

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Departamento de Engenharia Química

Cecília Ladeira Lopes Costa

**Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos
em batelada e batelada alimentada com pulsos de glicerol sob diferentes
condições de temperatura**

SÃO CARLOS - SP

2010

Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em batelada e batelada alimentada com pulsos de glicerol sob diferentes condições de temperatura

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Departamento de Engenharia Química

Cecília Ladeira Lopes Costa

Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em batelada e batelada alimentada com pulsos de glicerol sob diferentes condições de temperatura

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração em pesquisa e desenvolvimento de processos químicos.

Orientação: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

SÃO CARLOS

2010

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

C837pa

Costa, Cecília Ladeira Lopes.

Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em batelada e batelada alimentada com pulsos de glicerol sob diferentes condições de temperatura / Cecília Ladeira Lopes Costa. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

57 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Engenharia bioquímica. 2. Ácido clavulânico. 3. Batelada. 4. Batelada alimentada. 5. Temperatura. 6. Degradação. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
CECÍLIA LADEIRA LOPES COSTA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 25 DE MARÇO DE 2010.

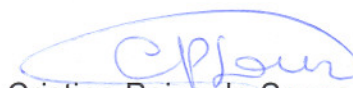
BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Júnior
Orientador, UFSCar



Marcel Otávio Cerri
UFSJ



Cristina Paiva de Souza
UFSCar

“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível”

Max Weber

AGRADECIMENTOS

Ao professor Alberto Colli Badino Jr pela oportunidade, pela valiosa orientação durante todos os momentos, pela amizade, estímulo e confiança sempre demonstrados e que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos professores Marlei Barboza (UFSCar), Maria Lúcia (UNESP), Cristina Paiva (UFSCar) e Marcel Cerri (UFSJ) pela participação nas bancas de qualificação e defesa deste trabalho e sugestões que contribuíram com o desenvolvimento do mesmo

Ao curso de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

Aos meus queridos pais, Marisa e Sebastião, que sempre incentivaram meu crescimento, dando apoio e motivação em todos os momentos, por sempre acreditarem em meu potencial e fazerem com que me sentisse especial. Ao meu irmão que amo muito. A uma pequeninha pequenininha dessa família, que mesmo longe sempre me fez sorrir com suas histórias. À minha querida família, por tudo o que significam pra mim.

A todos os colegas de laboratório de Bioquímica (DEQ – UFSCar) que colaboraram com esse trabalho, Sérgio, Carol, Juliana, Marcel, Lili, Luciana, Douglas, Guilherme, Maritza e Clóvis, pelos ensinamentos, conselhos e momentos de descontração.

Ao técnico do laboratório de Bioquímica (DEQ – UFSCar), Amadeus, pela sempre disposição em ajudar.

A todos os meus amigos, que mesmo alguns distantes, participaram dessa jornada, ouvindo, apoiando, incentivando e fazendo com que tudo fosse mais agradável e fácil mesmo quando foi difícil continuar.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço a Deus por sempre me guiar em cada etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
NOMENCLATURA.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Antibióticos β -lactâmicos	3
2.2. Ácido clavulânico	6
2.3. Produção de ácido clavulânico	8
2.3.1. Efeito da fonte de nitrogênio	9
2.3.2. Efeito da fonte de carbono	10
2.3.3. Efeito do pH	11
2.4. Influência da temperatura na produção e na degradação de bioprodutos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Microrganismo	17
3.2. Meios de cultura	17
3.2.1. Meio de cultura de reativação.....	17
3.2.2. Meios de cultura de inóculo e de produção	18
3.3. Procedimento experimental	18
3.3.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa.....	18
3.3.2. Avaliação da influência da temperatura na produção de AC	19
3.3.3. Avaliação da influência da temperatura na degradação de AC	20

3.4. Metodologia analítica	21
3.4.1. Análise da concentração de AC.....	21
3.4.2. Análise da concentração de glicerol	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Cultivos em batelada em diferentes temperaturas	23
4.2. Cultivos em batelada com redução de temperatura.....	26
4.3. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol e redução de temperatura	28
5. CONCLUSÕES.....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fórmula estrutural do anel β -lactâmico.	3
Figura 2.2 – Fórmula estrutural da benzilpenicilina.....	4
Figura 2.3 – Subgrupos do grupo dos β -lactâmicos.	4
Figura 2.4 – Fórmula estrutural do AC.	7
Figura 2.5 – Hidrólise do anel β -lactâmico pelo resíduo de serina 70 da β -lactamase.	8
Figura 4.1 - Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos em batelada a 30 °C, 25 e 20°C: (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G).....	24
Figura 4.2 – Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos controle e em batelada com redução de temperatura para 25 e 20°C: (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G).	27
Figura 4.3 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 1 pulso de glicerol a 30°C.....	30
Figura 4.4 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol a 30°C:	30
Figura 4.5 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 3 pulsos de glicerol a 30°C.	31
Figura 4.6 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 4 pulsos de glicerol a 30°C.	31
Figura 4.7 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 1 pulso de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.	33
Figura 4.8 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.....	33
Figura 4.9 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 3 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.....	34

Figura 4.10 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 4 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.....	34
Figura 4.11 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 1 pulso de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.	36
Figura 4.12 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.....	36
Figura 4.13 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 3 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.....	37
Figura 4.14 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 4 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.....	37
Figura 4.15 - Concentração máxima de (C_{AC-max}) nos cultivos em batelada com redução de temperatura em função do número de pulsos de glicerol.	40
Figura 4.16 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4: 78h ($r^2=0,990$), 96h ($r^2=0,98$), 120h ($r^2=0,96$) e 144h ($r^2=0,990$).	42
Figura 4.17 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4: 72h ($r^2=0,94$), 96h ($r^2=0,92$), 129h ($r^2=0,90$) e 169h ($r^2=0,81$)	43
Figura 4.18 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4: 81h ($r^2=0,86$), 129h ($r^2=0,92$), 168h ($r^2=0,83$) e 216h ($r^2=0,91$).	44
Figura 4.19 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao longo do tempo em cultivos a 30, 25 e 20°C.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Meio de cultura de Rosa et al., (2005)	17
Tabela 3.2 – Meio de cultura de Teodoro <i>et al.</i> (2006), modificado.....	18
Tabela 3.3 - Condições experimentais dos cultivos em mesa incubadora rotativa para avaliação da influência da temperatura na produção de AC.	20
Tabela 4.1 – Condições experimentais e principais resultados obtidos nos cultivos em batelada (B) e batelada com pulsos de glicerol (BP).	39
Tabela 4.2 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4.....	42
Tabela 4.3 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4.....	43
Tabela 4.4 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4.....	44
Tabela 4.5 - Constantes globais de degradação de AC (k_{dAC} globais) obtidas nos caldos de cultivo em diferentes temperaturas.	46
Tabela 4.6 – Valores médios de acúmulo de AC ($d\bar{C}_{AC}/dt$), de velocidade média de degradação de AC ($\bar{\Gamma}_{dAC}$) e de velocidade líquida de produção de AC ($\bar{\Gamma}_{AC}$) ao longo dos cultivos com pulsos de glicerol a diferentes temperaturas.....	49

NOMENCLATURA

AC = ácido clavulânico

MOPS = 3-N-ácido morfolino propanossulfônico

C_{AC} = concentração de AC (mg.L^{-1})

$C_{AC \text{ max}}$ = concentração máxima de AC (mg.L^{-1})

C_G = concentração de glicerol (g.L^{-1})

k_{dAC} = constante cinética de degradação de AC (h^{-1})

$P_{AC\text{-max}}$ = produtividade máxima em AC ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$Y_{AC/G}$ = rendimento de glicerol em AC (mg.g^{-1})

r_G : velocidade de consumo de glicertol ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$d\bar{C}_{AC}/dt$ = acúmulo de AC no caldo de cultivo ou velocidade global (observada) de produção de AC ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

\bar{r}_{AC} = velocidade líquida média de produção de AC ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

\bar{r}_{dAC} = velocidade média de degradação de AC ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

\bar{k}_{dAC} = constante cinética média de degradação de AC entre o início e o final de cada pulso de glicerol (h^{-1})

\bar{C}_{AC} = concentração média de AC no intervalo de tempo entre cada pulso de glicerol (mg.L^{-1})

RESUMO

A produção de enzimas β -lactamases por bactérias patogênicas é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos β -lactâmicos. As β -lactamases catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, rompendo a ligação amida o que leva à perda da atividade antimicrobiana do antibiótico. O ácido clavulânico (AC) é um metabólito secundário β -lactâmico produzido durante a fermentação de *Streptomyces clavuligerus* e possui uma potente atividade inibitória de β -lactamases. Como outros compostos β -lactâmicos, AC é quimicamente instável sob condições elevadas temperaturas. A decomposição do AC durante a fermentação bacteriana reduz sua concentração no caldo o que se traduz em baixos rendimentos do processo. No presente trabalho foi avaliada a produção de AC em processos em batelada e batelada com pulsos de glicerol em diferentes condições de temperatura em mesa incubadora rotativa operados a 250 rpm e pH 6,8. Inicialmente, três cultivos em batelada, contendo glicerol como fonte de carbono, foram conduzidos em temperaturas de 30, 25 e 20°C, onde a 30°C foi considerado ensaio controle. Em seguida, outros três ensaios em batelada foram realizados com redução de temperatura de 30°C para 25 ou 20°C após a exaustão de glicerol no caldo de cultivo. Também foram realizados quatro cultivos com redução de temperatura associado com alimentação de glicerol (1, 2, 3 e 4 pulsos de glicerol), totalizando doze cultivos. Em geral, a produção de AC aumentou com o decréscimo de temperatura e a alimentação de glicerol foi benéfica para a produção. Para todos os cultivos em quaisquer condições de baixas temperaturas, a produção máxima de AC e produtividades em AC ($P_{AC-máx}$ em $mg.L^{-1}.h^{-1}$) observadas foram superiores àquelas obtidas no cultivo controle. Além disso, houve um aumento significativo do rendimento AC por glicerol ($Y_{AC/G}$, $mg.g^{-1}$) chegando a 59,3 $mg.g^{-1}$ no cultivo em batelada a 20°C, enquanto que para o controle foi observado um rendimento de 10,2 $mg.g^{-1}$. A concentração máxima de AC obtida foi de 1115,6 $mg.L^{-1}$ para o cultivo com redução de temperatura de 30 para 25°C e três pulsos de glicerol o que representou cerca de 7 vezes a produção obtida no cultivo controle em batelada a 30°C. A degradação de AC em caldo de fermentação nas temperaturas de 30, 25 e 20°C também foi avaliada neste estudo. Valores de constantes de degradação de AC relativas ao modelo de degradação de primeira ordem (k_{dAC}) foram obtidos em diferentes tempos de cultivo. O maior valor de k_{dAC} foi encontrado a 30°C (0,01306 h^{-1}) e os valores para 25 e 20°C foram estatisticamente semelhantes (0,00303 e 0,00173 h^{-1}). A maior velocidade de produção de AC (r_{AC}) de 10,9 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ foi observada a 25°C. Estes resultados demonstram o potencial de aplicação da manipulação da temperatura durante a fermentação de *S. clavuligerus* para a otimização do processo de produção de AC.

ABSTRACT

The production of enzymes β -lactamases by pathogenic bacteria is the most common mechanism of resistance to β -lactam antibiotics. The β -lactamases catalyze the hydrolysis of β -lactam ring, splitting the amide bond, as a result, the antibiotics become ineffective. Clavulanic acid (CA) is a secondary metabolite β -lactam produced during the fermentation of *Streptomyces clavuligerus* and has a potent inhibitory activity of β -lactamases. Like other β -lactam compounds, CA is chemically unstable under high temperature conditions. The decomposition of the AC during the bacterial fermentation reduces its concentration in the broth which results in low yields of the process. In this study the production of CA was evaluated in batch processes and batch with glycerol pulses at different temperature conditions in shaker operated at 250 rpm and pH 6.8. Initially, three batch cultures containing glycerol as carbon source were performed at temperatures of 30, 25 and 20°C. Batch cultivation at 30°C was considered as a control run. Then, other three batch tests were performed with reduction of temperature of 30°C for 25 or 20°C after the exhaustion of glycerol in the broth culture. Added, also were performed four cultures with reduction of temperature associated with feeding of glycerol (1, 2, 3 and 4 pulses of glycerol), resulting in twelve cultures. In general, the production of CA increased with decreasing temperature and feeding of glycerol was beneficial for CA production. For all experiments under low temperatures, the maximum production (C_{CA-max}) and productivity in CC (P_{CA-max} in $mg.L^{-1}.h^{-1}$) were higher than the control run. In addition, a significant increase product (CA) yield coefficient in relation to the glycerol consumption ($Y_{CA/G}$, $mg.g^{-1}$) reaching 59.3 $mg.g^{-1}$ for the batch culture at 20°C, while for the control run was obtained 10.2 $mg.g^{-1}$. The C_{CA-max} obtained was 1115.6 $mg.L^{-1}$ in cultivation with temperature reduction from 30 to 25°C and three pulses of glycerol, which represented about 7 times the yield on the run control culture at 30°C. The CA degradation in fermentation broth at temperatures of 30, 25 and 20°C was also evaluated in this study. Values of constant degradation of CA (k_{dCA}) were obtained in different cultivation times. The highest k_{dCA} value in the broth was obtained at 30°C, 0.01306 h^{-1} , and values for 25 and 20°C were statistically similar, 0.00303 and 0.00173 h^{-1} . The higher rate of production of CA (r_{CA}) of 10.9 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ was observed at 25°C. The results obtained demonstrate the potential application of temperature manipulation during *S. clavuligerus* fermentation for the optimization of CA production process.

1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas e cefalosporinas. Estas enzimas são secretadas por importantes bactérias Gram-negativas e Gram-positivas patogênicas ao homem. As β -lactamases catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, rompendo a ligação amida. Como resultado, estes antibióticos se tornam ineficazes contra o crescimento bacteriano. O ácido clavulânico (AC) é um metabólito secundário β -lactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerus* que possui uma potente atividade inibitória de β -lactamases (BROWN et al., 1976). Por isso, o AC tem sido administrado clinicamente em conjunto com antibióticos β -lactâmicos sensíveis a ação das β -lactamases para o tratamento de doenças causadas por muitas bactérias patogênicas.

Como todo composto β -lactâmico, AC é quimicamente instável em condições de pH ácidos e alcalinos e sob elevadas temperaturas (HAGINAKA et al., 1981; MAYER E DECKWER, 1996; ROUBOS et al., 2002; BERSANETTI et al., 2004). A decomposição do AC durante a fermentação bacteriana reduz sua concentração no caldo o que se traduz em baixos rendimentos do processo. Isto representa um sério problema econômico para as indústrias farmacêuticas.

AC é tradicionalmente produzido por *Streptomyces clavuligerus* utilizando um meio de cultura complexo contendo derivados de soja e glicerol ou lipídeos como fonte de nitrogênio, carbono e energia, respectivamente (MAYER E DECKWER, 1996; CHEN et al., 2002; 2003; BAPTISTA-NETO et al., 2005; WANG et al., 2005; TEODORO et al., 2006; ORTIZ et al., 2007; AVIGNONE-ROSSA et al., 2008). Romero et al. (1984) estudaram a importância do glicerol na biossíntese de AC e verificaram que o glicerol é um precursor direto do AC. Chen et al. (2002) observaram que a biossíntese de AC é inibida por concentrações de glicerol acima de 15 g.L⁻¹. Rius and Demain (1997) concluíram que concentrações de glicerol acima de 2% m/v suprimem a produção do antibiótico.

Cultivos com suplementação de glicerol tem sido usado para aumentar a produtividade do processo microbiano. A alimentação tem sido considerada como estratégia para o controle da inibição pelo substrato e repressão catabólica potencializando a produção de AC (CHEN et al., 2002, 2003; TEODORO et al., 2006).

Muitos estudos sobre o efeito dos componentes do meio de cultura e melhores condições de pH para a produção de AC em cultivos de *S. clavuligerus* já foram realizados (BAPTISTA-NETO et al., 2005, TEODORO et al., 2006, CHEN et al., 2002, 2003, ORTIZ et al., 2005). No entanto, estudos sobre a influência da temperatura no consumo de substrato, produção e degradação de AC durante o processo de fermentação não foram suficientemente investigados.

A temperatura é considerada um importante parâmetro do processo a ser avaliado em estudos de otimização de produção de biomoléculas a partir de culturas celulares (RÖSSLER et al., 1996). Muitos experimentos sugerem que a redução da temperatura de cultivo resulta em aumento da viabilidade celular, redução da velocidade específica de consumo de substrato e oxigênio dissolvido além de reduzir a atividade de muitas proteases (LUDWIG et al., 1992; WEIDEMANN et al., 1994; CHUPPA et al., 1997; FURUKAWA e OSHUYE, 1998). Cabe ressaltar ainda que temperaturas mais baixas reduzem a degradação de alguns produtos como ácido láctico (AKERBERG et al., 1998), eritropoietina (YOON et al., 2002), amoxicilina (VAHDAT et al., 2007), entre outros, e que a solubilidade de oxigênio em meio aquoso em baixa temperatura é maior.

AC é tradicionalmente produzido por cultivos realizados a 28 ou 30°C (JIANG et al., 2004; BAPTISTA-NETO et al., 2005). Apesar destes valores serem ideais para o crescimento celular de *S. clavuligerus*, eles não são apropriados para o lento consumo da fonte de carbono, que poderia minimizar os efeitos da inibição ou repressão. Além disso, nesta faixa de temperatura, a degradação de AC é mais pronunciada que a 20°C, por exemplo (BERSANETTI et al., 2004).

Considerando os efeitos da temperatura no crescimento celular, consumo de substrato e degradação de AC, o presente trabalho apresentou como objetivos:

- investigar o efeito da temperatura (30, 25 e 20°C) nas cinéticas de consumo de glicerol e produção de AC em cultivos de *S. clavuligerus* em batelada e batelada com pulsos de glicerol.
- avaliar o efeito da redução de temperatura nas cinéticas de consumo de glicerol e produção de AC nas mesmas condições.
- investigar a cinética de degradação de AC em caldos de fermentação de *S. clavuligerus* em diferentes tempos e temperaturas de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antibióticos β -lactâmicos

A introdução dos antibióticos na prática clínica, iniciada há cerca de 70 anos, representou um marco importante na medicina moderna. Na última metade do século XX, um grande número de agentes antimicrobianos foi desenvolvido e utilizado com sucesso na clínica médica para o tratamento de diversas doenças infecciosas.

A palavra antibiótico é derivada do termo “antibiosis” proposto inicialmente por Vuillemin em 1889, para descrever o antagonismo entre seres vivos, em geral. O nome antibiótico foi primeiramente dado por Waksman em 1945, que definiu antibiótico como “substâncias químicas produzidas por microrganismos, possuidoras de capacidade de matar ou inibir o crescimento de bactérias ou outros microrganismos” (KURYLOWICZ *et al.*, 1981).

Os antibióticos constituem o grupo mais importante de substâncias farmacêuticas sintetizadas pelo metabolismo secundário microbiano. A família dos β -lactâmicos compõe o grupo mais importante dentre esses fármacos, tanto no que diz respeito à sua utilização clínica quanto no ponto de vista econômico. Segundo Elander (1999), os β -lactâmicos representam cerca de 60% do mercado mundial de antibióticos.

Os β -lactâmicos são assim chamados por possuírem o anel β -lactâmico em sua estrutura (**Figura 2.1**). A benzilpenicilina (penicilina G), primeiro antibiótico a ser introduzido na prática clínica, é um exemplo clássico (**Figura 2.2**).

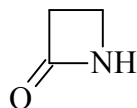


Figura 2.1 – Fórmula estrutural do anel β -lactâmico.

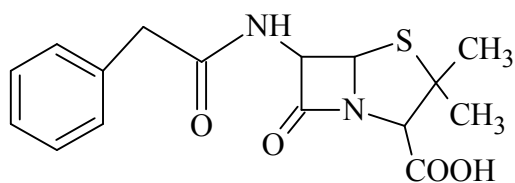


Figura 2.2 – Fórmula estrutural da benzilpenicilina.

Os antibióticos β -lactâmicos estão divididos em cinco subgrupos, dependendo do radical ligado ao anel (**Figura 2.3**).

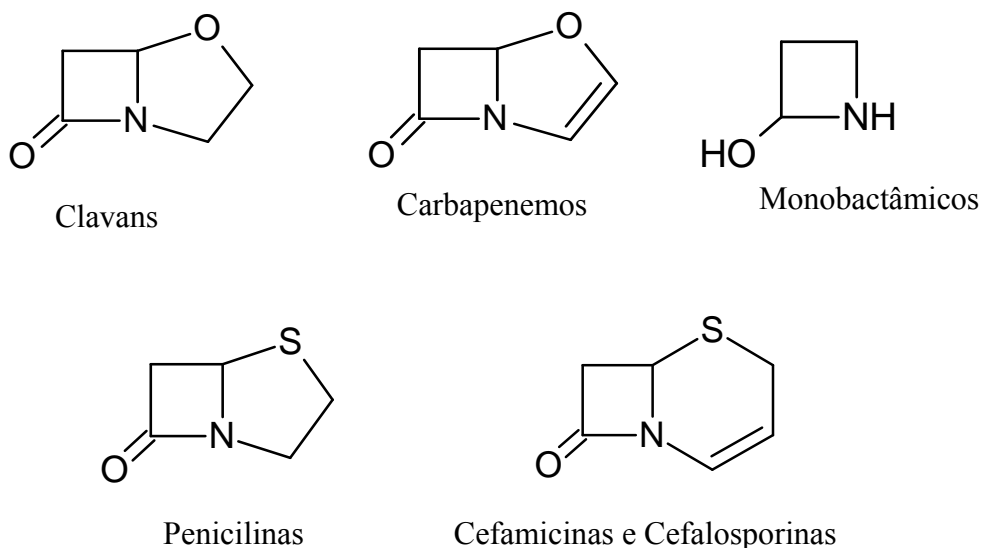


Figura 2.3 – Subgrupos do grupo dos β -lactâmicos.

Todos os antibióticos β -lactâmicos são agentes bactericidas que inibem a síntese da parede celular bacteriana. Esses interferem no estágio final de formação da parede celular pela inibição de enzimas bacterianas transpeptidases e coboxipeptidases que catalisam as reações de síntese do peptidoglicano. Estas enzimas, comumente chamadas de proteínas de ligação à penicilina (PBPs), são responsáveis pela formação da ligação cruzada entre os polímeros do peptidoglicano (ESSACK, 2001). Este consiste de unidades alternadas de ácido N-acetil-murâmico (NAM) e N-acetil-glicosamina (NAG). A composição da ligação peptídica cruzada é típica de cada microrganismo e confere a rigidez final da parede celular, responsável por manter a forma e proteger as bactérias de

uma alta pressão osmótica interna (STRYER, 1996).

O mecanismo de ação de antibióticos β -lactâmicos se deve a ligação desse fármaco as PBPs. Os peptidoglicanos são sintetizados em três etapas sendo que a última, que culmina no término da formação da ligação cruzada, envolve uma transpeptidação por uma PBP bacteriana ligada à membrana. Devido à semelhança estereoquímica dos β -lactâmicos com o resíduo acil-D-alanil-D-alanina do (NAM), componente da parede, as PBPs utilizam os β -lactâmicos como substratos da reação para a síntese da parede celular e a transpeptidase é acilada. A PBP acilada não hidrolisa o anel β -lactâmico e conseqüentemente as etapas posteriores de síntese da parede celular não ocorrem. As células bacterianas se tornam permeáveis e eventualmente sofrem lise (BABIC *et al.*, 2006).

Apesar de os antibióticos serem bastante efetivos no tratamento de inúmeras infecções, as doenças infecciosas permanecem sendo as principais causas de morte no mundo. Isso é resultado tanto do surgimento de novas doenças como também do aumento de patógenos resistentes aos antibióticos (NIKAIDO, 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

A resistência é uma conseqüência inevitável da pressão de seleção imposta pelo uso indiscriminado e mau uso dos antibióticos. A resistência bacteriana afeta tanto os resultados clínicos do tratamento terapêutico como também os custos do tratamento gerados pela alta taxa de mortalidade e morbidade, longos períodos de hospitalização e administração de medicamentos mais tóxicos e caros como drogas alternativas ao tratamento (DUDLEY, 1995)

O problema da resistência aos antibióticos e suas conseqüências são muito evidentes para o grupo dos β -lactâmicos uma vez que eles representam cerca de 50% dos antimicrobianos usados sistematicamente (LIVERMORE E WILLIAMS, 1996).

A maior causa de resistência a estes antibióticos é a existência das enzimas β -lactamases sintetizadas pelos microrganismos resistentes, que catalisam irreversivelmente a ligação amida do anel β -lactâmico, resultando na inativação do produto, isto é, gerando um produto sem ação bacteriana (ESSACK *et al.*, 2001).

As β -lactamases foram primeiramente identificadas em isolados de *Staphylococcus aureus* na década de 40 (ABRAHAM E CHAIN, 1940) e atualmente podem ser amplamente encontradas entre linhagens de Enterobacteriaceae, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium spp.*, dentre outras. Um

recente estudo europeu indicou uma elevada produção de β -lactamases em bactérias patogênicas ao homem. A incidência de produção dessa enzima foi de 97% em isolados de *Moraxella catarrhalis*; 89% em *Staphylococcus aureus*; 100% em *Klebsiella oxytoca*; 99% em *Klebsiella pneumoniae*; 22% em *Proteus mirabilis*, entre outras linhagens estudadas (WILLIAM, 1999). De acordo com o mesmo autor, apesar de todas as β -lactamases catalisarem a mesma reação, existem vários tipos de classificações baseadas na seqüência genética e características bioquímicas como massa molar ou especificidade ao substrato. Uma classificação comumente utilizada é a proposta por Bush *et al.* (1989). Esta divide as enzimas em quatro grupos de acordo com o substrato e inibidor. Os grupos 1 e 2 incluem as β -lactamases codificadas por genes cromossomais e plasmidiais; respectivamente; o grupo 3 as enzimas específicas para carbapenemos e grupo 4 inclui aquelas pobremente inibidas por ácido clavulânico.

2.2 Ácido clavulânico

O número de β -lactamases descritas na literatura vem aumentando exponencialmente à medida que isolados resistentes se tornam disponíveis ao longo dos anos. Assim, torna-se necessário encontrar inibidores de β -lactamases para serem administrados em conjunto com esses antibióticos, visando melhorar a sua eficiência. Essas moléculas são compostos β -lactâmicos de baixa atividade bactericida que podem ser combinadas com antibióticos suscetíveis a fim de restaurar a atividade contra microrganismos produtores de β -lactamases (PAGE *et al.*, 2000).

Os inibidores de β -lactamases são estruturalmente relacionados à penicilina, retendo uma ligação amida no anel β -lactâmico, mas com modificações na cadeia lateral. Estas características estruturais habilitam os inibidores de β -lactamases a se ligarem irreversivelmente como “substratos suicidas” no sítio ativo da enzima, tornando-a inativa.

Atualmente, podem-se citar como inibidores de β -lactamases o valclavan, as clavamicinas e o ácido clavulânico (AC), todos compostos β -lactâmicos do grupo “clavam” (BAGGALEY *et al.*, 1997).

O AC foi descoberto por Brown *et al.* em 1976, como um produto de metabolismo de *Streptomyces clavuligerus*, durante um programa de seleção de microrganismos produtores de compostos β -lactâmicos e foi descrito por apresentar uma elevada atividade inibitória de β -lactamases. Embora o AC seja efetivo contra um grande

espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, comparado a eficácia de outros antibióticos como tienamicina, sua atividade antibacteriana é relativamente baixa. Como resultado, não é desejável administrar AC como único produto antibacteriano. Por isso, é recomendável que ele esteja presente em formulações juntamente com outros antibióticos β -lactâmicos, que são suscetíveis à ação de β -lactamases (BROWN *et al.*, 1976). Tal estratégia tem-se mostrado muito eficaz em tratamentos terapêuticos.

Identificada por Howard *et al.* (1976), a estrutura química do AC, (Z)-(2R,5R)-3-(2-hidroxiethylideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo(3.2.0) heptano-2-ácido carboxílico, é formada pelos anéis β -lactâmico e oxazolidino (**Figura 2.4**).

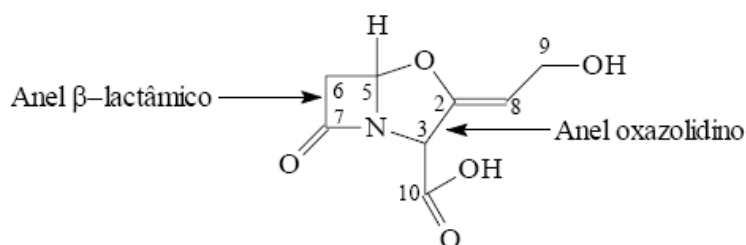


Figura 2.4 – Fórmula estrutural do AC.

A similaridade estrutural do AC com antibióticos β -lactâmicos permite que a molécula atue como inibidor de β -lactamases. Esta inibição “restaura” a atividade antibiótica do composto β -lactâmico contra bactérias que secretam β -lactamases (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

Brown *et al.* (1976) descrevem as quantidades mínimas de ampicilina na presença e na ausência de AC, para agir efetivamente contra uma colônia de bactérias produtoras de β -lactamases. No caso em que houve a adição do inibidor, observou-se a necessidade de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina para agir efetivamente e, na ausência de AC, a concentração necessária de antibiótico foi de 500 $\mu\text{g/mL}$ para se obter o mesmo resultado.

O AC pode ser encontrado em medicamentos na forma de sais de metais alcalinos, como clavulanato de potássio, em conjunto com antibióticos como a amoxicilina. Um dos medicamentos comercializados no Brasil é o Clavulin® (Glaxo SmithKline do Brasil Ltda.), uma combinação de 500 mg de amoxicilina e 125 mg de AC. O Augmentin® é outra combinação encontrada, porém este medicamento não é comercializado no Brasil, enquanto que o Timentin® é uma combinação de AC/ticarciclina (BAGGALEY *et al.*, 1997).

O AC pode penetrar na parede celular bacteriana e inativar β -lactamases

intracelulares, assim como inativar β -lactamases extracelulares (ESSACK, 2001). Segundo Reynold (1993), o mecanismo de inibição enzimática pelo AC varia de acordo com o tipo de β -lactamase envolvida, mas geralmente a molécula de AC atua como um inibidor competitivo e irreversível.

As β -lactamases têm sido designadas pelo Comitê de Nomenclatura Internacional em Bioquímica (“Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry”) como enzimas que hidrolisam ligações C-N, separando as amidas cíclicas do anel β -lactâmico. A maioria das β -lactamases age via éster de serina, mecanismo representado na Figura 2.5 (GHUYSEN, 1993). Inicialmente, a enzima associa-se de forma não covalente ao anel β -lactâmico do antibiótico. Em seguida, o radical hidroxila livre do resíduo de serina 70 presente no sítio ativo da enzima ataca o anel β -lactâmico, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e o antibiótico hidrolisado e funcionalmente inativado (LIVERMORE, 1995).

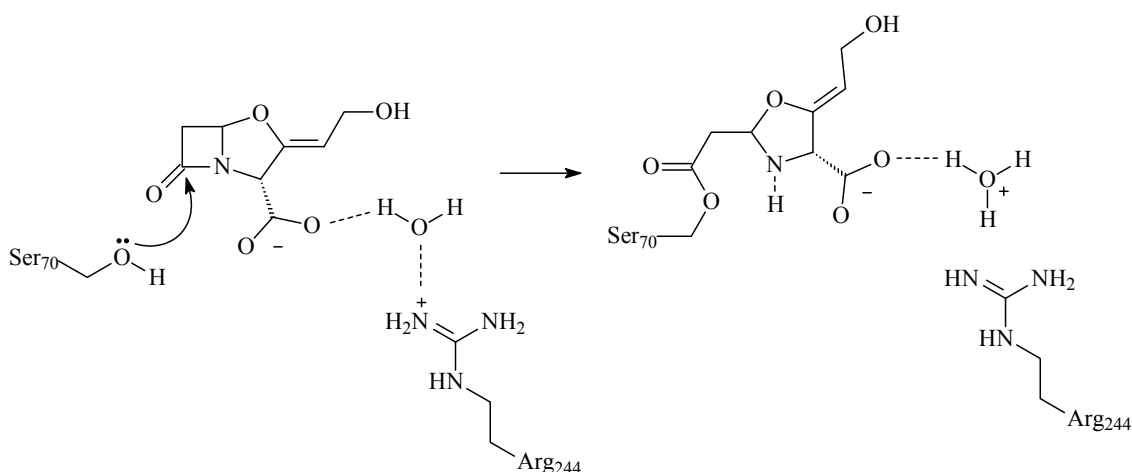


Figura 2.5 – Hidrólise do anel β -lactâmico pelo resíduo de serina 70 da β -lactamase.

A estereoquímica 2R,5R diferenciada do AC (outros antibióticos clavâmicos tem estereoquímica 2S,5S) permite que ele atue como um ligante irreversível no sítio ativo da β -lactamase, o que leva a inativação da sua atividade enzimática (PAGE, 2000).

2.3. Produção de ácido clavulânico

O AC é tradicionalmente produzido a partir de cultivos utilizando a bactéria *Streptomyces clavuligerus*. Esta é uma bactéria filamentosa Gram-positiva, aeróbia estrita, pertencente ao grupo dos actinomicetos e predominantemente encontrada no solo

(LECHEVALIER, 1981). A maioria das espécies do gênero *Streptomyces* crescem a temperaturas entre 28 a 45°C (BALLOWS et al., 1991). Romero *et al.* (1984) destacam que a característica mais importante da bactéria filamentosa *S. clavuligerus* é a sua capacidade de produzir antibióticos. Atualmente, sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir cerca de 20 metabólitos secundários, incluindo vários compostos β -lactâmicos como a penicilina N, a cefamicina C, a desacetoxicefalosporina C e o AC.

A produção de metabólitos pelas células microbianas se dá em duas fases distintas. Na trofofase ou fase de crescimento ocorre a síntese de produtos do metabolismo primário, descritos como produtos essenciais ao crescimento celular, como aminoácidos, proteínas, lipídios e carboidratos. A idiofase, equivalente à fase estacionária de crescimento, caracteriza-se pela síntese de produtos do metabolismo secundário os quais incluem os antibióticos.

A composição do meio de cultura é de fundamental importância nos bioprocessos. Existem na literatura muitos meios de cultura diferentes para a produção de AC. Os componentes do meio de cultura e suas composições podem gerar o acúmulo de diferentes metabólitos e no caso do AC, os níveis das fontes de carbono e nitrogênio podem influenciar de forma quantitativa a síntese do produto (GOUVEIA *et al.*, 1999; KIRK *et al.*, 2000). Os meios de cultura mais recentemente utilizados na produção de AC apresentam glicerol ou lipídeos (óleos) como fontes de carbono e energia e farinha ou proteína isolada de soja como fontes de nitrogênio.

2.3.1. Efeito da fonte de nitrogênio

As fontes de nitrogênio comumente utilizadas em meios de cultura para o crescimento celular, como os sais de amônio, apresentam efeito negativo sobre o metabolismo secundário (FANG e DEMAIN, 1995). A presença de íons amônio em quantidade suficientemente elevada, reprime as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio como aminoácido e uréia (WHITE, 1995).

Gouveia *et al.* (2001) estudaram a otimização da composição do meio de cultura para produção de AC por *S. clavuligerus*. Neste estudo foram avaliados os efeitos de diferentes fontes de N obtidas comercialmente como proteína isolada de soja, extrato de levedura, peptona bacteriológica e água de maceração de milho (milhocina). Observou-se que os maiores rendimentos se deram quando proteína isolada de soja foi utilizada no

cultivo.

Mayer e Deckwer (1996) investigaram os efeitos de farinha de soja ou extrato de farinha soja como fonte de nitrogênio nos meios de cultivo de *S. clavuligerus* na produção AC. Nos cultivos em extrato de farinha soja, observou-se que a produção de AC teve início já durante a trofofase enquanto que nos cultivos obtidos de farinha de soja a produção de AC ocorreu mais tardiamente, na idiofase. No entanto, as quantidades finais de produto foram menores em extrato de farinha de soja, possivelmente devido à maior degradação durante a fase estacionária. Em outro trabalho, Ortiz *et al.* (2007) verificaram em experimentos em shaker que a produção de AC em meio de cultura com farinha de soja foi muito maior que em meio contendo proteína isolada de soja.

A quantidade de N no meio de cultivo deve ser suficiente para assegurar um bom crescimento, no entanto o excesso de íons amônio, produto de catabolismo protéico, pode inibir a biossíntese bem como degradar o AC (ROMERO *et al.*, 1984). De acordo com Roubos *et al.* (2002), concentrações elevadas de íons amônio no meio levam a um aumento considerável na taxa de degradação de AC.

Visser-Lwirink *et al.* (2006) avaliaram o efeito de sais de amônio na fermentação para produção de AC. Observou-se um aumento da produção quando a concentração de íons amônio foi mantida igual ou superior a 50 mg/L. Entretanto, a concentração de íons amônio deve ser baixa o suficiente para não causar citotoxicidade.

2.3.2. Efeito da fonte de carbono

Em geral, os carboidratos são altamente utilizados como fonte de energia para o crescimento celular e produção de metabólitos secundários. No entanto, os produtos do catabolismo de carboidratos atuam como inibidores na síntese de diversos metabólitos secundários, demonstrando um decréscimo na biossíntese de antibióticos (BUTTERWORTH, 1984).

Carboidratos atuam inibindo a produção de penicilina em *Penicillium sp* (REVILLA *et al.*, 1984) e na síntese de cefalosporina em *S. clavuligerus* (AHARONOWITZ e DEMAIN, 1978).

Uma peculiaridade do *S. clavuligerus* é a sua incapacidade de assimilar glicose devido ao fato de não conseguir transportá-la através da membrana plasmática (ZHAN e DEMAIN, 1992). Por isso, diversos estudos têm sido realizados utilizando outras

fontes de carbono e energia na síntese de antibióticos a partir de cultivos de *S. clavuligerus*.

Lee e Ho (1996) utilizaram várias fontes de carbono, incluindo ácido graxos e óleo palmítico, obtendo uma maior produção de AC, embora baixa (5 mg/L), com óleo palmítico.

Maccarty *et al.* (1995) estudaram os efeitos de óleos e ácidos graxos na produção de fungicromina por *Streptomyces cellulosa*. Ao realizarem experimentos em incubador rotativo, verificaram que quando o meio de cultivo apresentava glicose como fonte de carbono, a produção de antibiótico foi de aproximadamente 100 mg/L e quando utilizaram óleo de soja na mesma concentração, a concentração final de antibiótico foi de 1000 mg/L. No entanto, o uso simultâneo de óleo de soja e glicose resultou em uma concentração final de antibiótico de aproximadamente 2000 mg/L. Nos ensaios em fermentador foi possível acumular produto somente quando foram utilizados simultaneamente glicose e óleo de soja.

Romero *et al.* (1984) estudaram o papel do glicerol na biossíntese de AC por *S. clavuligerus*. Os autores sugeriram que o glicerol é convertido em gliceraldeído-3P e utilizado como precursor do carbono C3 da molécula de AC. No entanto, Rius e Demain (1997) verificaram que altas concentrações de glicerol (2 a 3% m/v) reduzem a produção do antibiótico.

Gouveia *et al.* (2001) otimizaram o meio de cultivo para a produção de AC por *S. clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064). O meio de cultivo apresentava glicerol como fonte de carbono. Neste trabalho os autores concluíram que a melhor concentração de glicerol a ser utilizada foi igual a 20 g/L.

Recentemente, Ortiz *et al.* (2007) verificaram a partir de cultivos obtidos de óleo de soja e glicerol como fontes de carbono, que o óleo começou a ser consumido somente depois do consumo de glicerol, sugerindo um crescimento diáuxico. Segundo os mesmos autores, o cultivo com óleo em batelada simula um cultivo em batelada alimentada, pois a hidrólise do óleo pela ação de lipases gera glicerol como produto, assim o glicerol é lentamente disponibilizado no meio favorecendo a produção de AC.

2.3.3. Efeito do pH

O pH é um parâmetro importante a ser avaliado nos processos

fermentativos, tanto no que se refere à cinética de crescimento microbiano quanto à estabilidade e atividade biológica de proteínas produzidas e secretadas pelo microrganismo. Além disso, nos cultivos de *S. clavuligerus* o pH desempenha um papel fundamental na estabilidade do AC produzido.

Devido a sua estrutura molecular, os compostos β -lactâmicos são estáveis em condições neutras de pH. Muitos autores investigaram a estabilidade do AC em soluções aquosas tamponadas sob diferentes condições de pH (MAYER E DECKWER, 1996; BERSANETTI *et al.*, 2004). Estes autores observaram que a degradação segue uma cinética de pseudo-primeira ordem.

Haginaka *et al.* (1981) investigaram a estabilidade do AC a 35°C num intervalo de pH de 3,15 a 10,10 e observaram que a taxa de degradação é altamente dependente do pH da solução. Estes autores concluíram que a máxima estabilidade do AC foi observada em pH de 6,39 e que a degradação ácida foi 10 vezes mais rápida que em meio alcalino. Os autores também investigaram os efeitos catalíticos dos tampões a pH e força iônica constantes e concluíram que a velocidade de degradação aumentou com o aumento concentração do tampão (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

Mayer e Deckwer (1996) estudaram a produção e degradação simultânea do AC durante o cultivo de *S. clavuligerus*. A estabilidade *in vitro* foi 2-10 vezes maior que a observada *in vivo*. Neste estudo, observou-se que a hidrólise ácida foi principal responsável pela instabilidade do AC *in vitro*.

Em outros estudos, Almeida *et al.* (2003) e Bersanetti *et al.* (2004) concluíram que o AC é altamente instável em pHs superiores a 7,0 e inferiores que 5,0.

2.4. Influência da temperatura na produção e na degradação de bioprodutos

Sabe-se que muitos fatores podem afetar o crescimento celular e a produção de metabólitos em culturas bacterianas. Entre esses fatores incluem-se os componentes do meio de cultura como também parâmetros ambientais como pH e temperatura de cultivo. A temperatura do processo de produção deve ser destacada, pois exerce influência tanto no crescimento microbiano quanto no rendimento do produto final uma vez que a temperatura tem um efeito pronunciado na estabilidade de algumas biomoléculas produzidas durante processos biológicos (STANBURY *et al.*, 1994).

A influência da temperatura na produção de ácido láctico foi investigada por Akerberg *et al* (1998). Neste estudo, verificou-se que a produtividade do ácido láctico foi máxima entre 33 e 35°C. Observou-se um aumento na proporção de D-ácido láctico em relação à forma L quando se alterou as condições de pH de 4,0 para 5,0 ou quando a temperatura do processo de fermentação foi mantida acima de 33,5°C. Nesse caso, a temperatura elevada representou não apenas um aumento na produção de ácido láctico, mas também um aumento na proporção da molécula na forma D, o que poderia representar um aumento nos custos de purificação.

Aasen *et al.* (2000) estudaram o efeito da temperatura (20-30°C) na cinética de crescimento e de produção da bacteriocina sakacina P por *Lactobacillus sakei* CCGU42687. A produção de sakacina P foi máxima a 20°C. Os autores verificaram que temperaturas elevadas (25-30°C) reduziram o crescimento celular resultando em menores concentrações de produção sakacina P. Neste estudo, os pesquisadores concluíram que baixas temperaturas beneficiaram a produção resultando em uma concentração de sakacina P a 20°C 7 vezes maior que a observada a 30°C.

Romano e Suzzi (1996) verificaram que a produção de acetoína, um composto obtido da degradação de acetolactato, durante a fermentação do vinho por leveduras é um processo dependente da temperatura. Os autores observaram que o aumento de temperatura do processo leva ao aumento da velocidade da reação de decomposição de acetolactato assim mais diacetil e acetoína foram produzidos durante a fermentação.

O efeito da temperatura na produção de 2,3-butanodiol e acetoína foi estudado por Perego *et al.* (2003), utilizando um isolado de *Bacillus licheniformis*. Os autores variaram a temperatura de fermentação de 34 a 40°C e verificaram que até 37°C ocorreu um aumento na concentração final e na produtividade do produto, seguido de uma redução desses índices em temperaturas mais elevadas. Os autores sugeriram que este fato pode ter sido causado provavelmente pela inativação térmica de enzimas da rota de biossíntese do 2,3-butanodiol. Por outro lado, a concentração de acetoína não foi significativamente alterada nas temperaturas avaliadas neste estudo.

Relatos na literatura reportam que o uso de redução de temperatura durante o cultivo celular resulta em controle do crescimento, decréscimo das atividades metabólicas e melhoria da viabilidade celular e muitas vezes melhoria da produtividade de processos em batelada (FURUKAWA E OSHUYE, 1998; YOON *et al.*, 2002). Outros

estudos de cultivos de célula animal relatam que a redução de temperatura gerou aumento na produção de vários tipos de proteínas recombinantes (FURUKAWA E OSHUY, 1998; KAUFMANN et al., 1999; YOON et al., 2002). Em outro trabalho, Constantinides et al. (1970) concluíram que o rendimento de penicilina no processo em batelada aumentou cerca de 15% sob condições de operação com redução de temperatura.

Durante a fermentação em temperaturas mais elevadas, a degradação do metabólito pode ser muito elevada o que se traduz em baixos rendimentos do processo.

A equação de Arrhenius é um modelo matemático que expressa a influência da temperatura na constante de velocidade de uma dada reação (LEVENSPIEL, 2005):

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad \text{Eq. 2.1}$$

onde:

k : constante da velocidade da reação à temperatura absoluta T (h^{-1});

k_0 : fator pré-exponencial ou fator de frequência (h^{-1});

E_a : energia de ativação (J/mol);

R : constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J/mol.K}$);

T : temperatura absoluta (K).

Esta equação demonstra quimicamente que o aumento de temperatura gera um aumento da constante da velocidade de reação que, em alguns casos, pode estar relacionada com a degradação de um dado produto de interesse. Daí a importância de se estudar a influência da temperatura no processo de produção de biomoléculas de interesse sensíveis à temperatura.

Cruz *et al.* (2008) estudaram o efeito do calor na cinética de degradação de vitamina C em extratos de agrião em temperaturas que variavam de 82,5 a 92,5°C sob diferentes tempos de exposição. Após tratamento por calor, observou-se um redução de 40 a 60% de vitamina C e a degradação foi mais rápida em temperaturas mais elevadas. Os pesquisadores observaram que a degradação de vitamina C em extratos de agrião em função da temperatura seguia a equação de Arrhenius.

Hisin-Pin Ou *et al.* (2009) analisaram a cinética de degradação de monacolina K em solução fermentada por *Monascus sp.* Testes realizados para avaliar o efeito da temperatura-tempo de incubação na cinética de degradação de monacolina K revelou uma redução de 21,5% no conteúdo de monacolina K quando o tempo de

exposição a 100°C foi reduzido de 90 para 60 min. Os resultados mostraram que a relação entre temperatura e constante cinética de hidrólise da monacolina K obedeceu a equação de Arrhenius.

Verdona *et al.* (2000) estudaram a estabilidade da ampicilina em soluções tamponadas num intervalo de 5 a 237 dias sob duas condições diferentes de temperatura, -20 e -75°C. Observou-se que a degradação de ampicilina praticamente não ocorre a -75°C, enquanto que a -20°C observou-se cerca de 20% de degradação.

Riediker *et al.* (2004) investigaram a estabilidade de cinco antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina, penicilina G, oxacilina, ampicilina e cloxacilina) em diferentes extratos por um período de 28 dias sob condições distintas de temperatura, 4, -20 e -75°C, e verificaram que a menor taxa de degradação dos compostos ocorreu a -75°C em todos os extratos empregados ao final do período avaliado. Neste mesmo estudo, ensaios armazenados a 4°C tiveram uma perda superior a 50% de todos os antibióticos após seis dias de análise.

Similarmente em outro trabalho (RIEDKER *et al.*, 2004), a estabilidade da penicilina G foi estudada nas temperaturas de -20 e -76°C em tecido e em plasma armazenados por um período de 3 e 6 meses. Ambos os estudos indicaram uma perda de penicilina G a taxas diferentes à temperatura de -20°C, enquanto que a molécula se mostrou estável quando armazenada a -76°C para os períodos analisados.

Aguirre *et al.* (2006) abordaram o efeito da temperatura no rendimento da produção de cefalexina e ampicilina com penicilina acilase imobilizada em meio contendo etileno glicol. Observou-se que quanto mais baixa a temperatura testada maior o rendimento de produção, obtendo-se um rendimento próximo a 98% a 0°C para cefalexina enquanto que a 20°C esse aumento foi de 79%. Os autores também investigaram o efeito da hidrólise na degradação dos antibióticos e observou-se que quanto menor o teor de água no meio, maior a produtividade do processo.

Bersanetti *et al.* (2004) investigaram a degradação do AC em diferentes temperaturas (10-40°C) e verificaram que a estabilidade do AC diminuiu com o aumento da temperatura. Além disso, este estudo concluiu que a equação de Arrhenius pode ser usada para estabelecer uma relação entre velocidade de degradação de AC e temperatura.

Como já dito, o AC é tradicionalmente produzido em cultivos entre 25 e 30°C (JIANG *et al.*, 2004; BAPTISTA-NETO *et al.*, 2005). No entanto, apesar desses valores serem melhores para o crescimento celular, não há relatos se os mesmos são

apropriados para o lento consumo de fonte de carbono, que poderia minimizar os efeitos de inibição ou repressão na biossíntese de AC. Além disso, segundo Bersanetti *et al.* (2004), nessa faixa de temperatura a degradação de AC é mais pronunciada que a 20°C, por exemplo.

Nesse contexto, o estudo da degradação e produção de AC sob diferentes condições de temperatura torna-se necessário para a otimização no rendimento final do processo de produção deste fármaco. Considerando o efeito da temperatura no crescimento celular e degradação de AC, a produção de AC por *S.clavuligerus* em cultivos em diferentes condições de temperaturas foi estudada neste trabalho. Cultivos em batelada e batelada com pulsos de glicerol foram realizados em temperaturas constantes e com redução de temperatura após a fase de crescimento celular a fim de se avaliar a influência nas velocidades de consumo de glicerol e de degradação de AC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado na forma de células vegetativas a -70°C e suspensas em solução crioprotetora contendo 10% v/v de glicerol.

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Meio de cultura de reativação

Em todos os ensaios foi utilizados o meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al.* (2005), descrito na **Tabela 3.1**. O pH foi ajustado em 6,8 e o meio de cultura esterilizado a 121°C , 1 atm por 15 minutos.

Tabela 3.1 - Meio de cultura de Rosa *et al.* (2005)

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L^{-1})	21,0
Peptona bacteriológica (g.L^{-1})	10,0
Extrato de levedura (g.L^{-1})	1,0
Extrato de malte (g.L^{-1})	10,0
Tampão MOPS (g.L^{-1})	15,0
K_2HPO_4 (g.L^{-1})	0,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	0,75
Solução de sais ⁽¹⁾ (1mL.L^{-1})	2,5

⁽¹⁾ Composição (g.L^{-1} em água destilada): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; água destilada.

3.2.2. Meios de cultura de inóculo e de produção

Foram realizados cultivos em batelada e batelada com pulsos de glicerol para avaliar a produção de AC por *S. clavuligerus* em mesa incubadora rotativa (modelo G25 da New Brunswick Scientific Co.). Os meios de cultura de inóculo e de produção tiveram a mesma composição e foram baseados no meio proposto por Teodoro *et al.* (2006), (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Meio de cultura de Teodoro *et al.* (2006), modificado.

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L ⁻¹)	15,0
Proteína isolada de soja (g.L ⁻¹)	20,0
Tampão MOPS (g)	20,0
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais ⁽¹⁾ (1mL.L ⁻¹)	1

⁽¹⁾ Composição (g.L⁻¹ em água destilada): MnCl₂.4H₂O, 1,0; FeSO₄.7H₂O, 1,0; ZnSO₄.7H₂O, 1,0; água destilada.

O meio de cultura original proposto por Teodoro *et al.* (2006) continha óleo de soja (1g.L⁻¹) na sua composição. Neste estudo, o óleo de soja foi retirado da constituição do meio de cultura de produção e inóculo para garantir que os resultados em termos de produção de AC fossem exclusivamente em função do consumo de glicerol como única fonte de carbono.

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa

O procedimento para execução dos cultivos em mesa incubadora rotativa foi descrito por Rosa *et al.* (2005) e consiste de três etapas: reativação do microrganismo, crescimento e produção, sendo que os meios de cultura estão representados nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Primeiramente, 3,5 ml de suspensão de células vegetativas de *S. clavuligerus* mantidos em criotubos foram inoculados em Erlenmeyers de 500 ml contendo 50 ml de meio de reativação e estes incubados por 24 h a 30°C e 250 rpm (etapa de reativação).

Em seguida, 5 ml de suspensão foram transferidos para Erlenmeyers de 500 ml contendo 45 ml de meio de cultura de inóculo, de mesma composição do meio de cultura de produção. Estes foram incubados por 24 h a 30°C e 250 rpm (etapa de crescimento).

No estágio de produção, a suspensão de inóculo foi transferida na proporção de 10% v/v para um balão volumétrico de 3 L contendo meio de produção e mantido sob agitação. Volumes de 50 mL foram bombeados individualmente para Erlenmeyers de 500 mL e incubados em mesa incubadora rotativa em diferentes condições de temperaturas (como mostrado no item 3.3.2) e 250 rpm, dando início à etapa principal do processo de produção de AC.

O presente projeto foi dividido em duas etapas: na primeira etapa foi investigada a influência da temperatura na produção de AC durante o processo de fermentação por *S. clavuligerus*. Na segunda etapa, foi avaliada a influência da temperatura na degradação de AC no caldo de fermentação.

3.3.2. Avaliação da influência da temperatura na produção de AC

A influência da temperatura na produção de AC foi avaliada em cinco cultivos em batelada (B) e doze cultivos com pulsos de glicerol (BP). Três cultivos em batelada foram realizados a 30, 25 e 20°C durante todo o processo. Outros dois cultivos em batelada foram conduzidos a 30°C durante a fase de crescimento celular e consumo de glicerol (trofofase). Quando houve a exaustão do glicerol no caldo de fermentação, a temperatura foi reduzida para 25 e 20°C, respectivamente.

Nos cultivos em batelada com pulsos de glicerol (BP), um volume pré-estabelecido de solução de glicerol (100 g.L⁻¹) foi adicionado toda vez que a concentração de glicerol no caldo de cultivo estava abaixo de 4 g. L⁻¹ a fim de se obter uma concentração no caldo de 9 a 12 g.L⁻¹ após o pulso.

Todos os cultivos com pulsos foram conduzidos a 30°C durante a primeira fase de consumo de glicerol após a inoculação. Após a detecção da primeira exaustão de

glicerol, as temperaturas foram mantidas a 30, 25 e 20°C, respectivamente. Os cultivos em batelada com pulsos foram realizados com um, dois, três e quatro pulsos, respectivamente. As condições de cultivos estão representadas na **Tabela 3.3**.

Amostras de 1 mL foram retiradas aproximadamente a cada 12 h, centrifugadas a 3720·g e 4°C por 15 minutos e os sobrenadantes foram usados para análises de glicerol e AC. Todos os cultivos foram realizados em triplicata totalizando 51 experimentos. Para fins comparativos, o cultivo em batelada a 30°C foi considerado como controle.

Tabela 3.3 - Condições experimentais dos cultivos em mesa incubadora rotativa para avaliação da influência da temperatura na produção de AC.

Ensaio	T _i (°C)	T _G (°C)	Número de pulsos
B30-30	30	30	0
B30-25	30	25	0
B30-20	30	20	0
B25-25	25	25	0
B20-20	20	20	0
BP30-30-1	30	30	1
BP30-30-2	30	30	2
BP30-30-3	30	30	3
BP30-30-4	30	30	4
BP30-25-1	30	25	1
BP30-25-2	30	25	2
BP30-25-3	30	25	3
BP30-25-4	30	25	4
BP30-20-1	30	20	1
BP30-20-2	30	20	2
BP30-20-3	30	20	3
BP30-20-4	30	20	4

T_i: temperatura inicial. T_G: temperatura após exaustão de glicerol

3.3.3. Avaliação da influência da temperatura na degradação de AC

Os ensaios de degradação foram realizados com os caldos de cultivo obtidos dos ensaios em batelada com pulsos de glicerol. Após cada instante de exaustão de glicerol no caldo de fermentação, os mesmos foram transferidos em câmara de fluxo laminar para

tubos de centrifuga esterilizados a 120°C, 1 atm por 15 min, e centrifugados a 4°C e 3720-g por 15 minutos. Cerca de 20 mL de sobrenadante foram filtrados em membranas de 1 µm e transferidos assepticamente para Erlenmeyers de 25 mL. Esta etapa também foi feita de maneira asséptica em câmara de fluxo laminar. Os Erlenmeyers foram então transferidos para mesa incubadora rotativa a 250 rpm sob as mesmas temperaturas em que cada cultivo foi realizado (20, 25 e 30°C).

Amostras foram retiradas a cada 12 h para análise e acompanhamento da concentração de AC. Valores da constante de degradação do modelo de 1ª ordem (k_{dAC}) foram obtidos a partir do ajuste aos dados experimentais da equação de balanço de massa integrada.

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{dAC} \cdot t} \quad \text{Eq.3.1}$$

onde:

C: concentração de AC (mg.L^{-1})

C_0 : concentração de AC no início do ensaio de degradação, $C_0=C(t=0)$ (mg.L^{-1})

k_{dAC} : constante de degradação (h^{-1})

t: tempo (h)

3.4. Metodologia analítica

3.4.1. Análise da concentração de AC

A concentração de AC foi analisada pelo método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982). Neste método, a concentração de AC é avaliada por análise espectrofotométrica do produto de derivatização de AC com imidazol ($\lambda=311$ nm).

Para as análises de AC, amostras de 2 mL foram retiradas do sobrenadante após descongelamento, sendo uma alíquota de 1 mL adicionada a 5 mL de uma solução de imidazol (0,06 g/mL, pH 6,8) denominada solução A, e uma alíquota de 1 mL a qual foram adicionados 5 mL de água destilada, denominada solução B. O padrão de leitura para a solução A contém 1 mL de água destilada, adicionada a 5 mL da solução de imidazol e o padrão B é água destilada pura. As amostras em solução foram colocadas em banho-maria a 30°C por 15 minutos, para que ocorresse a derivatização.

As leituras de absorbância no espectrofotômetro foram realizadas a 311 nm

e o valor da diferença das absorvâncias das soluções A e B relacionados com a concentração de AC por uma curva de calibração.

3.4.2. Análise da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por método enzimático utilizando um kit para triacilglicerídeos (Triglycerides GPO-PAP, Liquid Stable Mono-reagent, Laborlab, Brasil). A curva de calibração foi obtida com solução de glicerol diluída em água em várias concentrações crescentes até 1 g.L^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivos em batelada em diferentes temperaturas

Três cultivos em batelada de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em meio contendo 15 g.L⁻¹ de glicerol foram realizados em triplicata a temperaturas de 30 (B30-30), 25 (B25-25) e 20°C (B20-20), respectivamente. O cultivo realizado a 30°C foi considerado como controle e todos os resultados foram comparados com os do mesmo. A **Figura 4.1** ilustra o efeito da temperatura na produção de AC e no consumo de glicerol.

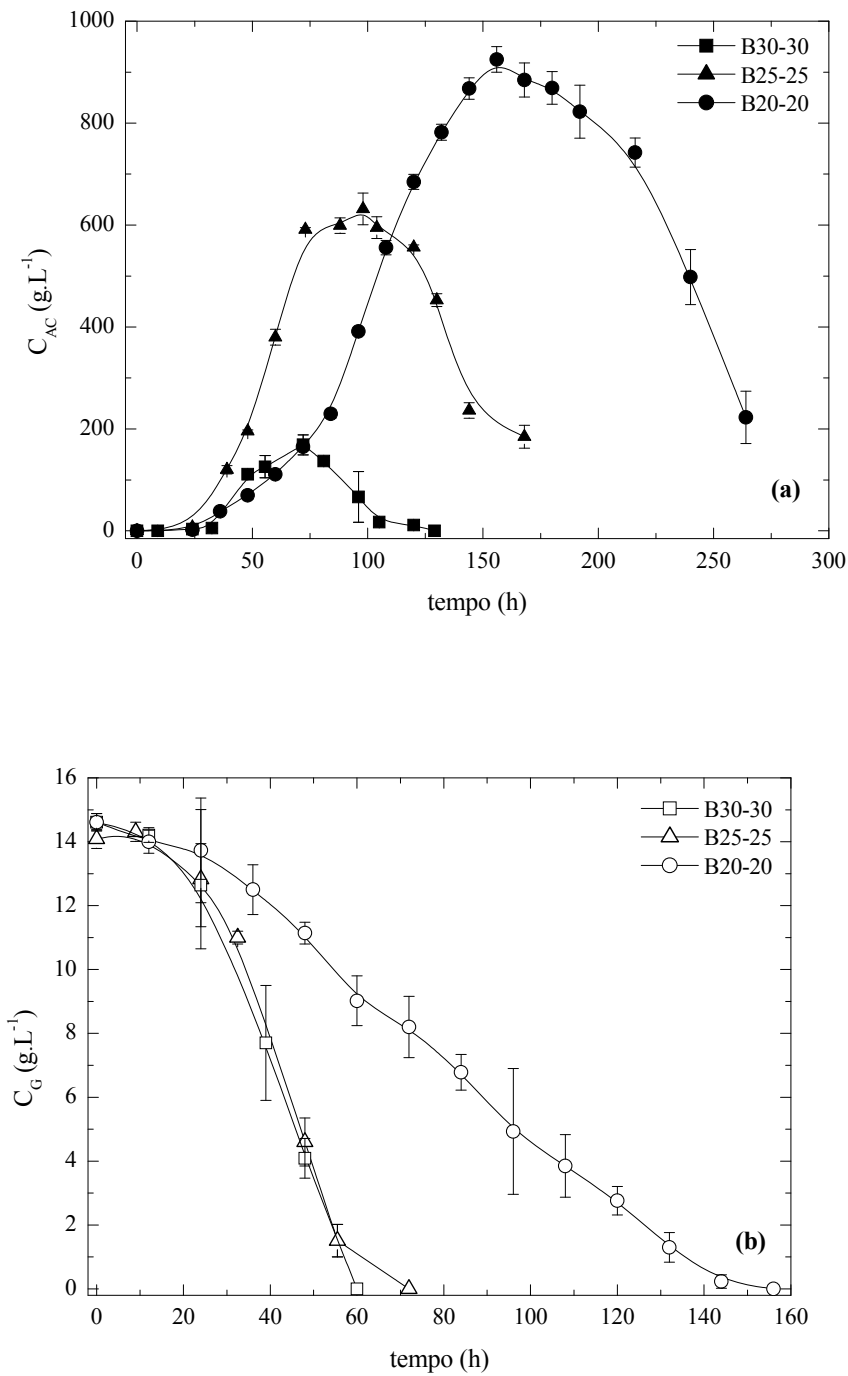


Figura 4.1 - Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos em batelada a 30 °C, 25 e 20°C: (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G)

Observa-se que a concentração máxima de AC decresceu com o aumento da temperatura. No cultivo controle (B30-30) a concentração máxima de AC acumulada no

caldo de fermentação foi de 168,7 mg.L⁻¹ na 72^a hora de cultivo seguida de um rápido decréscimo até a 132^a hora. O glicerol foi totalmente consumido às 55 h de cultivo. Já no ensaio em batelada a 25°C (B25-25), a máxima concentração de AC observada foi de 631,5 mg.L⁻¹ em 98 h. Entretanto, a maior concentração de AC foi observada no ensaio a 20°C (B20-20) de 925,0 mg.L⁻¹ em 156 h de cultivo, cerca de 5,5 vezes maior que a concentração de AC obtido no ensaio controle. As velocidades de consumo de glicerol foram similares para os cultivos B30-30 e B25-25 com valores de 0,227 e 0,219 g. L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, cerca de duas vezes o valor obtido a 20°C, de 0,100 g. L⁻¹.h⁻¹. Nos cultivos B30-30 e B25-25, verifica-se que após a exaustão do glicerol no caldo de cultivo a concentração de AC continua aumentando até que decresce rapidamente, enquanto que no ensaio B20-20, o decréscimo de AC ocorre imediatamente após o término do consumo de glicerol. De acordo com Romero et al. (1984), após o consumo de glicerol por *S. clavuligerus*, ele é metabolizado como fonte de carbono e energia e também como precursor da molécula de AC. Neste trabalho observa-se que o lento consumo de glicerol no ensaio B20-20, resultado da baixa temperatura, evitou a inibição pelo substrato e favoreceu o direcionamento de glicerol como precursor na biossíntese de AC.

Apesar das velocidades de consumo de glicerol terem sido muito semelhantes para os cultivos B30-30 e B25-25, o glicerol foi melhor metabolizado como precursor de AC a 25°C e a produção líquida de AC foi cerca de 3,4 vezes maior que a produção a 30°C. Estes resultados indicam que a produção de AC é favorecida pelo uso de baixa temperatura preferencialmente a temperaturas elevadas. Yuan et al. (2005) obtiveram resultados similares para produção de xilanase por *Aspergillus niger* em cultivos em batelada com redução de temperatura. Os resultados obtidos neste trabalho contrastam com os observados por Marques et al. (2009) que investigaram a formação de AC durante a fermentação de *S. clavuligerus* DAUPFE 3060 em temperaturas que variaram entre 24 e 40°C utilizando glicerol como fonte de carbono. Em desacordo com o presente estudo, esses autores verificaram uma maior produção de AC de 539.0 mg.L⁻¹ a 32°C, após 54 h de um cultivo que totalizou 120 h. Entretanto, é importante observar que as linhagens de *S. clavuligerus* utilizadas em ambos os trabalhos são diferentes.

4.2. Cultivos em batelada com redução de temperatura

Neste outro conjunto de ensaios, o efeito da redução de temperatura na produção de AC foi avaliado. Sabe-se que a temperatura de 30°C é adequada para o crescimento de *S. clavuligerus*, reduzindo a fase de crescimento do microrganismo. Entretanto, a baixas temperaturas o consumo de glicerol e a degradação de AC são lentos. Conseqüentemente, a produção líquida de AC (produção menos degradação) é maior. E por isso, ainda que as temperaturas ótimas de crescimento do microrganismo e de formação de AC sejam distintas, o emprego de duas temperaturas durante o cultivo pode ser vantajoso para a produção líquida de AC. Dessa forma, as estratégias de redução de temperatura utilizada nesta etapa foram: o cultivo foi mantido a 30°C até a exaustão de glicerol no meio e então a temperatura foi reduzida para 25 (B30-25) ou 20°C (B30-20), respectivamente. A **Figura 4.2** ilustra os perfis de concentração de AC obtidos nos cultivos a 30°C (controle) e com redução de temperatura, B30-25 e B30-20.

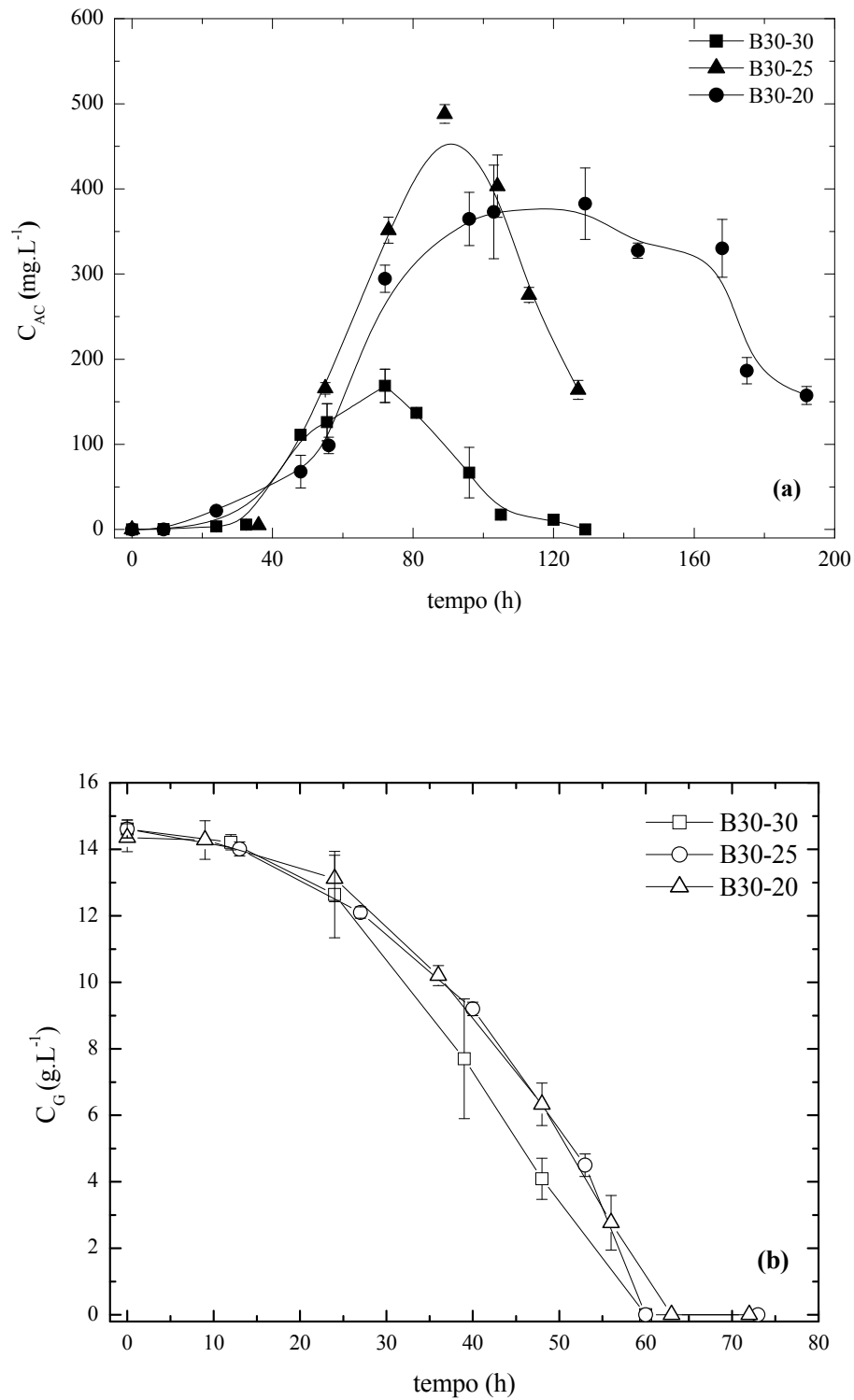


Figura 4.2 – Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos controle e em batelada com redução de temperatura para 25 e 20°C: (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G).

Nos cultivos B30-25 e B30-20, a exaustão de glicerol no caldo de fermentação se deu em intervalos similares uma vez que a temperatura na trofofase para ambos os cultivos foram similares. Após a completa exaustão de glicerol no caldo de fermentação às 60 h (B30-25) e 65 h (B30-20) de cultivo (**Figura 4.2 a e b**), a produção líquida de AC teve um aumento pronunciado nos cultivos com redução de temperatura em relação ao padrão. Provavelmente isso é devido à redução do efeito de inibição pelo glicerol. Segundo Baptista-Neto et al. (2005), este fato indica que os produtos do catabolismo do glicerol pode atuar como precursores ou inibidores da biossíntese de AC. A literatura clássica ainda relata que catabólitos carbônicos inibem a produção de penicilina em *Penicillium chrysogenum* (REVILLA et al., 1984) e de cefamicina em *S. clavuligerus* (AHARONOWITZ E DEMAIN, 1978).

As concentrações máximas de AC observadas foram de 488,0 mg.L⁻¹ no ensaio em batelada B30-25 e 382,7 mg.L⁻¹ no ensaio B30-20 (**Figura 4.2 a e b**), que são menores que as obtidas para os cultivos sob temperatura constante (B25-25 e B20-20) (**Figura 4.1 a e b**). No entanto, a estratégia utilizada de redução de temperatura ainda mostrou-se bastante eficaz ao aumentar a produtividade do processo e a produção de AC cerca de 2,2 vezes no cultivo B30-20 e 2,9 vezes no cultivo B30-25 em relação ao controle (B-30-30). A maior produção líquida de AC obtida foi devido principalmente à menor degradação de AC em baixas temperaturas uma vez que a elevada taxa de consumo de glicerol observada representa uma desvantagem na produção de AC por *S. clavuligerus*.

4.3. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol e redução de temperatura

Glicerol é essencial para a biossíntese de AC e é umas das melhores fontes de carbono para o processo de produção de AC (BAGGALEY et al., 1997; IVES E BUSHELL, 1997; ELSON E OLIVER, 1978). Chen et al. (2002) relataram que a biossíntese de AC durante fermentação em incubador rotativo por *S. clavuligerus* foi prolongada com alimentação de glicerol e a produção aumentou para 270 mg.L⁻¹ se comparado com o controle (115 mg.L⁻¹) que não recebeu alimentação de glicerol. Neste trabalho, o efeito da alimentação por pulsos de glicerol na produção de AC por *S. clavuligerus* foi estudada sob temperatura constante a 30°C e com redução de temperatura após o consumo inicial de glicerol. Baseado na hipótese de que a quantidade inicial de

glicerol foi consumida rapidamente pelo metabolismo primário durante a trofofase a 30°C, prejudicando a produção de AC, esse conjunto de ensaios em batelada com redução de temperatura foi desenvolvido para avaliar a produção de AC nestas condições. A hipótese era que o uso da baixa temperatura minimizasse os efeitos de degradação levando ao maior acúmulo de AC no caldo de fermentação.

Os principais resultados obtidos nos ensaios em batelada com pulsos estão mostrados na **Tabela 4.1** nas **Figuras 4.6, 4.9 e 4.12** e ilustram os perfis de concentrações de AC e de glicerol ao longo do tempo para os melhores cultivos com pulsos em cada condição de temperatura, BP30-30-4, BP30-25-3 e BP30-20-2.

Nos ensaios em batelada a 30°C, o primeiro pulso se deu às 55 h de cultivo. Em seguida, pulsos adicionais de glicerol foram dados quando a concentração de glicerol no meio era inferior a 4 g.L⁻¹. O segundo pulso foi dado às 78 h de cultivo, o terceiro às 96 h e o quarto às 120h. As **Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6** representam os resultados de produção de AC e consumo de glicerol obtidos para os cultivos em batelada com pulsos a 30°C BP30-30-1, BP30-30-2, BP30-30-3 e BP30-30-4, respectivamente.

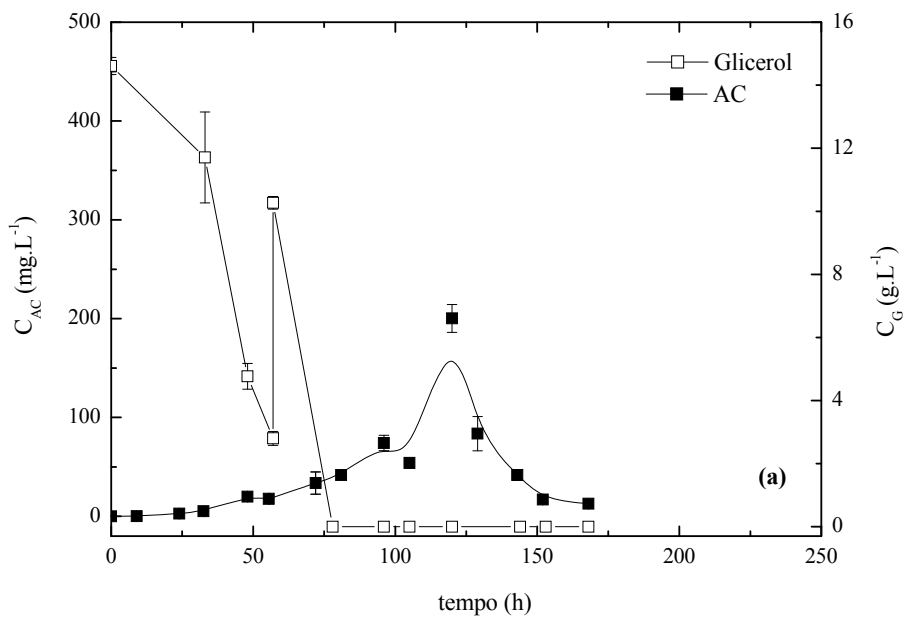


Figura 4.3 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 1 pulso de glicerol a 30°C.

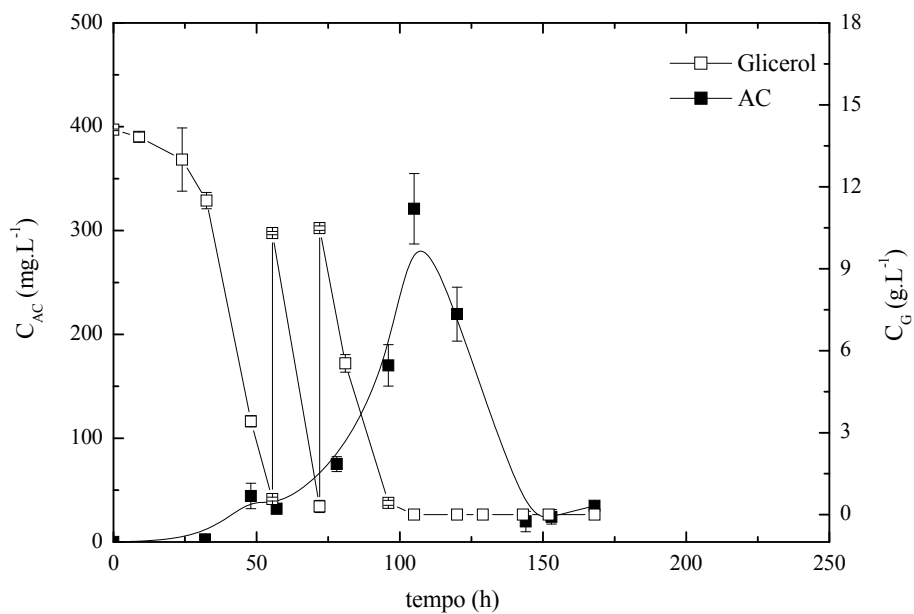


Figura 4.4 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol a 30°C:

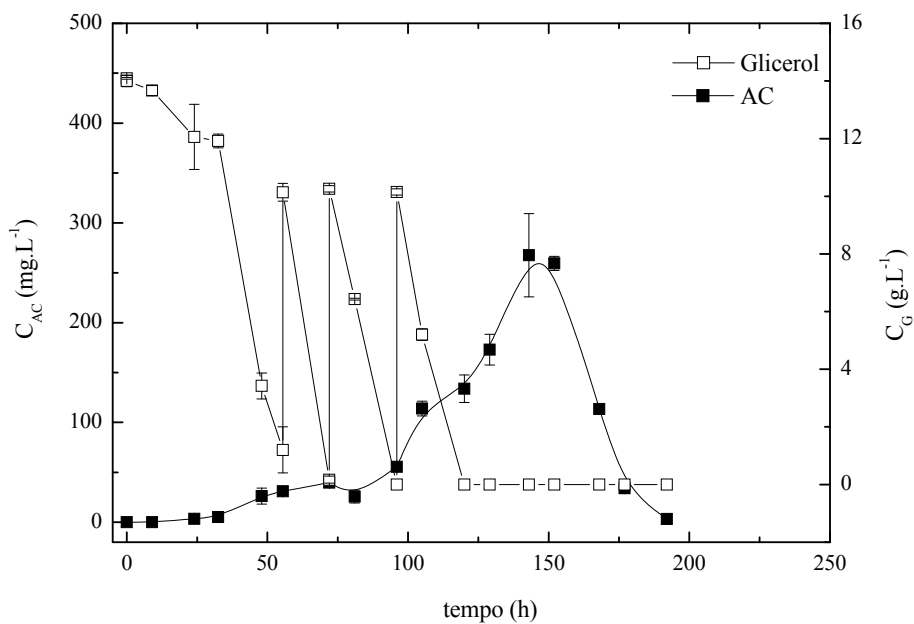


Figura 4.5 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 3 pulsos de glicerol a 30°C.

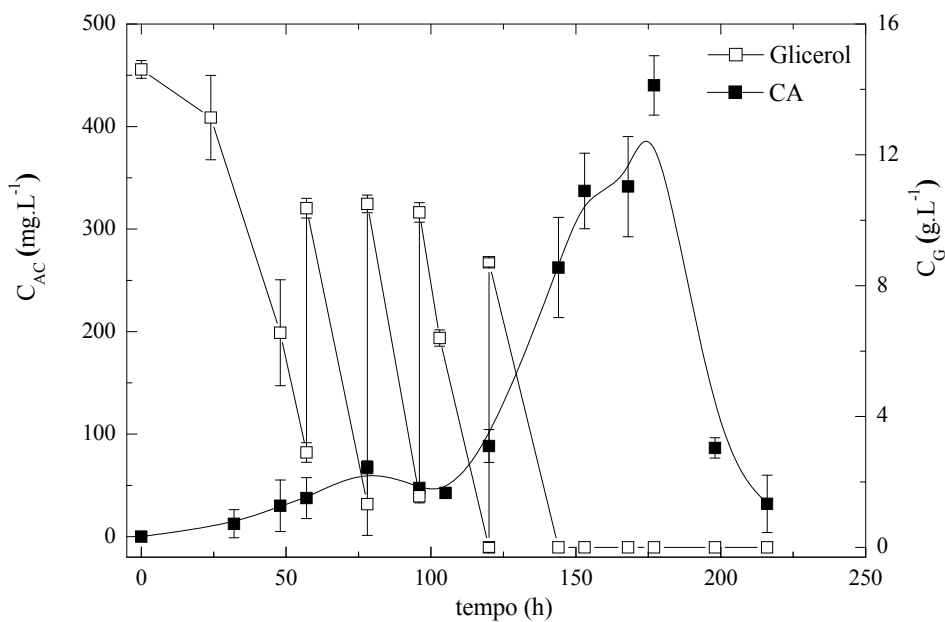


Figura 4.6 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 4 pulsos de glicerol a 30°C.

Em todos os cultivos a 30°C com pulsos de glicerol a produção de AC aumentou com o aumento no número de pulsos, confirmando o observado por Chen et al. (2003). As velocidades de consumo de glicerol foram muito semelhantes nos ensaios e variaram entre 0,316 e 0,363 g.L⁻¹.h⁻¹, valor superior ao obtido no cultivo controle de 0,227 g.L⁻¹.h⁻¹ (**Tabela 4.1**). Apesar das concentrações máximas de AC obtidas terem aumentado com o número de pulsos, em geral as produtividades máximas ($P_{AC-máx}$) do processo mantiveram-se próximas ou pouco superiores a observada no cultivo controle, de 1,9 mg.L⁻¹.h⁻¹, e os coeficientes de rendimento de glicerol em AC ($Y_{AC/G}$) foram inferiores ao obtido no cultivo controle, 10,2 mg.g⁻¹. Isso sugere que o glicerol foi rapidamente consumido e mais direcionado no metabolismo primário celular em detrimento da biossíntese de AC.

A **Figura 4.6** ilustra o melhor resultado obtido para produção de AC a 30°C que foi para o ensaio com 4 pulsos de glicerol (BP30-30-4). A máxima produção líquida de AC foi de 440,1 mg.L⁻¹, cerca de 2,6 vezes maior que a observada para o ensaio controle. Além disso, após o início dos pulsos a velocidade de consumo de glicerol foi de 0,342 g.L⁻¹.h⁻¹, aproximadamente 50% maior que a mesma no ensaio controle.

Na sequência são apresentados os gráficos dos perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo para os ensaios em batelada com pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C, ilustrados nas **Figura 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10**.

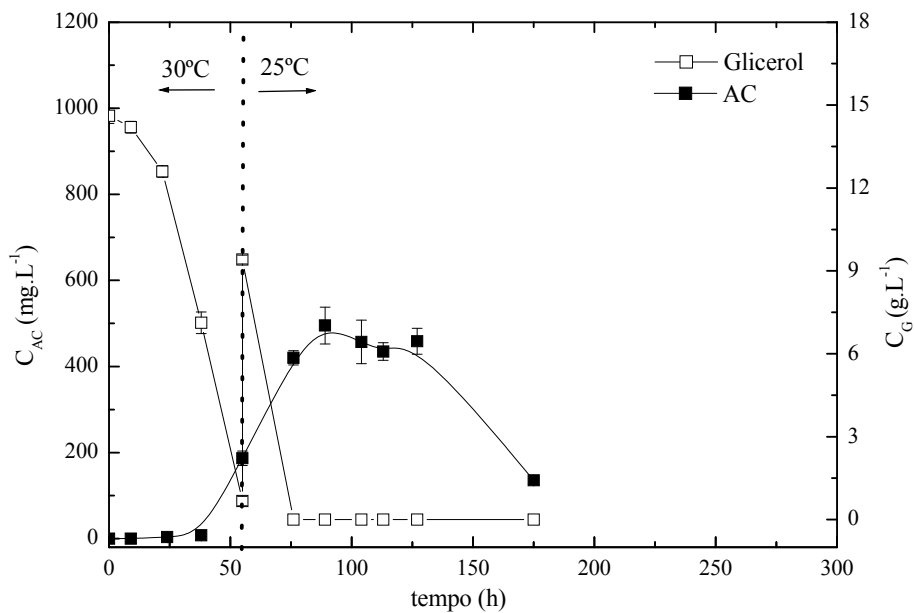


Figura 4.7 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 1 pulso de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.

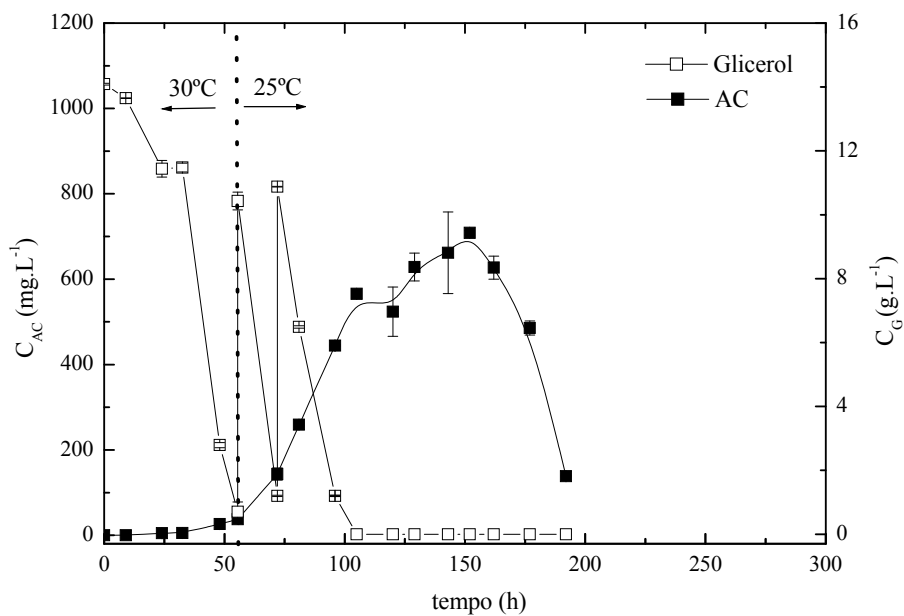


Figura 4.8 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.

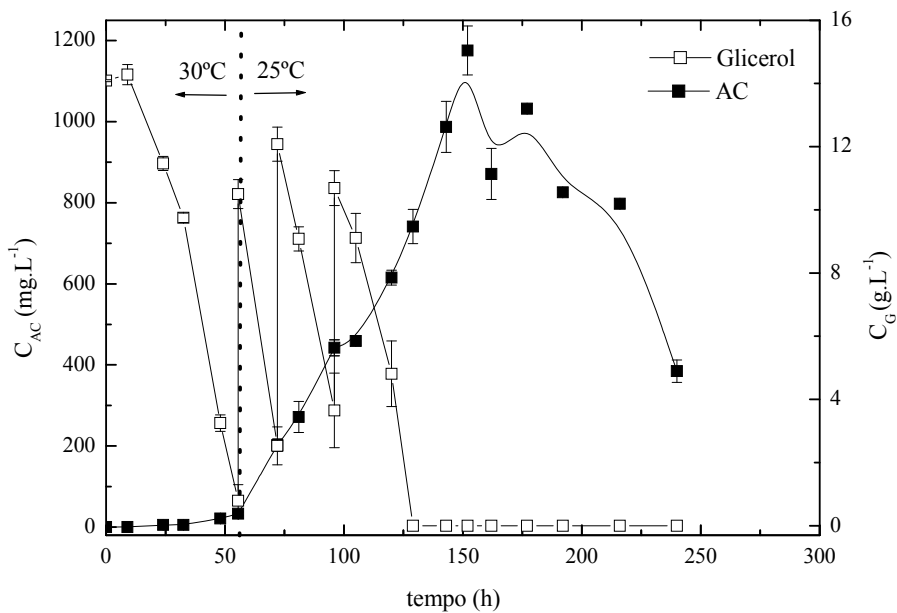


Figura 4.9 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 3 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.

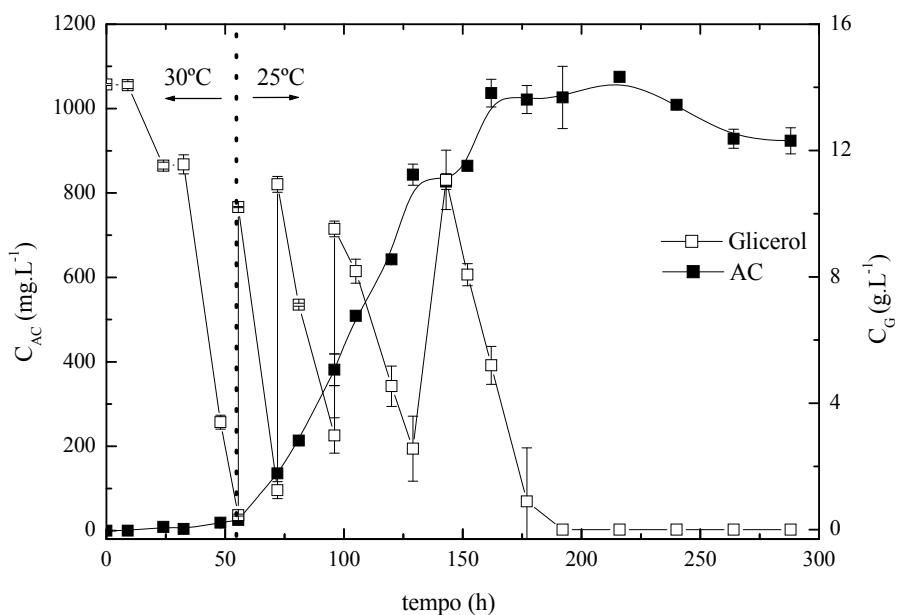


Figura 4.10 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 4 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C.

Em todos os cultivos a 25°C a redução de temperatura ocorreu às 55 h de cultivo, após a exaustão de glicerol no caldo de cultivo. Pulsos adicionais de glicerol foram dados como descrito anteriormente nas 72^a, 96^a e 129^a horas de cultivo.

As velocidades de consumo de glicerol para este conjunto de ensaios foram superiores à do cultivo controle, com variações entre 0,328 e 0,401 g.L⁻¹.h⁻¹. As concentrações máximas de AC aumentaram com o número de pulsos até o terceiro pulso quando se atingiu o valor máximo. A concentração máxima de AC obtida no ensaio BP30-25-4 foi inferior à obtida no cultivo BP30-25-4, sugerindo que o glicerol em excesso possa estar atuando como inibidor na biossíntese de AC. Ainda assim, observa-se que em todos os cultivos com redução de temperatura para 25°C a concentração máxima de AC foi bastante superior à do cultivo controle, atingindo valores de mais de 1g.L⁻¹. Além disso, o coeficiente de rendimento de glicerol em ($Y_{AC/G}$) foram muito superiores ao obtido no cultivo controle, indicando que a metabolização de glicerol nessa condição de temperatura é melhor direcionada para a biossíntese de AC.

O cultivo BP-30-25-3 apresentou os melhores resultados desse conjunto de experimentos (**Figura 4.9**). Pode-se observar que a produção máxima de AC foi de 1115,6 mg.L⁻¹, aproximadamente 6,6 vezes superior a obtida no cultivo controle. Além disso, também foi observada uma alta produtividade volumétrica em AC de 7,3 mg.L⁻¹, que é o melhor resultado dentre todos os cultivos. A velocidade de consumo de glicerol foi de 0,339 g.L⁻¹.h⁻¹, cerca de 49% maior que a verificada no cultivo controle. Provavelmente, altas velocidades de consumo de glicerol geram produtos de degradação intracelular que inibem a síntese de AC. Produção de AC obtida no cultivo BP-30-25-4 apresentou resultados semelhantes aos obtidos no cultivo BP-30-25-3, no entanto mais fonte de carbono foi utilizada.

Para os demais cultivos com pulsos de glicerol, a redução de temperatura de 30 para 20°C também ocorreu às 55 h de cultivo quando houve a exaustão de glicerol no caldo de fermentação (**Figura 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14**). Os demais pulsos foram dados nas 81^a, 129^a e 168^a horas de cultivo.

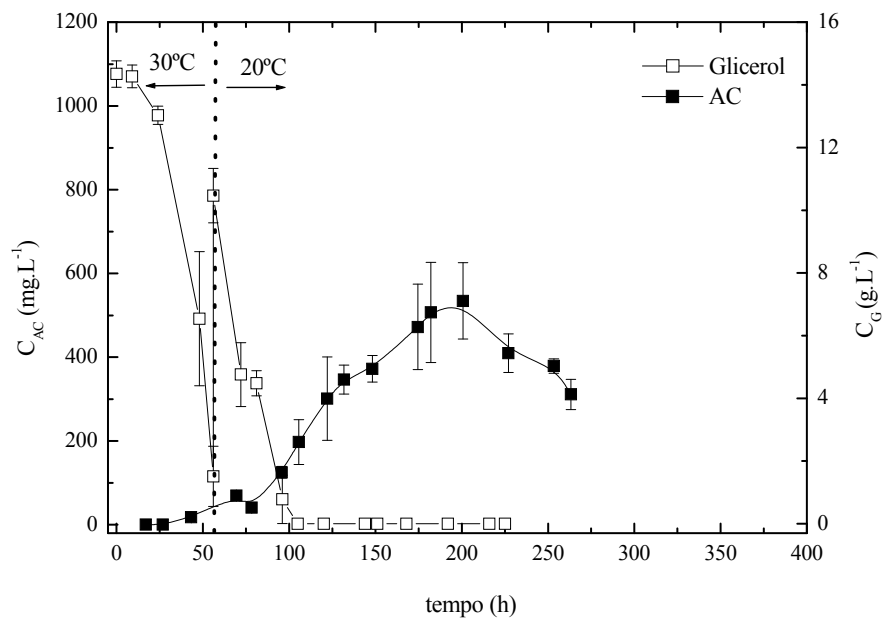


Figura 4.11 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 1 pulso de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.

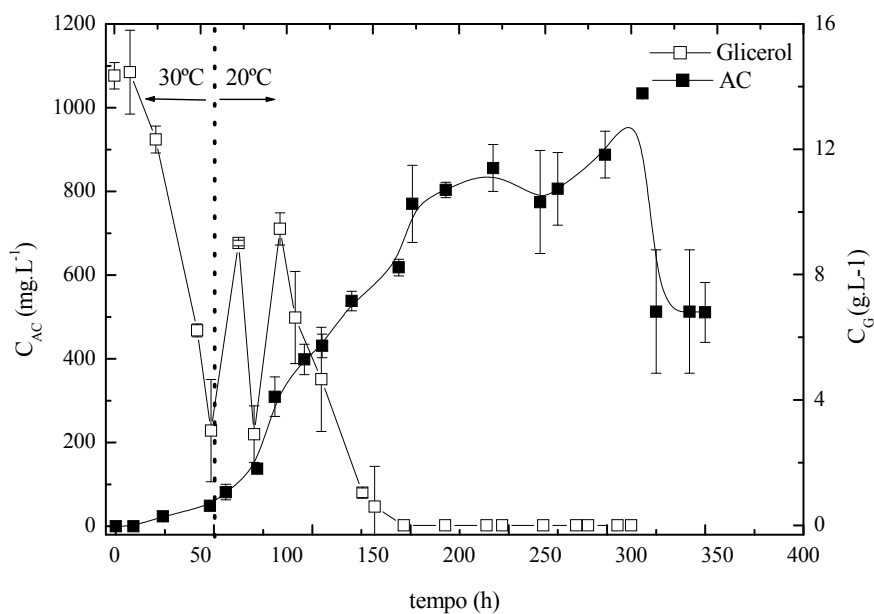


Figura 4.12 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.

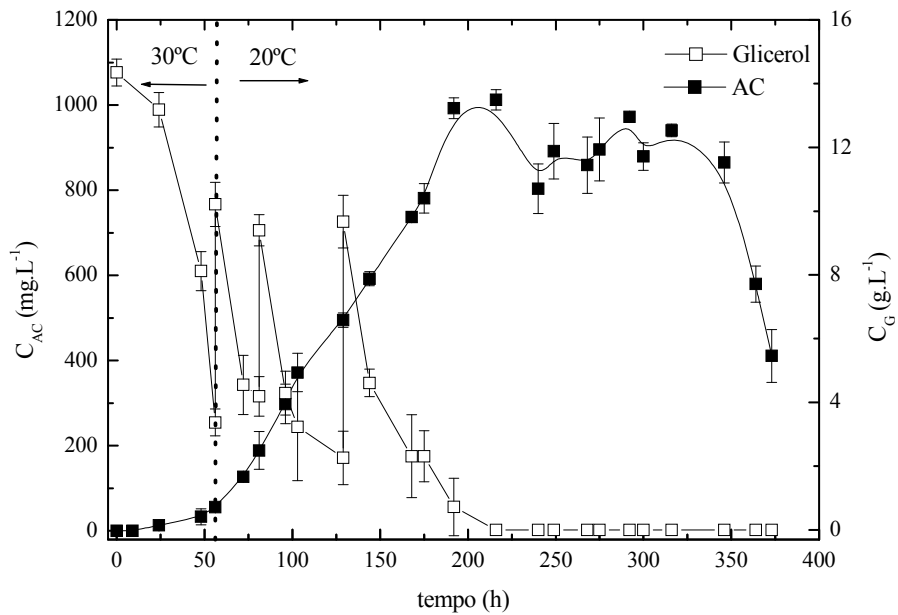


Figura 4.13 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 3 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.

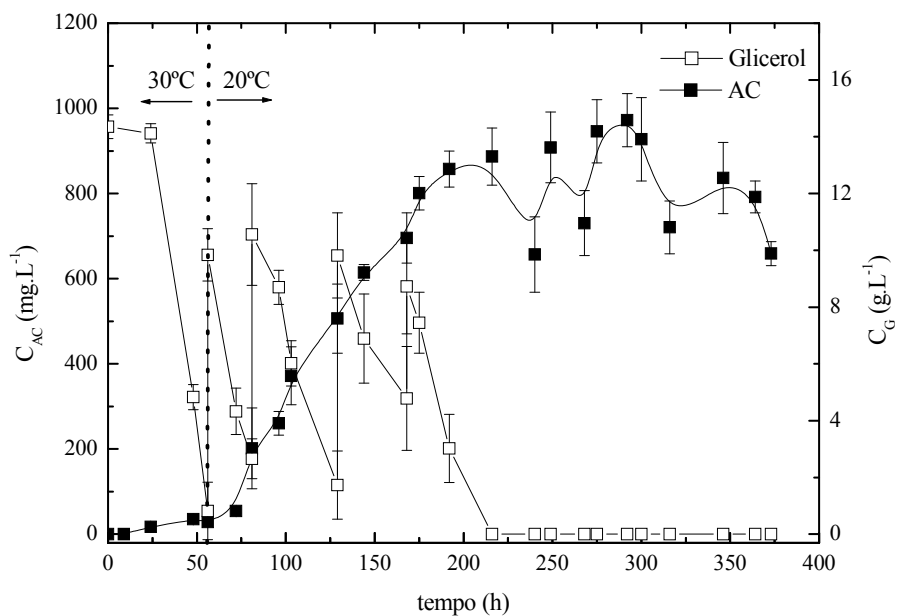


Figura 4.14 – Perfis de concentração de AC e glicerol ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 4 pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 20°C.

Neste conjunto de ensaios, a velocidade de consumo de glicerol foi inferior às dos demais ensaios com redução de temperatura e pulsos de glicerol, sugerindo que a baixa temperatura regulou a velocidade de consumo de glicerol. Como observado na **Tabela 4.1**, as concentrações máximas de AC, produtividades máximas ($P_{ACmáx}$) e os coeficientes de rendimento glicerol em AC ($Y_{AC/G}$) obtidos nesses cultivos foram superiores às obtidas no cultivo controle, ressaltando a importância da temperatura no processo de otimização do AC.

Nestas condições, os melhores resultados foram obtidos no cultivo com 2 pulsos (BP30-20-2). A **Figura 4.12** ilustra os resultados obtidos nesse ensaio. A produção máxima de AC foi de $1034,2 \text{ mg.L}^{-1}$, o que representa 6,1 vezes a produção máxima obtida no cultivo controle. Durante um longo período, 150 às 250 h de cultivo, a concentração de AC foi mantida em altos níveis, provavelmente devido à menor degradação de AC no caldo de fermentação nesta temperatura. A velocidade de consumo de glicerol foi $0,203 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Para fins comparativos a **Tabela 4.1** apresenta os principais resultados obtidos nos cultivos realizados.

Tabela 4.1 – Condições experimentais e principais resultados obtidos nos cultivos em batelada (B) e batelada com pulsos de glicerol (BP).

Ensaio	T _i (°C)	T _G (°C)	Pulsos	C _{AC-max} (mg.L ⁻¹)	P _{AC-max} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{AC/G} (mg.g ⁻¹)	r _G (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
B30-30	30	30	0	168,2	2,3	10,2	0,227
B30-25	30	25	0	488,0	5,5	26,0	0,210
B30-20	30	20	0	382,7	3,0	14,3	0,206
B25-25	25	25	0	631,6	6,4	26,4	0,219
B20-20	20	20	0	925,0	5,9	59,3	0,100
BP30-30-1	30	30	1	200,2	1,9	6,0	0,316
BP30-30-2	30	30	2	267,6	2,2	6,4	0,349
BP30-30-3	30	30	3	321,0	2,3	6,2	0,363
BP30-30-4	30	30	4	440,1	2,5	7,4	0,342
BP30-25-1	30	25	1	495,0	5,6	15,8	0,351
BP30-25-2	30	25	2	708,7	4,7	11,6	0,401
BP30-25-3	30	25	3	1115,6	7,3	21,0	0,339
BP30-25-4	30	25	4	1074,9	5,0	15,2	0,328
BP30-20-1	30	20	1	534,6	3,2	13,5	0,235
BP30-20-2	30	20	2	1034,2	4,0	25,9	0,203
BP30-20-3	30	20	3	1011,0	4,7	19,0	0,216
BP30-20-4	30	20	4	972,0	3,3	15,4	0,181

T_i: temperatura inicial. T_G: temperatura após a primeira exaustão de glicerol.

A **Figura 4.15** ilustra a concentração máxima de AC (C_{AC-max}) obtida das triplicatas dos cultivos em batelada com pulsos de glicerol e redução de temperatura.

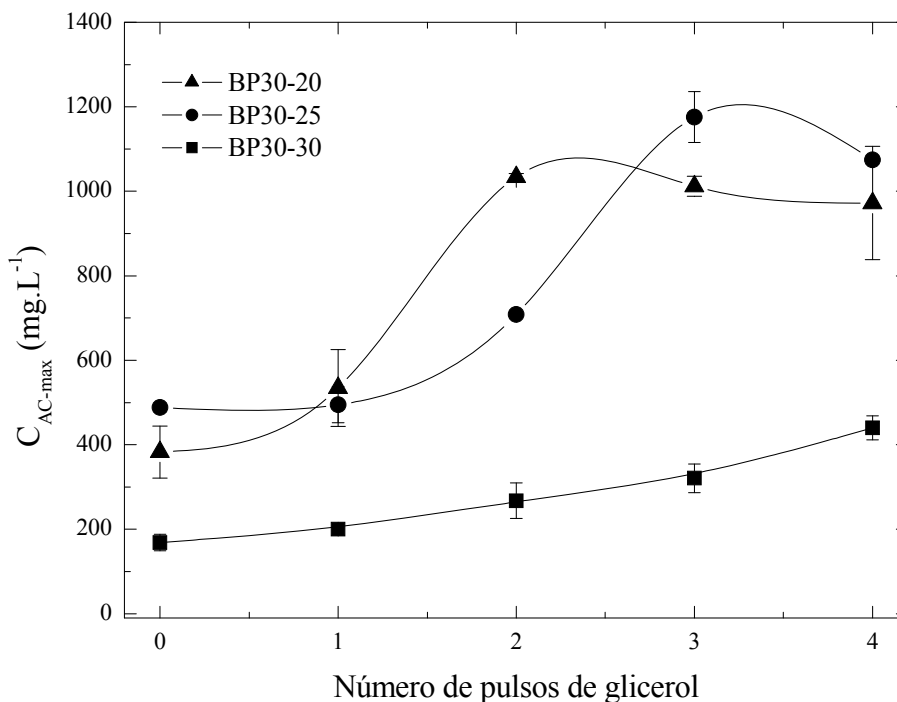


Figura 4.15 - Concentração máxima de (CAC-max) nos cultivos em batelada com redução de temperatura em função do número de pulsos de glicerol.

Em geral, a produção de AC aumentou com o aumento do número de pulsos de glicerol, confirmando o observado por Chen et al. (2003). Isto revela que o glicerol poderia ser utilizado continuamente para a biossíntese de AC e que o controle do consumo de glicerol e da degradação de AC pelo uso da baixa temperatura pode potencializar a produção líquida de AC. Quando a temperatura é reduzida, a concentração máxima de AC foi observada para os cultivos com menores números de pulsos. A máxima concentração de AC observada foi de 1115,6 mg.L⁻¹ para o cultivo com redução de temperatura de 30 para 25°C com três pulsos de glicerol (BP-30-25-3), o que significa um aumento de produção máxima de 6,6 vezes se comparado ao cultivo controle e 3,4 vezes maior que o obtido para o cultivo com três pulsos a 30°C (BP-30-30-3), confirmando o efeito positivo da redução de temperatura durante a fermentação de AC. No cultivo BP-30-25-3, uma adequada velocidade de consumo de glicerol e uma menor degradação de AC promoveram a melhor condição para o acúmulo de AC no caldo de fermentação.

As elevadas concentrações de AC obtidas para os cultivos a 20°C

provavelmente foi devido ao lento consumo de glicerol proporcionando melhor metabolização do glicerol como fonte de carbono e como precursor na síntese de AC em baixas temperaturas. Além disso, a alta produção pode ser explicada pela maior viabilidade celular em longos períodos a baixas temperaturas, como observado com células animais por Yoon et al. (2002).

Com relação aos melhores resultados, a maior produção líquida de AC (C_{AC-max}) de 1115,6 mg.L⁻¹ e produtividade volumétrica (P_{CA-max}) de 7,3 mg.L⁻¹.h⁻¹ foram obtidas no ensaio BP-30-25-3. Valores similares de concentração máxima de AC foram encontrados para os ensaios BP30-25-4, BP30-20-2 e BP30-20-3. Entretanto, o máximo rendimento de produto (AC) em relação ao consumo de glicerol foi de 59,3 mg_{CA}.g_G⁻¹ obtido no cultivo B20-20, que também apresentou a menor velocidade de consumo de glicerol (r_G) de 0.100 g.L⁻¹.h⁻¹.

Apesar das máximas produções de AC obtidas nos cultivos com redução de temperatura terem ocorrido em períodos tardios da fermentação, a produtividade do processo ainda sim foi superior em relação ao ensaio controle. A máxima produção e produtividade em AC encontradas neste estudo foram as maiores já observadas na literatura para cultivos com meio de cultura complexo em batelada e batelada com alimentação de glicerol em mesa incubadora rotativa utilizando linhagem selvagem de *S. clavuligerus* (CHEN et al., 2002; 2003; WANG et al., 2005; MARANESI et al., 2005).

4.4. Estudo da Degradação de AC

Com o objetivo de se determinar qual a melhor condição de temperatura que aliasse uma melhor produção com menor degradação de AC no caldo de cultivo, foi realizado um estudo da cinética de hidrólise desse antibiótico em diferentes temperaturas e em diferentes tempos ao longo do processo fermentativo.

Foram retiradas amostras nos cultivos em batelada com redução de temperatura ao final de cada um dos quatro pulsos em cada temperatura avaliada (BP30-20-4, BP30-25-4 e BP30-30-4) para posterior estudo de degradação. As amostras foram assepticamente centrifugadas e filtradas em membranas de 1µm para serem utilizadas nos ensaios de hidrólise. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para fins comparativos, o ensaio utilizado como controle foi o realizado a 30°C, sendo os demais resultados comparados com os obtidos nesse.

As constantes de degradação de AC relativas ao modelo de degradação de primeira ordem (k_{dAC} , h^{-1}) foram estimadas pelo ajuste do modelo não linear aos dados experimentais obtidos. Os ajustes obtidos para o cálculo das constantes de hidrólise (k_{dAC}) no sobrenadante dos caldos de cultivo podem ser visualizados nas **Figuras 4.16, 4.17 e 4.18** e **Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4**, juntamente com os coeficientes de correlação referentes aos ajustes.

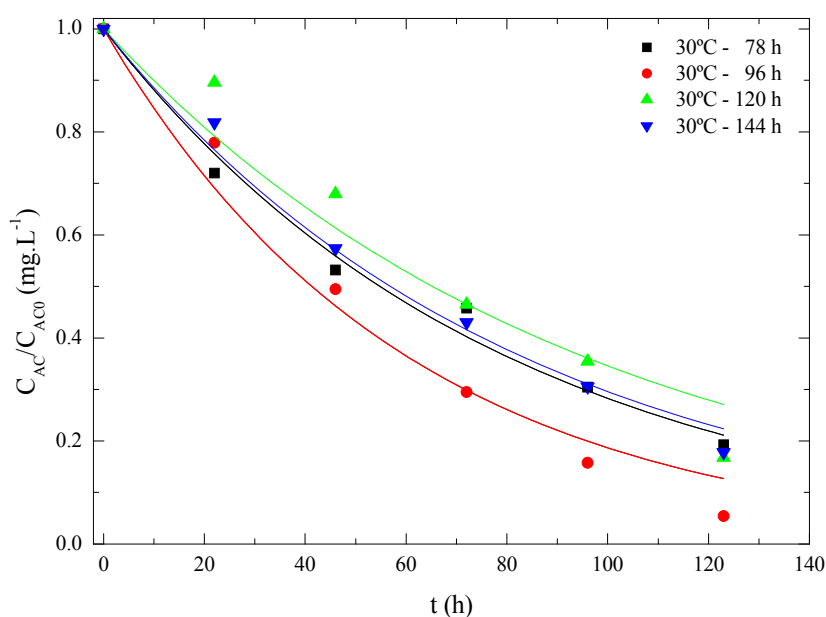


Figura 4.16 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4: 78h ($r^2=0,990$), 96h ($r^2=0,98$), 120h ($r^2=0,96$) e 144h ($r^2=0,990$).

Tabela 4.2 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4.

tempo (h)	k_{dAC} (h^{-1})	r^2
78	$0,01264 \pm 0,00059$	0,990
96	$0,01678 \pm 0,00133$	0,98
120	$0,01062 \pm 0,00107$	0,96
144	$0,01218 \pm 0,00054$	0,990

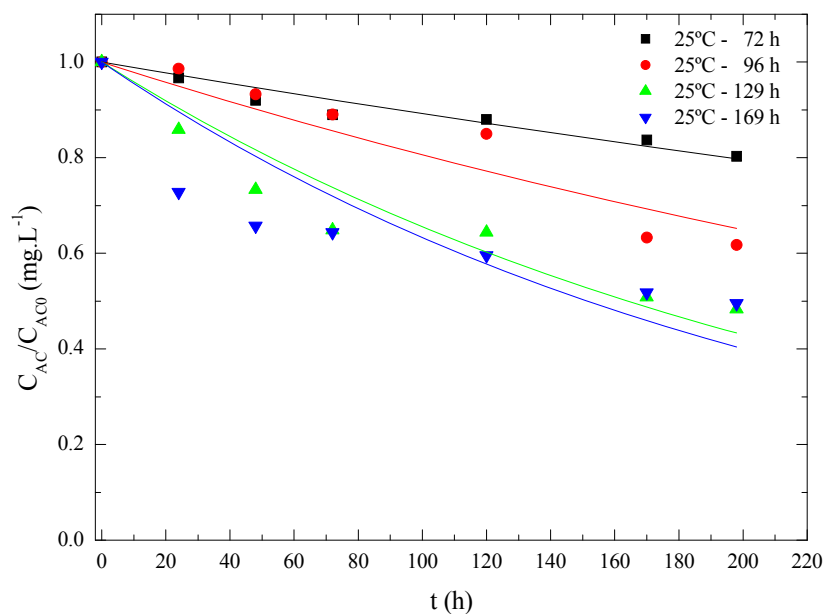


Figura 4.17 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4: 72h ($r^2=0,94$), 96h ($r^2=0,92$), 129h ($r^2=0,90$) e 169h ($r^2=0,81$)

Tabela 4.3 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4.

tempo (h)	k_{dAC} (h^{-1})	r^2
72	$0,00114 \pm 0,00007$	0,94
96	$0,00216 \pm 0,00023$	0,92
129	$0,00422 \pm 0,00038$	0,90
169	$0,00458 \pm 0,00071$	0,81

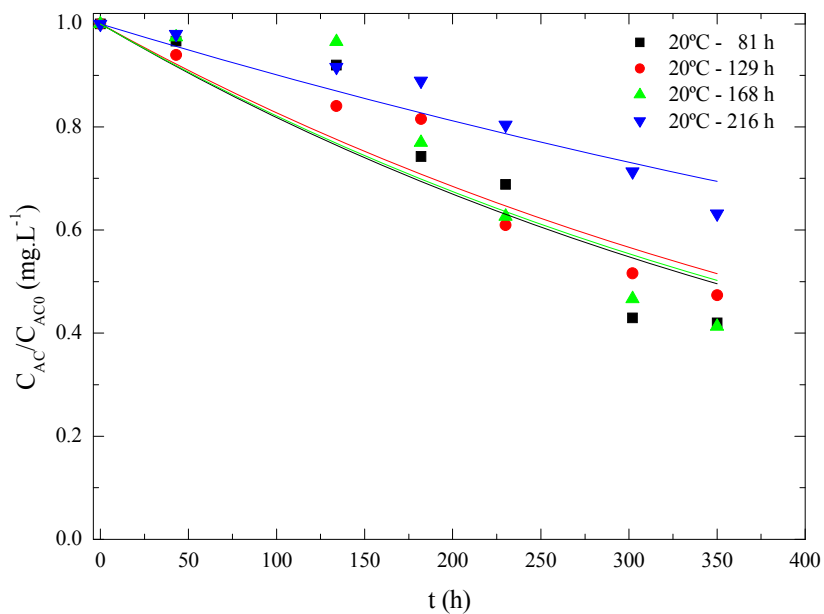


Figura 4.18 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4: 81h ($r^2=0,86$), 129h ($r^2=0,92$), 168h ($r^2=0,83$) e 216h ($r^2=0,91$).

Tabela 4.4 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4.

tempo (h)	k_{dAC} (h^{-1})	r^2
81	$0,00200 \pm 0,00028$	0,86
129	$0,00189 \pm 0,00018$	0,92
168	$0,00197 \pm 0,00031$	0,83
216	$0,00104 \pm 0,00010$	0,91

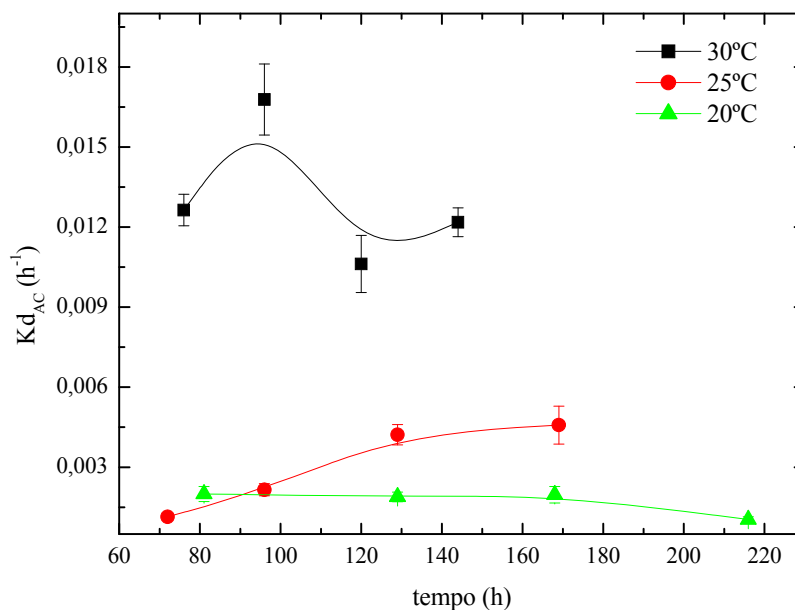


Figura 4.19 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao longo do tempo em cultivos a 30, 25 e 20°C.

Observa-se que a constante global de degradação de AC, (**Figura 4.19**), no caldo de fermentação aumenta com o aumento de temperatura como já retratado em outros trabalhos (BERSANETTI et al., 2004; ROUBOS et al., 2002; MARQUES et al., 2009), confirmando que a molécula de AC assim como outros compostos beta-lactâmicos é altamente instável diante de temperaturas mais elevadas.

Para fins comparativos, pode-se representar a degradação em cada um dos cultivos por uma constante de degradação global de AC (k_{dAC} global) como a média das constantes de degradação obtidas ao longo dos cultivos nas diferentes temperaturas, uma vez que os valores não tiveram uma variação tão grande. A **Tabela 4.5** apresenta os valores de k_{dAC} globais juntamente com os desvios-padrão.

Tabela 4.5 - Constantes globais de degradação de AC (k_{dAC} globais) obtidas nos caldos de cultivo em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	k_{dAC} global (h^{-1})
30	$0,01306 \pm 0,00263$
25	$0,00303 \pm 0,00165$
20	$0,00173 \pm 0,00046$

Bersanetti et al. (2004) investigaram o efeito da temperatura entre 10 e 40°C sob condições controladas de pH de 6,2 e 7,0, na degradação de AC em caldos de fermentação utilizando um meio de cultura similar ao utilizado neste estudo. Os autores observaram que a hidrólise de AC é maior quanto maior a temperatura para ambas as condições de pH estudadas e que a molécula de AC é mais estável em pH em torno de 6,2. As constantes cinéticas de hidrólise obtidas por Bersanetti et al. (2004) para as temperaturas de 20, 25 e 30°C em pH 6,2 foram 0,0218, 0,0256 e 0,0294 h^{-1} , respectivamente. A 30°C, a constante de degradação de AC foi 2,2 vezes superior à obtida neste estudo.

No trabalho de Bersanetti et al. (2004), todos os caldos de cultivo utilizados para o estudo de degradação de AC em diferentes temperaturas foram obtidos de fermentações realizadas a 28°C, enquanto que neste estudo os caldos utilizados vieram de fermentações obtidas nas mesmas condições de temperaturas que os ensaios de degradação foram realizados (20, 25 e 30°C). Essa diferença experimental entre os estudos poderia justificar as maiores constantes de degradação obtidas por Bersanetti et al. (2004) para as demais temperaturas, 20 e 25°C, cerca de 12,7 e 8,5 vezes superiores aos valores obtidos neste estudo para as mesmas condições.

Em outro trabalho, Marques et al. (2009) investigaram o efeito da temperatura (24-40°C) na degradação de AC durante a fermentação de *S. clavuligerus* DAUPFE 3060 utilizando um meio de cultura complexo proposto por Maranesi et al. (2005). Nesse trabalho, os autores verificaram que a degradação de AC aumentou com o aumento de temperatura, no entanto os valores estimados das constantes cinéticas de hidrólise de AC a 25 e 30°C foram iguais a 0,030 e 0,039 h^{-1} , cerca de 2,3 e 13 vezes superiores ao valor da constante de degradação global obtida neste estudo para as mesmas condições de temperatura, o que aliado a outros fatores já comentados, pode ser causado pela diferença na composição dos meios de cultura.

Neste estudo observou-se que a constante de degradação de AC no meio de fermentação a 30°C foi 4,3 vezes superior que a mesma observada a 25°C e aproximadamente 7,5 vezes superior que a obtida a 20°C. A maior estabilidade de AC observada nas temperaturas de 20 e 25°C em relação à 30°C (controle), não se deve apenas ao efeito da baixa temperatura na minimização da degradação da molécula de AC, como também ao efeito dos componentes presentes no caldo de fermentação. Sabe-se que o metabolismo microbiano é mais lento em baixas temperaturas, o que leva ao menor acúmulo de enzimas e outros metabólitos que interferem na estabilidade da molécula de AC, como o íon amônio resultante do metabolismo de proteínas e que, de acordo com Roubos et al. (2002), aumenta consideravelmente a taxa de degradação de AC. Embora a constante global de degradação de AC a 25°C tenha sido 1,8 vezes superior que a obtida à 20°C, observando os desvios-padrão conclui-se que esses valores são estatisticamente iguais, o que sugere que nessa faixa de temperatura a hidrólise de AC não é tão pronunciada. Possivelmente, nessas condições tem-se baixa temperatura e baixas concentrações de componentes tóxicos, condições que aliadas levam à maior estabilidade de AC na faixa de temperatura de 20-25°C em relação ao controle.

É possível ainda determinar as velocidades líquidas médias de geração de AC ao longo de cada pulso (\bar{r}_{AC}) com base nos valores médios observados de acúmulo da concentração de AC no caldo de cultivo ($d\bar{C}_{AC}/dt$) e de velocidade de degradação (\bar{r}_{dAC}) a partir do balanço de massa para o AC durante o cultivo em batelada.

Balço de massa para o AC no processo em batelada:

$$\text{sai (AC)} = \text{entra (AC)} + \text{gera (AC)} - \text{consome (AC)} - \text{acumula (AC)} \quad \text{Eq. 4.1}$$

No processo em batelada, tem-se que:

$$\text{sai (AC)} = \text{entra (AC)} = 0$$

Logo:

$$\text{acumula (AC)} = \text{gera (AC)} - \text{consome (AC)} \quad \text{Eq. 4.2}$$

$$d\bar{C}_{AC}/dt = \bar{r}_{AC} - \bar{r}_{dAC} \quad \text{Eq. 4.3}$$

ou

$$d\bar{C}_{AC}/dt = \bar{r}_{AC} - \bar{k}_{dAC} \cdot \bar{C}_{AC} \quad \text{Eq. 4.4}$$

onde:

$d\bar{C}_{AC}/dt$: acúmulo de AC no caldo de cultivo ou velocidade global (observada) de produção de AC ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

\bar{r}_{AC} : velocidade líquida média de produção de AC ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

\bar{r}_{dAC} : velocidade média de degradação de AC ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

\bar{k}_{dAC} : constante cinética média de degradação de AC entre o início e o final de cada pulso de glicerol (h^{-1})

\bar{C}_{AC} : concentração média de AC no intervalo de tempo entre cada pulso de glicerol (mg.L^{-1})

A **Tabela 4.6** resume os principais resultados obtidos.

Tabela 4.6 – Valores médios de acúmulo de AC ($\overline{dC_{AC}}/dt$), de velocidade média de degradação de AC ($\overline{I_{dAC}}$) e de velocidade líquida de produção de AC ($\overline{r_{AC}}$) ao longo dos cultivos com pulsos de glicerol a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tempo final do pulso (h)	$\overline{dC_{AC}}/dt$ (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$\overline{I_{dAC}}$ (mg.L ⁻¹)	$\overline{r_{AC}}$ (mg.L ⁻¹)
30	78	1,43	0,67	2,10
30	96	-1,12	1,14	0,02
30	120	1,70	0,93	2,63
30	144	7,25	2,00	9,25
25	72	6,91	0,09	7,00
25	96	9,96	0,42	10,39
25	129	14,19	1,94	16,14
25	162	5,85	4,14	9,99
20	81	6,90	0,23	7,13
20	129	6,35	0,69	7,04
20	168	4,86	1,16	6,02
20	216	3,36	1,14	4,53

Pode-se agora avaliar o perfil de produção total de AC propriamente dito nas diferentes temperaturas ao longo dos cultivos. Os menores valores de produção líquida de AC foram obtidos no ensaio com 4 pulsos de glicerol a 30°C (controle). Em média, a velocidade líquida de produção de AC ($\overline{r_{AC}}$) a 30°C foi de 3,50 mg.L⁻¹.h⁻¹, 3,1 vezes inferior que a média obtida a 25°C e 1,8 vezes inferior aquela a 20°C. Esses resultados provam que o efeito da baixa temperatura na redução da degradação de AC não é o único fator que contribui para o maior acúmulo de AC durante o processo de produção de AC, sugerindo que outros fatores também estejam diretamente relacionados.

Pode-se observar claramente que a 30°C a produção líquida de AC permanece baixa até o final do último pulso de glicerol, sugerindo um forte efeito de inibição ou até mesmo de repressão causado pelo glicerol e seus produtos de degradação nesta temperatura. Após esse período, a produção de AC aumenta potencialmente, provavelmente devido à metabolização do glicerol e posterior redução do efeito inibidor.

A menor velocidade de consumo de glicerol (r_G , g.L⁻¹.h⁻¹) observada para o ensaio a 20°C (BP-30-20-4) em relação ao controle (BP-30-30-4) pode ter contribuído para uma maior produção ao reduzir o efeito de inibição causado pelos produtos de degradação

do glicerol. A maior média de produção líquida de AC, $10,9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ foi observada a 25°C . Apesar das velocidades de consumo de glicerol BP-30-25-4 terem sido muito semelhantes ao do ensaio BP-30-30-4, observamos que o rendimento de glicerol em AC ($Y_{AC/G}$, $\text{mg}^{-1}.\text{g}^{-1}$) calculada para o cultivo BP-30-25-4 foi cerca de duas vezes maior em relação ao cultivo BP-30-30-4. Isto sugere que quando o glicerol é melhor direcionado para a via de biossíntese de AC, o efeito do acúmulo dos produtos de degradação do metabolismo do glicerol é reduzido o que poderia reduzir o efeito de inibição causado pelos mesmos.

Durante todo o cultivo a 25°C , observamos que a velocidade líquida de produção de AC manteve-se bastante elevada, o que indica que possivelmente essa temperatura proporcionou uma condição de menor degradação de AC aliada a uma melhor metabolização de glicerol na rota de biossíntese de AC.

5. CONCLUSÕES

A produção de AC em fermentação de *S. clavuligerus* foi aumentada pela manipulação da temperatura de cultivo. O uso de baixas temperaturas favoreceu a produção de AC nos cultivos em batelada a temperatura constante cerca de 5,5 vezes para ensaios a 20°C (B20-20) em relação ao controle a 30°C (B30-30). A 20°C, o coeficiente de rendimento produto (AC)/ substrato (glicerol), $Y_{CA/G}$, obtido foi de 59.3 mg.g⁻¹, o maior observado entre todos os ensaios.

Nos cultivos em batelada com redução de temperatura, a concentração máxima de AC no ensaio B30-25 foi cerca de 2,9 vezes maior e no ensaio B30-20, cerca de 2,5 vezes maior que o obtido no ensaio controle. As produtividades também foram melhoradas quando comparadas ao cultivo controle a 30°C. Os melhores resultados foram encontrados em cultivos em batelada com pulsos de glicerol e redução de temperatura. A máxima produção líquida de AC foi obtida no ensaio em batelada alimentada com três pulsos de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C (BP-30-25-3), com produtividade de 7,3 mg.L⁻¹.h⁻¹. Esses resultados possivelmente foram decorrentes das melhores condições de consumo glicerol e reduzida degradação de AC. Estes são os melhores resultados já relatados na literatura até o presente momento de produção de ácido clavulânico em mesa incubadora rotativa utilizando uma linhagem selvagem de *S. clavuligerus* em meio complexo

Os resultados obtidos provam que *S. clavuligerus* é capaz de crescer sob condições de estresse em baixas temperaturas, que a degradação de AC à baixa temperatura é minimizada e que o metabolismo celular parece direcionar melhor o consumo de glicerol para a síntese de AC contribuindo com o elevado acúmulo do produto no caldo de fermentação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN, I. M.; MURETÙ, T. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53: p.159-166, 2000.
- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, **Nature**, v.146, p.837, 1940.
- AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A.L. (1978); Carbon catabolite repression of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*, **Antimicrob Agents Chemother**, v.14, p.159-165, 1978.
- AKERBERG, C.; HOFVENDAHL, K.; ZACCHI, G.; HAHN, B.; HAHN-HÄGERDAL, B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.49, p.682-690, 1998.
- ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Continuous clavulanic acid adsorption, **Process Appl Biochem Biotechnol**, v.1, n.3, p.867-880, 2003.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R.A. What's new in antibiotic resistance Focus on beta-lactamases, **Drug Resistance Updates**, v. 9, p.142-156, 2006.
- BAGGALEY, K.H.; BROW, A.G.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams, **Natural Production Report**, p.309-333, 1997.
- BAGGALEY, K.H.; ELSON, S.W.; NICHOLSON, N.H.; SIME, J.T. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. Part 4 Synthetic routes to the monocyclic β -lactam precursor, proclavaminic acid, **J Chem Soc Perkin Trans I**, p.1513-1520, 1990.
- BALLOWS, A. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation identification, applications, v.1, 2^a ed, New York, Springer-Verlag, 1992.
- BAPTISTA-NETO, A.B.; HIRATA, D.B.; CASSIANO FILHO, L.C.M.; BELLÃO, C.; BADINO, A.C.; HOKKA, C.O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes, **Braz J Chem Eng**, v.22, p.557-564, 2005.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.(2004); Kinetic studies on clavulanic acid degradation, **Biochem Eng J**, v.23, p. 31-36, 2004.
- BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole, **Analyst**, v.107, p.1241-1245, 1982.
- BROWN, A.G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J.D.; READING, C., ROLINSON, G.N. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **J Antibiotics**, v.29, p.668-670, 1976.

BUSH, K; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure, **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p.1211-1233, 1995.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis and fermentation. In: Vandamme, E.J. **Biotechnol Indust Antibiotics**, New York, Marcel Dekker, v.22, p.225-235, 1984.

CHEN, K.C., LIN, Y.H., TSAI, C.M., HSIEH, C.H.; HOUNG, J.Y. Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding; **Biotechnol Lett**, v.24, p.455-458, 2002.

CHEN, K.C.; LIN, Y.H.; WU, J.Y.; HWANG, S.C.J. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding, **Enzyme Microb Technol**, v.32, p.152-157, 2003.

CHUPPA, S.; TSAI, Y.S.; YOON, S.; SHACKLEFORD, S.; ROZALES, C.; BHAT, R.; TSAY, G.; MATANGUIHAN, C.; KONSTANTINOV, K.; NAVEH, D. Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells, **Biotechnol Bioeng**, v.55, p.328-338, 1997.

CONSTANTINIDES, A.; SPENCER, J.L. Optimization of batch fermentation processes. I. Development of mathematical models for batch penicillin fermentations, **Biotechnol Bioeng**, v.12, p.803-830, 1970.

CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. **Innovative Food Science and Emerging Technol**, v.9, p. 483–488, 2008.

DE VUYST, L.; CALLEWAERT, R.; CRABBEÂ, K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions; **Microbiology**, v.142, p.817-827, 1996.

DEMAIN, A.L.; FANG, A. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes, **Actinomycetoliga**, v.9, p.98-117, 1995.

DUDLEY, M. Bacterial resistance mechanisms to β -lactams antibiotics, assessment of management of management strategies, **Pharmacotherapy**, v.15, p.9-14, 1995.

ELANDER, R.P. Industrial production of β -lactam antibiotics, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.61, p.385-392, 2003.

ELSON, S.W.; OLIVER, R.S. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid I. Incorporation of 13 C-labeled precursors. **J Antibiot**, v. 31, p.586-592, 1978.

ESSACK, S.Y. The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases, **Pharmaceutical Research**, v.18, n.10, p.1391-1399, 2001.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high performance chromatography, **Antimicrob Agents and Chemother**, v.22, p.753-762, 1982.

FURUKAWA, K. ; OHSUYE, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α -amidating enzyme, **Cytotechnol**, v.26, p.153-164, 1998.

GHUYSEN, J.M. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. **Annual Review Microbiology**, v. 45, p. 37-67, 1993.

GOSH, A.C.; BORA, M.M.; DUTTA, N.N. Development in liquid membrane separation of beta-lactamic antibiotics. **Bioseparation**, v.6., p.91-105. 1996.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A.G.; BADINO A.C.; HOKKA, C.O. Improvement fo clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivative; **World J Microbiol Biotechnol**, v.15, n.5, p.623-627, 1999.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Studies on rheology and oxygen mass transfer in the lavulanic acid production by *Streptomyces clavuligeru*, **Braz J Chem Eng**, v.17, p.827-834, 2001.

HAGINAKA, J.; NAKAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in queous solutions, **Chem Pharm Bull**, v.29, p.3334-3341, 1981.

HENDRICK, V.; WINNEPENINCKX, P.; ABDELKAFI, C.; VANDEPUTTE, O.; CHERLET, M.; MARIQUE, T.; RENEMANN, G.; LOA, A.; KRETZMER, G.; WERENNE, J. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis, **Cytotechnol**, v.36, p.71-83, 2001.

HOWARTH, T.F.; BROWN, A.G.; KING, T.J. Clavulanic acid. **J Soc Chem Commun**, p.266-267, 1976.

HSIN-PING, C.C.R.; Wang, L.L.S. Thermal degradation kinetics analysis of monacolin K in *Monascus*-fermented products, **Food Science Technol**, v.42, I. 1, p. 292-296, 2009.

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

JIANG, S.J.; YANG, Y.Y.; WANG, H.Q. Optimization of clavulanic acid fermentation, **Chinese J Antibiot**, v.29, p.335-338, 2004.

KAUFMANN, H.; MAZUR, X.; FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J.E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells, **Biotechnol Bioeng**, v.63, p.573-579, 1999.

KIRK, S.; AVIGNONE-ROSSA, C.A.; BUSHELL, M.E. Growth limiting substrate affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*, **Biotechnology Letters**, v.22, n.22, p. 1803-1809, 2000.

KURYLOWICZ, W. Antibióticos: uma revisão crítica. Editora Guanabara Koogan, S.A. Recife – PE – Brasil, 1981.

LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Introduction to the order Actynomycetales. In: Star, M.P.; Stalp, H., Tryper, H.G.; Balawi, A.; Schlegel, H.G. The prokariotes: A

handbook on habitats, isolation and identification of bacterias, New York, Springer-Verlag, 1981.

LEE, P.C.; HOO, C.C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm oil medium, **World J Microbiol Biotechnol**, v.12, p.73-75, 1996.

LIVERMORE, E. D. M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LUDWIG, A.; TOMECZKOWSKI, J.; KRETZMER, G. Influence of the temperature on the shear stress sensitivity of adherent BHK 21 cells, **Appl Microb Biotechnol**, v.38, p.323-327, 1992.

MACCARTHY, F.J.; FISHER, W.P.; CHARNEY, J.; TYTELL, A.A. Effects of oils and fatty acids on the production of fungichromin, **Antibiotics Annual**, p.71-723, 1995.

MARENESI, G.L.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O. Utilization vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, **World J Microbiol Biotechnol**, v. 21; p.509-514, 2005.

MARIOTTO, J.R. Produção de acetoina e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa* . Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina - SC, 2007.

MARQUES, D.A.V.; OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; PORTO, A.L.F.; CONVERTI, A. Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060, **Enzyme Microb Technol**, v. 45, p.169-173, 2009.

MAYER, A.F.; DECKWER, W.D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.45, p.41-46, 1996.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets, permeability barriers and active efflux, **Science**, v.264; p.382-388, 1994.

OHNO, A.; ANO, T. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, Iturin A and Surfactin by a aual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation, **J Ferment Bioeng**, v.80, n.5, p.517-519, 1995.

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

PAGE, M. G. P. β -Lactamase inhibitors; **Drug Resistance Updates** v.3, p.109-125, 2000.

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; BORGHI, M. D. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanodiol production by *Bacillus licheniformis*, **Bioresource Technology**, v. 89, p. 125-131, 2003.

REVILLA, G.; LOPEZ-NIETY ,M.J.; LUENGO, J.M.; MARTIN, J.F. Carbon catabolite repression of penicillin biosintesis by *Penicillin chrysogenum*, **J. Antibiotics**, v.37, p.781-789, 1984.

REYNOLD, J.E.F. Ed. Martindale. The Extra Pharmacopoeia, 30^a ed. The Pharmaceutical Press, London, 1993.

RIEDIKER, S.; RYTZ, A. Cold-temperature stability of five β -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis, **Journal Chromatography A**, v.1054, p. 359-363, 2004.

RIUS, N.; DEMAÏN, A.L. Regulation of lysine ϵ -aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*, **Appl Microb Biotechnol**, v. 48, p.735-738, 2002.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation – minireview, **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 309-315, 1996.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, **Appl Microb Biotechnol**, v.20, p.318-325, 1994.

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

ROUBOS, J.A. ; KRABBEN, P. ; DE LAAR, W.T.A.M; BABUSKAA, R. ; HEIJEN, J.J. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. **Biotechnol Prog**, v.18, p.451-457, 2002.

SAUDAGAR, P. S.; N. S. SHALIGRAM. Immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on loofah sponge for the production of clavulanic acid, **Bioresour Technol**, v.99, p.2250-2253, 2008.

SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, **Bioresour Technol**, v.98, p.2010-2017, 2007.

SAUDAGAR, P.S.; SURVASE, S.A.; SINGHAL, R.S. Clavulanic acid: a review, **Biotechnol Adv**, v. 26, p.335-351, 2008.

STANBURY, P.F.; WHITACKER, A.; HALLS, S.J. Principles of fermentation technology, Oxford-Pergamon Press, 2 ed., p.93-122, 1995.

STRYER, L. Bioquímica. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.

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

VISSER-LUIRINK, G.; DE LAAT, W.T.A.; KLOP, J.M. Fermentation of clavulanic acid at a controlled level of ammonia; USP 6,991,925, 2006.

WANG, Y.; REN, J.I.E.; DONG, M.; LIANG, D.; XU. A Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, **Process Biochemistry**, v.40, p. 1161-1166, 2004.

WEIDEMANN, R.; LUDWIG, A.; KRETZMER, G. Low temperature cultivation - A step towards process optimization, **Cytotechnol**, v.15, p.111-116, 1994.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokariotes, New York, Oxford University Press, p.187-194, 1995.

WILLIAMS, J.D. β -lactamses e β -lactamases inhibitors. **Internat J Antimicrob Agents**, v.12, p.3-7, 1999.

WORLD HEALTH ORAGANIZATION. The world health report 2000, Overcoming Antimicrobial Resistance, World Health Organization, Geneva, 2000.

YOON, S.K.; SONG, J.Y.; LEE, G.M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnol Bioeng**, v.82, p.289-288, 2003.

ZHANG, J.; DEMAINE, A.L. Regulation of ACV synthetase activity in the beta-lactam biosynthetic pathway by carbon source and their metabolites, **Archives Microbiol**, v.158, p.364, 1992.