adsorção e precipitação altamente seletivas para o produto, ocorrendo a remoção de impurezas com funcionalidade química e propriedades físicas semelhantes ao produto.

d. **Refinamento:** denominado isolamento final do produto. São utilizados processos como cristalização, centrifugação e secagem (atomização, liofilização ou remoção por solvente orgânico) são etapas que podem ser usadas para a obtenção do produto seco.

Evidentemente essas etapas serão empregadas de acordo com o tipo de produto, concentração e pureza desejada, dependendo da forma em que o produto será comercializado no mercado. O uso final do produto indica o método a ser utilizado.

O custo da produção depende grandemente da separação e purificação do produto dos caldos de fermentação, constituídos de muitos subprodutos como também outras matérias-primas que podem ser reaproveitadas (Lee et al., 1997). Assim a obtenção de produtos de qualidade numa linha de produção econômica tem promovido o desenvolvimento de alternativas e aperfeiçoamento de processos de extração e purificação.

Separação por Membrana

A maioria dos antibióticos beta-lactâmicos se acumula fora das células, portanto, o primeiro passo de separação é a remoção destas células, utilizando-se a filtração, que é uma técnica de separação empregando membranas.

A complexidade do caldo dificulta a filtração, devido à presença de espécies orgânicas (ex. carboidratos) que reduzem a velocidade de filtração.

Outros aspectos que contribuem para a dificuldade desta etapa do processo são:

a) Sólidos finamente dispersos, especialmente aqueles que formam tortas compressíveis, que apresentam densidade próxima à da água, que promovem uma solução com alta viscosidade ou com característica gelatinosa. Isso foi observado em caldos de fermentação aumenta a densidade da superfície das membranas (Ana I. Cavaco Morão, et al. 2006).

b) Compostos de baixa massa molar, compostos orgânicos não voláteis, compostos orgânicos farmacêuticos que podem ser sensíveis ao tratamento físico-químico convencional, sais dissolvidos.

Devido ao grande avanço desta técnica, este processo de filtração industrial mostra uma alta eficiência para a separação de partículas em suspensão.

Os processos de filtração são classificados de acordo com o tamanho do poro da membrana utilizada, como descrito a seguir:

- Microfiltração (MF): separação de partículas com tamanho entre 0,2 a 10 μm
- Ultrafiltração (UF): separação de partículas e soluções poliméricas com tamanho de 1-21 nm.

- Nanofiltração (NF): separação de colóides e moléculas de baixa massa molecular com tamanho de 1-10 nm.
- Osmose Reversa (OR): para separação de solutos iônicos tipicamente menores que 1,1 nm.

Desses três tipos, a microfiltração e a ultrafiltração podem ser amplamente aplicadas numa primeira etapa de clarificação ou recuperação em produtos de fermentação.

Microfiltração

A microfiltração é utilizada para remover partículas suspensas presentes em um caldo de fermentação. É empregada tanto na recuperação de produtos biotecnológicos e como na indústria de alimentos. Embora sejam baseados em diferentes mecanismos, pode-se dizer que a operação de centrifugação tem a mesma função da microfiltração. Na prática, ambas as técnicas podem ser utilizadas, sendo que a escolha deve ser feita em termos da eficiência da separação, que é baseada no tamanho da partícula a ser separada.

Usualmente essas membranas podem ser de acetato de celulose, cerâmicas, de polivinil, polipropileno ou politetrafluoretileno.

Esta técnica apresenta diversas aplicações:

- Remoção de sólidos suspensos.
- Clarificação de soro de queijo.
- Desengordurar e reduzir a carga microbiana de leite.
- Clarificação de vinho e cerveja e sucos.
- Remoção de partículas e pigmentos da indústria de açúcar.

Ultrafiltração

A ultrafiltração é utilizada para separar moléculas de tamanhos menores que na microfiltração, bem como promover o aumento da concentração dos solutos de interesse em solução.

As membranas podem ser poliácridonitrila e polisulfona, além das citadas para a MF.

Suas aplicações são:

- Ultrafiltração com diafiltração desenvolvido por Nabais e Cardoso (1995). Na recuperação de ácido clavulânico e da retenção de proteínas solúveis, substâncias coloridas e outras impurezas;
- Recuperação de proteínas na indústria de carnes;
- Fracionamento de leite na manufatura de queijo;
- Concentração de gelatina;
- Recuperação de amido.

Filtração tangencial ou Filtração por fluxo cruzado

Refere-se à forma de escoamento da solução em relação à parede da membrana e ao permeado. A solução passa tangencialmente à superfície da membrana e, devido à permeabilidade desta membrana, o permeado escoar perpendicularmente à direção do fluxo da solução que entra no sistema.

A concepção deste tipo de filtração é baseada na intenção de fornecer tensão suficiente na superfície da membrana, mantendo assim os sólidos e outras partículas retidas na superfície da membrana, em que se atinge um valor máximo para a espessura de material acumulado que é chamado de torta.

Geralmente um filtro tangencial é utilizado para reter partículas entre 0,1 e 10 μm . Os filtros tangenciais permitem apenas a formação de uma torta sobre a membrana filtrante que não bloqueie totalmente o filtro, podendo operar durante longos períodos de tempo (Blanch, et al., 1997).

2.8 Processo de Adsorção

Depois da filtração, uma das etapas mais críticas envolvidas na análise de misturas presentes em matrizes complexas consiste na extração e isolamento dos analitos de interesse, de forma a efetuar sua determinação qualitativa e quantitativa através de uma determinada técnica analítica adequada.

A extração visa à remoção dos analitos da matriz, enquanto que a etapa de isolamento focaliza-se na eliminação de interferentes. No processo de recuperação de antibióticos se destaca as técnicas de adsorção, sendo usadas na separação e na purificação destes.

O emprego da adsorção em coluna ou também chamado adsorção em cromatografia é uma técnica de separação líquido-sólido, e indicado para extração e purificação de vários produtos, como por exemplo, os compostos hidrofílicos (Voser, 1982).

Este método fundamenta-se nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão na forma mais simples e conhecida, empregando-se uma coluna aberta a qual contém a fase sólida denominada fase estacionária (adsorvente). (Figura 2.16).

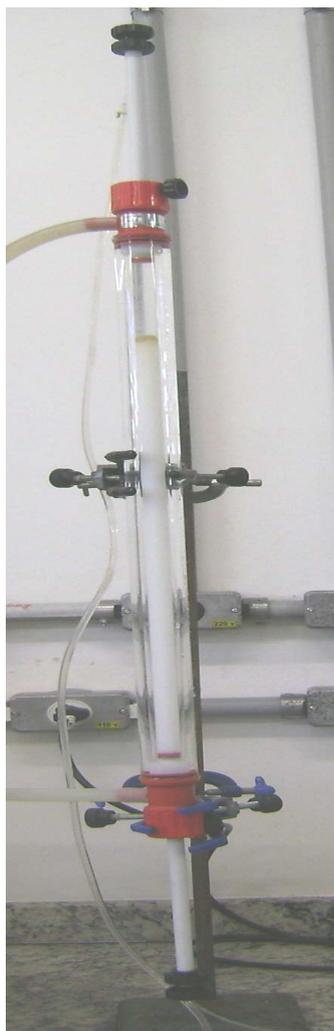


Figura 2.16. . Fotografia de uma coluna de leito fixo, coluna preenchida com material adsorbente.

O princípio desta técnica consiste na existência da interação entre os diversos constituintes da mistura com a fase estacionária. Os processos de separação empregando adsorventes de leito fixo normalmente consistem em três passos: adsorção, dessorção (ou regeneração) e lavagem.

Em processos biotecnológicos, o processo de adsorção em leito fixo é o mais comumente utilizado na indústria (Ward, 1991). Na coluna de leito fixo, a maior parte do

soluto é adsorvida, assim sua concentração no efluente deve ser zero. Na continuação do processo a concentração do soluto no efluente aumenta lentamente no início e depois abruptamente. Neste momento o fluxo de alimentação deve ser desligado e o material adsorvido é então eluído pela lavagem do leito com solvente apropriado.

Deve-se ter em conta também a influência do pH. Muitos componentes bioquímicos possuem carga em um pH específico e podem ser separados mediante a cromatografia troca iônica, na qual o grau de retenção pode ser controlada pelo pH da fase móvel.

2.8.1 Tipos de Adsorção

A Tabela 2-1 apresenta um resumo dos mecanismos e do tipo de adsorção aplicada aos processos biotecnológicos.

Adsorventes

Geralmente, para o desenvolvimento de um processo de adsorção deve-se procurar um adsorvente adequado à separação desejada, o que inclui estudos de capacidade de adsorção, seletividade, reutilização e estabilidade química e mecânica do material que se pretende utilizar. Algumas matrizes poliméricas usadas no processamento de antibióticos são compostas de poliestireno de divinilbenzeno, assim como as resinas poliméricas não iônicas, carbono ativado são propostas como adsorventes para isolamento de produtos hidrofílicos.

Novos adsorventes foram desenvolvidos recentemente para oferecer força mecânica necessária à adsorção, além de serem providos de altas áreas superficiais e tamanhos de poros apropriados para um rápido transporte (Belter, 1985).

Um processo alternativo para evitar o uso de solventes consiste em utilizar técnicas de cromatografia por adsorção com adsorventes não iônicos ou iônicos. Uma delas é a adsorção em resina de troca iônica, que envolve atração eletrostática dos compostos iônicos aos sítios de carga oposta na superfície do adsorvente (Barboza et al., 2002).

Para as resinas de troca iônica são fixados grupos iônicos por uma ou mais reações químicas. Os trocadores iônicos classificam-se em: (i) aniônicos, que trocam anions e, portanto, têm grupos funcionais positivos ligados à matriz como, por exemplo, sal de amônio quaternário. A apresentação desses tipos de trocadores pode ser observada na Figura 2.17. e; (ii) catiônicos que trocam cátions e apresentam grupos funcionais negativos ligados à matriz.

Tabela 2-2. Métodos cromatográficos para a purificação de produtos biológicos (adaptada de Blanch & Clark, 1997).

MECANISMO DE SEPARAÇÃO	TIPO DE CROMATOGRAFIA	CARACTERÍSTICAS	APLICAÇÃO
Interações de Van der Waals	Interação hidrofóbica	<ul style="list-style-type: none"> •Boa resolução •Boa capacidade •Velocidade alta 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicado em qualquer estágio, quando a força iônica é elevada (após troca iônica ou precipitação salina). • Possibilidade de alguma desnaturação. • Pode envolver solventes orgânicos durante a eluição.
Tamanho e forma ou adsorção específica	Filtração em gel	<ul style="list-style-type: none"> •Resolução moderada para fracionamento •Bom para troca de tampão e dessalinização. •Capacidade relativamente baixa, mas é possível altas vazões com alguns tipos de empacotamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fracionamento é melhor para os últimos estágios de purificação quando a alimentação é menor. • O tampão pode ser trocado em qualquer momento.
Carga	Troca iônica	<ul style="list-style-type: none"> •A resolução pode ser alta •Capacidade é elevada •Velocidade pode ser alta dependendo da matriz 	<ul style="list-style-type: none"> • Método mais utilizado. • Mais efetivo nos estágios iniciais, para volumes grandes. • Pode ser usado em modo batelada.
Afinidade biológica	Afinidade	<ul style="list-style-type: none"> •Seletividade pode ser alta. •Capacidade pode ser alta dependendo do ligante. •Alta velocidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Usado em qualquer estágio, mas os materiais são caros.
Adsorção por reação	Interação química	<ul style="list-style-type: none"> •Velocidade alta •Geralmente é necessária uma energia de ativação. •Frequentemente um processo irreversível. 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizado em qualquer estágio.

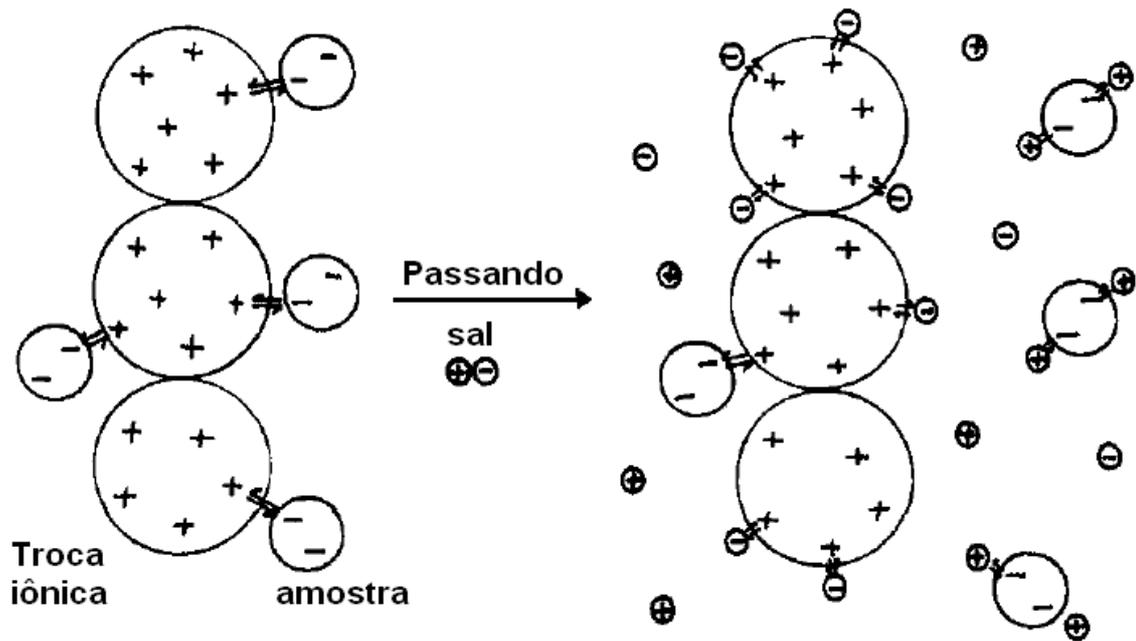


Figura 2.17. Esquema do processo de troca aniônica. Representação do equilíbrio dinâmico da troca aniônica entre a fase estacionária e os íons da fase móvel (A. Fallon et al.,1990).

Empacotamento na Coluna

O empacotamento da coluna é o coração desse tipo de sistema e reflete claramente a eficiência do processo. O tipo de partícula, forma e distribuição dentro da coluna que será empregada para realizar o empacotamento também influenciam na eficiência.

Existem relatos de diferentes técnicas de empacotamento, como por exemplo as técnicas de Unger e Messe (1978). Existem também colunas comerciais já empacotadas.

2.9 Processo de Separação e Purificação da Cefamicina C

Várias etapas de purificação para se isolar o antibiótico desejado a partir do caldo seguem a remoção das células, seguidas de outras etapas, tais como cromatografia de troca iônica, adsorção, extração por solventes, até mesmo a técnica de cristalização, podem ser utilizadas em combinação para se purificar estes antibióticos (Omstead et al., 1985).

O objetivo principal na escolha da melhor estratégia de purificação é obter um máximo rendimento com máxima pureza, e minimizar os custos. Para isso é necessário reduzir ao mínimo o número de etapas envolvidas (Harris e Angal, 1995). Um problema que se apresenta é a quantidade de antibióticos beta-lactâmicos presentes nos caldos de fermentação, representando uma pequena fração do total dos compostos presentes.

No processo de purificação de antibióticos, se o composto for solúvel em solventes orgânicos, o processo de purificação torna-se relativamente simples. Quando não é solúvel em solventes, este deverá ser removido do líquido de fermentação por meio de adsorção, troca iônica ou precipitação química.

Vários autores em patentes descrevem processos de recuperação e purificação da cefamicina C. A Merck & Co patenteou os processos de purificação da cefamicina C e o produz por fermentação utilizando a linhagem *Nocardia lactamdurans* (Schubert, 1980). Schubert descreveu nesta patente o processo de reciclagem eficiente que gera a cefamicina C pura e com alto grau de rendimento. Neste processo, o caldo fermentativo tem seu pH ajustado para um valor entre 1,8 - 2,5 e em seguida é submetido a uma filtração. O filtrado obtido é passado por uma coluna de resina de troca catiônica e a coluna é lavada com água. A coluna catiônica é então parcialmente eluída com solução de NaCl 10% (m/v). O material coletado tem seu pH ajustado para 7, o qual é então repassado pela coluna. Para que diminua a degradação química em pH 7 abaixa-se a temperatura no processo de purificação.

Este procedimento deve ser repetido de 10-15 vezes. A eficiência deste processo é maior em relação ao processo de adsorção em carvão ativo e ao processo de troca iônica seqüencial (Pines et al., 1973).

Outras propostas para o isolamento das cefamicinas A, B e C são esquematizadas nas Figuras 2.18 e 2.19.

Miller et al., (1972) descreveram o isolamento utilizado para a separação das cefamicinas A e B, (Figura 2.19). Um caldo fermentado que contém cefamicinas A e B é acidificado para obter uma máxima estabilidade dos antibióticos. O caldo é filtrado e 4000 litros deste filtrado, contendo aproximadamente 80 µg de cefamicina /mL, é passado através de um empacotamento de 380 litros de Amberlite XAD-2. A resina empacotada é lavada com água e eluída com 60% de metanol. 800 mL do eluente enriquecido são concentrados até 160 L em um pH 3,5 ajustado com amônio. 80 L são diluídos em 120 L e adsorvidos em Amberlite IRA-68 sobre um ciclo de cloreto. A eluição foi feita com uma solução de 200 L de 1 M de NaNO₃ e 0,1 M de acetato de sódio em um pH 7,5. O eluente é ajustado a um pH 3,0 e adsorvido em 45 L da Amberlite XAD-2, para separar o produto dos sais. A coluna é lavada com água e eluída com 320 L de acetona 25 %. Do eluente concentrado obtém-se um volume de 17,4 L, o pH ajustado para 4.0. Com este processo obteve-se um rendimento de 620 g de cefamicina, com aproximadamente com 13 % de pureza.

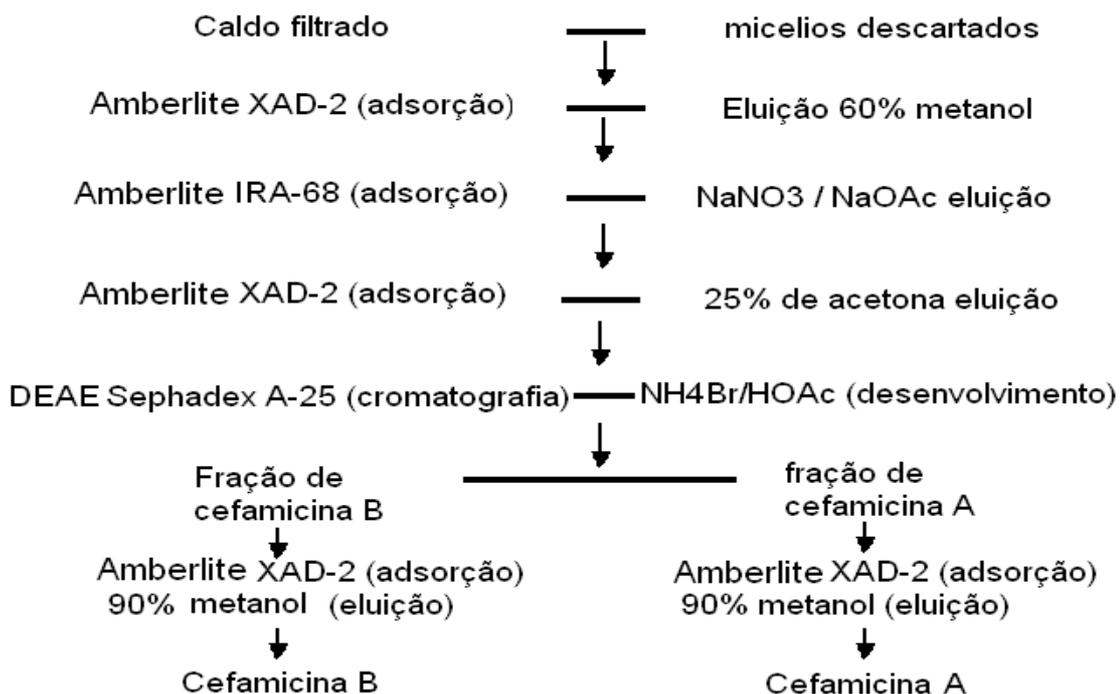


Figura 2.18. Isolamento de cefamicinas A e B (Miller et al., 1972).

Uma quantidade de 10 g do produto do passo anterior foi dissolvido em 18 mL de tampão (brometo de amônio/ ácido acético) e aplicado sobre a coluna Sephadex A-25, com uma vazão de 80 mL/h. O refratômetro mostrou 5 picos separados, e o bioensaio das frações mostraram que dois desses picos são bioativos. As frações 80-133 foram combinadas para recuperar cefamicina B e as frações 170-230 foram combinadas para recuperar cefamicina A.

A cromatografia foi repetida com outra porção de 10 g com resultados similares. As duas porções que continham cefamicina B foram combinadas e adsorvidas sobre 100 mL de Amberlite XAD-2 e eluídas com 300 mL de metanol a 90 %. O metanol foi removido do concentrado aquoso mediante evaporação, obtendo-se finalmente um rendimento de 810 mg de cefamicina B. O mesmo procedimento é feito para cefamicina A, obtendo-se um rendimento de 720 mg.

Os métodos de purificação de cefamicina C são mostrados na Figura 2.19. O caldo fermentado contendo cefamicina C é filtrado, e um volume de 800 L do filtrado contendo 3,5 µg/mL do antibiótico é adsorvido em 27 L de resina Dowex 1x2 no ciclo cloreto. Obtendo-se eluições com 5% de uma solução de NaCl e são coletadas frações de 19 L. As frações 2 e 3 que contêm 56% de atividade são combinadas o pH ajustado 2,0 com HCl e adsorvido sobre 27 L de resina Dowex 50x2. A eluição feita com 2% de piridina, e 4 frações de 18 L são coletadas. As análises das frações indicaram um rendimento de 43% a partir do

caldo filtrado. Quatro frações de 8 L contendo 24% de atividade são combinados, neutralizados com NaOH e concentrados a 100 mL.



Figura 2.19. Isolamento da cefamicina C.

A partir desse concentrado é realizada uma cromatografia com 2,3 L de resina Dowex 1x2 no ciclo de cloreto. Antecipadamente a coluna é equilibrada com um tampão de piridina/ HCl (0,1 M, pH 5,0) a uma vazão de 4 mL/min. O eluente da coluna é monitorado por um refratômetro. Depois, 4,26 L do efluente são obtidos, com frações de 20 mL cada, coletadas automaticamente e analisadas. As melhores frações foram determinadas por comparação de bioensaio. As frações 150-210 contêm 56% de atividade e são concentradas, ajustando o pH para 8,0. Logo é concentrado por evaporação para a remoção da piridina.

Feito isso, é realizada uma cromatografia sobre bio-gel P-2 para retirar o NaCl. A amostra obtida anteriormente é diluída em 50 mL de água, pH ajustado para 7,0; e aplicada numa coluna de gel. A vazão utilizada é de 10 mL/min, o efluente monitorado por um refratômetro e coletado automaticamente em frações de 20 mL. Essas frações são analisadas e sua atividade é comparada com a curva do refratômetro. Obtém-se um produto com 40% de pureza.

Os caldos de cefamicina são recuperados e purificados com um ajuste do caldo a pH 2,0-2,5 para inativar a penicilina (Nágarajan 1972).

2.9.1 Aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A CLAE se tornou o método de escolha para a análise e quantificação de antibióticos. A diversa natureza de combinação dos antibióticos torna difícil generalizar as técnicas específicas para a quantificação. Na realização da análise dos antibióticos em fluidos biológicos não se requer uma preparação especial da amostra. A maioria dos antibióticos contém um grupo cromóforo o qual permite a detecção destes pelo UV, (Nilsson-Ehle et al., 1983).

A respeito ao recheio ou adsorvente, uma variedade de empacotamentos na coluna e fases móveis foram utilizadas para análises das penicilinas (White et al, 1977, Lecaillon et al, 1982, e Lebellet et al. 1980) . Miller e Neuss (1983) fazem uma descrição dos métodos de CLAE para a análise dos beta-lactâmicos.

Uma técnica básica por CLAE para análise de aminopenicilinas (ampicilinas) utiliza um tampão de fosfato ácido aquoso e como fase móvel acetonitrila a um pH próximo ao ponto isoelétrico da aminopenicilina (Margosis, 1982). As aminopenicilinas são mais estáveis no ponto isoelétrico, porém, sua baixa solubilidade nesse pH.

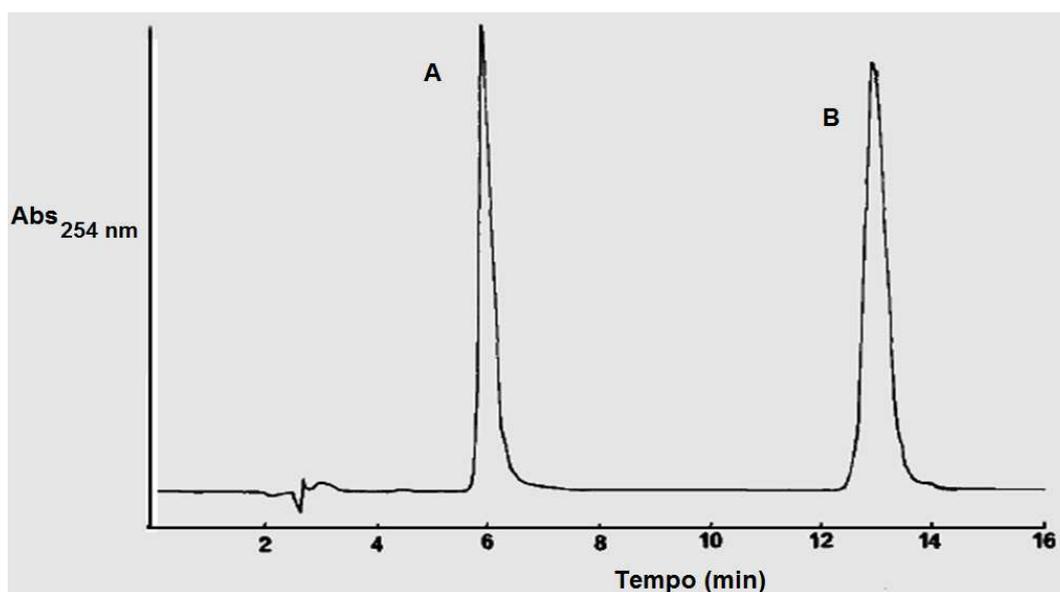


Figura 2.20. Cromatograma obtido de uma ampicilina dissolta(A) e cafeína (B). Detectado a temperatura ambiente e um detecção em UV a 254 nm. Margosis, 1982.

A fase estacionária utilizada é um empacotamento ODS (Octadecilsilano C-18) sobre sílica e a eluição é realizada em condições isocráticas (Figura 2.20).

White e Laufer, em 1984, utilizaram colunas microporosas na separação de cefalosporinas, o que proporcionou uma boa separação (Figura 2.21). As condições cromatográficas foram: coluna μ Bondapak C₁₈ (10 μ m) (250 x 1,0 mm) como fase estacionária, fase móvel 0,01 M fosfato monossódico- metanol- (75:25); taxa de fluxo 50 μ l/min. e 150 μ l/min.

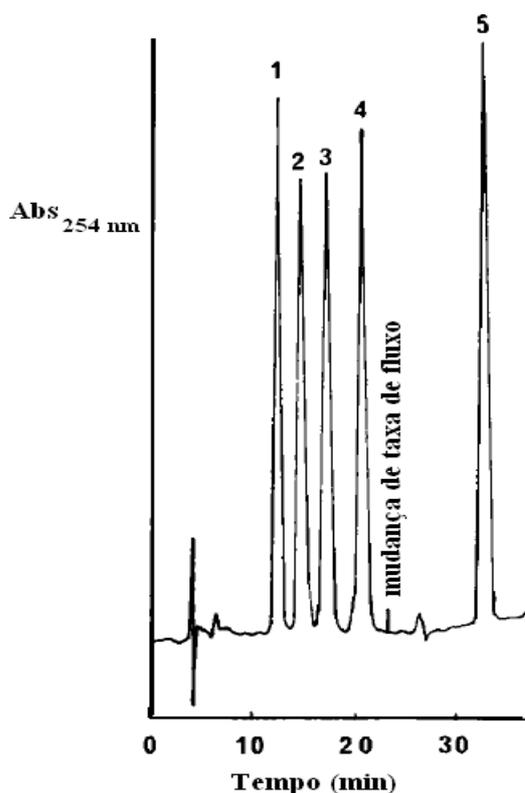


Figura 2.21. Separação de uma mistura de antibióticos cefalosporínicos numa coluna microporosa. Com uma taxa de fluxo de 50 μ l/min UV de 254 nm. Picos 1 – Cefalexin 2 – Cefoxitin 3 – Cefadrin 4 – Cefaloglicin 5 – Cefalofin. White e Laufer, 1984.

Vários dos metabolitos secundários nominados beta-lactâmicos carecem de um grupo cromóforo. Isto ocasiona um deslocamento do grupo amino primário deles. Porém, adicionando *fluorophore** é permitida a determinação desses compostos dentro dos caldos de fermentação (Peng et al, 1977).

* A **fluorophore** é um análogo ao cromóforo. É um componente de uma molécula que causa a fluorescência. É um grupo funcional numa molécula a qual absorve a energia em um comprimento de onda específico e re-emite energia com diferentes comprimentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Caldo de fermentação

No presente trabalho foram utilizados os caldos obtidos mediante cultivos utilizando a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* DSM 738. Estes cultivos foram realizados nos laboratórios de Engenharia Bioquímica do DEQ-UFSCar, por alunos de pós-graduação visando ao estudo das condições de cultivo em biorreatores para produção da cefamicina C em biorreatores.

Foram utilizados dois caldos, um deles cultivado em batelada e outro em batelada alimentada com suplementação com glicerol. Ambos tiveram a mesma composição do meio de cultivo principal: farinha de soja e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, o glicerol como fonte de carbono, e adiciono-se lisina, precursor da biossíntese de cefamicina C.

3.1.2 Microrganismo

Nos bioensaios para a detecção atividade antimicrobiana foi utilizada a cepa de bactéria *Escherichia coli* ESS.

3.1.3 Membranas

- Membrana de 0,22 μm da A/G Technology corporation Hampton Avenue, utilizada na etapa de microfiltração do caldo.
- Membrana de 3 kDa ou 3,000 NMWC da Amersham Biosciences, utilizada na etapa de ultrafiltração do caldo.

3.1.4 Resinas

Resina hidrofóbica

Foi utilizada a resina Amberlite XAD-4 da Rohm & Haas. É um polímero adsorvente insolúvel sem carga, em forma de esferas brancas, com tamanho da partícula 0,3-1,2 mm (90% aproximadamente), tamanho de poro entre 1-150 Å, área superficial 800 m²/g mínimo.

É escolhida preferencialmente na adsorção de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Entre suas funções, é utilizada como uma resina de adsorção para clarificar o caldo de cultivo após a ultrafiltrado.

Condicionamento: Inicialmente, a resina se encontrava numa solução de etanol 50 %. Antes da sua utilização, ela foi lavada abundantemente com H₂O milli-Q e finalmente filtrada.

Resina de troca iônica

No processo da purificação do antibiótico, a resina QXL da Amersham Biosciences foi empregada. Trata-se de uma matriz com ligações cruzadas de agarose e dextrana. Suas partículas esféricas possuem diâmetro entre 45-165 µm e capacidade iônica de 0,18-0,25 mmol/ml de adsorvente.

Condicionamento: Foram utilizadas diferentes soluções para o tratamento da resina seguindo a seguinte ordem:

- 1 L de uma solução de NaCl 1,00 M e NaOH 0,5 N.
- 1 L de H₂O milli-Q.
- 1 L de ácido acético CH₃COOH (HAc) 25% v/v.
- 2 L de H₂O milli-Q.

3.2 Equipamentos utilizados

3.2.1 Cromatógrafo CLAE

Para a realização das análises dos compostos beta-lactâmicos foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), composto por um sistema de bombas 515, um arranjo de detectores de fotodiodos (Detector Photodiode Array - PDA) Detector Waters PDA W996, injetor automático modelo W717.

3.2.2 Speed Vac

O concentrador utilizado foi o SpeedVac Concentrator da Savant modelo SC210A. Este foi utilizado para a concentração e secagem das amostras tanto do estrato bruto do caldo como das diferentes frações obtidas das cromatografias desenvolvidas. Possui uma alta eficiência na evaporação de solventes ou eluentes, utilizando uma combinação de força centrífuga, calor e vácuo. Várias amostras podem ser processadas sem a contaminação cruzada.

3.2.3 Espectrofotômetro UV/Vis

Foi empregado para monitorar as substâncias que absorvem em $\lambda = 254$ nm (grupos cromóforos). Neste caso, os compostos beta-lactâmicos, como cefalosporinas e penicilinas. O aparelho utilizado foi um espectrofotômetro digital da Amersham Pharmacia Biotech ULTROSPEC, modelo 2100 Pro UV/Vis conectado a um computador.

3.2.4 Ultrafreezer

A fim de manter as propriedades dos compostos bioativos a serem analisados, as amostras foram armazenadas em ULTRAFREZER da Scien Temp, Adrian MI, U.S.A, à temperatura de -70 °C.

3.2.5 Incubadora

Para obter os resultados dos testes de atividade bacteriológicos, o crescimento da *E. coli* ESS no ágar é realizado numa estufa NOVAETICA B.O.D modelo 411D, a uma temperatura de 37 °C, permitindo o crescimento do microrganismo nessa temperatura.

3.2.6 Autoclave

Para esterilizar o material usado (vidraria, ponteiras, soluções salinas, ágar, etc.), antes e depois de cada bioensaio, foi utilizada uma autoclave vertical, Modelo 103 da FABBE-PRIMAR Industrial nas condições de 1 atm de pressão (Kgf/cm²) a 120 °C, por 15 minutos.

3.2.7 Banho de água

A adsorção por troca iônica foi feita mantendo a temperatura controlada a 20 °C, fazendo uso de um banho térmico com o aparelho da Fujitec, modelo 521-2D.

3.2.8 Bombas

Foram utilizadas bombas da ISMATEC, modelos BVP e MCP, tanto para os processos de micro e ultrafiltração (a 240 rpm) do caldo de cultivo, como para a aplicação das amostras e dos eluentes na coluna de leito fixo.

3.2.9 pHmetro

Em todas as análises desenvolvidas, foi realizada uma monitoração do pH com o pHmetro de bancada PH/ISE Meter, modelo 710^a da marca Orion.

3.2.10 Colunas

Foram usadas três colunas de vidro de diferentes diâmetros e alturas. Essas colunas foram empacotadas com a resina QXL da Amersham e o volume aparente de empacotamento da coluna foi obtido mediante a seguinte expressão:

$$V=\pi r^2 h$$

3.1

Onde:

- V: volume
- r: radio interno
- h: altura ou comprimento.

Os empacotamentos feitos nessas colunas são descritos a seguir:

1. Coluna com 50 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro interno; preenchida com resina até uma altura de 40 cm, resultando em um volume empacotado aparente de 196 cm³. Utilizada para o desenvolvimento dos experimentos iniciais com um caldo de cultivo obtido em batelada, onde foram usados volumes maiores deste caldo tratado.
2. Uma coluna de 40 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro, preenchida com resina até uma altura de 30 cm, apresentando um volume empacotado de 53 cm³ de resina. Essa coluna foi utilizada no experimento do teste com acetato de sódio.
3. Uma coluna encamisada de 50 cm de comprimento por 1,0 cm de diâmetro interno, com um preenchimento de 40 cm de altura de resina, sendo o volume de empacotamento de 31,4 cm³. Utilizada no desenvolvimento dos últimos quatro experimentos (trabalhos com caldo obtido em batelada alimentada), com aplicação menores volumes de caldo.

3.2.11 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: NaCl, CH₃COONa ou (NaOAc), NaOH, CH₃COOH ou (HAc), entre outros, para o preparo da fase móvel e no condicionamento das colunas.

3.3 Métodos

3.3.1 Metodologia de análise de determinação de antibióticos beta-lactâmicos totais por bioensaio

A metodologia é realizada preparando-se um ágar nutriente seguindo a composição apresentada na Tabela 3-1.

Tabela 3-1. Composição do meio Ágar nutriente para a *E. coli* ESS.

Composição do meio Ágar nutriente	g/L
Ágar bacteriológico	20,0
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0

O pH do meio foi ajustado a 7,2, valor indicado para um bom crescimento da *E. coli* ESS. Depois da mistura dos componentes do meio com a água, este foi aquecido em microondas sob agitação constante para obter uma mistura homogênea. Subseqüentemente foram transferidas alíquotas de 100 mL para Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, sendo os mesmos esterilizados em autoclave.

Para a realização dos bioensaios utilizou-se a *E. coli*. ESS. Inicialmente a bactéria foi cultivada em meio ágar nutrientes mantidos em tubos previamente esterilizados. Este cultivo foi realizado entre 24 a 48 horas numa estufa a 37 °C. As bactérias cultivadas no meio sólido foram mantidas sob refrigeração (4°C) por até 2 meses.

Para re-suspender os microrganismos utilizados no bioensaio, transferiu-se aproximadamente 10 mL de solução NaCl 0,9% (m/v) esterilizada para cada tubo contendo bactérias cultivadas. A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado. A OD (densidade ótica) da suspensão resultante foi lida a 600 nm no espectrofotômetro.

A suspensão obtida é misturada com o meio ágar nutriente conforme descrito anteriormente, de tal forma que 1 mL dessa solução apresentasse valor de OD₆₀₀ igual ou

maior que 1. Assim tem-se que, $V_{\text{volume}} = 1/\text{OD}$. Este foi o volume aplicado para cada 100 mL de ágar.

Nesta parte do procedimento, toma-se cuidado de controlar a temperatura do ágar a 40 °C, transferindo essa mistura (ágar mais o microrganismo) para placas de Petri, devidamente esterilizadas, em câmara de fluxo laminar. Para cada 100 mL de ágar foram necessárias quatro placas, onde foram colocadas alíquotas de 25 mL da mistura.

Após solidificação do meio, perfurou-se quatro poços de 5 mm de diâmetro por placa, nos quais foram adicionados 20 µL de cada um das frações obtidas nas cromatografias (Figura 3.1).

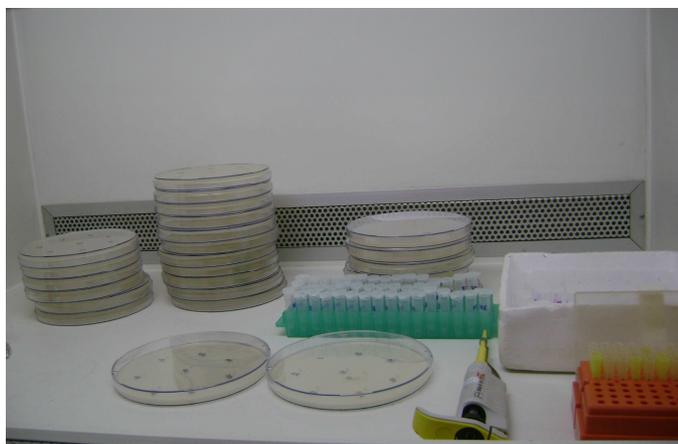


Figura 3.1. Materiais utilizados no bioensaio contra *E. Coli*, placas de Petri contendo o ágar.

As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas, e depois mediu-se os diâmetros dos halos de inibição.

3.3.2 Análise de uma cefalosporina, “cefamicina C”, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Este método foi utilizado para análise do experimento 1 na seção 5.5.2.1. e nas análises dos experimentos a partir da seção 5.6.

Foi utilizada como fase estacionária uma coluna C₁₂ Synergi Phenomenex, a eluição foi realizada em modo isocrático com ácido acético HAc 0,01 M, temperatura de 28 °C, a vazão do eluente de 2,0 mL.min⁻¹, e tempo de injeção de 20 min. Os picos foram detectados no comprimento de onda de 254 nm. O pico desta cefalosporina “cefamicina C” foi detectado num tempo aproximado de 10 min. Esta metodologia foi desenvolvida pelo Dr.

Álvaro Batista Neto, então bolsista da UFSCar Pro-Doc CAPES no PPG-EQ e atuando no laboratório de Engenharia Bioquímica.

3.3.3 Técnicas Finas de Detecção Molecular

A fim de determinar os compostos existentes nas frações que apresentaram atividade nos testes de bioensaio, foram utilizadas as técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e de espectrometria de massas (EM).

Ressonância magnética Nuclear RMN

Foi utilizada para determinar a estrutura dos compostos isolados, permitindo neste caso a contagem de átomos de hidrogênios.

É utilizado um aparelho Bruker DRX (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H), no DQ UFSCar, disponível no laboratório do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira.

Espectrometria de Massa (EM)

Neste caso foi empregado um equipamento Espectrômetro MS ESQUIRE 3000 PLUS (Captura de íons da Bruker Daltonics, capilaridade 4000 V, com nebulizador 12.0 psi, temperatura 300 °C, fluxo de injeção 180 $\mu\text{L}/\text{h}$) para obtenção de espectros das frações com baixa resolução. A análise por EM foi realizada na Central Analítica no IQ-USP de São Paulo.

A análise dos resultados dos espectros obtidos pelas duas técnicas (RMN e EM) tiveram a colaboração da Dra. Jaine H.Hortolan Luiz de Oliveira.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para uma melhor visualização do procedimento experimental, apresenta-se um diagrama de bloco com as etapas realizadas (Figura 4.1 e 4.2).

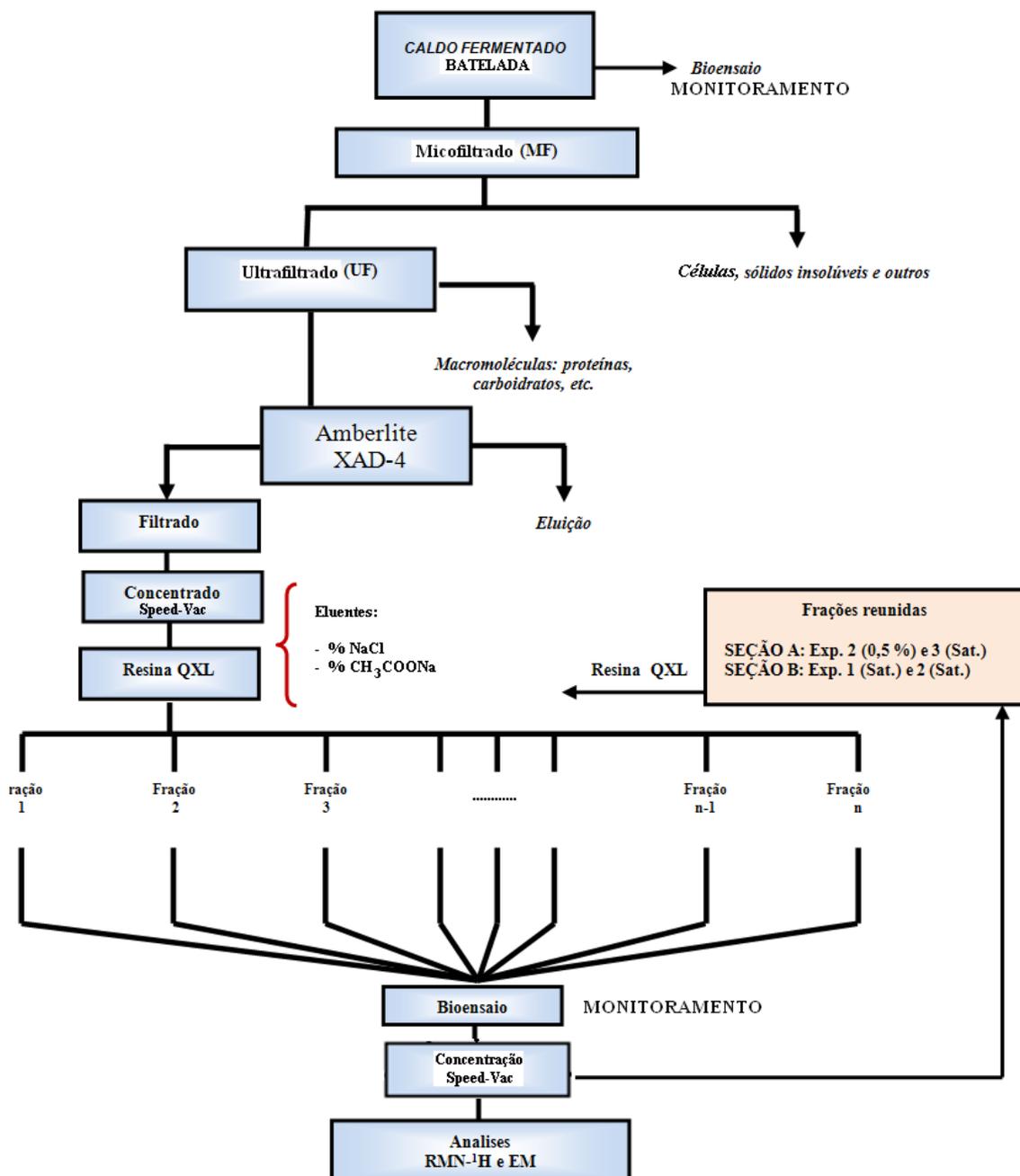


Figura 4.1. Diagrama resumindo a metodologia experimental adotada na pesquisa, utilizando o caldo de fermentação em batelada.

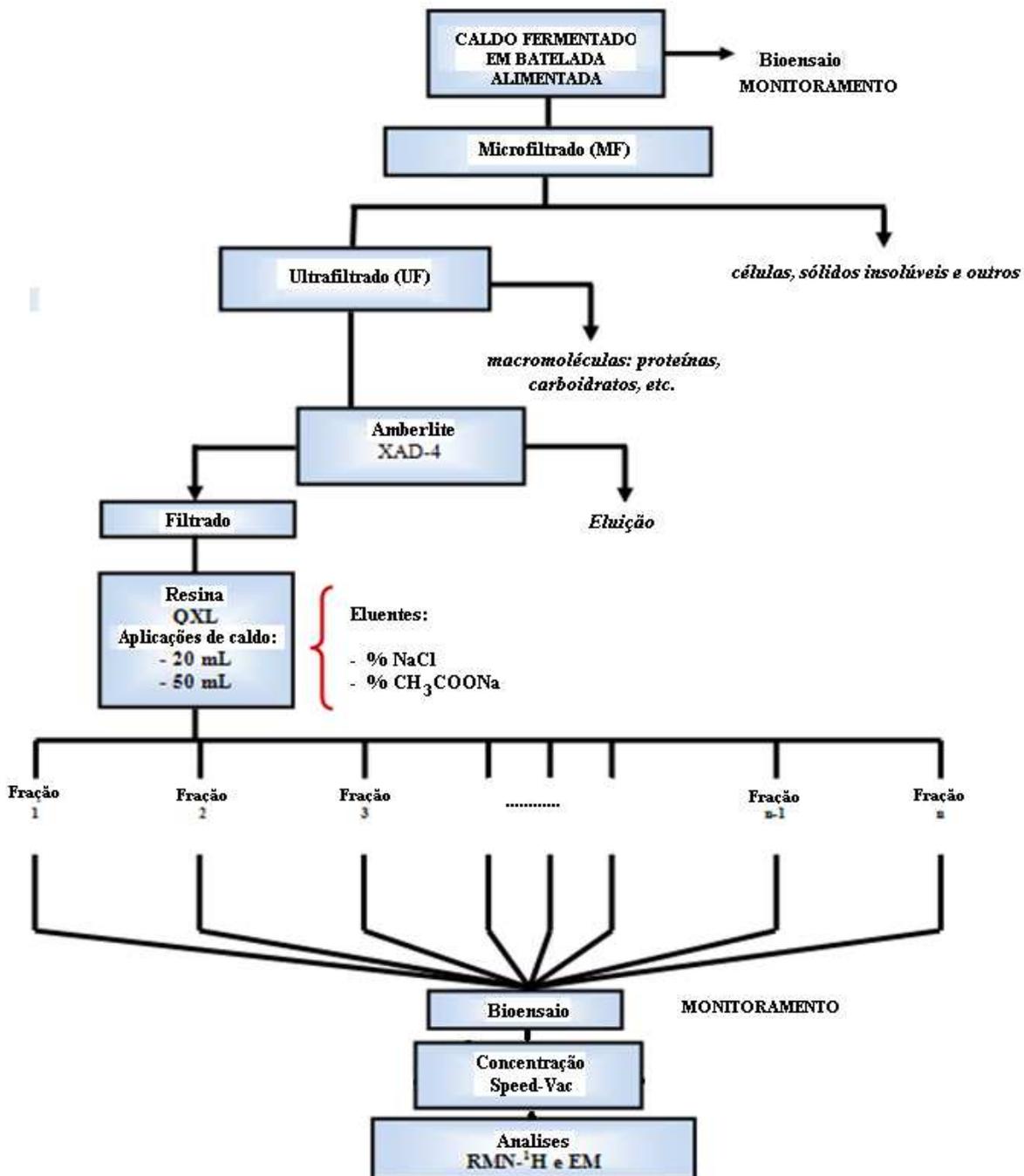


Figura 4.2. Organograma do processo de obtenção da cefamicina C utilizando o caldo de fermentação em batelada alimentada.

4.1 Tratamento do caldo com Amberlite XAD-4

Depois de passar pelos processos de filtração usando membranas descritas no item 3.1.3, os caldos foram tratados com a resina Amberlite XAD-4, para se obter um caldo clarificado, livre de pigmentos.

Como procedimento padrão, volumes de caldo foram colocados em contato com a resina em um Becker de 1 L de capacidade, mantido sob agitação mecânica (Figura 4.3).

Para o caldo proveniente do cultivo em:

a) Batelada: 600 mL de caldo foram adicionados a 200 mL de resina durante um tempo de 20 minutos.

b) Batelada alimentada: 800 mL de caldo foram colocados em contato com 500 g de resina, durante um tempo de agitação de 30 minutos. este tratamento foi realizado duas vezes .

Os processos estão detalhados na Figura 4.1 para o caldo obtido por batelada e na Figura 4.2 para o caldo obtido por batelada alimentada.

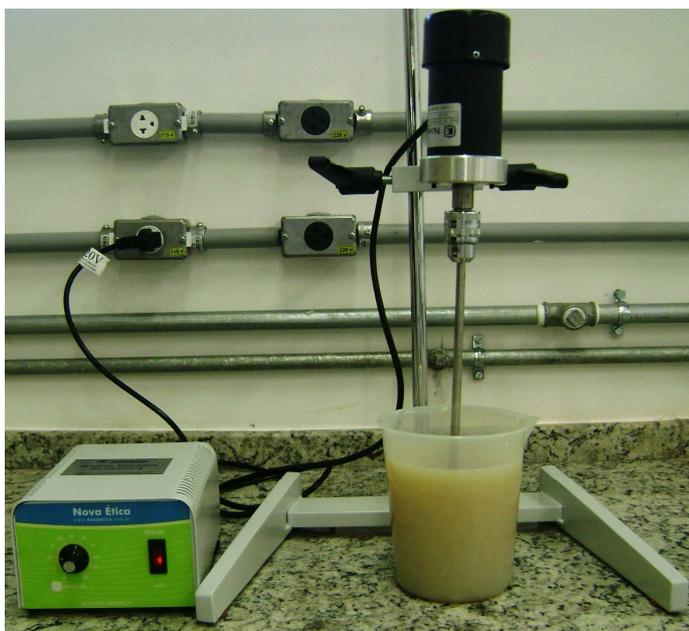


Figura 4.3. Adsorção: tratamento do caldo fermentado com Amberlite XAD-4.

Após este prévio tratamento, a solução foi filtrada, para a separação da resina.

4.2 Purificação Utilizando Resina de Troca Iônica QXL

Foram realizados nove experimentos de purificação, detalhados a seguir.

Os experimentos foram separados em duas seções, de acordo com o tipo de caldo e eluentes utilizados:

Caldo obtido em batelada

Nos experimentos desta seção, foram testados dois diferentes eluentes – solução de cloreto de sódio (NaCl) e de acetato de sódio (CH₃COONa). Em cada experimento, apenas um tipo de sal foi testado. A eluição foi feita aumentando-se a concentração das soluções do início até o fim do processo, utilizando um gradiente em forma degrau. Utilizou-se uma coluna com volume de 196 cm³. Um outro experimento, utilizando acetato de sódio, a eluição foi realizada com um gradiente salino em forma de rampa e o volume da coluna utilizada foi de 53 cm³.

Caldo obtido em batelada alimentada

Nesta seção, como na anterior, foram usadas soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio e de acetato de sódio como eluentes. Foi utilizada uma coluna com volume menor de empacotamento de 31,4 cm³.

Foi realizado o bioensaio com todas as frações coletadas nos experimentos, para verificação da atividade contra *E. coli* ESS. As frações com resultado positivo no bioensaio foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, método descrito anteriormente.

4.3 Caldo obtido por cultivo em batelada

4.3.1 Eluição com cloreto de sódio

Experimento 1

Foi utilizado um volume de 900 mL do caldo microfiltrado e ultrafiltrado. Uma amostra de 20 µL deste extrato bruto foi analisada por bioensaio para verificar a presença de antibióticos beta-lactâmicos. Adicionou-se este volume a um béquer com a resina XAD-4, e a mistura permaneceu em agitação durante 20 minutos. Após este tratamento a solução foi filtrada para separar o caldo tratado da resina.

O filtrado foi concentrado em Speed-Vac, obtendo um volume de 600 mL. O pH foi ajustado a 6,8 e o caldo foi alimentado em uma coluna empacotada com resina QXL, sendo eluída em um gradiente degrau composto por 400 mL de soluções de NaCl nas seguintes proporções: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 5,0 % (m/v).

Foram coletadas 60 frações de aproximadamente 40 mL cada uma. A operação durante a adsorção/eluição foi realizada à vazão de 5,0 mL.min⁻¹. As amostras foram evaporadas em Speed-Vac.

Experimento 2

Nesse segundo experimento, foram reunidas as frações 23 -29 já secas, obtidas da eluição com 0,5 % (m/v) de NaCl, obtidos no experimento 1. Foram diluídos 1,38 gramas da amostra seca em 40 mL de H₂O milli-Q.

Este novo volume de caldo foi aplicado na coluna empacotada com resina QXL, com uma vazão de 5,5 mLmin⁻¹. Iniciou-se a eluição com 400 mL de água e com 400 mL de soluções de NaCl: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 5,0% (m/v). Foram feitas coletas sucessivas de 40 mL em tubos Falcon, obtendo-se 70 frações, que foram evaporadas em Speed-Vac. As frações que apresentaram maior halo de inibição contra *E. coli* ESS foram analisadas por RMN-¹H.

Experimento 3

Neste experimento trabalhou-se com as frações obtidas da saturação da coluna do experimento 1, isto é, as primeiras frações (7 até 18).

Essas frações foram evaporadas e reunidas, e desta mistura 2,0 gramas de sólido seco foram diluídos em 40 mL de água milli-Q. A solução resultante foi alimentada na coluna preenchida com resina QXL. A eluição foi realizada com um gradiente degrau composto por soluções de cloreto de sódio, respectivamente nas seguintes proporções: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5 e 5,0% (m/v). Foi aplicado um volume de 400 mL de cada eluente, sendo finalmente coletadas 109 frações com volumes de 40 mL.

Após da evaporação do solvente, as frações que apresentaram maior diâmetro do halo de inibição foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H).

4.3.2 Eluição com acetato de sódio

Experimento 1

Neste experimento foi utilizado acetato de sódio como eluente. Foram alimentados 40 mL de caldo.

As eluições foram realizadas com volumes de 400 mL de cada solução eluente. As soluções preparadas em diferentes concentrações de acetato de sódio tiveram as seguintes concentrações de NaOAc: 0,0; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,5 e 5,0% m/v, respectivamente. Foram coletadas 79 frações de 40 mL cada, as quais foram concentradas em Speed-Vac

A amostra que apresentou maior diâmetro de halo de inibição foi analisada por espectrometria de massa (EM).

Experimento 2

Neste segundo experimento foi utilizada uma coluna de vidro com 1,5 cm de diâmetro interno e 40 cm de altura preenchida com resina QXL. A etapa de eluição foi desenvolvida com uma gradiente salino tipo rampa, e acoplou-se um espectrofotômetro ajustado a 254 nm para leituras em linha do efluente da coluna. Neste processo, as leituras foram feitas desde a alimentação até a eluição com o sal. O arranjo experimental utilizado está representado esquematicamente na Figura 4.4.

Este experimento foi desenvolvido utilizando as frações obtidas da saturação da coluna do experimento 1, no item 4.3.1.1 (frações 7 a 18). Como foi descrito anteriormente, estas frações foram secas e depois reunidas, e desta mistura foi extraído 1,5 gramas e diluído em 40 mL de água milli-Q. Esta solução foi alimentada na coluna, a uma vazão de $2,5 \text{ mLmin}^{-1}$, com temperatura controlada a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A lavagem da coluna foi feita com 100 mL de H_2O milli-Q para tirar o excesso da amostra. O gradiente salino em forma de rampa foi feito com 250 mL de uma solução de NaOAc a 12,5% m/v e um volume de 250 mL de H_2O . A concentração de sal alimentada na coluna foi calculada a partir da equação (4.1), obtida por balanço de massa no sistema.

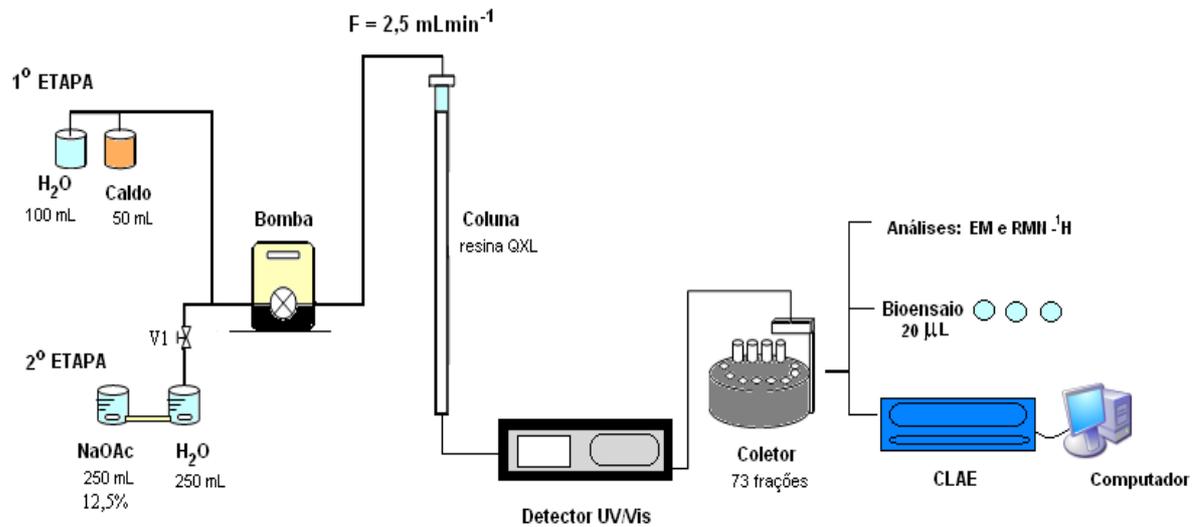


Figura 4.4. Sistema utilizado para a determinação dos diferentes parâmetros.

$$C(t) = C_{0sal} * \left(1 - \left(1 - \frac{F * t}{2V_0} \right) \right) \quad (4.1)$$

Onde:

$C(t)$: concentração de sal com o tempo.

F : vazão volumétrica de alimentação na coluna.

V_0 : volume inicial do frasco de armazenamento de sal.

t : tempo percorrido (minutos).

Deste experimento, foram coletadas 73 frações de 6,25 mL.

4.4 Caldo obtido por cultivo em batelada alimentada

Tem-se em conta que nestes experimentos as frações coletas foram controladas em função do tempo. Utilizou-se uma coluna com um volume $31,4 \text{ cm}^3$ de leito fixo.

4.4.1 Eluição com cloreto de sódio

Experimento 1

Nesse experimento foram utilizados 20 mL de amostra do caldo previamente tratado com a resina XAD-4 e aplicados na coluna preenchida com resina QXL (Figura 4.5). A eluição foi feita com um gradiente degrau composto por soluções de cloreto de

sódio, com um volume de 500 mL de cada eluente nas seguintes proporções NaCl: 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,3 e 5,0% m/v, respectivamente. Foram coletadas 151 frações de 20 mL. As vazões de eluição foram de 5,1 mL min⁻¹.



Figura 4.5. Montaje do sistema de cromatografia de troca aniônica, coluna empacotada, banho termostático e controlador de temperatura.

Na Figura 4.6, podem-se observar as diferentes frações obtidas nos experimentos coletadas nos tubos Falcon.



Figura 4.6. Frações coletadas em tubos Falcon para posterior análises por bioensaio e CLAE.

Após da evaporação do solvente, as frações que apresentaram maior diâmetro do halo de inibição foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H).

Experimento 2

Foram alimentados 50 mL de amostra do caldo, em uma coluna preenchida com resina QXL.

A eluição foi realizada com um gradiente degrau composto por soluções de cloreto de sódio, com volumes de 500 mL de cada eluente nas seguintes concentrações: NaCl: 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,3 e 5,0% m/v, respectivamente. Foram coletadas 152 frações de 20 mL, à vazão de 5,1 mL.min⁻¹. Após evaporação do solvente, as frações que apresentaram maiores diâmetros de halo de inibição foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H).

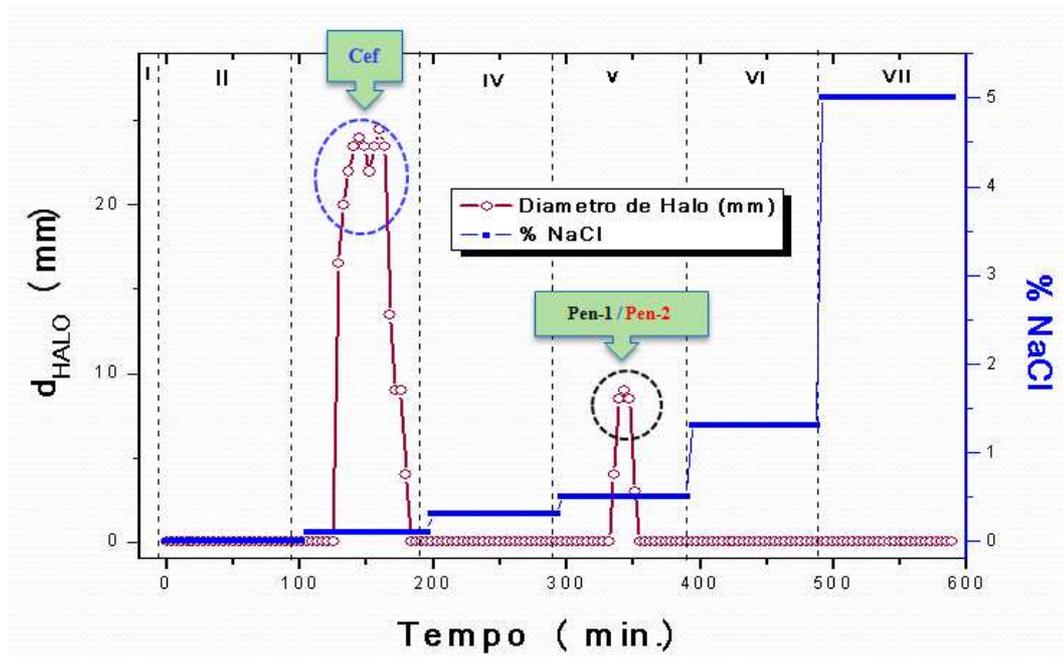
Experimento 3 – Bioensaio das frações tratadas com diferentes pH

Este experimento teve como objetivo estudar o comportamento em diferentes pHs dos compostos que apresentam atividade antimicrobiana, principalmente a sensibilidade do segundo composto ou grupo de compostos. Este ensaio foi ensaio meramente qualitativo.

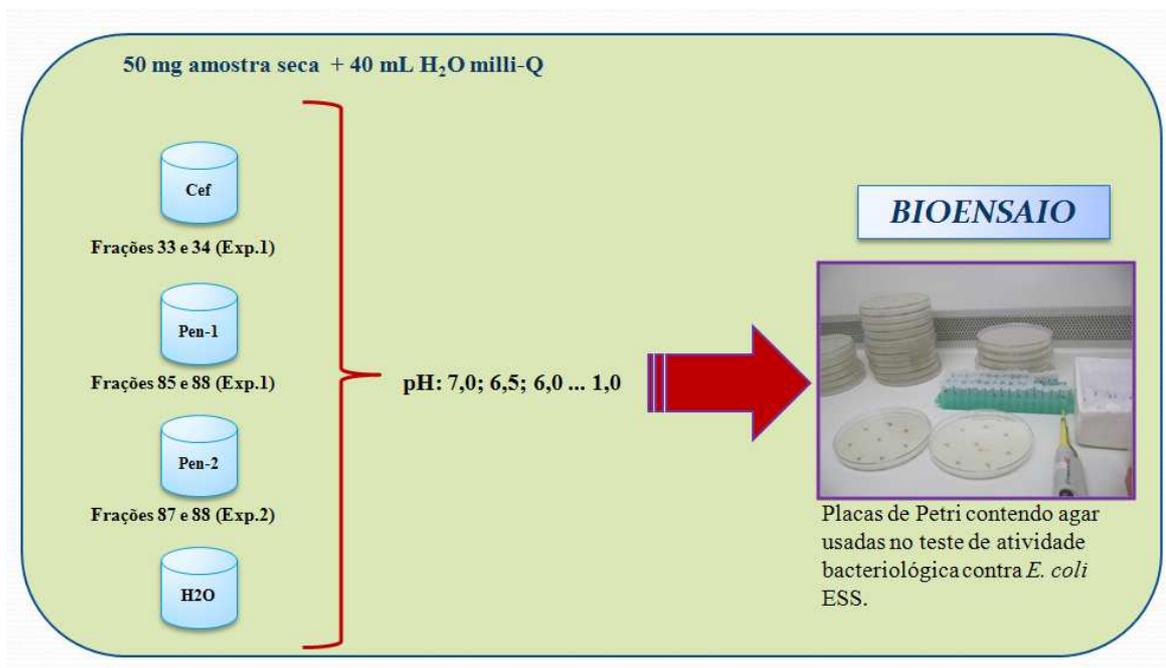
Neste experimento foram utilizadas frações obtidas dos experimentos anteriores (1 e 2) Foram utilizados 50 mg de cada amostra seca e diluídas em 40 mL de água milli-Q.

A leitura do pH foi realizada com variação da escala de 0,5, (ou seja, 7,0 ; 6,5; 6,0 ; 5,5 ; 5,0...1,0). Mediante agitação continua com adição de HCl 0,2 M altamente diluído coletaram-se amostras com volumes de 50 µL cada uma, para análise em bioensaio. Das frações majoritárias obtidas por eluição, tem-se a hipótese de ter dois compostos. O primeiro pode ser uma reunião de cefalosporinas e o segundo uma reunião de compostos, podendo estar entre eles, alguma penicilina por ser um precursor biossintético. Com efeito, estes compostos apresentam diferentes estabilidades a diferentes valores de pH. Assim, com essa hipótese fez-se (Ver figura 4.7.):

- Para a análise da amostra denominada Cef foram utilizadas amostras do experimento 1: frações 33 e 34, ambas são misturadas, para obter maior massa.
- Para a análise das amostras Pen foram realizadas dois ensaios utilizando amostras do experimento 1: frações 85 e 88 as quais foram denominados (Pen-1) e do experimento 2: as frações 37 e 38 que foram denominados (Pen-2). Em ambos os casos as frações foram misturadas.
- Neste caso o H₂O é selecionado como branco (amostra de referência), para ter uma melhor comparação, com as amostras.



(a)



(b)

4.7. Estudo do comportamento de compostos bioativos obtidos segundo (a) mudando o pH por bioensaio das frações que apresentaram atividade em (b).

4.4.2 Eluição com acetato de sódio

Experimento 1

Neste caso, o caldo obtido em batelada alimentada utilizado não foi concentrado, Após microfiltração e ultrafiltração, ele foi tratado com resina XAD-4, e 50 mL foram aplicados em uma coluna preenchida com resina QXL. A eluição foi feita com um gradiente degrau composto por soluções de acetato de sódio, com volume de 500 mL de cada eluente nas seguintes concentrações 0,0; 0,4; 0,5; 0,6; 1,5% m/v. A vazão de operação foi de 5.1 mL min⁻¹. Foram coletadas 128 frações de 20 mL cada uma.

Experimento 2

Da mesma forma que o experimento 2 visto anteriormente em (4.4.2.1), 50 mL de amostra do caldo previamente tratado foram aplicados na coluna. A eluição foi feita com um gradiente degrau composto por soluções de acetato de sódio, com volume de 500 mL de cada eluente nas seguintes concentrações: 0,0; 0,2; 0,3; 1,5; 2,5 e 3,5 e 5,0% m/v. A vazão de operação foi de 4,8 mL min⁻¹. Foram coletadas 130 frações de 20 mL cada uma.

Após a evaporação do solvente, as frações que apresentaram maior diâmetro do halo de inibição foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H). A diferença do experimento anterior seção 4.4.2.1 é o uso de uma menor concentração de sal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo encontra-se dividido em duas partes. A primeira refere-se à utilização de um caldo obtido em batelada. A segunda parte refere-se ao uso de um caldo obtido em batelada alimentada.

Portanto, serão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos através das diferentes técnicas de caracterização, conforme os objetivos deste trabalho de pesquisa.

5.1 Tratamento do caldo com Amberlite XAD-4

Neste experimento nota-se que através da utilização da resina de adsorção, como a XAD-4, ocorre adsorção de pigmentos escuros presentes no caldo de fermentação, sendo, portanto, uma etapa importante no processo de limpeza do caldo.

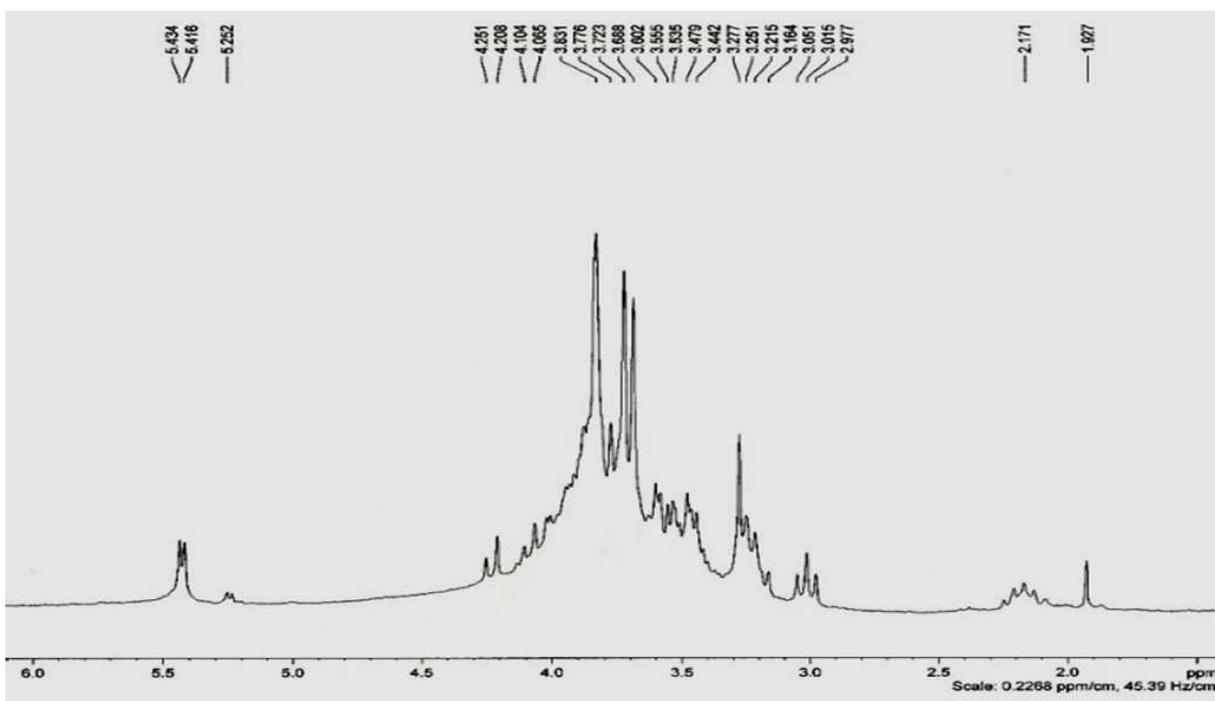


Figura 5.1. Espectro de RMN-¹H do caldo ultrafiltrado. Intensidade contra deslocamento químico em ppm.

Na Figura 5.1, apresenta-se o espectro RMN-¹H de um caldo de cultivo típico, apenas microfiltrado e ultrafiltrado, onde são observados sinais de hidrogênios alargados entre deslocamento químico 3,0 e 4,5 ppm, bem característicos de açúcares.

Este resultado será necessário para comparar qualitativamente o desempenho do processo proposto quanto à purificação.

5.2 Purificação Utilizando a Resina de Troca Iônica QXL

Os resultados obtidos utilizando esta resina foram satisfatórios de acordo com o caldo e os eluentes empregados.

5.3 Caldo obtido por cultivo em batelada

5.3.1 Eluição com cloreto de sódio (NaCl)

Experimento 1

A Figura 5.2 apresenta os resultados obtidos nas condições descritas e referentes a este primeiro experimento.

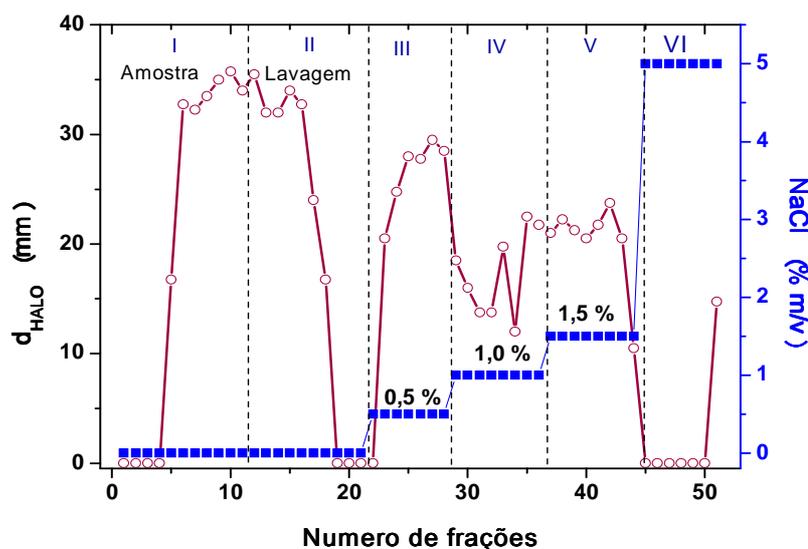


Figura 5.2. Resultado do experimento 1: diâmetro de halo de inibição em função do número de frações. Dessorção realizada em resina QXL. I - aplicação da amostra, II - lavagem com água; III - eluição com solução de NaCl 0,5 % m/v; IV - eluição com solução de NaCl 1,0 % m/v; V - eluição com solução de NaCl 1,5 % m/v e VI - eluição com solução de NaCl 5,0 % m/v.

Podemos observar que a aplicação de 600 mL de caldo na coluna com volume aparente de resina de 196 cm³ promoveu a saturação do leito, como pode ser observado já na quinta fração durante aplicação da amostra.

Durante a lavagem da coluna, verificou-se que houve a retirada de antibióticos em excesso na coluna, isto ocorre, pois uma parte da solução fica retida nos vazios do leito de adsorção. Além disso, pode ocorrer arraste de parte dos compostos que ficaram fracamente retidos na superfície da resina pela força iônica da solução que se forma da alimentação com água. As etapas de eluição mostraram que diferentes frações, que apresentavam atividade antibacteriana, foram eluídas com diferentes concentrações salinas.

Foram obtidos espectros de RMN-¹H de algumas frações com elevada atividade, sendo destacados os espectros que se encontram na Figura 5.3 referentes à fração 10 obtida durante a aplicação da amostra. Especialmente na Figura 5.4, concernente ao espectro da fração 25, referente à eluição com solução de 0,5 % m/v de NaCl, está ilustrando claramente a limpeza do caldo, bem como sinais de hidrogênios que podem estar relacionados à estrutura de um antibiótico beta-lactâmico, onde são observados hidrogênios em 3,6 ppm e 5,2 ppm que podem ser do grupo metoxila, encontrado apenas na cefamicina C e do hidrogênio na forma de um singlete entre os dois anéis do antibiótico, respectivamente, o mesmo foi observado por Fukase et al., 1975.

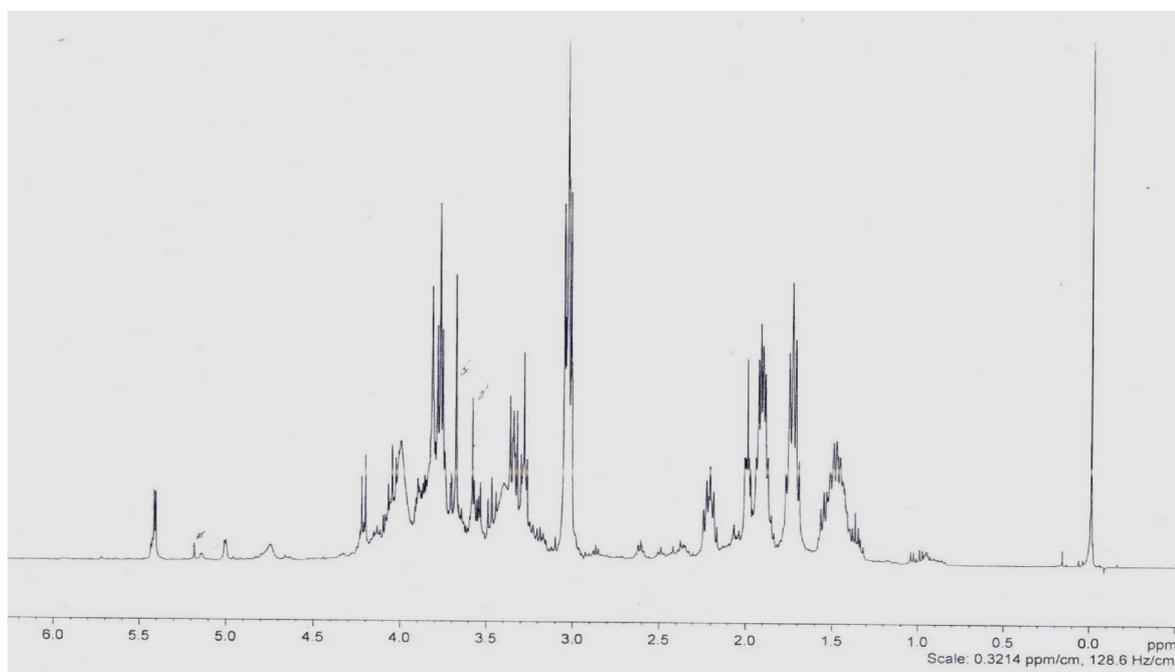


Figura 5.3. Espectro 2, RMN-¹H da fração 10. Obtida da lavagem com água. (D₂O, 400 MHz).

É notório verificar a redução do conglomerado de sinais de hidrogênio pertencentes aos açúcares, aminoácidos, etc, que aparecem na Figura 5.1, relativos ao caldo apenas ultrafiltrado. A diminuição destes sinais mostrados na Figura 5.3 equivale ao caldo tratado com a resina XAD-4. E, por fim, uma redução significativa das impurezas, conforme pode ser verificado na Figura 5.4, pela redução dos hidrogênios referentes a estes contaminantes.

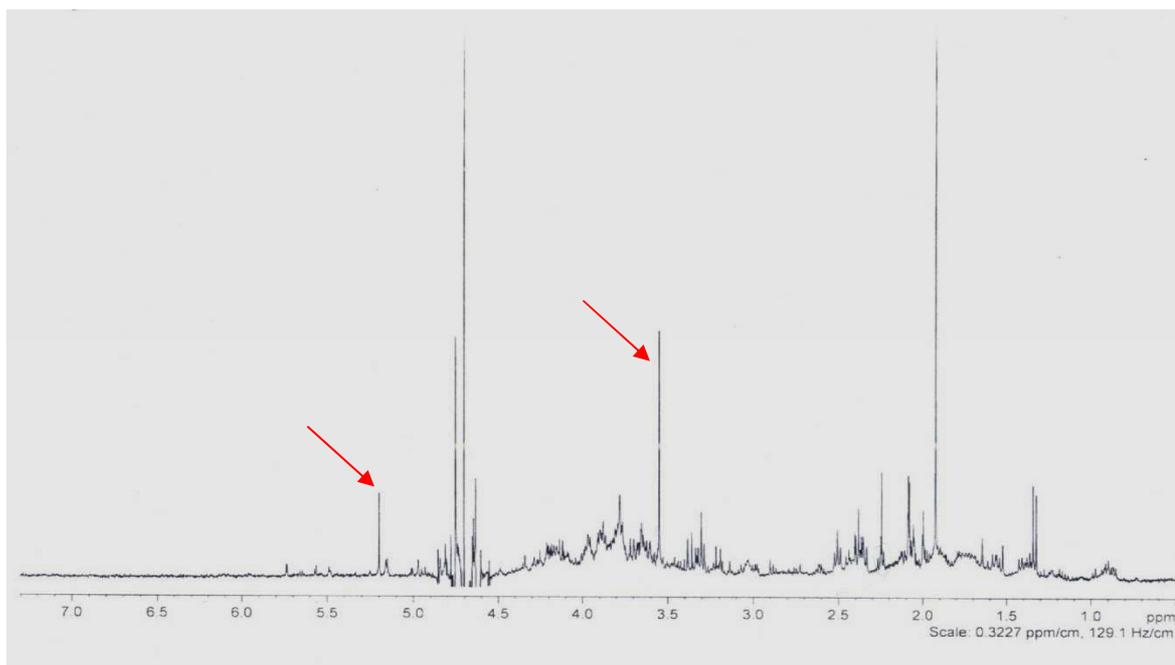


Figura 5.4. Espectro 3, RMN-¹H da fração 25 obtida da eluição com 0,5 % m/v de NaCl. (D₂O, 400 MHz).

Experimento 2

Esta fração é a mais importante do estudo devido aos resultados obtidos, tal como pode ser verificado na Figura 5.5.

Durante a lavagem com água (fração do intervalo II) não foi verificada a exaustão da solução através de testes de atividade antibacteriana. Isto mostra que todos os compostos com atividade foram retidos pelos sítios iônicos da resina. Este experimento permitiu mostrar a separação bem definida de duas frações que apresentam atividade antibacteriana. A primeira fração foi eluída com uma concentração de 0,2% m/v de NaCl, e, durante todo o processo de eluição, é possível verificar que a segunda fração é eluída com 1% m/v de NaCl. Este resultado indica a presença de dois compostos ou de dois grupos de

compostos diferentes que apresentam atividade antibacteriana, visto que são eluídos com soluções de diferentes forças iônicas.

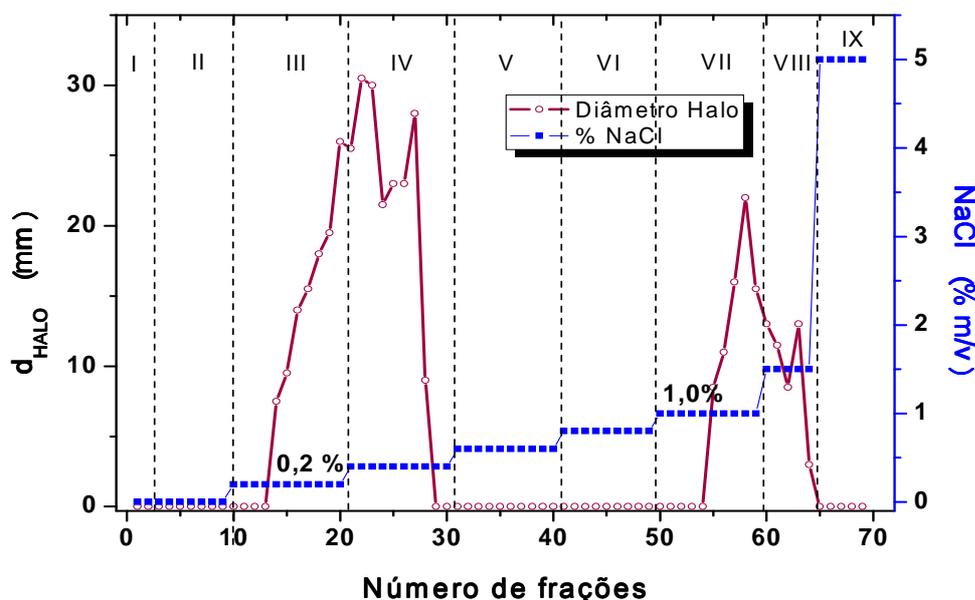


Figura 5.5. Experimento 2 diâmetro de halo de inibição (mm) em função do número de frações Cromatografia realizada com a resina QXL; I - aplicação da amostra, II - lavagem com água, e eluição com NaCl a diferentes concentrações: III - NaCl 0,2 % m/v; IV - NaCl 0,4 % m/v; V - NaCl 0,6 % m/v; VI - NaCl 0,8 % m/v; VII - NaCl 1,0% m/v; VIII - NaCl 1,5% m/v e IX - NaCl 5,0% m/v.

De acordo com este resultado, pode-se dizer que a segunda fração obtida se adsorve fortemente aos sítios da resina. Isto ocorre devido ao fato que quando o eluente ingressa na coluna é mais fácil retirar dos sítios da resina os componentes com menor força de interação eletrostática com a matriz. As análises por RMN-¹H das frações 22, 27 e 58, encontram-se mostradas nas figuras 5.6, 5.7, e 5.8, respectivamente.

Através da análise dos espectros verifica-se que, apesar de se obter espectros mais limpos, o que confere caldos mais puros, houve a presença de um contaminante, (Figura 5.6 fração 22) cujo sinal de hidrogênio aparece próximo a 1,9 ppm, prejudicando a análise dos demais sinais de hidrogênio. Estes sinais se referem, talvez, as impurezas presentes na vidraria utilizada para este tipo de análise. Neste espectro são observados hidrogênios em 3,6 ppm e 5,2 ppm, presentes unicamente na cefamicina C.

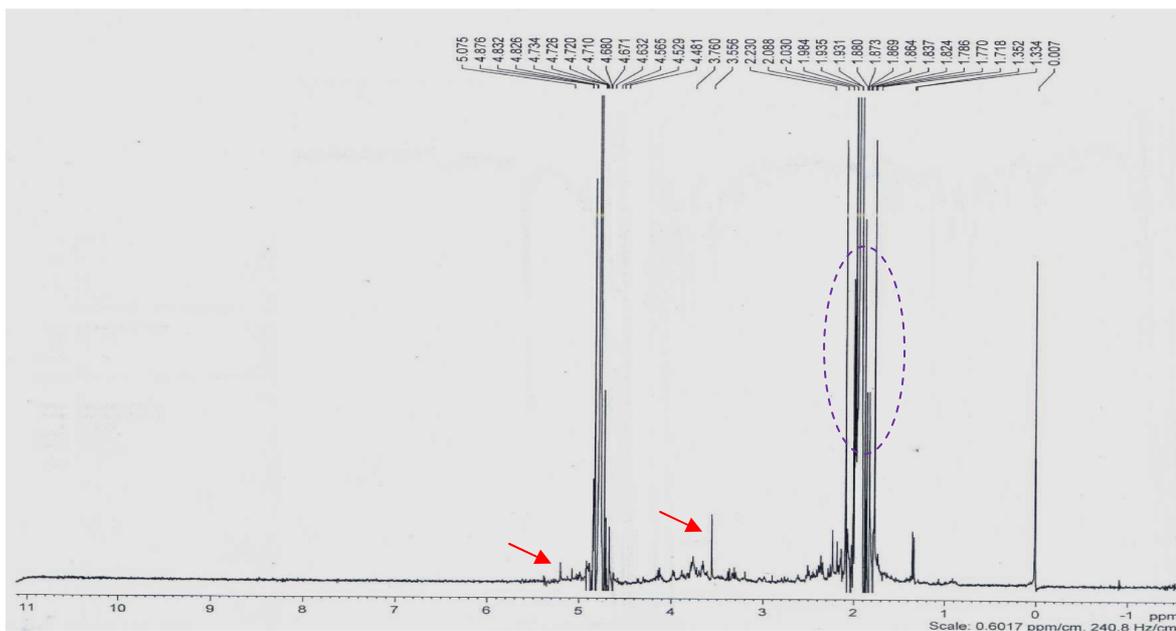


Figura 5.6. Espectro 4, RMN-¹H da fração 22, aplicação da amostra do Experimento1. Obtida da eluição com 0,4 % de NaCl. (D₂O, 400 MHZ).

Estes sinais também aparecem no espectro da Figura 5.7 pertencente à fração 27.

Pode-se observar a presença do contaminante perto de 1,9 ppm, mas em menor concentração.

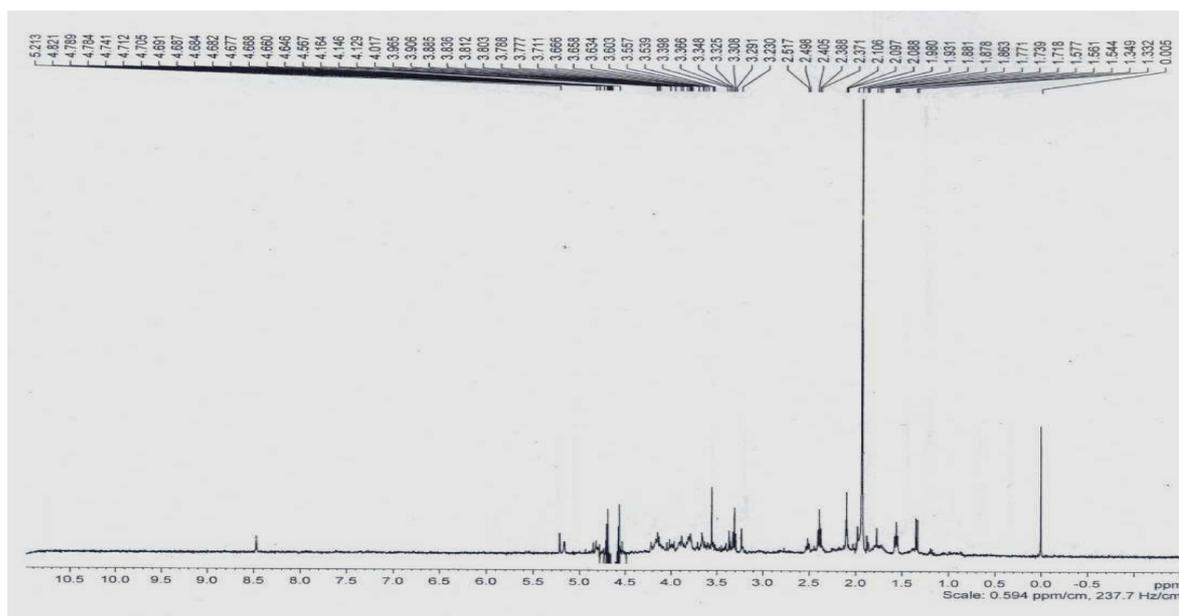


Figura 5.7. Espectro 5, RMN-¹H da fração 27, aplicação da amostra do Experimento1 (seção 5.5.1.1.) frações reunidas 23 - 29. Obtida da eluição com 0,4 % de NaCl. (D₂O, 400 MHZ).

O espectro apresentado na Figura 5.8, referente à segunda fração que apresentou atividade biológica, mostra um espectro mais limpo, ou seja, a amostra está mais purificada.

No entanto, se refere a um composto diferente a primeira fração, ou seja, os sinais de hidrogênio que apresentam são totalmente diferentes dos apresentados nas figuras 5.6 e 5.7, podendo ter outro antibiótico devido à ausência dos sinais apresentados nos espectros anteriores correspondentes a cefamicina C. Não é possível perceber visualmente qual o composto em questão. Além disso, já não é notado o sinal intenso do contaminante em 1,9 ppm. Ainda, pode-se dizer a respeito desta figura que o composto bioativo se apresenta em baixa concentração visto que são notados os sinais de diversos contaminantes.

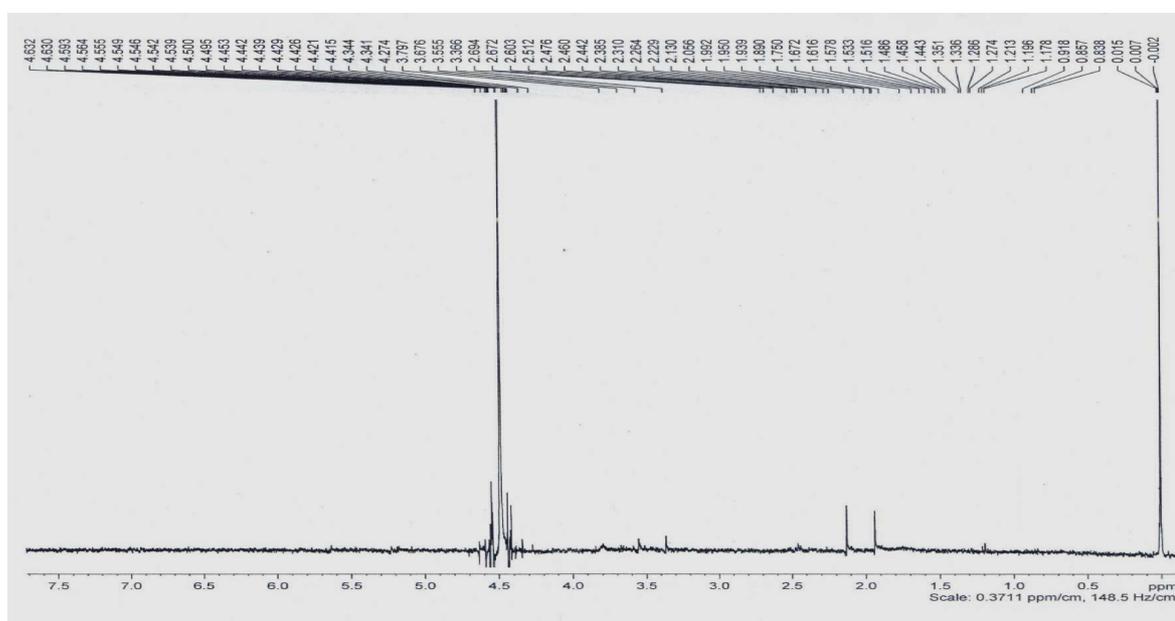


Figura 5.8. Espectro 6, RMN-¹H da fração 58, aplicação da amostra do Experimento 1, obtida da eluição com 1,0 % de NaCl. (D₂O, 400 MHz).

Experimento 3

Neste experimento foram utilizadas concentrações ainda menores de NaCl como eluente, com a finalidade de poder diminuir o efeito do sal em análises de espectrometria de massas.

Os resultados obtidos neste experimento estão apresentados na Figura 5.9.

De acordo com esses resultados é possível verificar que, durante a lavagem com água não há exaustão de compostos com atividade, indicando que grande parte do composto foi adsorvida pelos sítios da resina. É possível verificar que para uma concentração

de NaCl de 0,1% (m/v) se inicia a eluição do primeiro composto ou de um grupo de compostos.

No entanto, à medida que se aumentou a concentração de NaCl, novas frações foram eluídas. É possível que a primeira fração se refira a um antibiótico, e as seguintes, a outros.

No entanto, isso pode estar ocorrendo devido à formação de multicamadas de soluto na superfície da resina devido à força eletrostática exercida nos diferentes compostos. As camadas mais afastadas da superfície se ligam mais fracamente, sendo, portanto, eluídas com uma baixa concentração (neste caso 0,1 % m/v) e as que estão mais próximas da superfície são eluídas com maiores concentrações. Entretanto, deve-se ressaltar que isso não pode estar ocorrendo com a fração majoritária presente no intervalo IX, pois esta é eluída com uma concentração específica de 1,25% m/v de NaCl e no transcorrer do ensaio de eluição, que vai do término da primeira fração majoritária no intervalo V até o início da eluição desta segunda fração (segundo pico) no intervalo IX, não houve outra fração que apresentasse esta atividade.

Assim, é provável que se trate de dois compostos diferentes.

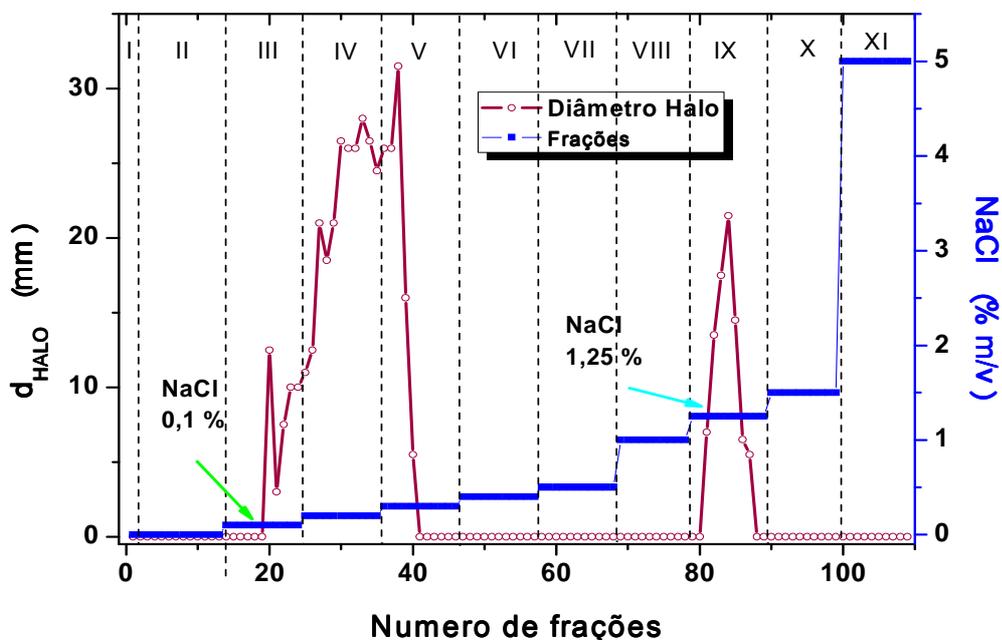


Figura 5.9. Resultado do experimento 3 diâmetro de halo de inibição em função do número de frações. I - aplicação da amostra, II - eluição com água, e eluição com solução de NaCl a diferentes concentrações: III - NaCl 0,1 % m/v; IV - NaCl 0,2 % m/v; V - NaCl 0,3 % m/v; VI - NaCl 0,4 % m/v; VII - NaCl 0,5% m/v; VIII - NaCl 1,0% m/v; IX -NaCl 1,25% m/v; X - NaCl 1,5% m/v e XI - NaCl 5,0% m/v.

As frações 27, 30, 38 e 84 que apresentaram maior halo de inibição, também foram analisadas por RMN-¹H e os resultados encontram-se apresentados nas Figura 5.10, 5.11, 5.12 e 5.13. Estas análises por RMN foram importantes, neste caso, para mostrar que o caldo ficou muito mais limpo, com menos interferentes, quando comparado com o caldo eluído do experimento anterior (Experimento 2 no item 5.3.2). Isto, possivelmente, ocorreu por características do processo de produção e mesmo por características do processo de eluição. Neste experimento 2, a eluição do primeiro pico foi feita com duas concentrações de NaCl (intervalos III e IV, com 0,2% e 0,4% m/v, enquanto que neste terceiro experimento foram utilizadas 3 intervalos de concentrações de NaCl (intervalos III, IV e V, com 0,1%, 0,2 e 0,3% m/v. Este maior gradiente de grau permitiu uma maior limpeza no caldo. De acordo com os resultados obtidos de RMN-¹H é possível observar que na fração 27, Figura 5.10, são observados sinais interessantes pertencentes a um composto que apresentou atividade, mas estes sinais não são característicos de um composto beta-lactâmico. Novamente, apresenta-se o sinal do contaminante em 1,9 ppm.

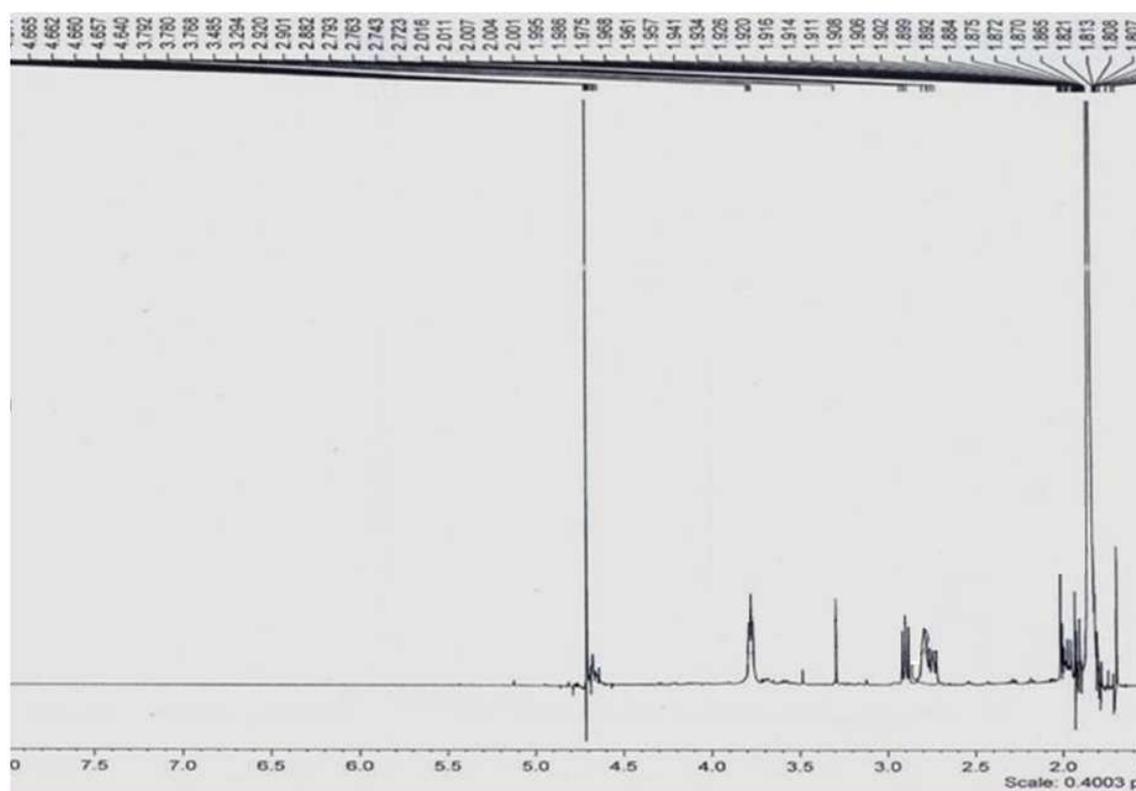


Figura 5.10. Espectro 7, RMN-¹H da fração 27, eluída com 0,2 % de NaCl. (D₂O, 400 MHz). Com aplicação de uma amostra obtida das frações 7 – 18 reunidas do Experimento1.

No entanto, a fração 30 (Figura 5.11) é semelhante ao espectro número 4 (Figura 5.6), onde são observados, novamente, os sinais dos hidrogênios característicos da cefamicina C em 3,6 ppm e 5,2 ppm, além do contaminante perto de 1,9 ppm.

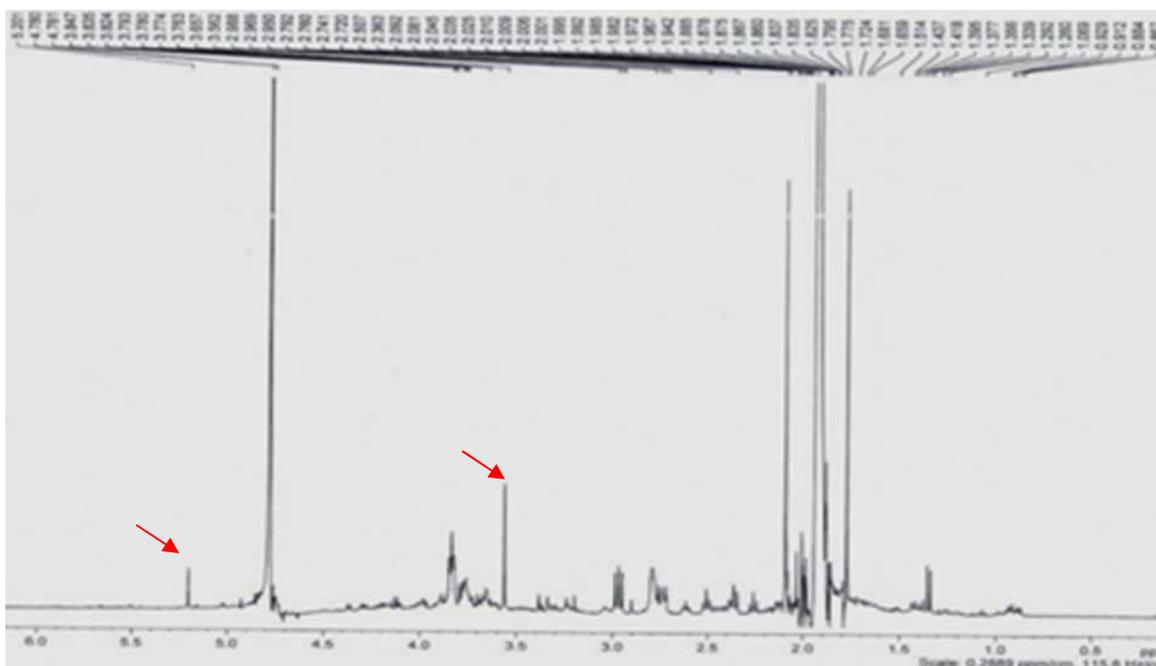


Figura 5.11. Espectro 8, RMN-¹H da fração 30, eluída com 0,2 % de NaCl. (D₂O, 400 MHz). Com aplicação de uma amostra obtida das frações reunidas 7 - 18 do Experimento1.

Também se pode dizer que o espectro mostrado na Figura 5.12 apresenta sinais de hidrogênio maiores que o apresentado na fração 30 (Figura 5.11), indicando que, nesta fração, a concentração deste composto é majoritário, coincidindo com o bioensaio realizado, cujo resultado encontra-se na Figura 5.9, onde esta fração mostrou um diâmetro de inibição maior.

Isto permite dizer que é mais eficiente a eluição deste composto com 0,3 % m/v de NaCl, nas condições em que foi realizado o experimento. Este espectro é muito semelhante ao espectro da Figura 5.4, além de exibir sinais característicos deste antibiótico (cefamicina C).

Para o segundo grupo de compostos ativos, que também se apresentou mais puro neste terceiro experimento (Figura 5.13), pertencente a fração 84, pode-se observar claramente que trata-se de um composto totalmente diferente obtido no intervalo IX em comparação com as outras frações obtidas no primeiro pico. Isto é, neste espectro não se observa os sinais característicos da cefamicina C.

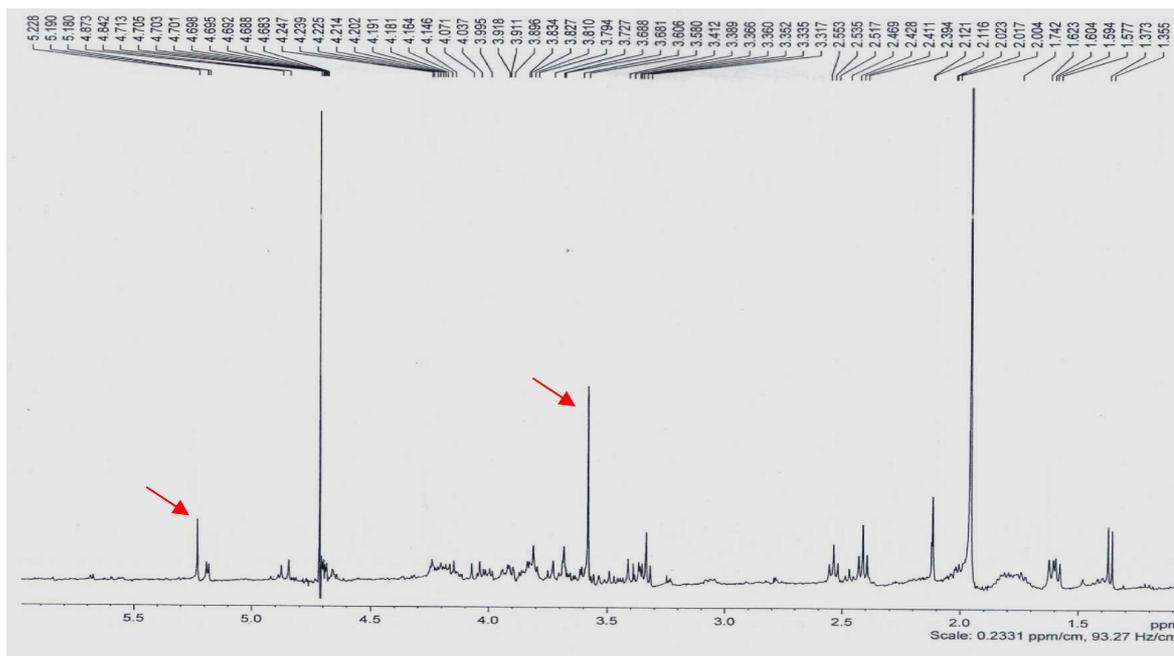


Figura 5.12. Espectro 9, RMN-¹H da fração 38. Obtida da eluição com 0,3 % de NaCl. (D₂O, 400 MHz). Com aplicação de uma amostra obtida das frações reunidas 7 - 18 do Experimento1.

O fato de incrementar o gradiente degrau, quando comparado com o experimento 2, permitiu a retirada de contaminantes que, provavelmente, saíram em diferentes concentrações de NaCl.

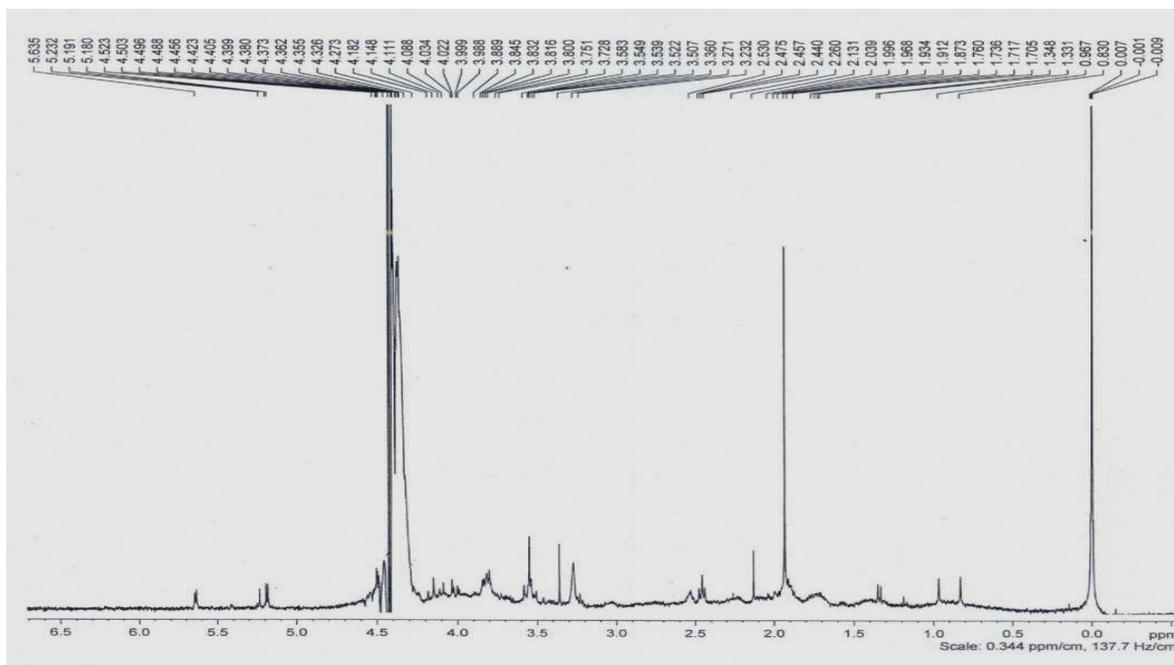


Figura 5.13. Espectro 10, RMN-¹H da fração 84, pertencente ao intervalo IX. Obtida da eluição com 1,25 % de NaCl. (D₂O, 400 MHz).

As análises de RMN, no entanto, não permitiram concluir a respeito dos compostos que foram separados neste experimento com a resina QXL. Provavelmente, estes compostos estão presentes em menor concentração quando comparados com os de outros produtos presentes nas amostras, sendo assim, mascarados nesta análise.

5.3.2 Eluição com acetato de sódio CH_3COONa

Experimento 1

Os resultados obtidos neste primeiro experimento, utilizando acetato, estão apresentados na Figura 5.14.

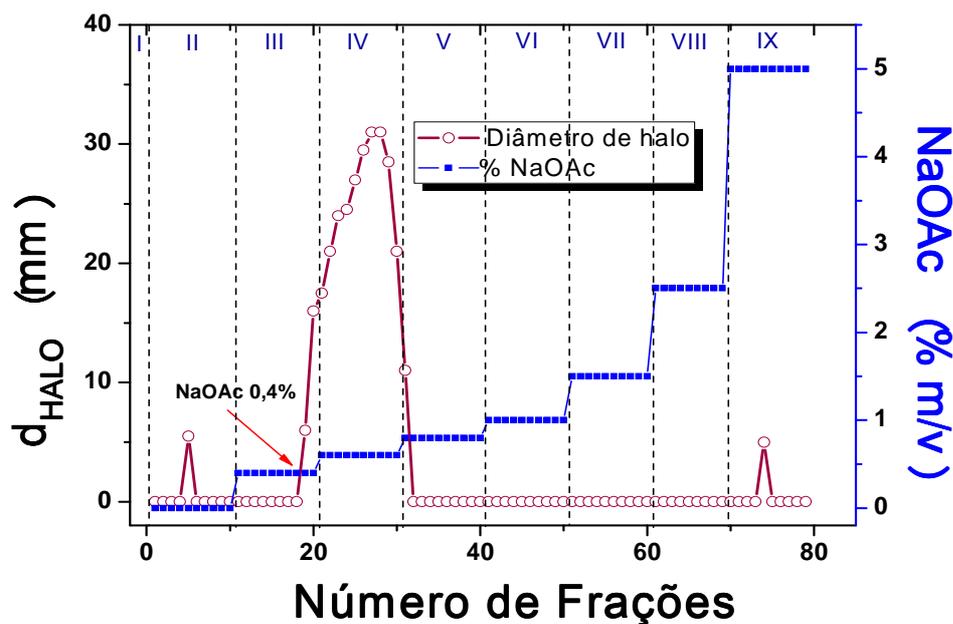


Figura 5.14. Experimento 1 com acetato de sódio diâmetro de halo de inibição em função do número de frações. Observa-se I – aplicação da amostra, II – lavagem com água, e eluição com NaOAc a diferentes concentrações: III – 0,4 % m/v; IV – 0,6 % m/v; V – 0,8 % m/v; VI – 1,0 % m/v; VII – 1,5 % m/v; VIII – 2,5 % m/v e IX – 5,0 % m/v.

De acordo com este experimento foi possível verificar que uma pequena fração foi eluída ainda durante o processo de lavagem da coluna, sendo que outras duas frações foram eluídas a diferentes concentrações de acetato, indicando a presença de dois compostos com atividade antibacteriana. O primeiro composto eluiu com uma concentração de acetato de sódio de 0,4% m/v, enquanto que o segundo eluiu com uma concentração de 5% m/v de sal.

Esta segunda fração apresentou um diâmetro de halo menor do que aquele obtido com NaCl, referente aos experimentos anteriores. É possível que este segundo composto esteja simplesmente presente em menor concentração do que os outros. Esse resultado pode ser um indicativo de que o segundo composto seja mais facilmente degradado do que o primeiro, pois vale ressaltar que a amostra utilizada neste experimento ficou armazenada em ultrafreezer por um maior período de tempo.

Análise por Espectrometria de Massa

A fração 27 deste experimento foi submetida à análise por espectrometria de massas. O resultado desta análise está ilustrado na Figura 5.15. Este espectro foi feito por ionização de eletro-spray (ESI+) através de inserção direta da amostra e os íons foram monitorados na faixa de m/z 100 - 500.

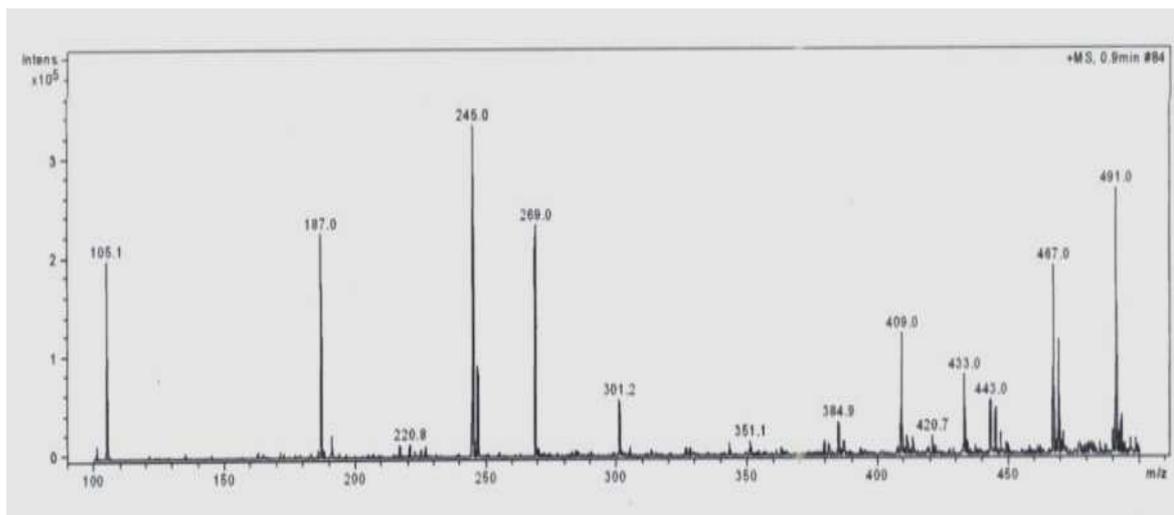


Figura 5.15. Espectro de massas da amostra 27 eluída com 0,6% m/v NaCl..

Na Figura 5.16, pode-se observar o mesmo espectro ampliado na região de interesse.

De acordo com os resultados apresentados neste espectro é possível verificar uma ampla gama de íons cuja relação massa carga varia de m/z 100 a 500. Através do espectro, observa-se o íon de m/z 446,9 referente a um íon protonado $[M+H]^+$ muito próximo ao valor esperado para a Cef, cujo valor m/z já detectado em outros experimentos foi de 447,2 referente a massa molecular da cefamicina C protonada $[M+H]^+$, não sendo possível confirmar a presença de cefamicina C na amostra analisada. Para uma análise mais conclusiva haveria a necessidade de se fazer uma análise por espectrometria de massas de alta resolução.

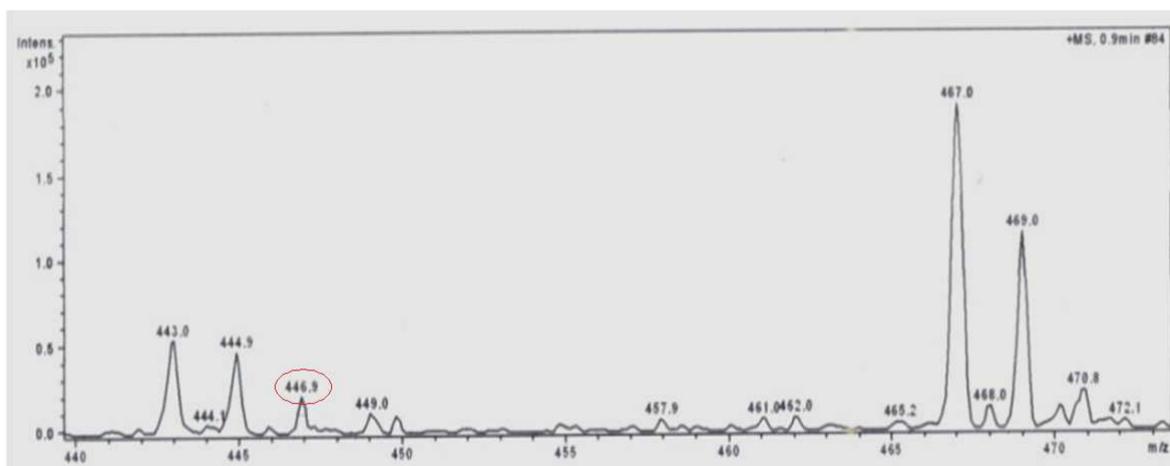


Figura 5.16. Ampliação do Espectro de massas da amostra 27 na faixa de íons de interesse (Cef).

Experimento 2

Os resultados obtidos no segundo experimento realizado com a solução de acetato de sódio como eluente são apresentados na Figura 5.22.

Neste gráfico são apresentados os resultados da leitura em linha feita no espectrofotômetro UV em 254 nm. De acordo com o resultado obtido é possível verificar que, neste caso, o comportamento durante a alimentação, lavagem e primeira eluição foi similar ao do experimento obtido em 5.3.2-1. Vale destacar a importância deste resultado sob o ponto de vista analítico, que embora não forneça um resultado quantitativo, fornece um resultado qualitativo que representa satisfatoriamente o caminho percorrido pelo composto com atividade biológica. A eluição do composto iniciou-se em aproximadamente entre 0,3 e 0,4% (m/v) de acetato de sódio, pois neste resultado pode-se observar o deslocamento na linha de base gerando interferência. É importante mencionar que o tipo de eluente interfere na leitura no espectrofotômetro UV.

Não foi verificada a ocorrência de eluição após da detecção do primeiro pico (Figura 5.17 e Figura 5.18), ou seja, a presença do segundo grupo com atividade (segundo pico, ver Figura 5.19).

As análises realizadas por CLAE e bioensaio permitiram uma melhor discussão deste resultado.

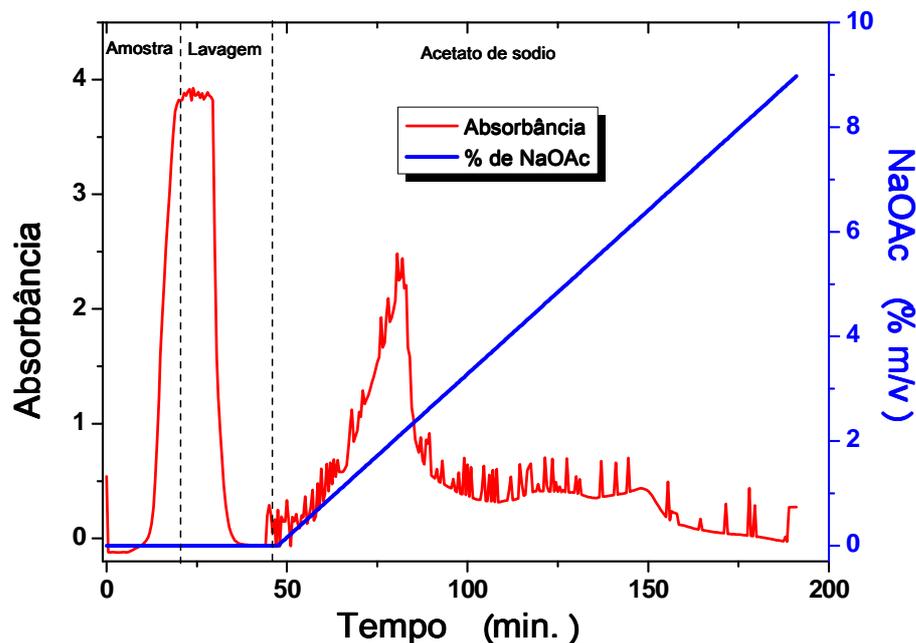


Figura 5.17. Absorbância em função do tempo ($\lambda = 254 \text{ nm}$) da cromatografia realizada com acetato de sódio, em resina QXL e eluída com um gradiente degrau de H₂O:NaOAc 1:1.

Leituras no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (eluente Acido acético)

Os resultados obtidos nesta análise estão apresentados na Figura 5.18, onde mostra o mesmo comportamento daquele obtido por leitura no espectrofotômetro. Neste caso, é observado um cromatograma das amostras coletadas com o tempo, novamente, se verifica a saída do composto ainda durante a alimentação sendo que a eluição foi verificada a uma concentração de acetato de sódio de $\sim 0,4\%$ (m/v).

Novamente, tem-se uma análise qualitativa do experimento, sendo possível definir a concentração de eluente que permite a eluição do composto.

Esta metodologia desenvolvida utilizando CLAE, a rigor, permite obter um pico referente à cefamicina C, podendo estar sujeito à presença de outros compostos que deixam a coluna no mesmo tempo de retenção. No entanto, este resultado (análise em CLAE a 254 nm) prevê, majoritariamente, a presença do antibiótico.

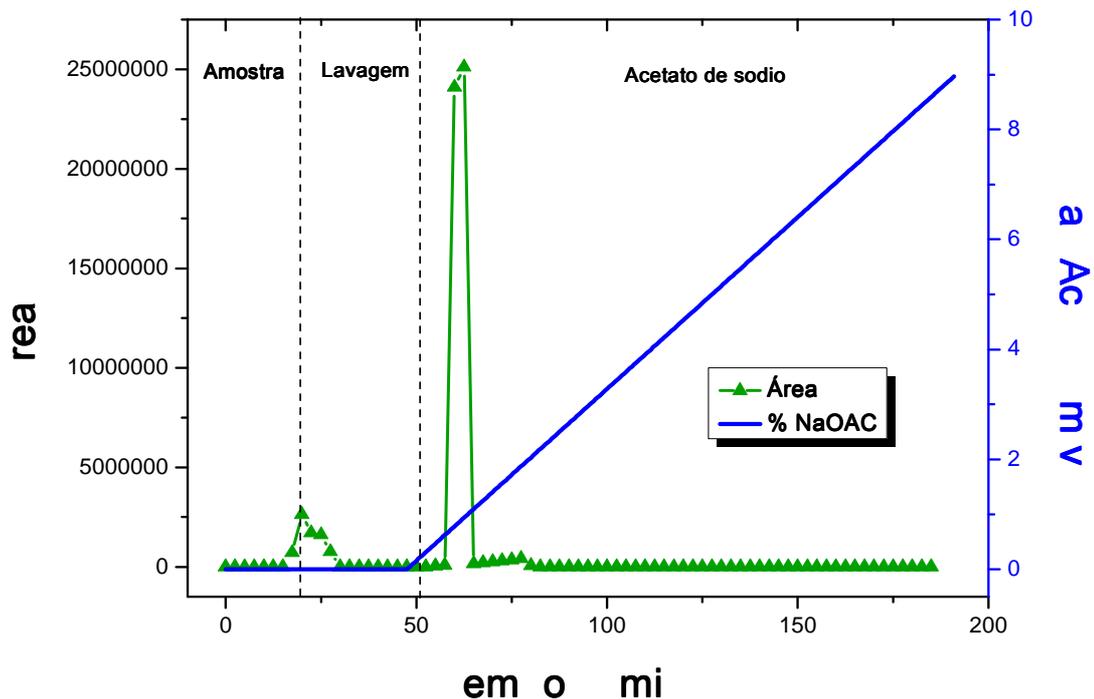


Figura 5.18. Cromatograma dos volumes injetados através de um gradiente degrau de H₂O : NaOAc.

Assim, eventuais compostos com atividade antibacteriana, diferente desta cefalosporina, não são detectados nesta metodologia, estando em concordância com o resultado obtido segundo a Figura 5.17, mediante a análise por espectrofotometria UV-Vis.

Teste da Atividade Bacteriológica contra *E. coli*.

Para a confirmação dos resultados obtidos por espectrofotometria UV-Vis e por CLAE, todas as amostras foram analisadas pela metodologia de bioensaio. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.19.

De acordo com estes resultados, há comprovação qualitativa do comportamento do processo de adsorção, lavagem e eluição da coluna. Somando-se aos resultados anteriores, o aparecimento de uma fração com atividade biológica, que não havia aparecido nas análises em linha por espectrofotometria e por CLAE, o que leva a concluir que estas duas metodologias não são sensíveis ao aparecimento deste segundo composto.

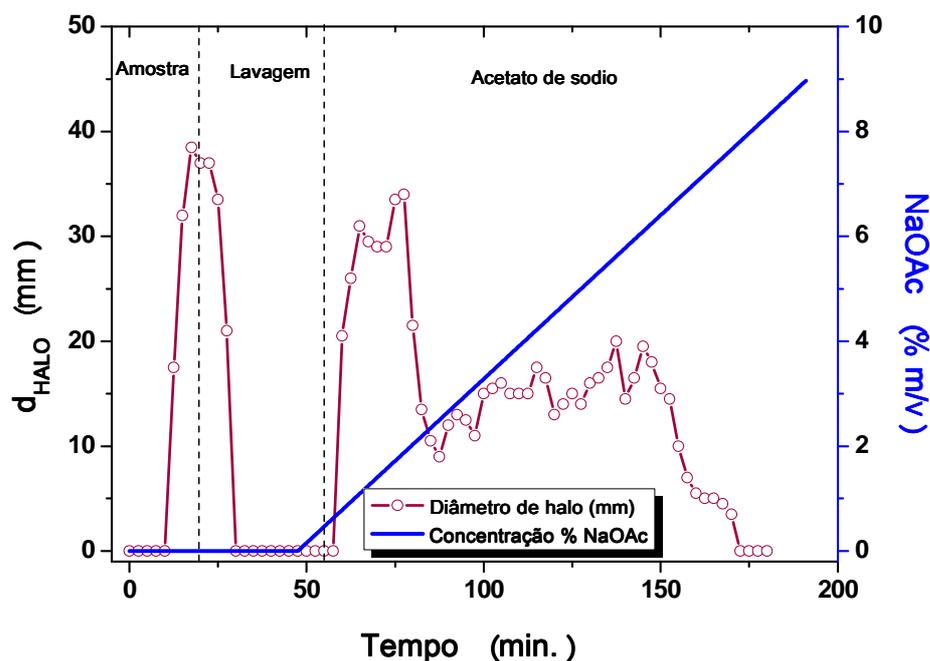


Figura 5.19. Diâmetro de halo de inibição em função do tempo do processo para diferentes concentrações de NaOAc. Cromatografia realizada com a resina QXL e eluída com concentrações diferentes desta sal e realizada através de um gradiente degrau de H₂O : NaOAc.

O resultado obtido, no entanto, vem confirmar os demais resultados obtidos nos experimentos. Esta eluição em rampa, entretanto, não permitiu uma boa separação entre as duas frações.

5.4 Caldo obtido por cultivo em batelada alimentada

5.4.1 Eluição com cloreto de sódio NaCl

Experimento 1

Tendo em vista os resultados apresentados anteriormente, nesta etapa do trabalho serão apresentados os resultados experimentais tal como é detalhado na seção 4.4.1.1.

Na Figura 5.20 apresenta o comportamento dos resultados obtidos. Cabe lembrar que este caldo não foi concentrado como nos casos anteriores. Devido ao uso de um volume menor de caldo (20 mL) é possível verificar que a coluna não alcançou o ponto de

saturação com compostos ativos de acordo com o observado nos intervalos I e II. A primeira fração (intervalo III) foi eluída completamente, com 0,1 % m/v do eluente garantindo desta forma a obtenção do composto de interesse em uma única concentração de sal.

Não foi possível realizar uma análise mais detalhada dos espectros RMN destas substâncias, pois seriam necessários os demais espectros mono e bidimensionais. Além disso, as impurezas presentes nas amostras interferiram em suas análises.

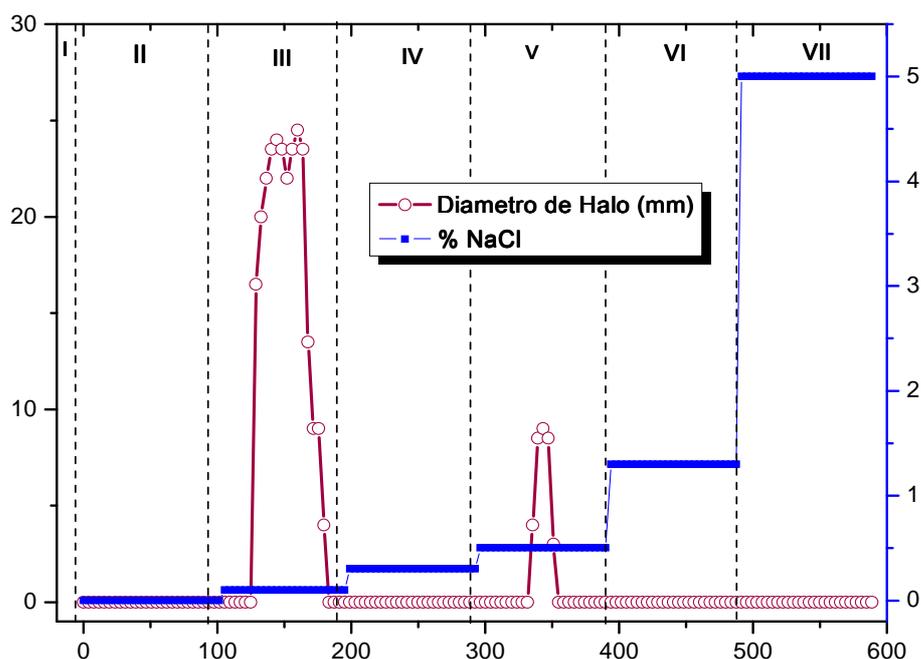


Figura 5.20. Resultado do diâmetro de halo de inibição em função do tempo do processo. O intervalo I - aplicação da amostra, II - lavagem, e a eluição em III - NaCl 0,1 % m/v; IV - NaCl 0,3 % m/v; V - NaCl 0,5 % m/v; VI - NaCl 1,3 % m/v; VII - NaCl 5,0 % m/v.

Outro fato importante de mencionar é que houve adsorção irreversível de substâncias pela resina que apresentaram uma coloração escura. Devido ao emprego de uma pequena quantidade de caldo fermentado durante a aplicação, não foram feitas análises por RMN-¹H.

Na Figura 5.21 é apresentado o resultado das amostras analisadas em CLAE, onde só foi lido o primeiro composto referente à cefalosporinas. Ressalta-se que o segundo pico com atividade não foi detectado pelo método desenvolvido.

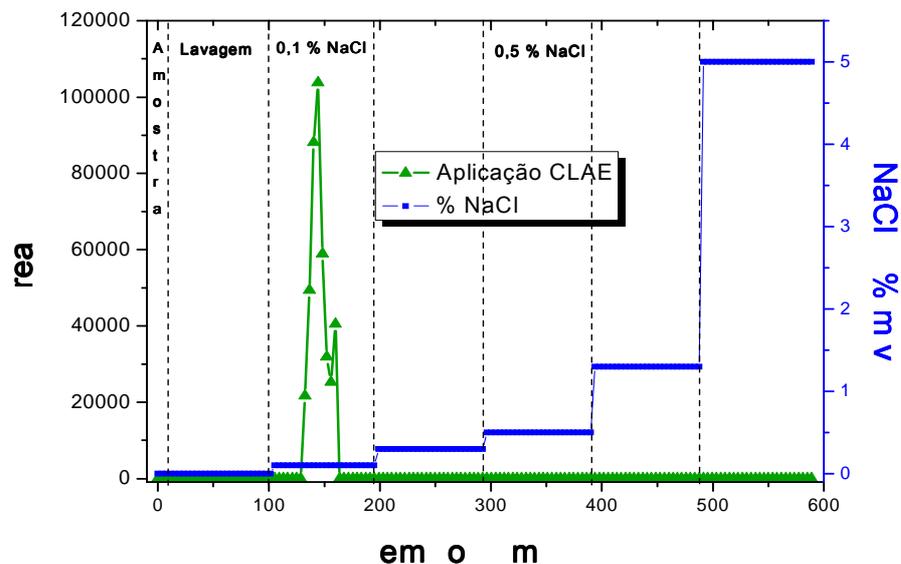


Figura 5.21. Variação da área e da concentração de NaCl com o tempo. Leturas obtidas no CLAE a um $\lambda = 254$ nm.

Experimento 2

Os resultados obtidos neste experimento são ilustrados na Figura 5.22, indicando a presença de um primeiro pico no intervalo II (durante a lavagem), mostrando que a coluna havia atingido o ponto de saturação, pois foi injetado um volume de 50 mL de caldo.

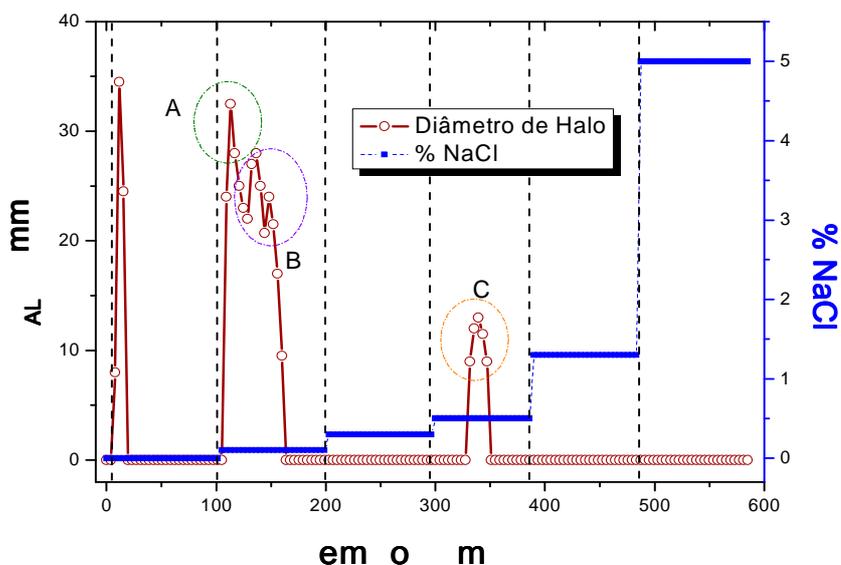


Figura 5.22. Resultado do Experimento 5; variação do diâmetro de halo de inibição em função do tempo de processo. Cromatografia realizada com a resina QXL. O intervalo I - aplicação da amostra, II - lavagem, e a eluição com solução de NaCl a diferentes concentrações: III - NaCl 0,1 % m/v; IV - NaCl 0,3 % m/v; V - NaCl 0,5 % m/v; VI - NaCl 1,3 % m/v; VII - NaCl 5,0 % m/v.

Foram realizadas análises de RMN-¹H das regiões A, B e C da Figura 5.2.2, e por apresentarem quantidades pequenas de compostos de interesse, estes não foram detectados.

Na Figura 5.23 são ilustrados os resultados das amostras analisadas no CLAE.

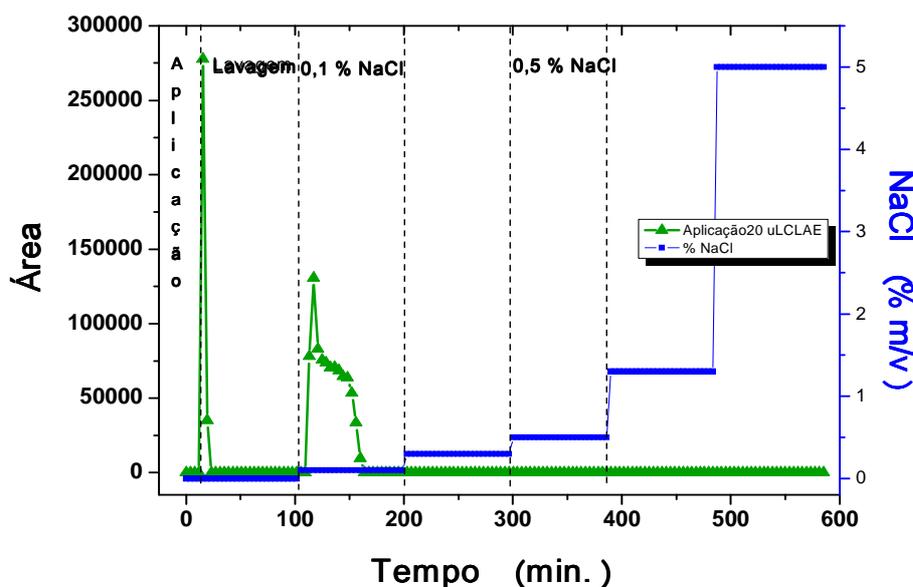


Figura 5.23. Leturas obtidas no CLAE do experimento 5, com $\lambda = 254$ nm.

Experimento 3 - Bioensaio mudando o pH das frações que apresentaram atividade

É importante mencionar os seguintes fatos de se medir o pH inicial de cada uma das amostras diluídas em H₂O milli-Q:

1. Para a análise da fração denominada Cef, este apresentou um pH 8,2 e foi ajustado a 7. Tomou-se 13 amostras desde pH 7,0 até pH 1.0.
2. Para a análise da segunda fração com atividade denominada Pen-1, o pH se apresentava inicialmente a 6,3 e foi feito um ajuste a pH 7,0. Esta solução apresentou características de difícil ajuste ao valor de pH 7,0 .
3. Devido ao problema anteriormente mencionado, foi utilizada uma segunda amostra, denominada Pen-2, que se encontrava a um pH inicial de 5,8 e, novamente, o problema ocorreu. Desta forma, decidiu-se trabalhar a partir deste pH, tanto para a amostra Pen-1 quanto para a Pen-2. Assim, quantificou-se as amostras até pH igual a 1.

Os resultados obtidos indicam que estes compostos mostraram comportamentos muito diferenciados em diferentes valores de pH, que outorgam propriedades e características muito interessantes, apresentadas na Figura 5.24.

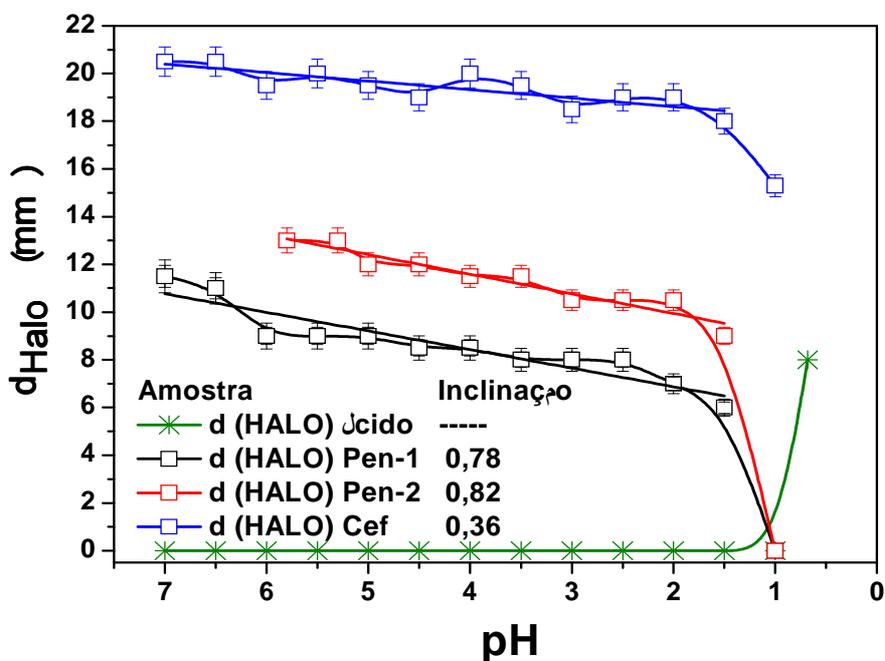


Figura 5.24. Variação do diâmetro do Halo em função do pH.. As linhas sólidas mostram o comportamento linear desses pontos.

Na legenda da Figura 5.24 é mostrado a inclinação de ajuste linear realizado para a variação do diâmetro do halo em função do pH, correspondentes a cada amostra. Observa-se nas curvas da Figura 5.24 que o composto denominado Cef, apresentou atividade contra organismos gram-negativos e é mais estável a pH ácidos em comparação com as outras amostras denominados Pen. Isto pode ser notado através do ajuste linear dos pontos (e as respectivas barras de erros de cada amostra), onde vemos que a amostra Cef possui uma menor inclinação (0,36) em comparação aos outros compostos Pen-1 e Pen-2 com maior inclinação (0,78 e 0,82 respectivamente), evidenciando maior instabilidade com o incremento da acidez nestes dois últimos compostos. Ainda por observação a esta figura, vale ressaltar que foi apresentada uma solução aquosa a diferentes valores de pH (entre 7,0 e 0,6), sendo estas submetidas a análise por bioensaio, a fim de se verificar a influência do pH na determinação do halo de inibição. Estes resultados mostram que a solução ácida não interfere na análise por bioensaio a menos do valor de pH em 0,6. Isto corrobora com os resultados obtidos para as soluções contendo os compostos bioativos.

Em tempo, pode-se comprovar que o segundo composto com atividade corresponderia a uma penicilina por apresentar uma estrutura elevadamente instável e hidrolisável em meios ácidos, particularmente, abaixo de pH 2,0 e segundo o ajuste a pH 1,0 este composto apresentou alta degradação. De acordo com a literatura, Nágaraian (1972) propõe que para recuperar os caldos de cefamicina C, o pH do caldo de cultivo é ajustado entre 2,0 – 2,5 para inativar a penicilina N e, também, de acordo com Schubert (1980), para obter cefamicina C no processo é necessário inativar a penicilina N por ajuste do pH entre 1,8 – 2,5.

No transcorrer do trabalho foi verificado que para as frações referentes ao segundo pico de eluição na coluna com a resina QXL, quando congeladas e descongeladas, por sucessivos intervalos, o valor do pH sempre diminui. Por hipótese, pode-se apresentar que isto ocorre com a degradação das penicilinas que, em geral, formam ácido penicilóico.

Cabe lembrar que as estruturas químicas das penicilinas são mais instáveis que as das cefalosporinas. Sendo que, se este segundo composto apresentar a estrutura de uma penicilina e o primeiro, a estrutura de uma cefalosporina, certamente aquele será mais suscetível à degradação.

5.4.2 Eluição com acetato de sódio CH_3COONa

Experimento 1

Os resultados obtidos com eluição, utilizando-se acetato de sódio na forma degrau, estão apresentados na Figura 5.25.

De acordo com os resultados, obteve-se a saturação da coluna e a fração correspondente à cefamicina C é mostrada no intervalo III, que foi obtida com um 0,4 % m/v de sal. Este resultado é semelhante aos obtidos na seção A (Experimentos 4 e 5), pois este composto sai com a mesma concentração de sal. Devido a um erro no experimento não foi possível extrair dados sobre o segundo composto, mas este resultado foi importante para indicar as condições experimentais do trabalho subsequente onde se diminuiu a concentração do sal.

Na Figura 5.26 são apresentadas as análises das frações realizadas em CLAE. O cromatograma em função das áreas apresenta o pico das cefalosporinas nas frações eluídas com 0,4 % m/v de acetato de sódio.

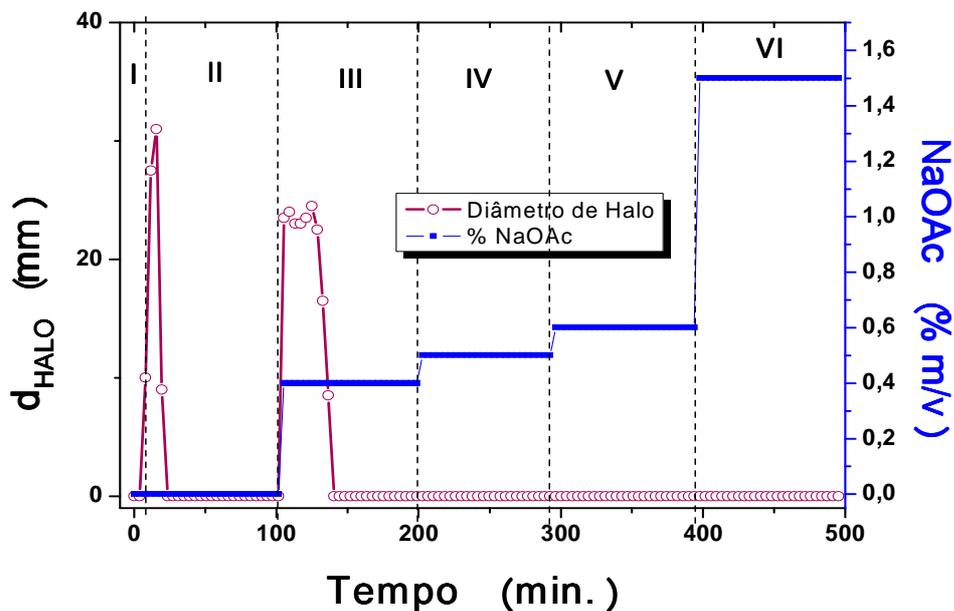


Figura 5.25. Experimento 1 usando acetato de sódio. Diâmetro de halo de inibição em função do tempo do processo. I – aplicação da amostra, II – eluição com água, e eluição com NaOAc a diferentes concentrações: III – 0,4 % m/v; IV – 0,5 % m/v; V – 0,6 % m/v; VI – 1,5 % m/v; VII.

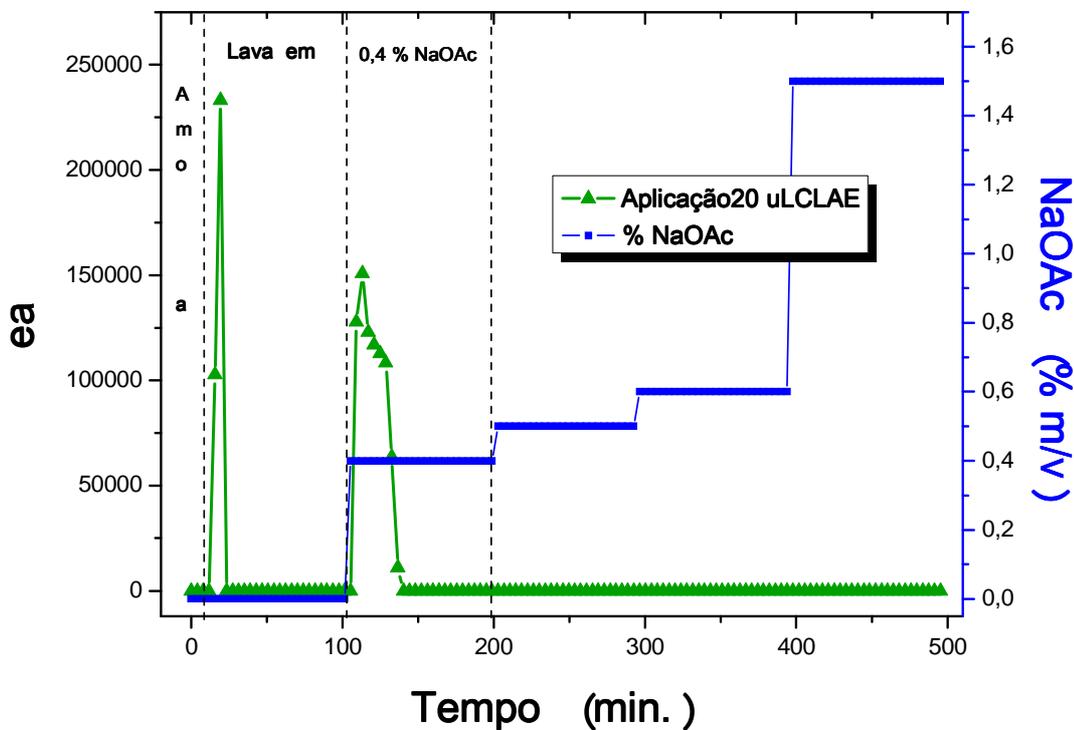


Figura 5.26. Variação da área obtida por cromatografia e variação da concentração de NaOAc em função do tempo. Cromatograma dos volumes injetados do CLAE do experimento 1 ($\lambda = 254$ nm).

Experimento 2

Neste experimento foi obtido o mesmo resultado anterior, no entanto, com uma concentração menor de sal sendo 0,2 % (m/v). O segundo composto ativo deixou a coluna com uma concentração maior de sal, sendo este de 2,5 % (m/v). Neste caso, observa-se um comportamento totalmente diferente aos resultados anteriores, dando a entender que este composto apresenta um comportamento fortemente iônico, onde o acetato de sódio não possui força iônica suficiente para conseguir eluir o composto da resina.

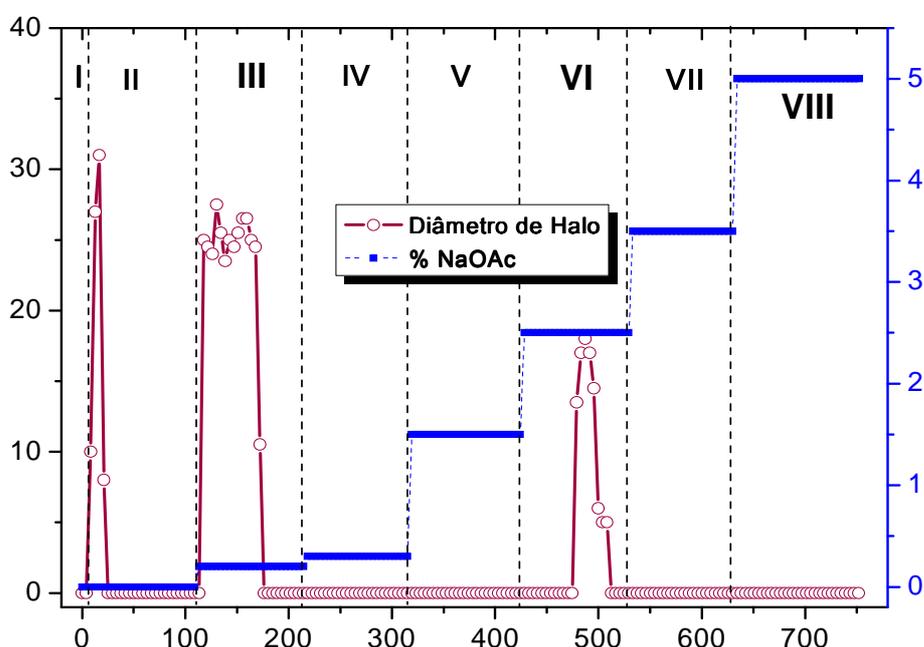


Figura 5.27. Experimento 2, diâmetro de halo de inibição em função do tempo de processo. Cromatografia realizada com a resina QXL da Amershan. I – aplicação da amostra, II – eluição com água, e eluição com NaOAc a diferentes concentrações: III – 0,2 % m/v; IV – 0,3 % m/v; V – 1,5 % m/v; VI – 2,5 % m/v; VII – 3,5 % m/v; VIII – 5,0 % m/v.

A Figura 5.28 apresenta o resultado das amostras analisadas por CLAE, sendo detectadas cefalosporinas. O segundo pico com atividade não foi detectado, novamente.

Na análise dos espectros por RMN-1H (Figura 5.29) foi obtido um sinal do acetato (aproximadamente de 2 ppm), que atrapalhou a análise dos resultados. Isto indica que o melhor eluente é o NaCl para análise por RMN.

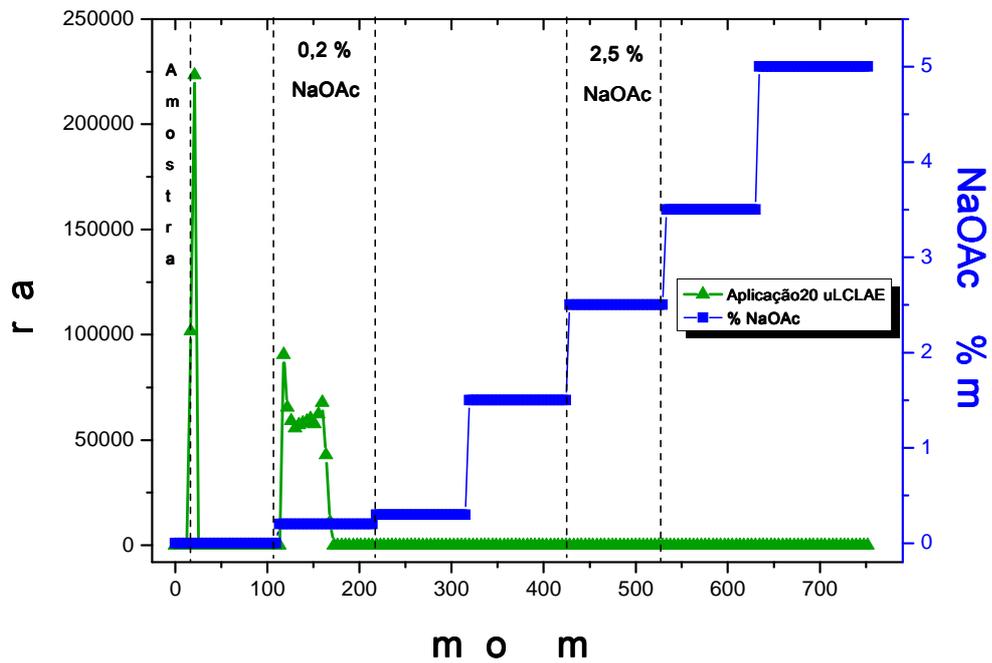


Figura 5.28. Cromatograma dos volumes injetados do CLAE do experimento 2 ($\lambda = 254$ nm). Áreas do picos e de concentração de NaOAc (% m/v) em função do tempo.

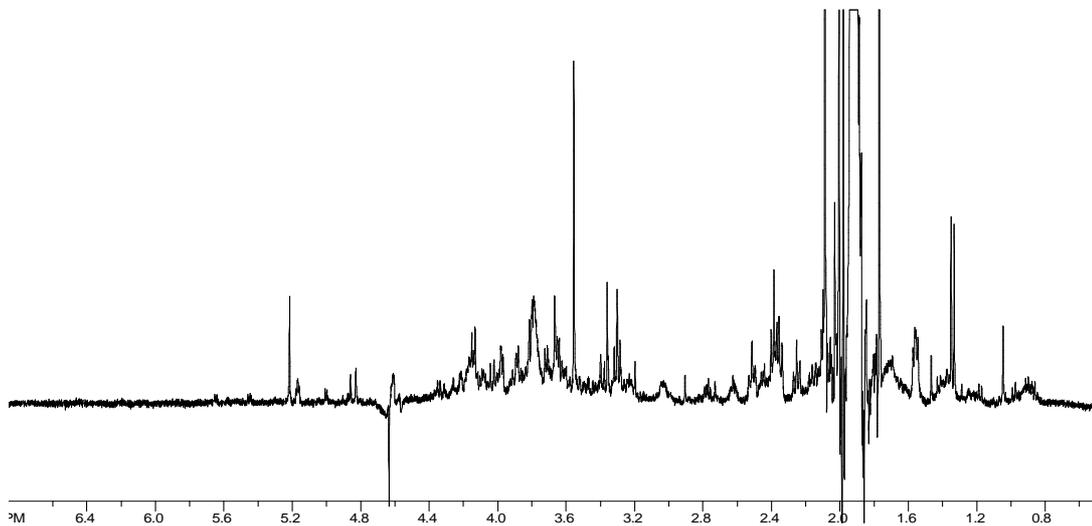


Figura 5.29. Interferência do acetato na região dos sinais de hidrogênio da cefalosporina.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível separar duas frações bem definidas com atividade antibacteriana, utilizando-se a resina QXL e ambos os caldos de cultivo.
- Foi possível verificar que a metodologia adotada (seqüência de etapas) permitiu uma melhor clarificação do caldo de cultivo, tendo sido verificada pelos espectros de RMN-1H.
- A utilização da UF e da adsorção a pH 6,8 com a resina Amberlite XAD-4 promoveu uma purificação no caldo.
- Os eluentes NaCl e CH₃COONa permitiram a eluição similar de compostos da coluna empacotada com a resina QXL, mas o eluente NaCl mostrou ser mais eficiente que o CH₃COONa, devido a este último ter provocado distorção dos sinais nos resultados dos espectros por RMN-¹H.
- A introdução repetida na coluna QXL levou a um produto final mais puro, segundo os resultados obtidos nos primeiros experimentos trabalhados com um caldo de cultivo obtido em batelada.
- A utilização de espectrofotometria UV/Vis permitiu um monitoramento do comportamento da eluição das frações que contenham atividade antibiótica.
- Foi possível comprovar a detecção da cefalosporina mediante a metodologia analítica desenvolvida no DEQ.
- O primeiro composto denominado “Cef” é eluído com concentrações muito baixas de sal. Segundo os espectros de RMN-1H poderia tratar-se da cefamicina C mas está presente em pequenas quantidades. Devido a esse fato, na análise por EM, estes sinais são sobrepostos pelos sinais de impurezas que estão presentes em maior quantidade.

- O segundo composto obtido denominado “Pen” possui um comportamento diferenciado, segundo o caldo gerado em batelada e em batelada alimentada pela eluição com concentrações muito caracterizadas de eluente.
- O abaixamento do pH das duas frações que apresentaram atividade mostrou que a segunda (segundo pico), a que chamamos de “Pen”, são instáveis a pH ácidos, sendo degradado a um $\text{pH} < 1$, acontecendo o contrário com a primeira fração.

CONCLUSÕES PONTUAIS

Com relação ao uso de solução de NaCl

- Utilizadas em grandes quantidades danificam o espectrômetro de Massa, isto é uma desvantagem, sendo necessária a retirada de sal.
- Na análise de RMN-1H, as concentrações maiores (NaCl) interferem nos resultados, isto é evidenciado nos sinais de ruído observado nos espectros.

Com relação ao uso de solução de Acetato de sódio.

- O acetato como eluente produz um deslocamento no sinal do UV ou deslocamento temporal dos picos.
- Nos resultados do RMN-1H foi observado um sinal intenso perto de 2,0 ppm, que sobrepôs os demais sinais.

PERSPECTIVAS

- Aumentar o volume de caldo para conseguir detectar uma maior quantidade de metabólitos com atividade.
- Aumentar o volume de lavagem com água para poder tirar a maior quantidade de impurezas.
- Verificar se é possível diminuir a concentração de eluente inicial, por exemplo, 0,01 % m/v do eluente (NaCl ou de NaOAc). Fazer uma eluição em rampa empregando uma menor concentração de sal. Dos resultados experimentais foi constatado a eluição de compostos ativos apenas aplicados ao eluente com 0,1 % m/v para NaCl e com 0,2 % m/v para NaOAc.

- Recolher as frações obtidas pela passagem na QXL e repetir a metodologia, processando as frações em XAD-4 e, novamente, pela QXL. Realizar esse procedimento repetidamente com o objetivo de melhorar a purificação.
- Analisar aminoácidos, ácido clavulânico e cefalosporina C nas amostras além de outros compostos presentes na rota biossintética da cefamicina C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. Fallon, R.F.G. Booth and L.D. Bell, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17, Ed. Elsevier (1990).

Agustin Pumarola Busquets, Microbiología y Parasitología Médica. Ed. 2, Barcelona, Masson, 1992.

Aharonowitz, Y.; Cohen G., Martín, J. F. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structures, organization, regulation and evolution. Annual Review Microbiology, 46 (1992) 461- 495

Aoki, H.; Sakai, H.; Kohsaka, M.; Konomi, T.; Hosoda J. Nocardicin A, a new Monocyclic α -Lactam Antibiotic. Journal Antibiotics, v. 29, p. 492-500, 1976.

Arnstein, H. R. V.; Morris, D. The structure of a peptide, containing α -aminoadipic acid, cystine and valine, present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. Biochemical Journal, v. 76, p. 357–361, 1960.

Baggaley, K. H.; Brown, A. G.; Schofield, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and clavams. Natural Product Report, v. 14, p. 309-333, 1997.

Barboza, M.; Almeida, R. M. R. G.; Hokka, C. O. Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion-exchange chromatography. Ind. Eng. Chem. Res., v. 41, n. 23, p. 5789-5793, 2002.

Belter, P.A. Ion-exchange Recovery of Antibiotics. In: Moo-Young M. ed. Comprehensive Biotechnology, Pergamon Press, New York, 1985.

Birnbaum, J; Stapley, E. P.; Miller, A. K.; Wallick, H.; Hendlin, D.; Woodruff H.B. Cefoxitin, a semi-synthetic cephamycin: a microbiological overview. The Journal Antimicrobial Chemotherapy, v. 4B, 15–32 (1978).

Blanch, H. W.; Clark, D. S.; Biochemical Engineering New York Marcel Dekker, Inc. (1997).

Borém, A. Melhoria de Plantas, 22 edição, Viçosa: Editora UFV, 1998.

Brakhage, A. A. *In* D. Barton and K. Nakanishi (ed.), Comprehensive natural products chemistry, vol. 4. Amino acids, peptides, porphyrins and alkaloids. Biosynthesis of β -lactam Compounds in Microorganisms, p. 159-193, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 1999.

Brakhage, Axel A. Molecular Regulation of β -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Microbiology And Molecular Biology*, v. 62, n. 3, p. 547-585, setembro, 1998.

Brown, A. G.; Butterworth, D.; Cole, M.; Hanscomb, G.; Hood, J. D. Naturally occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics*, v. 29, n. 6, p. 668-669, 1976.

Coleman, K.; Athalye, M. Bacterial Resistance Mechanisms as Therapeutic Targets. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 33, p. 1091-1116, 1994.

Daust, D. R.; Onishi, H. R.; Wallick, H.; Hendlin, D.; Stapley, E. O. Cephamecins, a New Family of β -Lactam Antibiotics: Antibacterial Activity and Resistance to β -Lactamase Degradation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 3, n. 2, p. 254-261, fevereiro, 1973.

Demain, A. L.; Kupka, J.; Shen, Y. Q.; Wolfe, S.; Microbiological synthesis of β -lactam antibiotics, *Trends in Antibiotic Research. Genetics, biosynthesis, action and new substances*, Editor Humezawa H., Japan And Res Association, Tokio, 1982.

Demain, Arnold L.; Richard, P. Elander. Biosynthesis β -lactum Antibiotics. *Antoine van Leeuwenhoek*, v. 75, p. 381-383, Janeiro/Fevereiro, 1999.

Fukase, H.; Hasegawa, T.; Hatano, K.; Iwasaki, H.; Yoneda, M. C-2801X, a New Cephamycin-type II. Isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, v. 29, n. 2, p. 113-120, 1976.

Ghosh, A. C.; Bora M.; Dutta, N. N. Development in Liquid Membrane Separation of Beta-Lactam Antibiotics. *Bioseparation*, v. 6, p. 91-105, 1996.

Harris, E. L.; Angal, V. S. *Protein Purification Methods-A Practical Approach*, Oxford: Press, 1995.

Harrison, P. G.; Ulrich, S. E.; Zuckerman, J. J. -Lactam antibiotics from *Streptomyces*, *Journal of the American Chemical Society*, v. 93, n. 9, p. 2308-2310, 1971.

Higgins, C. E.; Kastner, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov. β -Lactam Antibiotic Producer. *International Journal System. Bact.* v. 21, n. 4, p. 326-331, 1971.

Hornish, R. E. Paired-ion high-performance liquid chromatographic determination of the stability of novobiocin in mastitis product sterilized by ^{60}Co irradiation. *Journal of Chromatography A*, v. 236, n. 2, p. 469-480, 1982.

Inamine, E. R.; Birnbaum, J. Merck & Co. Inc. Fermentation of Cephamycin C. United States Patent US 3977942, 1976.

Ives, P.R.; Bushell, M.E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, v. 143, p. 3573-3579, 1997.

Iwamatsu, K.; Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Mizutani, K.; Omoto, S.; Ogino, H.; Miyauchi, K.; Watanabe, T.; Niida, T. Synthesis and biological activity of 7 β -(2-amino-2-carboxy)-ethylthioacetamido-7 α -methoxycephalosporin derivatives. *The Journal Antibiotics*, v. 36, n. 3, p. 229-241, 1983.

Jensen, S. E.; Alexander, D. C.; Paradkar, A. S.; Aidoo, K. A. "Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics", eds. R. H. Baltz, G. D. Hegeman, and P. L. Skatrud, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993.

K. Prasad K., P. Sridhar, Solid state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for cephamycin C production. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 4, p. 325-328, junho 1999.

Kern, B. A.; Hendlin, D.; Inamine, E. L-lysine -aminotransferase in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.17, p.674-685, 1980.

Kim, J. K.; Kang, H.; Chae, J. S.; Park, Y. H.; Choi, Y. J. Synthesis of cefminox by cell-free extracts of *Streptomyces clavuligerus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 182, p. 313-317, 2000.

Kohsaka, M.; Demain, A. L. Conversion of penicillin N to cephalosporin(s) by cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 70, n. 2, p. 465-473, 1976.

Kropp, H.; Gerckens, L.; Sundelof, J.G.; Kahan, F.M. Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic. *Review Infect. Dis.*, v. 7, n. 3, p. S389-410, 1985.

Lebelle, M.J.; Lauriant, G.; Wilson, W.L. High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Penicillin V Solid Dosage Forms. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 3, n. 10, p. 1573-1578, 1980.

Lecaillon, J.B.; Rouan, M.C.; Souppart, C.; Febvre, N.; Juge, F. Determination of cefsulodin, cefotiam, cephalixin, cefotaxime, desacetyl-cefotaxime, cefuroxime and cefroxadin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 228, n. 12, p. 257-267, 1982.

Lee, Jae Wook; Park, H. C.; Moon, H. Adsorption and desorption of cephalosporium C on nonionic polymeric sorbents. *Separation and Purification Technology*, v. 12, p. 1-11, 1997.

Liras, Paloma, Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. *Cephamycins produced by actinomycetes. Antonie van Leeuwenhoek*, v. 75, n. 1-2, p. 109-124, 1999.

Liras, Paloma; Martin, Juan F. Complexos génicos (“clusters”) de antibióticos β -lactámicos e controle de sua expressão: por que se originaram, e de onde procedem?. *International Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 9-19, março, 2006.

Madigan; Martinko; Parker. *Microbiologia de Brock*. Prentice Hall, Pearson; 10ª edição, 2004.

Méndez, R.; Di Donna G.; Sanchez, S. Avances y Contribución de la Biología Molecular en la Biosíntesis de los Antibióticos Beta-Lactámicos. *B.E.B.*, v. 16, n. 1, p. 17-21, 1980.

Miller, I. M.; Stapley, E. O.; Chalet, L. Production of synnematin B by a member of the genus *Streptomyces*, *Bacteriol. Proceeding*, v. 32, p. A49, 1962.

Miller, R.D.; Neuss, N. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 67, 1983.

Miller, T.W.; Goegleman, R.T.; Weston, R.G.; Putter, I.; Wolf, F.J. Cephamycins, a New Family of β -Lactam Antibiotics II. Isolation and Chemical Characterization. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 2, n. 2, p. 132-135, 1972.

Morão, Ana I. Cavaco; Brites, A. M. Alves.; Afonso, Maria Diná. Concentration of clavulanic acid broths: Influence of the membrane surface charge density on NF operation. *Journal of Membrane Science*, v. 281, n. 2, p. 417-428, 2006.

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

Nágarajan, R.; Boeck, L. D.; Gorman, M.; Hamill, R. L.; Higgins, C. E.; Hoehn, M. M.; Stark, W. M.; Whitney, J. G. β -Lactam antibiotics from *Streptomyces*. *Journal American Chemical Society*, v. 93, n. 9, p. 2308-2310, 1971.

Newton, G.G.; Abraham E.P. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-aminoadipic acid. *Nature*, v. 175, p. 4456-4548, março, 1955.

Nilsson, K.; Larsson, P.O. High-performance liquid affinity chromatography on silica-bound alcohol dehydrogenase. *Analytical Biochemistry*, v. 134, n. 1, p. 60-72, outubro, 1983.

O'Sullivan, J.; Aplin R. T.; Stevens, C. M.; Abraham, E. P. Biosynthesis of a 7-Methoxicephalosporin Incorporation of molecular oxygen. *Biochemical Journal*, v. 179, p. 47-52, 1979.

Omstead, D. R.; Hunt, G. R.; Buckland, B.C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: Moo-Young, M. *Comprehensive biotechnology: The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products*, v. 3, Pergamon Press Inc., USA, 1985.

Peng, G. W.; Jackson, G. G.; Chiou, W. L. High-Pressure Liquid Chromatographic Assay of Netilmicin in Plasma. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 12, n. 6, p. 707-709, 1977.

Pines, S.; Jamieson, N. C.; Kozlowski, M. A. Merck & Co. Inc. Antibiotic purification process. United States Patent US 3733320, 1973.

Queener, S. W.; Neuss. *Biosynthesis of β -lactam antibiotics*. vol 3, New York, Academic press, Inc. 1982.

Roderick, E. White; Diane, N. L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of antibiotics on microbore columns. *Journal of Chromatography A*, v. 290, p. 187-196, maio, 1984.

Rodríguez, M.; Nuñez, L.; Braña A. Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Molecular Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 633–645, Agosto, 2008.

Santamarta, Irene; Rodríguez-García; Antonio, Pérez-Redondo, Rosario; Martín, Juan F.; Liras, Paloma. CcaR Is an Autoregulatory Protein That Binds to the *ccaR* and *cefD-cmcl* Promoters of the Cephamycin C-Clavulanic Acid Cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 11, p. 3106-3113, 2002.

Schubert, P. F. Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. Antibiotic purification process. United States Patent US 4196285, 1980.

Shinohara, G. M. M.; Nobre, M. A. L. Manual de Introdução ao editor de Equações Químicas Isis Draw 2.4. São Paulo, UNESP, 2005.

Stapley E. P.; Jackson, M.; Hernandez, S. Cephamycins, a New Family of β -Lactam Antibiotics I. Production by Actinomycetes, Including *Streptomyces lactamdurans* sp. N. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 2, n. 2, p. 122-131, setembro, 1972.

Unger, K.; Messer, W.; Krebs, K. F. Comparative study of the performance of spherical and angular silica and alumina supports in the 1-10- μ m size range. Journal Chromatography A, v. 149, p. 1-12, 1978.

Kunishima, M. S.; Yabuuchi, M.; Masuda, M. Y.; Imazumi, K. ; Hamanao, H. Nippon Kayaku Kabushiki Kaisha, Tokyo – Japan. Derivate of Cephamicyn C. United States Patent US 4495348, 24/11/1981.

Sánchez-Ferrer, A.; López-Más, J.; García-Carmona, F. Biofarma Murcia S.A. Process for Preparing cephalosporin derivatives. United States Patent US 6642020, p. 1-14, 04/11/2003.

Vandamme, E. J. Antibiotic Search and Production: an Overview, Biotechnology of Industrial Antibiotics, Marcel Dekker, New York, 1984.

Voser, W. Isolation of hydrophilic fermentation products by adsorption chromatography, Journal Chemical Technology Biotechnology, v. 32, p. 109-118, 1982.

Ward, O.P. Biochemical Separations. In: Bioprocessing. Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.

White, E.R.; Carroll, M.A.; Zarembo, J.E.; Bender, A. D. Reversed-phase high-speed liquid chromatography of antibiotics. The Journal of Antibiotics, v. 28, p. 205-214, 1975.

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