

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

**LILIANE MACIEL DE OLIVEIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO E  
CEFAMICINA C POR *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS***

**SÃO CARLOS – SP  
2009**

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

**LILIANE MACIEL DE OLIVEIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO E  
CEFAMICINA C POR *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.**

**Orientação: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka**

**Co-orientação: Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz**

**SÃO CARLOS – SP  
2009**

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

O48ec

Oliveira, Liliâne Maciel de.

Estudo cinético da produção de ácido clavulânico e cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* / Liliâne Maciel de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
79 f.


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

1. Fermentação. 2. Ácido clavulânico. 3. Cefamicina C. 4. Modelagem matemática. I. Título.

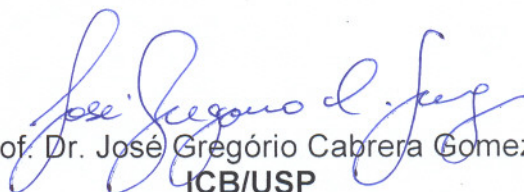
CDD: 660.28449 (20<sup>ª</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
**LILIANE MACIEL DE OLIVEIRA** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 30 DE MARÇO DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



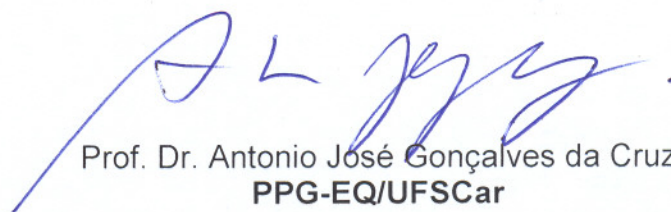
Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka  
**Orientador, PPG-EQ/UFSCar**



Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez  
**ICB/USP**



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior  
**PPG-EQ/UFSCar**



Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz  
**PPG-EQ/UFSCar**

*Aos meus pais, Geraldo e Vanda,  
por todo amor e carinho  
oferecidos,  
e pela confiança e apoio em tudo que faço.*

*"As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.*

*Elas sabem fazer o melhor das oportunidades*

*que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece (...)*

*Para aqueles que buscam*

*e tentam sempre."*

*Clarice Lispector*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, sempre presente em minha vida – a fortaleza nos momentos difíceis, o consolo nos dias tristes, a luz nos momentos de dúvida, e alegria e esperança nos dias de felicidade. “alfa, ômega, princípio e fim. (...) Para sempre cantarei o seu louvor.”

Agradeço à minha família, que investiu e acreditou em mim, e que renunciou a muitas coisas para me oferecer a melhor educação possível. Obrigada pela confiança e pelo apoio em todas as minhas decisões, mesmo estas não sendo a vontade de vocês. Agradeço pela pessoa que sou hoje, por tudo o que conquistei e por todas as perspectivas que tenho daqui para frente, pois vocês são grandes responsáveis por isso e também fazem parte das minhas conquistas.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka, pela orientação no trabalho, pela paciência e disponibilidade para ensinar, e por todo aprendizado profissional, abrindo os meus horizontes e me fazendo enxergar mais longe, e me fazendo acreditar mais na minha capacidade.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antônio J. G. Cruz, pela disponibilidade e paciência, cuja ajuda foi fundamental para desenvolvimento do trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto Colli Bandino Jr., pela ajuda e pelas sugestões dadas à dissertação.

Agradeço muito aos amigos de laboratório, que também fizeram parte deste trabalho, seja pela ajuda constante no laboratório seja pela companhia e brincadeiras nos momentos de descontração: Éliton, Álvaro, Clóvis, Carol, Luis Henrique, Douglas, Juliana, Sérgio, Cecília, Guilherme, Marcel, Amadeus.

Agradeço às amigas-irmãs e aos amigos sempre presentes na minha vida: Cris, Sandra, Giann, Léo, Thaisa, Lidiane, Nickely e Luciana.

## RESUMO

O ácido clavulânico e a cefamicina C são compostos  $\beta$ -lactâmicos, um importante grupo de medicamentos utilizados no tratamento de doenças bacterianas, e são produzidos simultaneamente pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*. Como qualquer metabólito secundário, a produção destes compostos pode ser controlada pela concentração intracelular de precursores e cofatores, e a sua disponibilidade para uso no metabolismo secundário responde diretamente a mudanças na concentração de nutrientes presentes no meio de cultura. Baseado nestas informações, este trabalho teve como objetivo avaliar como certas fontes de carbono e nitrogênio afetam a produção do ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (CefC) por *S. clavuligerus*, e desenvolver um modelo cinético que possa descrever matematicamente a influência destes componentes no bioprocessamento. Para isso, foram realizados cultivos em mesa incubadora rotativa, usando meios sintéticos constituídos da combinação de glicerol, maltose, asparagina, prolina, ácido glutâmico e ornitina. Os resultados dos cultivos mostraram que tanto as fontes de carbono e energia quanto as fontes de nitrogênio foram limitantes. Os cultivos em meios com maltose apresentaram as maiores produções de AC e CefC, mas um menor crescimento. Um comportamento contrário foi observado nos cultivos com os meios contendo glicerol. O cultivo realizado no meio contendo glicerol, prolina e ornitina foi o que apresentou menor crescimento e produção de AC, e nenhuma produção de CefC. O ácido glutâmico favoreceu o crescimento no meio com maltose e asparagina, mas não alterou a produção. O aumento da concentração de asparagina no meio com maltose e asparagina também favoreceu o crescimento, mas também não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento e produção. Baseado nos resultados obtidos, foi proposto um modelo matemático que descrevesse o crescimento e a produção de AC e CefC nos meios utilizados. O ajuste foi feito em seis meios diferentes. O modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais para quatro dos meios estudados e foi capaz de representar o bioprocessamento nas condições testadas neste trabalho.



## ABSTRACT

Clavulanic acid and cephamycin C are  $\beta$ -lactam compounds, an important group of drugs used in the treatment of several bacterial diseases, and are simultaneously produced by the bacteria *Streptomyces clavuligerus*. Similarly to any secondary metabolite, the production of these compounds can be controlled by the intracellular concentration of precursors and cofactors, and their availability to be used in the secondary metabolism depends directly on the nutritional composition changes in the culture media. Based on these facts, the aim of this work was to evaluate the effect of some carbon and nitrogen sources on clavulanic acid (CA) and cephamycin C (CefC) production by *S. clavuligerus*, and to propose a kinetic model able to represent the influence of these compounds on the behavior of this bioprocess. The fermentation runs were carried out in shakers, using synthetic media, combining glycerol, maltose, asparagine, proline, glutamic acid and ornithine. The results showed that both carbon and nitrogen sources were limitants. The fermentations with media containing maltose gave the highest CA and CefC productions, but the bacterial growth was lower. On the other hand, the fermentations with the media containing glycerol gave a higher bacterial growth and lower production, except for the fermentation using the media composed by glycerol, proline and ornithine, that gave the lowest growth and CA production, and there was no CefC production. The addition of glutamic acid in the medium containing maltose and asparagine, and the addition of more asparagine in this same medium favored the bacterial growth, but have no effect on production. The glutamic acid effect on the growth was more intense than that of asparagine. Based on the obtained results, a kinetic model describing the growth, CA and CefC production was proposed. The adjustment of the model to the experimental data was made in six different fermentations. The model had a good adjustment to four of all the media tested, and was able to represent the bioprocess within the conditions studied in this work.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Estrutura das principais classes de compostos $\beta$ -lactâmicos.....	3
<b>Figura 2.2:</b> Fórmula estrutural da molécula de Ácido Clavulânico.....	6
<b>Figura 2.3:</b> Rota metabólica de produção do ácido clavulânico (Li et al., 2000).....	8
<b>Figura 2.4:</b> Fórmula estrutural das Cefamicinas.....	9
<b>Figura 2.5:</b> Rota metabólica de produção da Cefamicina C (Oster et al., 2006; Fuente et al., 1997).....	10
<b>Figura 4.1 -</b> Perfis de consumo de substratos (sacarose, glicerol, ácido glutâmico (Glu), prolina (Pro)) (a), crescimento (massa seca - MS) e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. C), quantificada na forma de cefalosporinas totais (b) ao longo do cultivo em meio GPG (símbolos abertos) e GSPG (símbolos fechados).....	43
<b>Figura 4.2 –</b> Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cefalosporinas totais) em meio GPG.....	44
<b>Figura 4.3 –</b> Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GPG com pulso de maltose (GPG + M).....	44
<b>Figura 4.4 –</b> Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GPG com pulso de ácido glutâmico (GPG + glu).....	45
<b>Figura 4.5 –</b> Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GPO.....	45
<b>Figura 4.6 –</b> Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GA.....	46
<b>Figura 4.7 –</b> Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio MA.....	46

<b>Figura 4.8</b> – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio MAG.....	47
<b>Figura 4.9</b> – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio MAA.....	47
<b>Figura 4.10</b> – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico e cefamicina C em meio GMPG.....	50
<b>Figura 4.11</b> - a) Maltose é convertida a dois resíduos de glicose-6-P. b) Glicose-6-P seguindo a via das pentoses ( LEHNINGHER et al., 2002).....	51
<b>Figura 4.12</b> - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GPG. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de glicerol; (C) Consumo de ácido glutâmico e prolina; (D) Produção de AC e Cef. C.....	56
<b>Figura 4.13</b> - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GPG+glu. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de glicerol; (C) Consumo de ácido glutâmico e prolina; (D) Produção de AC e Cef. C.....	56
<b>Figura 4.14</b> - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio MAA. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina; (D) Produção de AC e Cef. C.....	59
<b>Figura 4.15</b> - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio MA. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina; (D) Produção de AC e Cef. C.....	60
<b>Figura 4.16</b> - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio MAG. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina e ácido glutâmico; (D) Produção de AC e Cef. C.....	62
<b>Figura 4.17</b> - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GA. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina.....	64
<b>Figura 4.18</b> - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GA. (A) Modelo de produção misto: associado e não associado ao crescimento (B) Modelo de produção associado ao crescimento.....	65

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 3.1.</b> Composição do meio agar nutriente.....	26
<b>Tabela 3.2.</b> Meio de cultura para reativação do microrganismo.....	27
<b>Tabela 3.3.</b> Meios de cultura preparados de acordo com Romero et al. (1984, 1986) ou com algumas modificações.....	28
<b>Tabela 3.4.</b> Meios de cultura MA e seus derivados.....	28
<b>Tabela 3.5</b> - Símbolos utilizados nas equações estequiométricas e expressões cinéticas e matemáticas do modelo proposto.....	35
<b>Tabela 4.1</b> – Dados de crescimento e produção máximos atingidos nos cultivos realizados e os respectivos tempos de cultivo em que esses valores foram atingidos.....	48
<b>Tabela 4.2</b> – Dados de crescimento e produção máximos atingidos no cultivo realizado com o meio GMPG e os respectivos tempos de cultivo em que esses valores foram atingidos.....	50
<b>Tabela 4.3</b> - Cofatores e grupos funcionais necessários para a biossíntese do ácido clavulânico e cefamicina C.....	52
<b>Tabela 4.4</b> - Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para os meios GPG e GPG+glu.....	57
<b>Tabela 4.5</b> - Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para os meios GPG e GPG+glu.....	57
<b>Tabela 4.6</b> - Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para os meios GPG e GPG+glu.....	57
<b>Tabela 4.7</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para os meios MAA e MA.....	58
<b>Tabela 4.8</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para os meios MAA e MA.....	58

<b>Tabela 4.9</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para os meios MAA e MA.....	59
<b>Tabela 4.10</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para o meio MAG.....	61
<b>Tabela 4.11</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para o meio MAG.....	62
<b>Tabela 4.12</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para o meio MAG.....	62
<b>Tabela 4.13</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para o meio GA.....	64
<b>Tabela 4.14</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para o meio GA.....	64
<b>Tabela 4.15</b> – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para o meio GA.....	64
<b>Tabela 4.16</b> – Valores calculados de $\mu_i$ utilizando as equações do modelo.....	66
<b>Tabela 4.17</b> - Comparação dos valores experimentais de $\mu_{\text{máxexp}}$ e os valores ajustados de $\mu_{\text{máxi}}$ .....	67

## NOMENCLATURA

$a_i$ ,  $b_i$ ,  $c_i$ ,  $d_i$  e  $e_i$ , com  $i=(1,13)$ , são os coeficientes estequiométricos das equações do modelo

AC: ácido clavulânico

Asn: asparagina

Cef.C: cefamicina C

Cef. totais: cefalosporinas totais

$c_i$ : coeficientes das equações pseudo-estequiométricas

$C_i$ : concentração do composto  $i$

$C_{Si}$ : concentração intracelular do composto  $i$

$CO_2$ : gás carbônico formado durante crescimento celular

$D_1$  e  $D_2$ : produtos de degradação do ácido clavulânico e cefamicina C, respectivamente

$e_{ativa}$ : concentração de enzima ativa

$Em_1$  e  $Em_2$ : energia de manutenção celular obtida a partir do consumo de glicerol e maltose, respectivamente

GA: meio de cultura composto por glicerol e asparagina como principais nutrientes

Glu: ácido glutâmico

GMPG: meio de cultura composto por glicerol, maltose, prolina e ácido glutâmico como principais nutrientes

GPG: meio de cultura composto por glicerol, prolina e ácido glutâmico como principais nutrientes

GPG+glu: meio de cultura composto por glicerol, prolina e ácido glutâmico como principais nutrientes, adicionado de pulso de ácido glutâmico

GPG+M: meio de cultura composto por glicerol, prolina e ácido glutâmico como principais nutrientes, adicionado de pulso de maltose

GPO: meio de cultura composto por glicerol, prolina e ornitina como principais nutrientes

GSPG: meio de cultura composto por glicerol, sacarose, prolina e ácido glutâmico como principais nutrientes

k: constante de proporcionalidade entre  $e_{ativa}$  e  $V_{máx}$

kd1 e kd2: constantes de morte celular na presença de ácido glutâmico ou na sua ausência, respectivamente.

kdp1 e kdp2: constantes de degradação do ácido clavulânico e cefamicina C, respectivamente

Ki: constante do modelo de Aiba, Shoda e Nagatani para velocidade específica de crescimento celular

$K_m$ : constante de Michaelis-Menten

$K_P$ : constante de inibição do produto dos modelos de Andrews, e de Aiba, Shoda e Nagatani para velocidade específica de crescimento celular

$K_s$ : constante de saturação

$K_X$ : constante do modelo de Contois para velocidade específica de crescimento celular

MA: meio de cultura composto por maltose e asparagina como principais nutrientes

MAA: meio de cultura composto por maltose e asparagina como principais nutrientes, com uma concentração adicional de asparagina em relação ao meio MA

MAG: meio de cultura composto por maltose, asparagina e ácido glutâmico como principais nutrientes

$m_s$ : coeficiente de manutenção celular

$m_1$  e  $m_2$ : coeficiente de manutenção celular em glicerol e maltose, respectivamente

M: células mortas

MS: massa seca

N: substrato no meio de cultura, fonte de energia

$O_2$ : oxigênio disponível para crescimento celular

$P_1$  e  $P_2$ : produto associado e não-associado ao crescimento, respectivamente

$P_1$ : Ácido clavulânico

$P_2$ : Cefamicina C

Pro: prolina

$r_P$ : velocidade de formação de produto

$r_S$ : velocidade de consumo de substrato

$r_X$ : velocidade de crescimento celular

S: substrato limitante no meio de cultura, fonte de carbono e energia

$S_1$ : Glicerol

$S_2$ : Maltose

$S_3$ : Ácido glutâmico

$S_3'$ : Ácido glutâmico intracelular

$S_4$ : Prolina

$S_4'$ : Prolina intracelular

$S_5$ : Asparagina

$S_5'$ : Asparagina intracelular

$v_i$ : velocidade máxima da reação enzimática para o componente  $i$

$v_j$ : atividade da enzima participando da reação  $j$

$v_{m\acute{a}x}$ : velocidade máxima da reação enzimática

$X$ : células vivas

$Y_{ij}$ : coeficiente de rendimento celular do substrato  $i$  associado ao substrato  $j$

$Y_{X/S}$ : coeficiente de rendimento de substratos em células

$Y_{P/X}$ : coeficiente de rendimento de células em produtos

## LETRAS GREGAS

$\alpha$ : coeficiente de proporcionalidade entre a formação de produto associado ao crescimento e o crescimento celular

$\beta$ : coeficiente de proporcionalidade entre a formação de produto não-associado ao crescimento e a concentração celular

$\mu$ : velocidade específica de crescimento celular

$\mu_{m\acute{a}x}$ : velocidade específica de crescimento celular máxima

$\lambda$ : parâmetro do modelo de Moser para velocidade específica de crescimento celular

$\lambda_{ij}$ : coeficiente estequiométrico da equação que descreve a taxa de variação da concentração de um metabólito intracelular



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>V</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	3
2.2. Ácido Clavulânico .....	5
2.3. Cefamicina C .....	8
2.4. Produção de cefamicina C e ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	12
2.5. Modelagem matemática de processos biotecnológicos.....	16
2.6. Princípios da construção de modelos para processos biotecnológicos .....	18
2.7. Aplicação da modelagem matemática na produção de antibióticos .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1. Microrganismos .....	26
3.2. Meios de cultura .....	26
3.2.1. Meio sólido de cultivo da bactéria-teste .....	26
3.2.2. Meio de cultura de reativação .....	27
3.2.3. Meio de cultura para preparo do inóculo e produção .....	27
3.3. Procedimento experimental .....	29
3.3.1. Experimentos em mesa incubadora rotativa .....	29
3.4. Metodologia analítica .....	29
3.4.1. Análise de ácido clavulânico .....	30
3.4.2. Análise de Cefamicina C .....	30
3.4.2.1 Análise de Cefamicina C por bioensaio.....	31
3.4.2.2 Análise de Cefamicina C por cromatografia líquida de alta eficiência	32

3.4.3. Análise de glicerol, maltose e sacarose .....	33
3.4.4. Análise de aminoácidos .....	33
3.4.5. Determinação da concentração celular .....	34
3.5. Modelagem matemática .....	34
3.6. Tratamento numérico dos dados experimentais e das equações do modelo proposto.....	39
3.7. Métodos computacionais .....	40
3.7.1. Estimativa dos parâmetros cinéticos e constantes do modelo proposto	40
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
4.1. Avaliação do efeito da sacarose em meio GSPG .....	42
4.2. Avaliação do bioprocesso nos diferentes meios de cultura .....	44
4.3. Ajuste do modelo aos dados experimentais .....	54
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>6.SUGESTÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos representam um importante grupo de medicamentos utilizados no tratamento de infecções bacterianas. As penicilinas, utilizadas no combate de muitos patógenos Gram-positivos e alguns Gram-negativos, e as cefalosporinas, que é ativa contra muitos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, foram os antibióticos mais vendidos entre 2001 e 2005, correspondendo, respectivamente, a 17 e 27% do total de vendas (KRESSE et al., 2007).

Contudo, a eficiência dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem sido ameaçada pelo aumento da resistência bacteriana a essa classe de medicamento. O mecanismo prevalente de resistência é a produção de  $\beta$ -lactamases pelas espécies resistentes. Essas enzimas clivam o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, liberando compostos de degradação sem atividade bactericida. Esse problema incentivou pesquisadores a procurar outros compostos inibidores ou que fossem mais resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases, o que conduziu à descoberta da cefamicina C e do ácido clavulânico.

A cefamicina C pertence à classe das cefalosporinas. Este composto apresenta uma grande estabilidade às  $\beta$ -lactamases da classe serina, e apresenta um espectro de ação maior que as penicilinas, sendo eficiente também contra organismos Gram-negativos. É produzido por processos biotecnológicos, utilizando bactérias como os actinomicetos *Streptomyces clavuligerus* e *Nocardia lactamdurans*.

O ácido clavulânico é um  $\beta$ -lactâmico com fraco poder bactericida, mas um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases. Ele é utilizado em associação com um antibiótico  $\beta$ -lactâmico e restaura a atividade bactericida do medicamento. A ação deste composto ocorre devido a sua ligação irreversível às  $\beta$ -lactamases, evitando a clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico. O ácido clavulânico, como a cefamicina C, é também produzido pelo actinomiceto *S. clavuligerus*.

Devido à importância destes compostos, vários estudos têm sido conduzidos para elucidar os mecanismos de produção e regulação pelos microrganismos produtores, bem como definir as melhores condições operacionais

para uma maior produtividade. Neste contexto, a modelagem matemática de bioprocessos entra como uma ferramenta de grande utilidade. Modelos estequiométricos e cinéticos têm sido utilizados para investigar o metabolismo celular, os quais têm resultado na definição de condições ótimas de fermentação e indicando direções para introdução de mudanças genéticas de maneira a obter linhagens com uma melhor capacidade produtora (GOMBERT E NIELSEN, 2000). Com o aumento da disponibilidade de informações a respeito do genoma e de poderosas técnicas analíticas, os modelos matemáticos também servem como uma ferramenta para a compreensão do metabolismo e fisiologia celular (GOMBERT E NIELSEN, 2000).

Considerando a importância do ácido clavulânico e da cefamicina C, o uso da modelagem matemática se apresenta como uma boa alternativa para auxiliar na compreensão do processo de produção destes compostos por *S. clavuligerus*. Visando contribuir para uma maior compreensão deste bioprocessos, este trabalho teve como objetivo estudar a cinética de produção do ácido clavulânico e cefamicina C por *S. clavuligerus* em meio sintético quimicamente definido e desenvolver um modelo matemático que descreva a cinética deste bioprocessos. Para alcançar a consecução do objetivo acima, procurou-se alcançar os seguintes objetivos específicos:

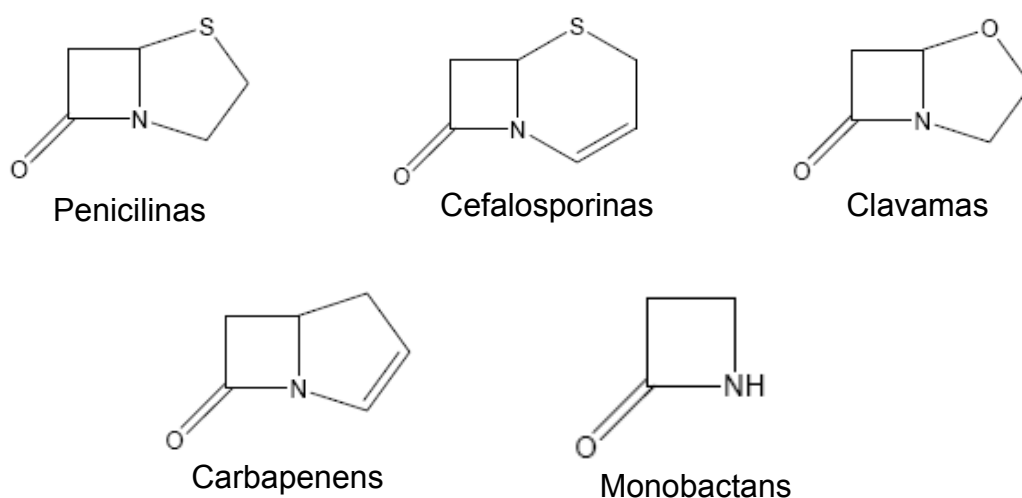
- Obtenção de dados cinéticos experimentais a partir de cultivos em meios sintéticos descritos na literatura.
- Desenvolvimento de um modelo matemático com base nos resultados experimentais obtidos.
- Ajuste do modelo aos dados experimentais e determinação dos parâmetros do modelo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos representam um importante grupo de medicamentos utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Segundo Kresse et al. (2007), entre 2005 e 2001 as penicilinas e cefalosporinas dominaram o mercado de antibióticos, correspondendo a 17 e 27% do total de vendas. Inicialmente descobertos em fungos filamentosos, atualmente sabe-se que os actinomicetos e algumas bactérias Gram-negativas também produzem diferentes tipos de  $\beta$ -lactâmicos. Os fungos produzem apenas os compostos com a estrutura da penicilina ou cefalosporina. Já as bactérias sintetizam uma grande variedade de estruturas  $\beta$ -lactâmicas, incluindo as cefalosporinas, cefamicinas, cefabacinas, clavamas, carbapenens e monobactans (LIRAS e MARTIN, 2006; LIRAS, 1999).

Os  $\beta$ -lactâmicos têm como característica comum a presença do anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura molecular, composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio (LIRAS e MARTIN, 2006). São divididos em subgrupos, de acordo com a estrutura do segundo anel ligado ao anel  $\beta$ -lactâmico (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Estrutura das principais classes de compostos  $\beta$ -lactâmicos

Os  $\beta$ -lactâmicos possuem um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A atividade bactericida destes antibióticos se deve à inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular das bactérias. Ao afetar a parede celular, o equilíbrio osmótico fica comprometido, a célula absorve muita água e morre por lise celular (LIRAS e MARTIN, 2006).

Mas um grande problema que vem reduzindo a eficiência dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é o aumento da resistência bacteriana a esse tipo de medicamento. O mecanismo mais importante e prevalente de resistência bacteriana é a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico gerando produtos de degradação sem atividade bactericida. Já em 1940, estudando novos processos para o isolamento e purificação da penicilina, e antes mesmo da utilização deste antibiótico na prática médica, Abraham e Chain (1940) observaram que cepas de *Escherichia coli* eram capazes de produzir uma enzima capaz de inativar a penicilina, denominada penicilinase. No final da década de 40 e início da década de 50, o uso extensivo da penicilina G levou a uma dramática redução da susceptibilidade de cepas de *Staphylococcus* a esse antibiótico, devido a produção de  $\beta$ -lactamases (BAGGALEY et al., 1997). Nos últimos 20 anos, a pressão seletiva causada pelo uso indiscriminado dos  $\beta$ -lactâmicos no tratamento de pacientes levou a seleção de microrganismos produtores de vários tipos diferentes de  $\beta$ -lactamases (BRADFORD, 2001). As novas classes de  $\beta$ -lactamases que surgiram representam um grande problema no tratamento de pacientes hospitalizados no mundo inteiro. Segundo a revisão realizada por Bradford (2001), nos Estados Unidos, a produção de BLAE ( $\beta$ -lactamases de amplo espectro) em *Enterobacteriaceae* varia de 0 a 25%, dependendo da instituição, com uma média nacional de 3%. Na Europa, a ocorrência de resistência a ceftazidima em *Klebsiella pneumoniae* foi de 20% nas bactérias isoladas de pacientes que não estavam em unidade de terapia intensiva (UTI), subindo para 42% daqueles isolados em pacientes em UTI. No Japão, a ocorrência de BLAE é baixa, sendo de <0,1% em *E. coli* e 0,3% em *K. Pneumoniae*. Em outros países asiáticos, a incidência da produção de BLAE nestas bactérias varia, sendo de 4,8% na Korea, 8,5% em Taiwan e 12% em Hong Kong.

Para contornar este problema, pesquisadores de várias partes do mundo têm se empenhado na descoberta de novos compostos mais resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases. Como resultados dessas pesquisas surgiram compostos  $\beta$ -

lactâmicos semi-sintéticos, obtidos por meio da manipulação química dos antibióticos naturais, gerando produtos mais estáveis e mais resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases, ou outras substâncias naturais, como a cefamicina, os carbapenens e o ácido clavulânico, este último um inibidor de  $\beta$ -lactamases (BAGGALEY et al., 1997).

## 2.2. Ácido Clavulânico

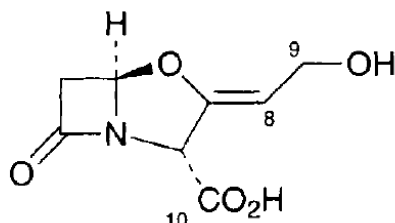
O ácido clavulânico foi primeiramente detectado na década de 70. Brown e colaboradores (1976) verificaram que a associação de caldo fermentado por *Streptomyces clavuligerus* a uma solução de benzilpenicilina inibia o crescimento de uma cepa de *Klebsiella aerogenes*, produtora de  $\beta$ -lactamases, enquanto que as adições isoladas do caldo fermentado ou da solução de benzilpenicilina não exerciam efeito algum sobre o crescimento do patógeno. Esse comportamento foi atribuído a presença de um novo composto no caldo que evitava a clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina pelas  $\beta$ -lactamases, fazendo com que o antibiótico permanecesse na sua forma ativa, com efeito bactericida. Mais tarde, o composto foi isolado e identificado, e chamado de ácido clavulânico. Apesar de ser um eficiente inibidor de  $\beta$ -lactamases bacterianas, o ácido clavulânico tem fraca ação bactericida, sendo necessário uma concentração muito alta deste composto para alcançar os mesmos resultados conseguidos com outros antibióticos (TOWNSEND, 2002).

O ácido clavulânico tem ação inibitória contra a maioria das  $\beta$ -lactamases da classe A, e enzimas da classe D que hidrolisam cloxacilina. Tem fraca ação inibitória contra cefalosporinases da classe C e é inativo contra  $Zn^{+2}$  metaloenzimas da classe B e penicilinases cromossomais do grupo 4. A molécula de ácido clavulânico se liga irreversivelmente ao grupo serina hidroxil no centro ativo das  $\beta$ -lactamases, produzindo um intermediário estável e resultando na inativação da enzima (LIRAS e GARCÍA, 2000).

Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos têm sido administrados com sucesso em associação com o ácido clavulânico (BAGGALEY et al., 1997). Já existem

medicamentos comercialmente disponíveis constituídos da associação de ácido clavulânico e amoxicilina, e ácido clavulânico e ticarcilina (IVES e BUSHELL, 1997).

O ácido clavulânico pertence à classe das clavamas. Tem a sua estrutura formada pelo anel  $\beta$ -lactâmico ligado ao anel oxazolidino (Figura 2.2) e relaciona-se a sua conformação 3-R,5-R como responsável pelo seu efeito inibitório (LIRAS e GARCÍA, 2000).



**Figura 2.2:** Fórmula estrutural da molécula de ácido clavulânico

O fato de microrganismos produtores de ácido clavulânico e outras clavamas também produzirem outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, e a grande semelhança entre as estruturas químicas destes dois tipos de compostos levou inicialmente à especulação da existência uma rota metabólica comum, que em certo ponto se dividiria para dar origem aos diferentes compostos (JENSEN e PARADKAR, 1999). Mas “teoria do tripeptídeo”, criada para a biossíntese das penicilinas e cefalosporinas, não se aplicava ao ácido clavulânico devido à ausência do grupo 6-amino e da cadeia lateral amino adipil, e à presença do anel oxazolidino no lugar dos anéis tiazolidina ou diidrotiazina (ELSON e OLIVER, 1978). Foi demonstrado também que as enzimas conhecidas da rota metabólica das penicilinas e cefalosporinas não apresentavam especificidade compatível aos precursores da biossíntese do ácido clavulânico (JENSEN e PARADKAR, 1999). Essas e outras evidências descartaram a hipótese da rota metabólica comum.

Durante os estudos, vários compostos já foram cogitados como precursores do ácido clavulânico. As pesquisas adicionavam compostos marcados ao meio de cultura e verificavam se estes eram incorporados à molécula de ácido clavulânico (BUTTERWORTH, 1984). Como precursor C-5, ou seja, a molécula cujos carbonos são incorporados na molécula de ácido clavulânico nas posições C-2, C-3, C-8, C-9 e C-10, Valentine et al. (1993) demonstraram ser a arginina. Como precursor C-3, cujos carbonos são incorporados nas posições C-5, C-6 e C-7, as suposições eram de que seria algum intermediário de três carbonos da glicólise.

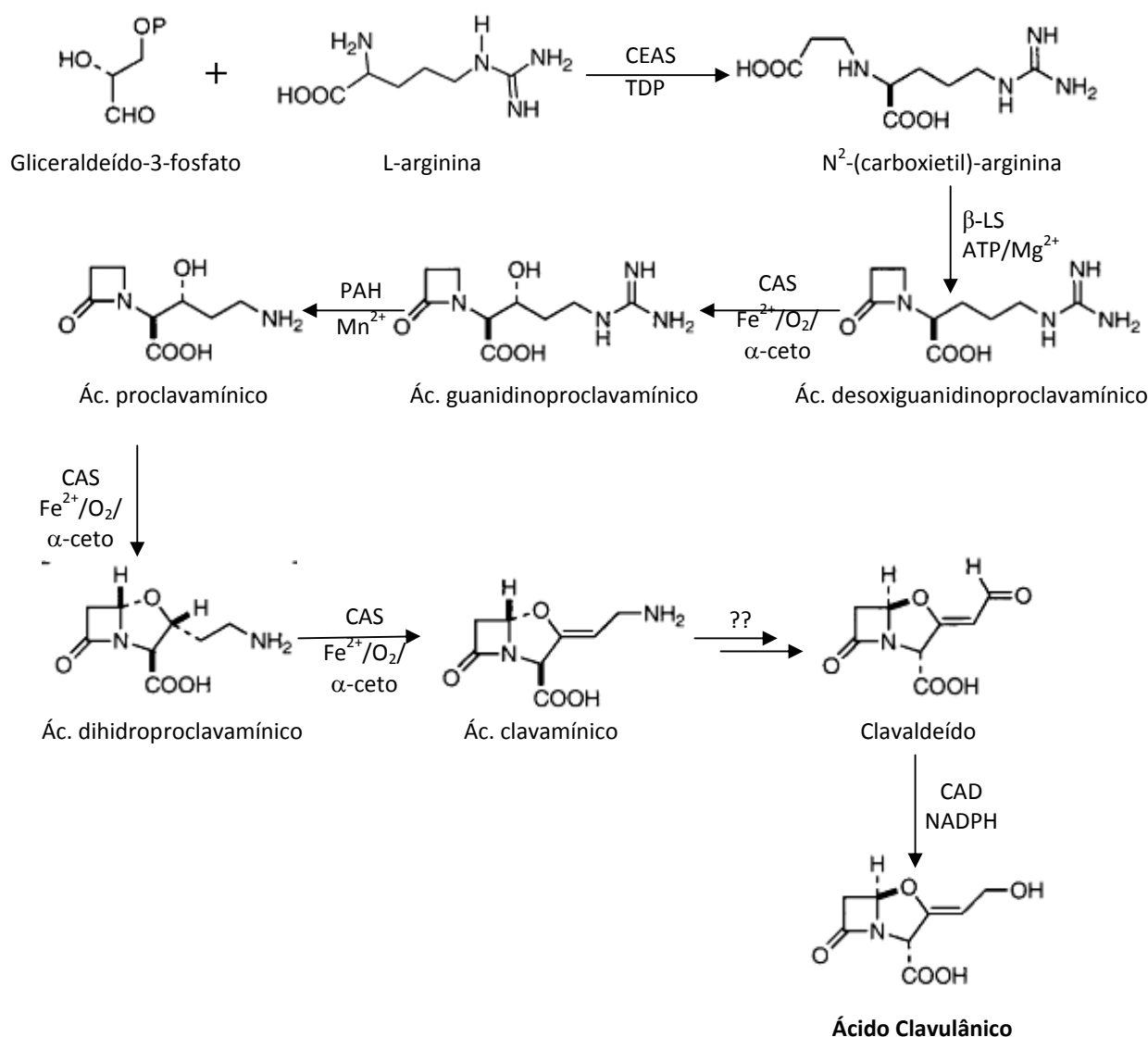


Khaleeli et al. (1999), realizando estudos com a enzima CEAS purificada, enzima responsável pelo primeiro passo metabólico da biossíntese do ácido clavulânico (Figura 2.3), sugeriram que o gliceraldeído-3-fosfato seria o precursor C-3, já que uma maior conversão em N-carboxietilarginina foi observada quando utilizou-se esta molécula do que quando outros possíveis precursores foram utilizados.

Quando não são adicionados ao meio de cultura, os precursores são fornecidos pelo metabolismo primário. A arginina é sintetizada a partir do glutamato, sendo formado primeiro a ornitina que é então convertida a arginina, numa seqüência análoga ao ciclo da uréia em mamíferos (VALENTINE et al., 1993). O gliceraldeído-3-P pode ser fornecido por várias rotas: a molécula pode ser desviada diretamente da glicólise ou gliconeogênese, ou se glicerol é fornecido como substrato, pode haver a fosforilação direta do glicerol, gerando o gliceraldeído-3-P.

Atualmente, a rota metabólica de biossíntese do ácido clavulânico é quase que completamente conhecida. Estudos complementares envolvendo o uso de compostos marcados, o isolamento de intermediários, estudos genéticos e a purificação e caracterização das enzimas envolvidas na síntese permitiram a elucidação dos passos da via metabólica (LIRAS e GARCÍA, 2000).

A rota metabólica é representada na Figura 2.3. Os passos metabólicos que convertem o ácido clavamínico a clavaldeído são desconhecidos. As enzimas que participam dessa conversão ainda não foram purificadas, mas acredita-se que sejam uma aminotransferase e uma epimerase, responsáveis, respectivamente, pela substituição do grupo amino da cadeia lateral e da inversão da conformação química (LIRAS e GARCÍA, 2000).



**Figura 2.3:** Rota metabólica de produção do ácido clavulânico (Li et al., 2000)

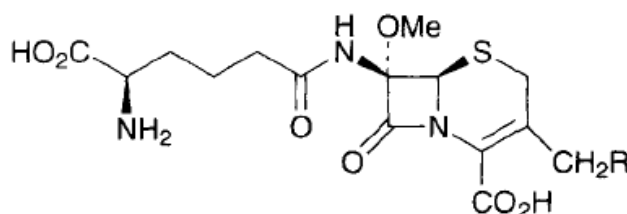
Enzimas : CEAS – N-carboxietilarginina sintase; βLS – β-lactam sintetase; CAS – clavaminato sintase; PAH – proclavamínico amidino hidrolase; CAD – clavaldeído desidrogenase. Cofatores : TDP – tiamina bifosfato; ATP; α-ceto - α-cetoglutarato; NADPH.

### 2.3. Cefamicina C

A cefamicina C foi primeiramente detectada no início da década de setenta (STAPLEY et al., 1972). Nesta época, pesquisas intensivas estavam sendo desenvolvidas para a descoberta de microrganismos produtores de compostos β-lactâmicos resistentes às β-lactamases, e pesquisadores dos laboratórios Merck e Lilly descreveram uma nova família de antibióticos β-lactâmicos, as cefamicinas, que

se mostraram estáveis à classe das “serina  $\beta$ -lactamases” e apresentaram interessante atividade contra bactérias Gram-negativas (BAGGALEY et al., 1997). É considerada uma cefalosporina modificada e a presença do grupo metoxil no anel  $\beta$ -lactâmico confere uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas e patógenos anaeróbios, e aumenta sua resistência contra as  $\beta$ -lactamases de bactérias Gram-negativas (JENSEN e PARADKAR, 1999; DEMAIN e ELANDER, 1999).

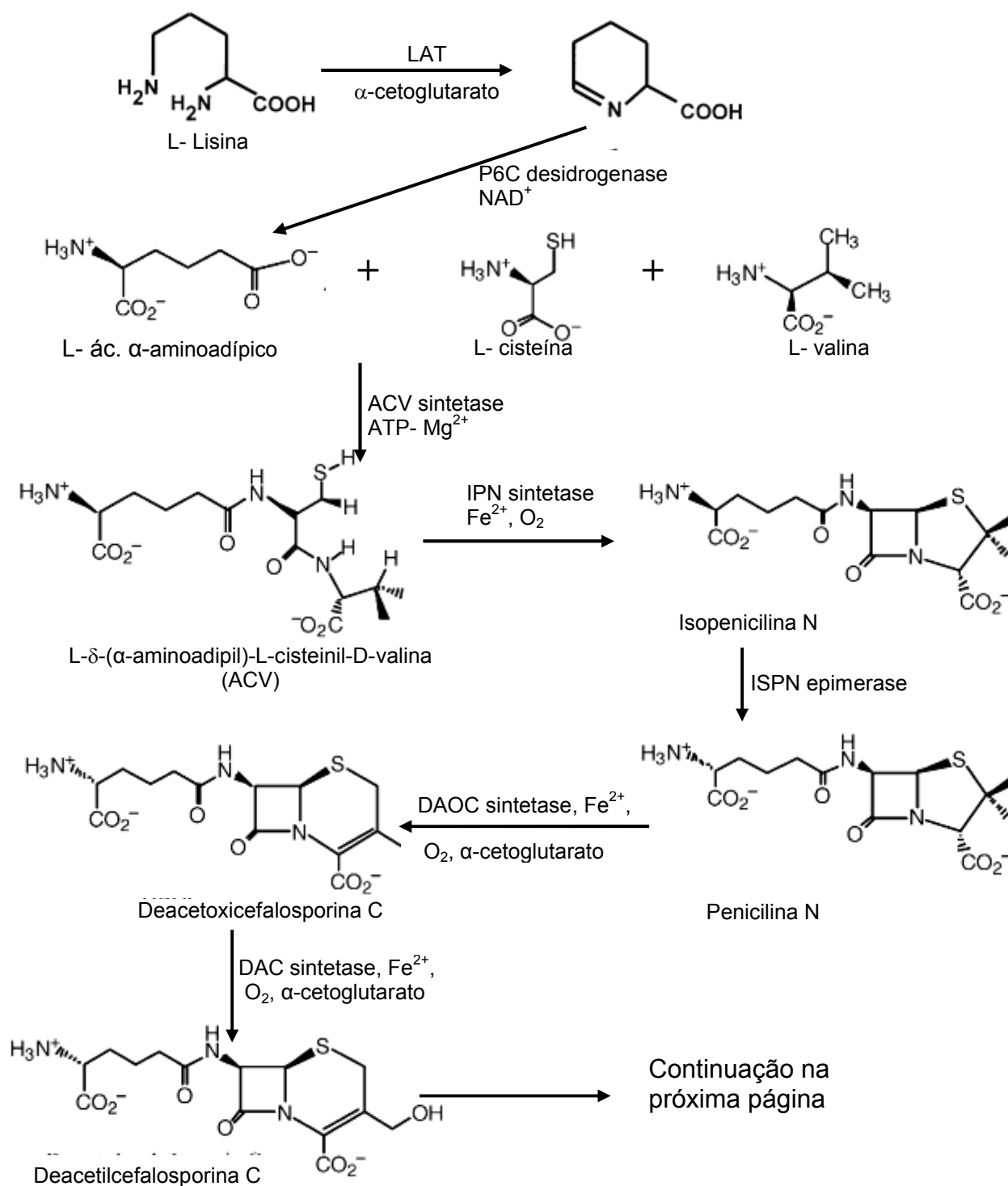
Como as cefalosporinas, sua fórmula estrutural, mostrada na Figura 2.4, é formada pelo anel  $\beta$ -lactâmico ligado ao anel diidrotiazina, e o grupo metoxil ligado ao carbono sete da estrutura da molécula.



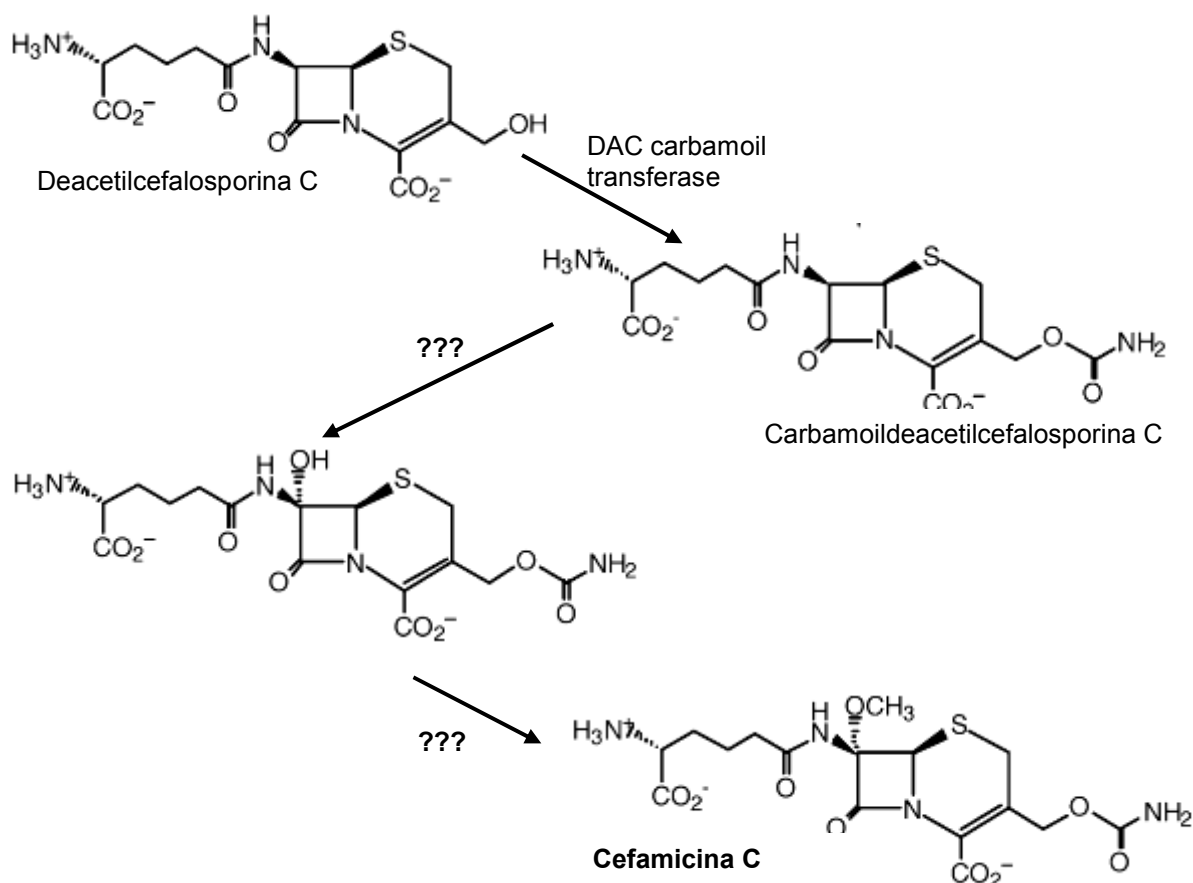
**Figura 2.4:** Fórmula estrutural das Cefamicinas

A biossíntese da cefamicina C possui passos metabólicos comuns à biossíntese das penicilinas (os passos iniciais) e das cefalosporinas (até passos intermediários). Os precursores da cefamicina C são três aminoácidos: L-lisina, L-cisteína e L-valina (LIRAS, 1999). Estes aminoácidos precursores são desviados do metabolismo primário para serem utilizados no metabolismo secundário, na rota de biossíntese da cefamicina. A valina é um aminoácido pertencente à família do piruvato, a cisteína à família do 3-fosfoglicerato e a lisina à família do oxaloacetato, o que significa que para a biossíntese destes aminoácidos, a molécula precursora, que dá o nome à família, precisa ser desviada da rota glicolítica .

A Figura 2.5 ilustra a rota metabólica da cefamicina. Nos primeiros passos da rota biossintética, a lisina é convertida ao ácido  $\alpha$ -aminoadípico por meio de duas reações enzimáticas, catalisadas pelas enzimas LAT (lisina 6-amino transferase) e P6C-desidrogenase (ácido piperideíno-6-carboxílico-desidrogenase). O passo seguinte envolve a condensação dos três aminoácidos: ácido  $\alpha$ -aminoadípico, cisteína e valina, formando o tripeptídeo  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteína-D-valina), ou ACV. A reação é catalisada pela enzima ACV sintase, e requer o gasto de uma molécula de ATP.



**Figura 2.5:** Rota metabólica de produção da Cefamicina C (Oster et al., 2006; Fuente et al., 1997)



**Figura 2.5:** Rota metabólica de produção da Cefamicina C (Oster et al., 2006; Fuente et al., 1997)

O ACV é convertido em um composto contendo o anel  $\beta$ -lactâmico, a isopenicilina N, pela ACV ciclase ou isopenicilina N sintase. A epimerase, próxima enzima na rota metabólica, converte a isopenicilina N em penicilina N, ao mudar a configuração da cadeia lateral  $\alpha$ -aminoadipil de L para D. O anel tiazolidina da penicilina N é expandido, formando a deacetoxicefalosporina C, já com o anel diidrotiazina, comum a todas as cefalosporinas. A enzima que participa dessa reação é a penicilina N expandase ou deacetoxicefalosporina C sintase. A deacetoxicefalosporina C formada é hidroxilada no carbono C-3' pela deacetoxicefalosporina C hidroxilase, formando deacetilcefalosporina C. Da deacetilcefalosporina C são mais três passos metabólicos, nos quais a molécula recebe um grupo carbamoil e é metoxilada, resultando na molécula de cefamicina C.

## 2.4. Produção de cefamicina C e ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

*Streptomyces clavuligerus* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia estrita, predominantemente encontrada no solo. Pertence ao grupo dos actinomicetos e como tal, apresenta uma característica incomum às outras bactérias, que é a capacidade de formar hifas (LECHEVALIER, 1981).

Esses microrganismos apresentam um ciclo de vida complexo. Primeiramente, há a germinação de esporos, originando um micélio vegetativo formado por hifas ramificadas que penetram no substrato para obtenção dos nutrientes necessários ao seu crescimento (BALOWS et al., 1992). Do micélio vegetativo é originado o micélio aéreo. As hifas aéreas passam por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos. Nessa fase, ativa-se o metabolismo secundário em que são produzidos principalmente antibióticos (DEMAIN, 1998).

Os actinomicetos têm grande potencial para produzirem antibióticos. Representam um grupo de grande importância na indústria farmacêutica, já que mais de 50% dos antibióticos empregados terapeuticamente são produzidos por bactérias desse grupo (KURYLOWICZ, 1981). Dentre os metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces clavuligerus* podem ser citados os compostos  $\beta$ -lactâmicos isopenicilina N, deacetilcefalosporina C, cefamicina C e o ácido clavulânico (IVES e BUSHEL, 1997), alanilclavam e compostos com a estrutura pirrotina, como a holomicina (LORENZANA et al., 2004).

Embora sejam capazes de degradar compostos mais complexos, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e compostos aromáticos, espécies de *Streptomyces* necessitam somente de uma fonte de carbono orgânico, fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns sais minerais. Também não requerem vitaminas ou fatores de crescimento. Para a maioria das espécies do gênero *Streptomyces*, a temperatura de crescimento varia de 28 a 45°C (BALLOWS et al., 1992).

O glicerol tem sido a fonte de carbono e energia mais utilizada na composição dos meios de cultura para a produção de ácido clavulânico (SAUDAGAR e SINGHAL, 2007; ROMERO et al., 1984; CHEN et al., 2002,

BATISTA-NETO, 2004). Ao ser assimilado pela célula, o glicerol é convertido diretamente a gliceraldeído-3-fosfato, precursor da molécula de ácido clavulânico, por isso é bem razoável a inclusão deste composto no meio de cultura (BAGGALEY et al., 1997; LIRAS e RODRIGUEZ-GARCIA, 2000). A repressão por fonte de carbono foi verificada na produção de ácido clavulânico. Romero et al. (1984) verificaram uma taxa máxima de produção quando a concentração inicial de glicerol foi de 165 mM (15 g.L<sup>-1</sup>), sendo que concentrações superiores reduziram a produção. Chen et al. (2002) obtiveram produção máxima quando a concentração inicial de glicerol estava entre 10-20 g.L<sup>-1</sup>. Aharonowitz e Demain (1978) mostraram que o aumento da concentração de glicerol favorece o crescimento de *Streptomyces clavuligerus*. A regulação por fonte de carbono pode estar relacionada ao controle da biossíntese de antibiótico pela velocidade de crescimento do microrganismo (MARTIN e DEMAINE, 1980). Ao favorecer o crescimento, altas concentrações de glicerol podem estar reprimindo o metabolismo secundário.

O glicerol também pode ser usado como fonte de carbono para a produção de cefamicina C, mas o uso do amido tem apresentado uma maior produção (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978; ANTÔNIO, T., 2007). Como na produção de ácido clavulânico, o aumento na concentração inicial de glicerol no meio de produção também reprimiu a síntese do antibiótico (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978). Rius e Demain (1997) verificaram que o aumento da concentração de glicerol e amido no meio de cultura de 1% para 3% provocou uma queda na produtividade específica e volumétrica de cefalosporina. Mas foi verificado que o aumento da concentração de amido aumentou a atividade máxima da enzima LAT, enquanto que o glicerol reduziu a atividade desta enzima. Segundo os autores, já foi retratado na literatura que fontes facilmente assimiláveis reprimiam a síntese de enzimas da rota metabólica das cefalosporinas, como a enzima expandase. Como o aumento na atividade da LAT não proporcionou um aumento na produção de antibióticos, os autores levantaram a hipótese de que outras enzimas, não a LAT, presentes na biossíntese das cefalosporinas estavam sujeitas à repressão por fonte de carbono.

Como fonte de nitrogênio, vários substratos já foram testados para a produção destes  $\beta$ -lactâmicos. Como ocorre com as fontes de carbono, fontes de nitrogênio facilmente assimiláveis favorecem o crescimento, influenciando de forma negativa a produção de metabólitos secundários. Já é conhecido também que fontes

de nitrogênio simples presentes no meio, como sais de amônia, reprimem as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio mais complexas (MARTIN e DEMAINE, 1980). Geralmente, a pesquisa por melhores fontes de nitrogênio para a produção de antibióticos levam a seleção das fontes mais lentamente metabolizáveis, o que provavelmente resulta numa condição de limitação por nitrogênio. Exemplos clássicos são o uso da prolina em meios quimicamente definidos na produção de estreptomicina e da farinha de soja em várias fermentações conduzidas por actinomicetos. Estes dois componentes liberam amônia em pequenas taxas ao longo da fermentação, provavelmente evitando a repressão por nitrogênio (DEMAINE, 1984).

A amônia pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para a produção de ácido clavulânico, mas não é uma fonte interessante devido aos seus efeitos de inibição e por ser uma fonte nutricionalmente pobre (IVES e BUSHELL, 1997). A adição de aminoácidos ao meio de cultura tem proporcionado um aumento na produção de ácido clavulânico. Ives e Bushel (1997), trabalhando com um meio a base de glicerol e amônia, constataram que a suplementação com os aminoácidos isoleucina, leucina, serina e valina aumentaram produção de ácido clavulânico em comparação ao meio sem suplementação, mas a suplementação com arginina não apresentou nenhum efeito. Chen et al. (2003) avaliaram a adição de ornitina e arginina ao meio de cultura contendo glicerol e farinha de soja como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Como observado por Ives e Bushel (1997), a adição de arginina não provocou aumento na produção de ácido clavulânico, mas a ornitina quase que duplicou a produção. Segundo os autores, já foi retratado na literatura que a ornitina reprime a biossíntese da cefamicina C, rota metabólica concorrente à rota de produção do ácido clavulânico pelos intermediários do metabolismo do glicerol. Essa repressão permite um maior fluxo de intermediários para a produção de ácido clavulânico. Na produção de cefalosporinas, Aharonowitz e Demain (1978) testaram a adição de vários aminoácidos ao meio de cultura contendo 0,1% de glicerol e verificaram que a adição de asparagina proporcionava maior produção.

Os melhores resultados de produção de ácido clavulânico e cefamicina C foram conseguidos com a adição de fontes complexas de nitrogênio. Antônio (2007) obteve uma melhor produção de cefamicina utilizando extrato protéico de caroço de algodão (Proflo), alcançando um máximo de produção de 140 mg.L<sup>-1</sup>,



enquanto que a utilização de caseína, triptona e a mistura de asparagina e tirosina renderam, respectivamente, 60 mg.L<sup>-1</sup>, 90 mg.L<sup>-1</sup> e 40 mg.L<sup>-1</sup> de cefalosporinas totais. Na produção de ácido clavulânico, os derivados protéicos de soja têm se mostrado as fontes de nitrogênio mais interessantes. Gouveia et al. (2001) trabalhou com a combinação de diferentes fontes de nitrogênio (água de maceração de milho, extrato de levedura e peptona) com o extrato protéico de soja (Samprosoy 90NB) e verificou que a maior produção de ácido clavulânico foi obtida quando somente extrato protéico de soja foi utilizado. Mayer e Decker (1996) estudaram a utilização de farinha de soja e extrato de farinha de soja como fonte de nitrogênio. A maior produção foi obtida no meio adicionado de farinha de soja, que é uma fonte de nitrogênio mais complexa que o extrato.

Como *Streptomyces clavuligerus* é uma bactéria estritamente aeróbia, o oxigênio é um nutriente de fundamental importância tanto para crescimento quanto para produção de metabólitos. Yegneswaran et al. (1991) descreveram que, em cultivos com *Streptomyces clavuligerus* realizados com o controle do oxigênio dissolvido em 50% e 100% da saturação determinou um aumento na velocidade específica de produção de cefamicina C de 2 a 3 vezes em comparação com experimentos realizados sem o controle do oxigênio dissolvido. O processo de aeração, agitação e a relação volume de meio e volume do reator são fatores importantes que devem ser considerados na produção de ácido clavulânico e cefamicina C, de forma a evitar limitação de oxigênio dissolvido no meio. Na produção de cefamicina, condições limitantes de oxigênio afetam principalmente a enzima expandase, que realiza a expansão do anel tiazolidina da penicilina N para o anel dihidrotiazina das cefalosporinas (LEBRIHI et al., 1988).

O fosfato é outro nutriente importante já que faz parte da estrutura molecular de vários constituintes celulares, como o ATP. Deve ser adicionado ao meio em quantidades moderadas, já que a produção de ácido clavulânico e de cefamicina são reprimidas por altas concentrações deste íon, e maiores produções foram verificadas em condições de limitação por fosfato (LEBRIHI et al., 1987). O enxofre, constituinte da molécula de cisteína, também deve ser adicionado ao meio.

O enxofre, o fosfato e outros micronutrientes são geralmente adicionados na forma de sais inorgânicos. Em alguns meios em que é adicionado o tampão biológico MOPS (ácido 3-[N-Morpholino]-propanosulfônico), o ácido sulfônico residual pode ser usado sozinho como fonte de enxofre.

## 2.5. Modelagem matemática de processos biotecnológicos

A história dos modelos matemáticos aplicados aos processos biotecnológicos começou com as famosas equações de Blackman (1905), Monod (1942) e Teissier (1942) apud Bellgardt (1991), que relacionavam a concentração de substrato limitante à velocidade de crescimento dos microrganismos. Desde então, um grande número de modelos foi desenvolvido para vários tipos de bioprocessos, conduzidas por diferentes microrganismos, e muitos deles ainda se baseiam na cinética proposta por Monod (BELLGARDT, 1991).

Os modelos matemáticos estabelecem uma relação funcional entre as variáveis do processo, sendo de grande utilidade no desenvolvimento e projeto de processos. Dentre suas aplicações podem ser citadas a otimização da planta de construção e dos parâmetros de operação; cálculos de perfis temporais ótimos para alimentação do substrato e outras variáveis; planejamento de experimentos para obtenção de máxima informação num tempo mínimo e com poucos gastos; projeto de controle de sistemas; estimação de parâmetros e variáveis que não podem ser medidas (BELLGARDT, 1991).

Os modelos biológicos podem ser divididos em modelos estruturados e não estruturados, segregados ou não segregados. Num modelo segregado, as células de uma população são consideradas heterogêneas e singulares. Na abordagem segregada, características conhecidas do ciclo celular, descrevendo células em etapas de desenvolvimento ou tipos morfológicos diferentes podem ser incorporadas e usadas para aumentar a validade e o âmbito de aplicação do modelo cinético. Nos modelos segregados, a cinética para cada unidade celular e mecanismos de regulação são pontos centrais e essenciais. O modelo não segregado ou distributivo representa a população celular por suas propriedades médias. Este tipo de aproximação pode ser empregado quando a heterogeneidade celular não influencia substancialmente a cinética do processo estudado. Na fase de crescimento denominada crescimento balanceado, as atividades celulares de síntese estão coordenadas de tal maneira que a média da composição celular não é afetada pelo crescimento da população (BAILEY e OLLIS, 1986).

Os modelos não-estruturados são os mais simples. Eles consideram as células de microrganismos como uma massa uniforme, sem dinâmicas internas e

cujas velocidades de reações dependem diretamente e apenas das condições da fase líquida do reator. O modelo não considera se as células presentes no meio reacional estão em diferentes estágios fisiológicos, sendo o crescimento celular descrito como uma média do crescimento de toda população. Além da concentração celular, este modelo inclui apenas as variáveis que têm significativa influência no comportamento microbiano e cujas concentrações variam muito ao longo do processo. Assim, o modelo contém apenas a cinética de crescimento, consumo de substrato e formação de produto. Este tipo de aproximação gera bons resultados quando o tempo de resposta às variações do meio ambiente pela célula ou é insignificamente pequeno ou muito longo quando comparado à duração do processo fermentativo (BELLGARDT, 1991). Mas justamente pela sua simplicidade e ausência de detalhes sobre os mecanismos do metabolismo celular, sua aplicação na interpretação da fisiologia e predição do comportamento celular sob diferentes condições de cultivo é bem limitada (GOMBERT e NIELSEN, 2000). Particularmente, erros consideráveis podem aparecer na presença de regulação metabólica ou crescimento não sincrônico da cultura, no qual a variação metabólica durante o ciclo de divisão se torna globalmente visível, ou então quando as células não se adaptam rapidamente às novas condições da cultura.

Ao contrário dos modelos não-estruturados, os modelos estruturados informam o estado fisiológico dos microrganismos, como a mudança na sua composição e adaptação do sistema regulatório às mudanças no meio ambiente em que a célula está crescendo. Nos modelos estruturados são incluídas apenas as variáveis mais relevantes para os processos intracelulares, de forma a obter um modelo o mais simples possível e minimizar o número de parâmetros. Um modelo pode ser estruturado com base nos componentes da biomassa, como a concentração de metabólitos, enzimas, ou RNA (BELLGARDT, 1991).

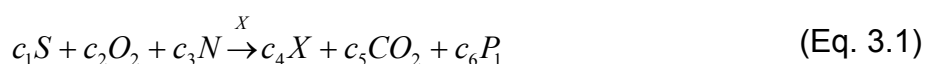
Gombert e Nielsen (2000) propuseram o agrupamento dos modelos que descrevem o metabolismo celular de acordo com a sua estrutura, dividindo-os em dois grupos: os modelos estequiométricos e os modelos cinéticos. Os modelos estequiométricos são construídos com base na análise de fluxos metabólicos (AFM) (ou MFA, sigla do termo em inglês metabolic flux analysis), que tem sido largamente aplicada para a quantificação dos fluxos intracelulares do metabolismo central de bactérias, leveduras, fungos e células animais. A AFM leva em consideração as rotas metabólicas presentes no microrganismo ou célula em estudo, e são feitos

balanços de massa sobre todos os componentes intracelulares para calcular os fluxos através das diferentes ramificações das rotas do metabolismo. Assim é possível compreender o comportamento do metabolismo sob determinadas condições de cultivo (GOMBERT e NIELSEN, 2000). Os modelos cinéticos descrevem a dinâmica do processo, combinando cinéticas enzimática e microbiana e a estequiometria das rotas metabólicas. Modelos cinéticos estruturados de baixa complexidade são obtidos agrupando-se sistemas com funções biológicas e dinâmicas semelhantes em um único grupo (BELLGARDT, 1991).

## 2.6. Princípios da construção de modelos para processos biotecnológicos

A função de um modelo biológico é descrever a velocidade com que as reações metabólicas ocorrem com base nas condições de operação do reator. Como já mencionado, devido à complexidade das reações metabólicas, todos os modelos são simplificações da realidade. Muitas vezes, vários mecanismos da reação metabólica em estudo não são conhecidos e dependendo do objetivo para o qual o modelo será estudado, as simplificações podem ser feitas sem perda de qualidade dos resultados (GOMBERT e NIELSEN, 2000). Para isso, devem-se identificar os fatores mais importantes que influenciam o processo de crescimento, formação do produto e do tipo de bioprocesso em estudo, o que representa uma das principais dificuldades encontradas na construção de um modelo. É claro que quanto mais complexo o modelo e quanto mais variáveis e parâmetros tiver, melhor o ajuste aos dados experimentais. Mas nem por isso estes modelos são mais exatos. A verificação experimental e a identificação de parâmetros para os modelos complexos são difíceis e sujeitas a complicações, e se os resultados não forem avaliados cuidadosamente, o modelo será provavelmente ajustado aos erros experimentais.

De uma forma simplificada, o crescimento microbiano e a produção de metabólitos em cultivos aeróbios podem ser representados pelas equações pseudo-estequiométricas descritas a seguir (SHULER e KARGI, 1992):





em que:

- $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$  são os coeficientes estequiométricos;
- $X$  são as células;
- $S$  é a fonte de carbono e energia;
- $N$  é a fonte de nitrogênio;
- $P_1$  é o produto associado ao crescimento;
- $P_2$  é o produto não-associado ao crescimento.

Estas equações representam um modelo não-segregado e não estruturado. A Equação 3.1 descreve o crescimento celular e a produção de metabólito associado ao crescimento, ou metabólito primário, oriundo do metabolismo primário do microrganismo. A Equação 3.2 descreve a morte celular que ocorre durante o cultivo. A morte celular ocorre quando há exaustão de algum nutriente essencial no meio ou acúmulo de alguma substância tóxica, e pode ser influenciada pelas condições de operação do biorreator. A Equação 3.3 descreve a produção de metabólito secundário, não-associado ao crescimento, oriundo do metabolismo secundário do microrganismo.

A velocidade de crescimento celular,  $v_x$ , (Eq. 3.4) é proporcional à concentração celular,  $C_x$ , presente no meio reacional, e essa constante de proporcionalidade foi denominada como velocidade específica de crescimento -  $\mu$ .

$$v_x = \mu \cdot C_x \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Dentre muitas expressões utilizadas para representar a velocidade específica de crescimento, a mais simples e conhecida é a equação de Monod que, através de experimentos em quimiostato, considerou na formulação de seu modelo a presença de um único substrato limitante para o crescimento celular. A equação proposta por Monod é dada pela Equação 3.5 a seguir.

$$(\text{Monod}) \quad \mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_s + C_s} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

sendo  $C_s$  a concentração do substrato limitante;  $\mu$  a velocidade específica de crescimento;  $\mu_{m\acute{a}x}$  a velocidade específica máxima de crescimento, quando  $C_s \gg K_s$  e a concentração dos outros nutrientes essenciais não se torna limitante;  $K_s$  é a constante de saturação, é o valor da concentração do substrato  $S$

quando a  $\mu$  atinge metade do seu valor máximo,  $\mu_{m\acute{a}x}$ . Segundo este modelo, a célula cresce na sua velocidade máxima, ou seja,  $\mu = \mu_{m\acute{a}x}$ , quando o valor de  $C_s \gg K_s$ , resultando numa equação de ordem zero (BAILEY e OLLIS, 1986).

A equação de Monod é uma equação bem simples e não inclui efeitos de inibição que muitas vezes interfere no crescimento microbiano. A concentração de substrato, produto ou mesmo a concentração celular podem causar a inibição. Como a equação de Monod não descreve de maneira satisfatória o crescimento microbiano em qualquer condição, outros modelos foram propostos, incluindo ou não efeitos de inibição:

$$\text{(Tessier)} \quad \mu = \mu_{m\acute{a}x} (1 - e^{-s/K_s}) \quad (\text{Eq. 3.6})$$

$$\text{(Moser)} \quad \mu = \mu_{m\acute{a}x} (1 + K_s C_s^{-\lambda})^{-1} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

$$\text{(Contois)} \quad \mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_x C_x + C_s} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

$$\text{(Andrews)} \quad \mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_i + C_s + C_s^2 / K_p} \quad (\text{Eq. 3.9})$$

$$\text{(Aiba, Shoda e Nagatani)} \quad \mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_i + C_s} \frac{K_p}{K_p + C_p} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

O modelo de Contois prevê a redução da velocidade específica de crescimento com o aumento da concentração celular. Os modelos propostos por Andrews e Aiba e colaboradores levam em consideração a inibição pelo substrato e inibição pelo produto, respectivamente (BAILEY e OLLIS, 1986).

É possível que dois ou mais substratos sejam simultaneamente limitantes para o crescimento. Embora haja poucos dados disponíveis, pode ser proposto um modelo baseado no de Monod para cada substrato limitante, como na equação a seguir (BAILEY e OLLIS, 1986):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{C_{s1}}{K_1 + C_{s1}} \frac{C_{s2}}{K_2 + C_{s2}} \dots \quad (\text{Eq. 3.11})$$

A velocidade de consumo de substrato,  $v_s$ , e formação de produtos,  $v_p$ , podem ser descritas em relação à velocidade de crescimento celular, a partir das equações pseudo-estequiométricas definidas anteriormente. Para isso, são definidos os coeficientes de rendimento e manutenção (BAILEY e OLLIS, 1986):

$$Y_{X/S} = \frac{\text{massa de células formada}}{\text{massa de substrato consumido}} \quad (\text{Eq. 3.12})$$

$$Y_{P/X} = \frac{\text{massa de produto formado}}{\text{aumento na massa celular}} \quad (\text{Eq. 3.13})$$

As velocidades de consumo de substratos e variação dos produtos são dadas pelas equações 3.14, 3.15 e 3.16 (BAILEY e OLLIS, 1986):

$$-v_S = \left( \frac{1}{Y_{X/S}} \mu \right) C_X + m_S C_X \quad (\text{Eq. 3.14})$$

$$v_P = Y_{P/X} \mu C_X \quad (\text{Eq. 3.15})$$

$$v_P = \alpha \mu C_X + \beta C_X \quad (\text{Eq. 3.16})$$

Da Equação 3.14,  $m_S$  é o coeficiente de manutenção celular, que representa a fonte de carbono e energia consumida pelas células apenas para manutenção do metabolismo celular, sem que haja crescimento. A Equação 3.15 representa o modelo para produto associado ao crescimento. A Equação 3.16 representa o modelo proposto por Luedeking e Piret apud Bailey e Ollis (1986) que leva em consideração a formação de produto associado e não associado ao crescimento.

Nos modelos estruturados, a descrição da dinâmica dos componentes intracelulares geralmente é feita considerando-se o modelo de reações enzimáticas. Processos regulatórios e modelos moleculares, quando conhecidos, também podem ser considerados no modelo. Quando a rota metabólica é conhecida e as enzimas já estão caracterizadas quanto à sua cinética, a elaboração de um modelo estruturado é facilitada. Neste caso, a seguinte equação pode ser aplicada:

$$\frac{dC_{S_i}}{dt} = \sum_{j=1}^N \lambda_{ij} v_j - \mu C_{S_i} \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (\text{Eq. 3.17})$$

sendo  $C_{S_i}$  a concentração intracelular do metabólito  $i$ ,  $n$  é o número de metabólitos no sistema,  $v_j$  a atividade da enzima participando da reação  $j$ ,  $N$  é o número de reações no sistema,  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento e  $\lambda_{ij}$  o coeficiente estequiométrico, que é positivo se o metabólito  $i$  for o produto da reação  $j$  ou é negativo quando o metabólito  $i$  é o substrato (MALMBERG e HU, 1991).

As concentrações dos componentes intracelulares em relação à célula são definidas como:

$$C_{S_i} = \frac{C_{S_i}}{C_x} \quad (\text{Eq. 3.18})$$

sendo  $C_{S_i}$  a concentração volumétrica (em relação ao volume do reator) do componente i.

Conhecendo-se a cinética da enzima envolvida na reação j, é possível escrever as N atividades  $v_j$  do modelo estudado. O modelo de Michaelis-Menten de cinética enzimática, apresentado na Equação 3.19, embora muito simples, ainda é aplicado em vários modelos propostos na literatura (MALMBERG e HU, 1991; KHETAN et al., 1999; PAZOUTOVA et al., 1981 apud BAILEY e OLLIS, 1986).

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} C_S}{K_m + C_S}, \text{ sendo } v_{m\acute{a}x} = kC_{e_{ativa}} \quad (\text{Eq. 3.19})$$

$K_m$  é a constante de Michaelis-Menten;  $e_{ativa}$  é a concentração de enzima ativa participando da reação e  $k$  é a constante de proporcionalidade entre  $v_{m\acute{a}x}$  e  $e_{ativa}$ .

Existem outros modelos de cinética enzimática mais complexos propostos na literatura que levam em consideração os efeitos de inibição enzimática, reações reversíveis e cinética de enzimas alostéricas (BAILEY e OLLIS, 1986).

Quando muitos passos da rota metabólica em estudo não são conhecidos, lança-se mão de modelos cinéticos estruturados de baixa complexidade agrupando-se sistemas com funções biológicas e dinâmicas semelhantes. São propostas equações estequiométricas e equações matemáticas para descrever os grupos formados, baseando-se ou não em reações enzimáticas.

Uma vez estabelecido o modelo cinético do processo, parte-se para a avaliação de seus parâmetros não conhecidos. Estes são determinados ajustando o modelo aos dados experimentais através de métodos numéricos adequados auxiliados por programas computacionais. Quanto maior o grau de complexidade, mais difícil é a identificação dos parâmetros e a verificação do modelo. Assim, a construção de um modelo deve ser feita baseada em hipóteses que o tornam o mais simples possível. Caso a modelagem não gere resultados satisfatórios, as hipóteses devem ser verificadas uma de cada vez.

Para modelos simples, métodos de regressão como os gráficos de Lineweaver-Burk podem ser empregados, mas modelos complexos exigem métodos



mais elaborados, como regressões não lineares, para a identificação de seus parâmetros. O procedimento de identificação deve ser capaz de eliminar ou minimizar as perturbações nas variáveis medidas. Métodos “off-line” para modelos paramétricos são particularmente interessantes para construção de um modelo. Geralmente um método de minimização da variância dos erros das saídas do modelo é usado – método dos mínimos quadrados (FASOL e JÖRGL, 1980, apud BELLGARDT, 1991).

Após avaliação estatística dos resultados da identificação do modelo matemático, este pode então ser aplicado na simulação do processo. A simulação envolve a resolução das equações do modelo através de métodos computacionais adequados para diferentes condições iniciais e de contorno de acordo com as circunstâncias de interesse do processo. Desta forma, é possível testar novas variantes tecnológicas do processo, como por exemplo a mudança de um modo de cultivo em batelada para um modo contínuo de operação. A manipulação dos estudos de simulação possibilita, enfim, a busca de um regime ótimo ou pseudo ótimo (próximo do ótimo) de operação.

## 2.7. Aplicação da modelagem matemática na produção de antibióticos

Cruz e colaboradores (1999) desenvolveram um modelo matemático não-estruturado para descrever o processo de produção de cefalosporina C pelo fungo *Cephalosporium acremonium*, em batelada alimentada. Neste modelo, foram considerados dois tipos celulares metabolicamente diferentes – um grupo de células  $X_2$ , que crescia e produzia o antibiótico, e um outro grupo  $X_1$  apenas com capacidade de crescimento, mas que ao longo do cultivo se transformava em células  $X_2$ . Para descrever o processo de produção, os autores consideraram que as células  $X_2$ , ao se multiplicarem, produziam um complexo enzimático, responsável pela síntese da cefalosporina C a partir de seus precursores. A cinética de produção foi estabelecida como um modelo de cinética enzimática e levou em consideração a concentração do complexo enzimático e do substrato. Baseado no modelo, foi possível calcular a vazão de alimentação ótima do meio suplementar, de modo a maximizar a produção do antibiótico.

Malmberg e Hu (1991) propuseram um modelo cinético estruturado para a produção de cefalosporina C por *Streptomyces clavuligerus*. O modelo partiu da concentração intracelular dos aminoácidos precursores e incluiu os passos enzimáticos conhecidos da rota metabólica de biossíntese da cefalosporina. Com a simulação do modelo, foi possível prever o perfil de concentração dos intermediários ao longo do período de cultivo e a atividade específica das enzimas envolvidas. Os autores constataram que o passo metabólico catalizado pela enzima ACV sintetase é o limitante do processo, seguido pelo passo catalizado pela hidroxilase. O aumento da atividade destas duas enzimas aumenta linearmente a produção, até um certo ponto que uma terceira enzima limitante se torna o fator dominante. Como pode ser observado, este tipo de modelo fornece informações importantes que podem ser usadas, por exemplo, no desenvolvimento de um microrganismo geneticamente modificado, no qual pode-se introduzir uma super-expressão das enzimas limitantes.

Kirk et al. (2000) estudaram o efeito do substrato limitante – nitrogênio, fosfato ou carbono - na produção de ácido clavulânico por meio de uma análise de fluxo metabólico. No modelo, foram incluídas as principais rotas metabólicas presentes na maioria das espécies de *Streptomyces*, as reações de biossíntese dos precursores envolvidos na produção de biomassa e a reação de síntese do ácido clavulânico. Os autores constataram que a natureza do substrato limitante interferiu no fluxo de carbono através das diferentes reações consideradas, o que explicaria uma maior ou menor produção. A maior concentração de ácido clavulânico foi observada no meio no qual o fosfato era o substrato limitante, enquanto que no meio em que a fonte de carbono era limitante não houve produção. A limitação de carbono reduziu o fluxo através do metabolismo anaplerótico, que repõe os intermediários do ciclo do ácido cítrico. Segundo os autores, esta redução se refletiu na redução da concentração intracelular de  $\alpha$ -cetoglutarato, diminuindo a disponibilidade deste para a biossíntese do glutamato, e conseqüentemente, reduzindo a biossíntese da arginina. Já no meio com fosfato limitante, o fluxo para a arginina a partir do arginino-succinato foi o maior entre as diferentes condições testadas, disponibilizando uma maior concentração deste precursor para a síntese do ácido clavulânico. Segundo os autores, os resultados sugerem que sob limitação de fosfato, o fluxo através das reações que sintetizam a arginina está saturado, limitado sob limitação de nitrogênio e insuficiente sob limitação de carbono.

Bushell et al. (2006) também utilizaram a análise de fluxo metabólico para desenvolver uma estratégia de adição de aminoácidos ao meio de cultura que pudesse estimular a produção de ácido clavulânico. A análise dos resultados mostrou que a síntese do ácido clavulânico foi limitada pela disponibilidade do gliceraldeído-3-fosfato, o precursor C3 da molécula, e que parece que a “competição” entre as diferentes rotas que utilizam este componente influencia a sua disponibilidade. Os autores realizaram então um experimento com a adição de aminoácidos cuja biossíntese requer oxaloacetato como precursor – a combinação de arginina, aspartato e treonina, e outra dos três anteriores mais asparagina. A suplementação promoveu o aumento da produtividade de ácido clavulânico em até cinco vezes, comparado com o meio sem suplementação.

Baptista Neto et al. (2005) propuseram um modelo cinético simples para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Para descrever a cinética de crescimento, foi usado o modelo de Contois, e dois substratos diferentes como fonte de carbono e energia – o glicerol e a fonte de nitrogênio. A cinética de produção foi considerada não associada ao crescimento, e levou-se em conta a degradação do produto. A estimação dos parâmetros foi feita ajustando-se valores experimentais de um cultivo contínuo ao modelo proposto. Com os parâmetros estimados, foram feitas simulações de processos em batelada alimentada e cultivo contínuo com reciclo celular. Concluiu-se que a maior produtividade foi obtida no modo de operação contínuo com reciclo.

Como apresentado anteriormente, os modelos cinéticos, além de ferramentas tecnológicas muito úteis para desenvolvimento de processos, também auxiliam na compreensão da biossíntese de metabólitos pelos microrganismos, identificando gargalos nas rotas metabólicas, substratos limitantes e componentes no meio de cultura que não são precursores mas favorecem a produção. Apesar dos avanços alcançados na elucidação dos passos metabólicos da produção do ácido clavulânico e cefamicina C por *S. clavuligerus*, os mecanismos de regulação da produção destes compostos ainda não são completamente conhecidos. Justifica-se, assim, o uso de modelos cinéticos como uma ferramenta de auxílio para entender e explicar a produção desses metabólitos secundários, descrevendo a maneira como cada componente presente no meio de cultura pode afetar a cinética de crescimento e produção.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismos

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, armazenada em criotubos na forma de células vegetativas e suspensas no meio de reativação (Tabela 3.2) contendo 10% v/v de glicerol, usado como agente crioprotetor. Os criotubos foram conservados em ultrafreezer, a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para análise de cefamicina C, foi utilizada a bactéria-teste *Escherichia coli* ESS (Liras e Martin, 2005), também conservada como descrito acima, ou em ágar nutriente, estocada em geladeira.

#### 3.2. Meios de cultura

##### 3.2.1. Meio sólido de cultivo da bactéria-teste

O cultivo da *E. coli* ESS foi feito em agar nutriente, cuja composição é mostrada na tabela abaixo.

**Tabela 3.1.** Composição do meio agar nutriente

Componentes	Concentração
Peptona ( $\text{g.L}^{-1}$ )	5,0
Extrato de carne ( $\text{g.L}^{-1}$ )	3,0
Agar bacteriológico ( $\text{g.L}^{-1}$ )	15,0
pH	$7,2 \pm 0,1$

### 3.2.2. Meio de cultura de reativação

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa (2002), descrito na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Meio de cultura para reativação do microrganismo

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	15,0
Peptona (g.L <sup>-1</sup> )	10,0
Extrato de Levedura (g.L <sup>-1</sup> )	1,0
Extrato de malte (g.L <sup>-1</sup> )	10,0
MOPS (g.L <sup>-1</sup> )	21,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	0,75
Solução de sais <sup>(1)</sup> (mL.L <sup>-1</sup> )	1,0
pH	6,8± 0,1

<sup>(1)</sup> Composição (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,0; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; água destilada, q.s.p 1L.

### 3.2.3. Meio de cultura para preparo do inóculo e produção

Todos os meios utilizados neste trabalho foram meios sintéticos, de composição definida, propostos na literatura ou com algumas modificações. As tabelas 3.3 e 3.4 apresentam a composição de cada um.

A composição do meio MA (maltose-asparagina) foi baseada no meio utilizado por Khetan et al. (1999), sendo utilizado a maltose (AHARANOWITZ E DEMAIN, 1978) no lugar do glicerol, na mesma concentração.

**Tabela 3.3.** Meios de cultura preparados de acordo com Romero et al. (1984, 1986) ou com algumas modificações

Componentes	Concentração			
	GSPG	GMPG	GPG	GPO
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	15	15	15	15
Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	20	-	-	-
Maltose (g.L <sup>-1</sup> )	-	10	-	-
Prolina (g.L <sup>-1</sup> )	2,5	2,5	2,5	2,5
Ácido Glutâmico (mM)	10	10	10	-
Ornitina (mM)	-	-	-	10
NaCl (g.L <sup>-1</sup> )	5	5	5	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	2	2	2	2
CaCl <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	0,4	0,4	0,4	0,4
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1	0,1	0,1	1
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1	0,1	0,1	0,1
ZnCl <sub>2</sub>	0,05	0,05	0,05	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1
pH	7	7	7	7

**Tabela 3.4.** Meios de cultura MA e seus derivados

Componentes	Concentração			
	MA	GA	MAA	MAG
Maltose (g.L <sup>-1</sup> )	10	-	10	10
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	-	10	-	-
L-asparagina (g.L <sup>-1</sup> )	2	2	4	2
Ácido Glutâmico (mM)	-	-	-	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	3,5	3,5	3,5	3,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	1,23	1,23	1,23	1,23
MOPS <sup>(1)</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	21	21	21	21
pH	6,8± 0,1	6,8± 0,1	6,8± 0,1	6,8± 0,1

<sup>(1)</sup>- ácido 3-[N-Morpholino]-propanesulfônico: componente usado para tamponar o meio de cultura.

<sup>(2)</sup> - Composição (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,0; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; CaCl<sub>2</sub>,1,0; água destilada, q.s.p 1L.

### 3.3. Procedimento experimental

#### 3.3.1. Experimentos em mesa incubadora rotativa

O procedimento de cultivo utilizado é o mesmo descrito por Batista-Neto (2004), e é dividido em três etapas: reativação, preparo do inóculo e produção. Todos os cultivos foram realizados a uma temperatura de 28°C, sob uma agitação de 250 rpm.

- Reativação: 3,5 mL da suspensão de células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus* contidas nos criotubos foram inoculadas em Erlenmeyers de 500mL contendo 50mL do meio de reativação e incubados por 24h.

- Preparação do inóculo: após a reativação, 5 mL do caldo fermentado foram inoculados em 45 mL de meio de produção, em um Erlenmeyer de 500 mL, e incubados por 24h.

- Produção: 5 mL do caldo de inóculo foram adicionados a Erlenmeyers de 500mL contendo 45mL de meio de produção e foram incubados por 98 ou 120 h . No tempo inicial do cultivo e a cada 12 h retirou-se uma amostra. As amostras foram centrifugadas a 4°C, a 11000 rpm por 15 min, e o sobrenadante recolhido e congelado a -80°C para análises posteriores. Em alguns ensaios, as amostras foram filtradas em membrana de éster de celulose (HA em ester de celulose), de poro 0,45µm, antes serem de congeladas. As células compactadas foram quantificadas pelo método de massa seca, descrito em análise da concentração celular.

Em dois ensaios, o meio GPG foi alimentado com um pulso de maltose (10mM), e o outro com um pulso de ácido glutâmico (5mM), na etapa de produção, em 36h de cultivo.

Estes experimentos foram realizados para levantamento dos dados cinéticos do modelo proposto.

#### 3.4. Metodologia analítica

### 3.4.1. Análise de ácido clavulânico

O ácido clavulânico foi quantificado pelo método cromatográfico proposto por Foulstone e Reading (1982).

Esse método baseia-se na determinação de um composto oriundo da derivatização do ácido clavulânico com imidazol, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Foi utilizada a coluna C-18  $\mu$ -Bondapak de 300 mm da Waters como fase estacionária, e a fase móvel composta de 6% (v/v) de metanol e 94% (v/v) de tampão fosfato (0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH=3,2), a uma vazão de 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do forno foi mantida a 28°C. Os picos foram detectados no comprimento de onda de 311 nm. As concentrações de ácido clavulânico foram determinadas a partir de uma curva de calibração construída com uma solução padrão de clavulanato de potássio, preparada a partir do medicamento CLAVULIN®, da Glaxo SmithKline Farmacêutica, disponível comercialmente.

Foi adotado o seguinte procedimento para cada amostra:

- Após o término do cultivo, as amostras foram descongeladas, e aquelas que não foram previamente filtradas, foram filtradas em membrana de ésters de celulose, de poro 0,45 $\mu$ m.
- Reação com imidazol: misturou-se a amostra com uma solução de imidazol (16,5 g/L, pH 6,8) na proporção 1:1- geralmente 0,5 mL da amostra e 0,5 mL de imidazol. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria por 15 min a 30°C.
- Terminada a reação, os tubos com as amostras e da curva padrão foram colocados no cromatógrafo para injeção.

### 3.4.2. Análise de Cefamicina C

Utilizou-se dois métodos diferentes para quantificação da cefamicina C nos caldos de cultivo. Para os primeiros experimentos foi utilizado o método do bioensaio com a bactéria-teste *E. coli* ESS. Ao final do trabalho, já havia disponível



uma outra metodologia que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação deste antibiótico (BAPTISTA NETO et al., 2009).

### 3.4.2.1 Análise de Cefamicina C por bioensaio

Este método foi utilizado para análise dos caldos de cultivo com os meios GSPG, GPG, GPO, GPG+M, GPG+glu, MAA e MAG.

A cefamicina C foi quantificada por bioensaio como cefalosporinas totais, utilizando como bactéria-teste a linhagem de *E. coli* ESS 2235 (LIRAS e MARTIN, 2005).

O método baseia-se na difusão da solução de antibiótico no ágar previamente inoculado com a bactéria-teste, inibindo o crescimento da mesma nas regiões onde o antibiótico se difunde. A concentração de cefalosporinas totais é determinada medindo-se o halo de inibição formado. Os procedimentos do método consistem em:

- Preparo das soluções padrões e das amostras: são preparadas duas soluções padrões de cefalosporina C, sendo uma mais concentrada e outra mais diluída. Para cada amostra, também são utilizadas duas soluções, sendo uma a amostra sem diluição e a outra a amostra diluída com o mesmo fator de diluição entre as soluções padrões.

- A bactéria-teste é cultivada em agar nutriente (aproximadamente 20 mL) em um tubo de ensaio inclinado, por 48h a 36-37°C.

- Após crescimento, prepara-se a suspensão bacteriana adicionando-se 10 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril ao tubo de ensaio.

- É feita a leitura de DO da suspensão resultante a um comprimento de onda de 600 nm. O cálculo da quantidade da suspensão adicionada para cada x mL de agar é feito da seguinte forma:

$$y = \frac{x}{100 \cdot DO}$$

sendo que:

y = quantidade de suspensão bacteriana a ser adicionada em x mL de agar;

DO = valor de DO a 600 nm da suspensão bacteriana.

- O agar já inoculado com as bactérias é então distribuído na placas de petri. Após solidificação, perfura-se 8 poços de 5 mm de diâmetro.
- Adiciona-se 20  $\mu$ L das soluções padrões e das amostras preparadas em cada poço, e incuba-se as placas a 37°C por 24h.
- Após este tempo, o diâmetro dos halos de inibição são medidos. De posse desse valor, pode ser feito o cálculo da concentração de cefalosporinas totais das amostras, por interpolação logarítmica:

$$\theta = \frac{(\sum A_H + \sum A_L) - (\sum P_H + \sum P_L)}{(\sum A_H + \sum P_H) - (\sum A_L + \sum P_L)} \cdot \log(\text{fator de diluição})$$

$$C_{amostra} = 10^\theta \cdot \text{concentração mais alta do padrão}$$

sendo que:

A e P: diâmetros dos halos de inibição das amostras e dos padrões, respectivamente;

H e L: representam, respectivamente, as altas e baixas concentrações;

fator de diluição: razão entre a concentração mais alta e mais baixa das soluções padrões;

$C_{amostra}$ : concentração de cefalosporinas totais na amostra

### 3.4.2.2 Análise de Cefamicina C por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método foi utilizado para análise dos caldos de cultivo com os meios MA e GA.

Utilizou-se a coluna C-12 Synergi da Phenomenex como fase estacionária e solução de ácido acético 0,01M como eluente. As condições de operação do equipamento foram as seguintes: temperatura de 28°C, vazão do eluente de 2ml.min<sup>-1</sup>, regime isocrático, e tempo de injeção de 20 min. A detecção foi feita por UV no comprimento de onda de 254 nm. O pico da cefamicina foi detectado num tempo aproximado de 10 min. Como não existe padrão de cefamicina C, a curva de calibração foi obtida a partir dos resultados de bioensaio de uma das amostras dos caldos analisados, a amostra-padrão. Como amostra-padrão,

escolheu-se uma das amostras dos tempos finais do cultivo, de forma a garantir que esta apresentasse uma maior concentração do antibiótico. Volumes diferentes da amostra-padrão foram injetados no cromatógrafo, e foi feita uma correlação entre a área do pico e a concentração de cefalosporinas totais, previamente quantificada pelo bioensaio. Desta correlação obteve-se uma curva de calibração, relacionando área do pico e concentração de cefalosporinas totais.

### **3.4.3. Análise de glicerol, maltose e sacarose**

As concentrações de glicerol, maltose e sacarose foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS-802 (Lonpak, divisão da Millipore) e água Milli-Q como eluente. O equipamento foi operado nas seguintes condições: 80°C, 1 mL.min<sup>-1</sup>. O detector deste método foi um medidor do índice de refração (W410 da Waters). A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão do composto a ser analisado. As amostras analisadas foram diluídas em água para ficarem na faixa de concentração da curva padrão e filtradas em membranas de éster de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro, exceto aquelas previamente filtradas.

### **3.4.4. Análise de aminoácidos**

A análise de aminoácidos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseado no método proposto por Henrikson e Meredith (1984). Utilizou-se uma coluna Pico-tag (Waters) como fase estacionária e o eluente um gradiente construído a partir da mistura de duas fases móveis A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água mili-Q e acetonitrila. A fase B é composta de água e acetonitrila. Foram utilizadas as seguintes condições de operação: temperatura de 38°C, tempo de retenção 45 minutos e gradiente de vazão pré-determinado. Os picos são detectados no comprimento de onda 254 nm.

As amostras passaram por etapas de secagem, rehidratação, derivatização com fenilisotiocianato (PITC), até sua diluição em tampão antes de sua injeção no cromatógrafo, de acordo como o método proposto pela Waters. Para quantificação das amostras, foi feita uma curva de calibração para cada aminoácido, a partir de uma solução padrão do componente analisado, ou a partir de uma solução padrão da Waters.

#### **3.4.5. Determinação da concentração celular**

A concentração celular foi obtida determinando-se a massa seca. Depois de coletadas as amostras e centrifugadas, as células compactadas foram lavadas em água destilada e centrifugadas novamente a 4°C, 15000 g, por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as células transferidas para recipientes previamente pesados e colocados em estufa à 60°C por 24 h. Depois de secas, a massa seca foi determinada pesando-se os recipientes e descontando-se o valor do peso deles vazios.

### **3.5. Modelagem matemática**

A partir de informações encontradas na literatura, foram feitas as hipóteses para construção do modelo. Todas as fontes de carbono, nitrogênio e energia foram incluídas, já que afetam as dinâmicas de crescimento e produção. Vasconcelos (2008) verificou que *Streptomyces clavuligerus* não foi capaz de crescer em meio mínimo adicionado de ácido glutâmico e prolina, mas cresceu quando este meio foi adicionado de asparagina. Desta forma, no modelo o ácido glutâmico e a prolina foram consideradas apenas fontes de nitrogênio e a asparagina foi considerada um substrato completo – fonte de carbono, energia e nitrogênio. O crescimento celular foi descrito de acordo com o modelo de Monod, considerando as fontes de carbono e energia e as fontes de nitrogênio como

limitantes. Como o consumo dos aminoácidos foi muito rápido e o crescimento depende também das fontes de nitrogênio, foi considerado o transporte desses aminoácidos para o interior celular, via mecanismo enzimático, e o crescimento em função da concentração intracelular dos mesmos. Considerou-se que as fontes de nitrogênio no interior celular acabam quando o crescimento cessa. A formação dos produtos foi considerada associada e não-associada ao crescimento, dependendo do meio de cultivo. A morte celular e a degradação do produto também foram incluídas. Deve-se mencionar que as concentrações internas das substâncias estão expressas em termos de volume total do meio reacional. Isto é, as fontes de nitrogênio que estão no interior das células afetam as velocidades de reação em que estão envolvidas, proporcionalmente às suas concentrações em relação ao volume total. Este aparente paradoxo surge ao considerar-se o sistema, composto por meio solúvel e células em suspensão, como homogêneo - tal como expresso ao descrever-se o sistema como não estruturado e não segregado.

A seguir estão descritos os símbolos adotados no modelo (Tabela 3.5), as equações pseudo-estequiométricas e as equações de balanço.

**Tabela 3.5** - Símbolos utilizados nas equações estequiométricas e expressões cinéticas e matemáticas do modelo proposto

---

C: concentração

S<sub>1</sub>: Glicerol

S<sub>2</sub>: Maltose

S<sub>3</sub>: Ácido glutâmico

S<sub>3</sub>' : Ácido glutâmico intracelular

S<sub>4</sub>: Prolina

S<sub>4</sub>' : Prolina intracelular

S<sub>5</sub>: Asparagina

S<sub>5</sub>' : Asparagina intracelular

P<sub>1</sub>: Ácido clavulânico

P<sub>2</sub>: Cefamicina C

a<sub>i</sub>, b<sub>i</sub>, c<sub>i</sub>, d<sub>i</sub> e e<sub>i</sub>, com i=(1,13), são os coeficientes estequiométricos das equações

X e M: células vivas e mortas, respectivamente

Em<sub>1</sub> e Em<sub>2</sub>: energia de manutenção celular obtida a partir do consumo de glicerol e maltose, respectivamente

kd1 e kd2: constantes de morte celular na presença de ácido glutâmico ou na sua ausência, respectivamente.

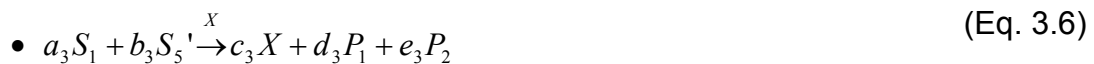
$D_1$  e  $D_2$  : produtos de degradação do ácido clavulânico e cefamicina C, respectivamente.

kdp1 e kdp2: constantes de degradação do ácido clavulânico e cefamicina C, respectivamente

Equações pseudo-estequiométricas representando a assimilação dos aminoácidos no meio de cultura para o interior celular:



Equações pseudo-estequiométricas representando o crescimento celular e a formação de produtos associados ao crescimento, a partir das fontes de carbono e energia - maltose e glicerol - e de nitrogênio – aminoácidos :



A equação 3.9 representa o crescimento apenas em asparagina, quando este aminoácido era utilizado como fonte de carbono e energia, além de ser fonte de nitrogênio. Neste caso, não foi considerada a produção de ácido clavulânico e cefamicina C associadas ao crescimento. Assumiu-se esta hipótese porque já foi demonstrado na literatura que não há produção de ácido clavulânico sob limitação de fonte de carbono (KIRK et al. 2000), e considerou-se que a produção de cefamicina C assumiria o mesmo comportamento.



Equações pseudo-estequiométricas para a formação de produtos não associados ao crescimento, a partir de uma fonte de carbono e energia e de uma fonte de nitrogênio:



Equações representando a utilização das fontes de carbono e energia – glicerol e maltose – para a produção de energia para manutenção celular:



Equações pseudo-estequiométricas para a morte celular e degradação dos produtos:



Para cada equação de crescimento celular (Eq. 3.4 Eq. 3.9) foi considerada uma equação cinética de velocidade específica de crescimento  $\mu_j$ , que são apresentadas a seguir.

$$\bullet \mu_1 = \mu_{\text{máx1}} \frac{C_{S_1}}{k_{S_1} + C_{S_1}} * \frac{C_{S_3'}}{k_{S_3} + C_{S_3'}}, \text{ associada à Eq. 3.4} \quad (\text{C3.1})$$

$$\bullet \mu_2 = \mu_{\text{máx2}} \frac{C_{S_1}}{k_{S_1} + C_{S_1}} * \frac{C_{S_4'}}{k_{S_4} + C_{S_4'}}, \text{ associada à Eq. 3.5} \quad (\text{C3.2})$$

$$\bullet \mu_3 = \mu_{\text{máx3}} \frac{C_{S_1}}{k_{S_1} + C_{S_1}} * \frac{C_{S_5'}}{k_{S_5} + C_{S_5'}}, \text{ associada à Eq. 3.6} \quad (\text{C3.3})$$

$$\bullet \mu_4 = \mu_{\text{máx4}} \frac{C_{S_2}}{k_{S_2} + C_{S_2}} * \frac{C_{S_3'}}{k_{S_3'} + C_{S_3'}}, \text{ associada à Eq. 3.7} \quad (\text{C3.4})$$

$$\bullet \mu_5 = \mu_{\text{máx5}} \frac{C_{S_2}}{k_{S_2} + C_{S_2}} * \frac{C_{S_5'}}{k_{S_5'} + C_{S_5'}}, \text{ associada à Eq. 3.8} \quad (\text{C3.5})$$

$$\bullet \mu_6 = \mu_{\text{máx6}} \frac{C_{S_5'}}{k_{S_5'} + C_{S_5'}}, \text{ associada à Eq. 3.9} \quad (\text{C3.6})$$

Por meio do balanço de massa para o processo em batelada, foram obtidas as equações matemáticas que descrevem o modelo, listadas a seguir.

Equação para descrição do crescimento celular, considerando a combinação das diferentes fontes de carbono e energia e de nitrogênio utilizadas no trabalho:

$$\bullet \frac{dC_X}{dt} = (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6 - kd1 - kd2) * C_X \quad (\text{Eq. 3.20})$$

Equações para descrição do consumo de substratos:

$$\bullet \frac{dC_{S_1}}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{13}} * \mu_1 + \frac{1}{Y_{14}} * \mu_2 + \frac{1}{Y_{15}} * \mu_3 + m_1\right) * C_X \quad (\text{Eq. 3.21})$$

$$\bullet \frac{dC_{S_2}}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{23}} * \mu_4 + \frac{1}{Y_{25}} * \mu_5 + m_2\right) * C_X \quad (\text{Eq. 3.22})$$

$$\bullet \frac{dC_{S_3}}{dt} = -v_3 \frac{C_{S_3}}{km_3 + C_{S_3}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.23})$$

$$\bullet \frac{dC_{S_4}}{dt} = -v_4 \frac{C_{S_4}}{km_4 + C_{S_4}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.24})$$

$$\bullet \frac{dC_{S_5}}{dt} = -v_5 \frac{C_{S_5}}{km_5 + C_{S_5}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.25})$$

$$\bullet \frac{dC_{S_3'}}{dt} = v_3 \frac{C_{S_3}}{km_3 + C_{S_3}} * C_X - \left(\frac{1}{Y_{31}} * \mu_1 + \frac{1}{Y_{32}} * \mu_4\right) * C_X \quad (\text{Eq. 3.26})$$

$$\bullet \frac{dC_{S_4'}}{dt} = v_4 \frac{C_{S_4}}{km_4 + C_{S_4}} * C_X - \left(\frac{1}{Y_{41}} * \mu_2\right) * C_X \quad (\text{Eq. 3.27})$$

$$\bullet \frac{dC_{S_5'}}{dt} = v_5 \frac{C_{S_5}}{km_5 + C_{S_5}} * C_X - \left(\frac{1}{Y_{51}} * \mu_3 + \frac{1}{Y_{52}} * \mu_5 + \frac{1}{Y_5} * \mu_6\right) * C_X \quad (\text{Eq. 3.28})$$

sendo que  $v_3$  e  $v_4$  são os coeficientes pseudo-estequiométricos do modelo.



Equações para descrição da formação de produtos, considerando a produção associada e não associada ao crescimento, e a degradação dos mesmos:

$$\bullet \frac{dC_{P_1}}{dt} = \alpha_{1i}(\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6) * C_X + \beta_{1i} * C_X - kdp1 * C_{P_1} \quad (\text{Eq. 3.29})$$

$$\bullet \frac{dC_{P_2}}{dt} = \alpha_{2i}(\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6) * C_X + \beta_{2i} * C_X - kdp2 * C_{P_2} \quad (\text{Eq. 3.30})$$

sendo  $i=(\text{GPG, GPG+glu, MA, MAA, MAG, GA})$ , ou seja, um valor de  $\alpha_{1i}$ ,  $\alpha_{2i}$ ,  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  para cada meio de cultura estudado.

### 3.6. Tratamento numérico dos dados experimentais e das equações do modelo proposto

Alguns parâmetros do modelo foram estimados a partir de dados experimentais, quando possível. Os demais foram determinados a partir do modelo proposto para o processo.

O balanço material para células no interior do reator operado em modo batelada resulta na equação 3.31, desconsiderando-se a morte celular. Esta equação relaciona a velocidade específica de crescimento,  $\mu$ , em função da concentração celular.

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu * C_X \quad (\text{Eq. 3.31})$$

Na fase de crescimento exponencial, a velocidade específica de crescimento celular é constante e atinge seu máximo valor ( $\mu_{\text{máx}}$ ), para aquelas condições de cultivo. Assim, a equação 3.31 pode ser integrada dos tempos  $t_0=0$  a  $t$ , sendo  $t$  o tempo final da fase exponencial, chegando-se a seguinte relação:

$$\ln\left(\frac{C_X}{C_{X0}}\right) = \mu_{\text{máx}} * t \quad (\text{Eq. 3.32})$$

Segundo a equação 3.32,  $\mu_{\text{máx}}$  é o coeficiente angular da reta do gráfico de  $\ln(C_X/C_{X0})$  em função do tempo, durante a fase exponencial de crescimento. O valor das velocidades específicas de crescimento  $\mu_{\text{máx}}$  foram obtidos após regressão linear dos gráficos de  $\ln(C_X/C_{X0})$  em função do tempo, durante a fase exponencial. Para diferenciar os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  experimentais dos valores ajustados

para o modelo, adotou-se a seguinte nomenclatura:  $\mu_{\text{máxi}}$  representam os valores ajustados e  $\mu_{\text{máxexp}}$  os valores calculados dos dados experimentais.

Para os meios de cultura considerados pelo modelo matemático proposto, foi considerada a situação hipotética em que  $C_{S_j} \gg k_{S_j}$  e  $C_{S_k} \gg k_{S_k}$ . Neste caso, as equações cinéticas de velocidade específica de crescimento propostas, C3.1 a C3.6, podem ser simplificadas, da forma da Eq. 3.33 para a Eq. 3.34:

$$\mu_i = \mu_{\text{máxi}} \frac{C_{S_j}}{k_{S_j} + C_{S_j}} * \frac{C_{S_k}}{k_{S_k} + C_{S_k}} \quad (\text{Eq. 3.33})$$

em que  $i=1,6$ ;  $j=1,2$ ;  $k=3,4,5$ .

Sendo  $C_{S_j} \gg k_{S_j}$  e  $C_{S_k} \gg k_{S_k}$ , então:

$$\mu_i = \mu_{\text{máxi}} \quad (\text{Eq. 3.34})$$

Ainda considerando a hipótese acima, o valor da velocidade específica de crescimento  $\mu$  para cada meio de cultura é dado pela Eq. 3.35:

$$\mu = \sum \mu_{\text{máxi}} \quad (\text{Eq. 3.35})$$

De acordo com a Eq. 3.35, para cada meio de cultura, foi calculado o valor de  $\mu$  em que o microrganismo estaria crescendo, caso a situação hipotética fosse real. Os  $\mu_{\text{máxi}}$ 's incluídos na Eq. 3.35 dependeram da composição de cada meio. Por exemplo, como  $\mu_{\text{máxi}1}$  representa o crescimento em glicerol e ácido glutâmico, para o meio MA, este valor não foi incluído.

### 3.7. Métodos computacionais

#### 3.7.1. Estimativa dos parâmetros cinéticos e constantes do modelo proposto

As equações diferenciais ordinárias do modelo matemático não estruturado proposto neste trabalho foram integradas empregando método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem em rotina computacional escrita em Fortran (PRESS et al., 1986).

Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir de ajuste visual entre a resposta do modelo (simulação) e os dados experimentais obtidos nos

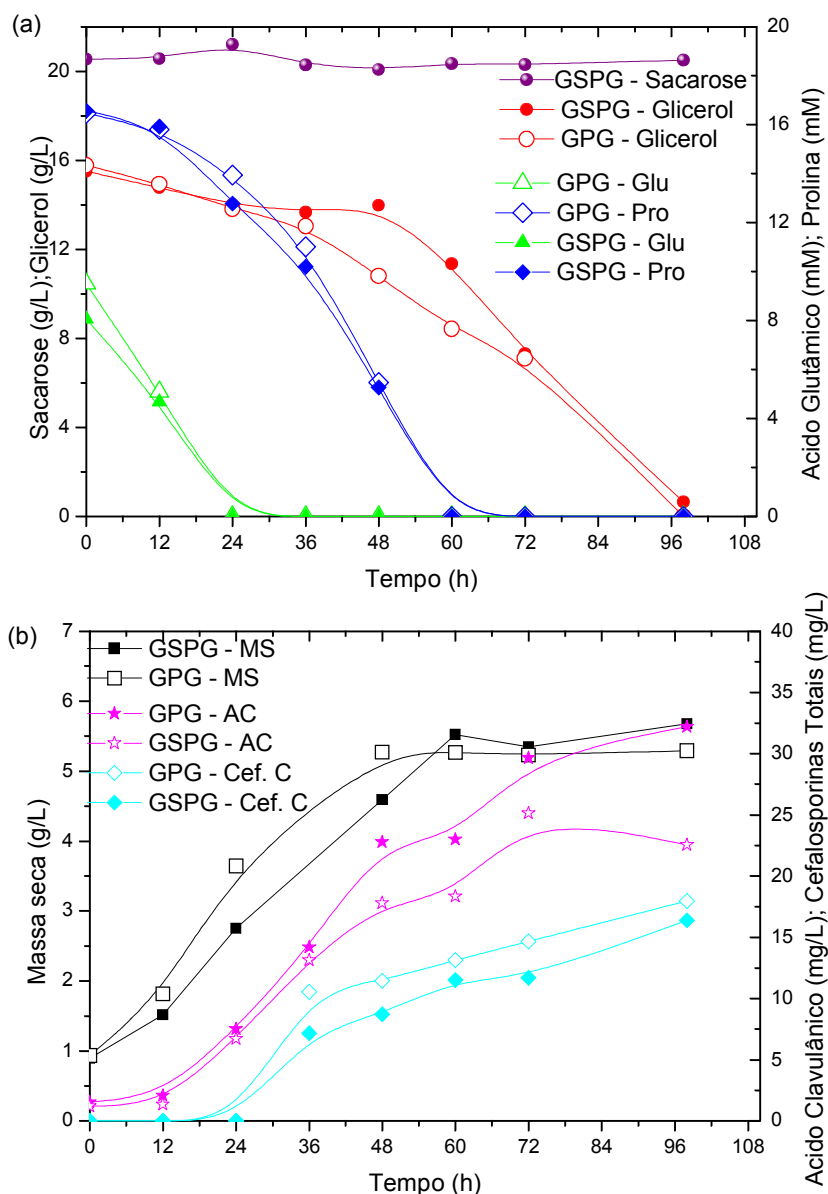
cultivos em mesa incubadora rotativa. Na fase de ajuste dos parâmetros, adotou-se como valores iniciais aqueles encontrados na literatura, quando disponíveis. A otimização numérica dos parâmetros não foi realizada devido à complexidade do modelo, que resultou em um grande número de parâmetros. A utilização de um método numérico para este fim não seria tão trivial, e poderia resultar em parâmetros ajustados sem sentido lógico, como valores negativos.

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação do efeito da sacarose em meio GSPG

Inicialmente procurou-se verificar a cinética de consumo dos nutrientes em dois meios sintéticos clássicos, muito citados na literatura. Optou-se pelo estudo em meios sintéticos pois a intenção era verificar exatamente qual nutriente estaria influenciando e talvez controlando as produções de ácido clavulânico e de cefamicina C; como esse nutriente agiria, se como inibidor, indutor ou repressor de formação do produto. Os resultados nos meios GSPG e GPG sugerem que todos os componentes do meio são utilizados, com exceção da sacarose que não é utilizada nem apresenta efeito específico no bioprocessamento, pelo menos em relação às variáveis estudadas. Os resultados apresentados na figura 4.1 mostram que a sacarose não foi consumida, e o crescimento, consumo de substratos e produção dos metabólitos ácido clavulânico e cefamicina C tiveram pequenas diferenças para os dois meios estudados. Pela figura 4.1(a) é possível verificar que nas primeiras horas de cultivo o glicerol é consumido lentamente, devido, provavelmente, à baixa concentração celular no início, passando para uma velocidade de consumo mais rápida em 36h no meio GPG e 48h no meio GSPG. Em ambos os meios, o glicerol se esgotou entre 72 e 98h de cultivo. A figura 4.1(b) mostra que o crescimento máximo foi semelhante, sendo que o meio GPG entrou na fase estacionária de crescimento 12h antes. Quanto à produção dos  $\beta$ -lactâmicos, o meio GPG apresentou uma produção ligeiramente maior.

Diferente dos resultados obtidos, um estudo realizado por Romero et al. (1984) mostrou um pequeno consumo da sacarose nos cultivos em meio GSPG, sem a adição de MOPS. Quando adicionada ao meio de cultura, os microrganismos geralmente promovem a hidrólise da sacarose, por meio da ação de enzimas extracelulares, liberando a glicose e a frutose, que são então assimiladas pelas células para utilização como fonte de carbono e energia. Ao contrário desses microrganismos, a bactéria *Streptomyces clavuligerus* não é capaz de assimilar glicose, e pelos resultados obtidos neste trabalho, ela também não se mostrou capaz de hidrolisar sacarose, nem de incorporá-la para o interior celular.

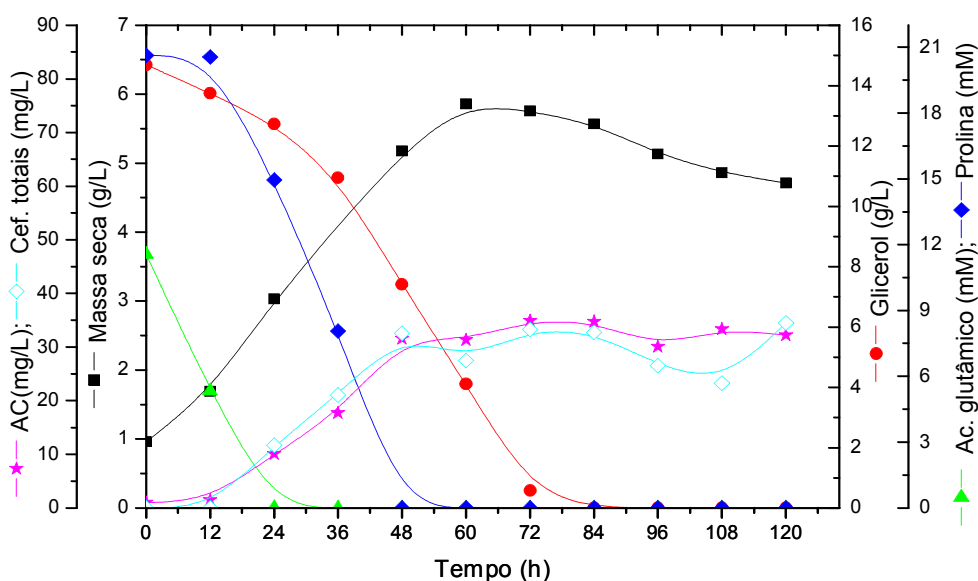


**Figura 4.1** - Perfis de consumo de substratos (sacarose, glicerol, ácido glutâmico (Glu), prolina (Pro)) (a), crescimento (massa seca - MS) e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. C), quantificada na forma de cefalosporinas totais (b) ao longo do cultivo em meio GPG (símbolos abertos) e GSPG (símbolos fechados).

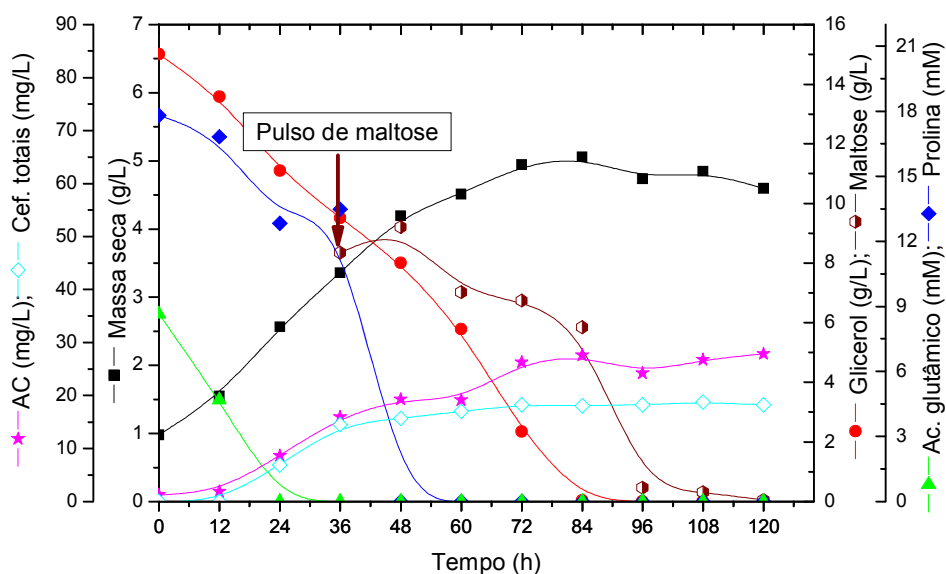
A partir desses resultados, optou-se pela utilização do meio GPG para os próximos ensaios, pois a sacarose do meio GSPG, muito utilizado em trabalhos na literatura, não é assimilada pelo microrganismo nem estimula ou promove produção de ácido clavulânico ou cefamicina C.

## 4.2. Avaliação do bioprocesso nos diferentes meios de cultura

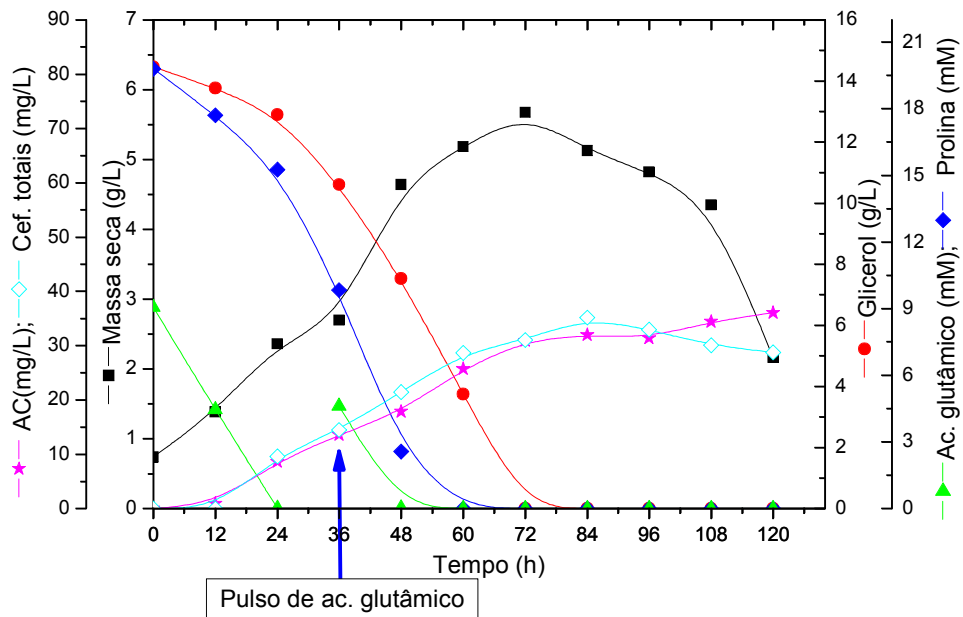
Nesta etapa do trabalho, diferentes meios à base de maltose, glicerol e aminoácidos foram utilizados para obtenção dos dados experimentais e elaboração do modelo matemático. As figuras 4.2 a 4.9 a seguir mostram os perfis de crescimento, consumo de substratos e produção nos cultivos realizados.



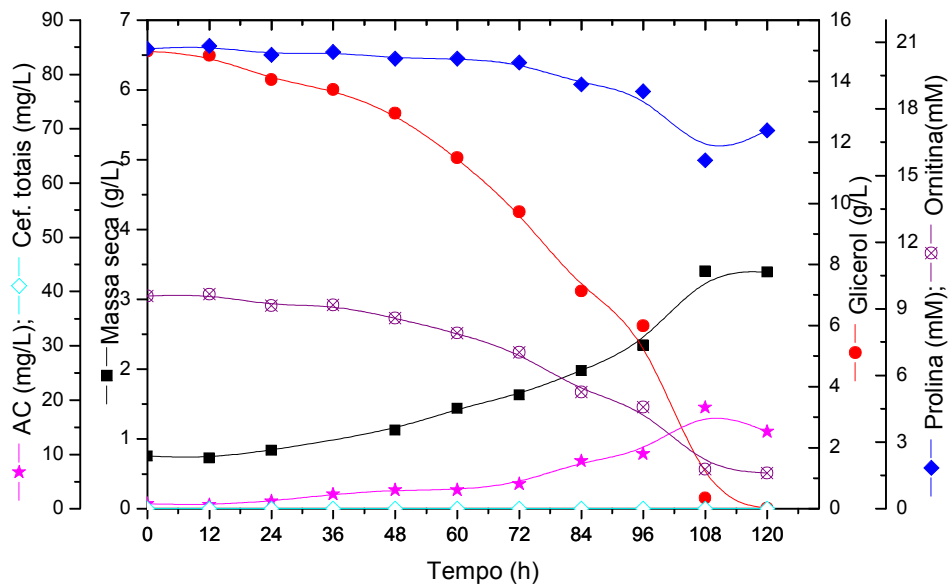
**Figura 4.2** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cefalosporinas totais) em meio GPG.



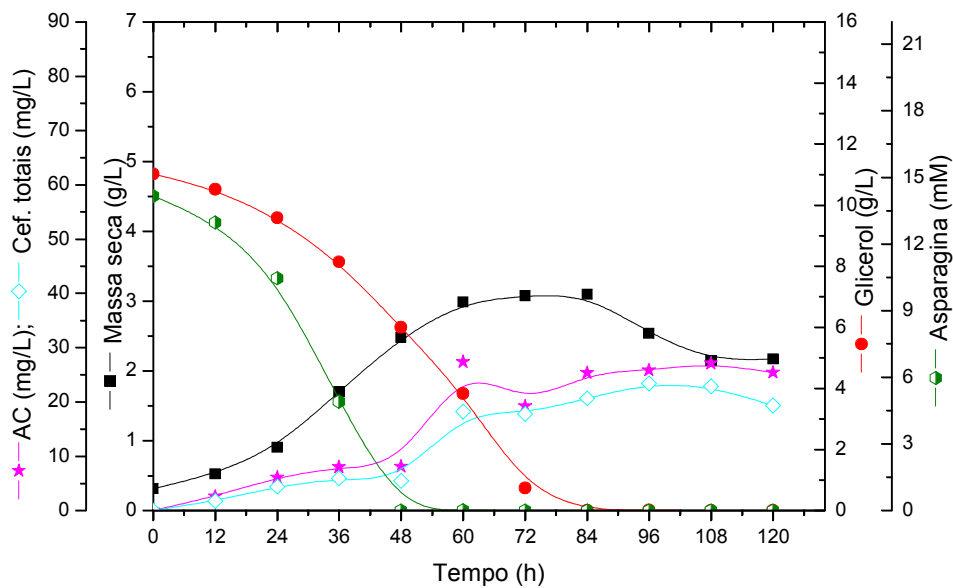
**Figura 4.3** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GPG com pulso de maltose (GPG + M).



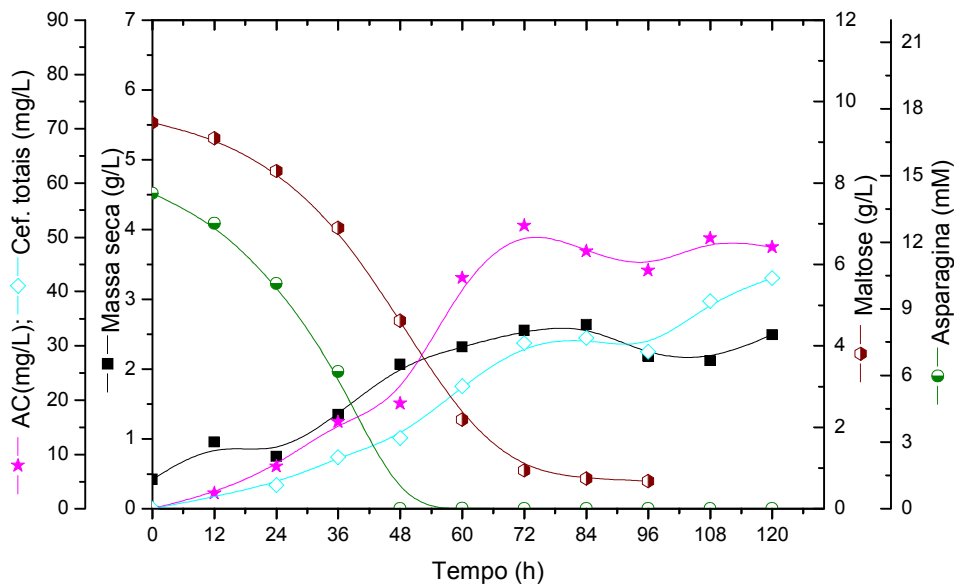
**Figura 4.4** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GPG com pulso de ácido glutâmico (GPG + glu).



**Figura 4.5** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GPO.

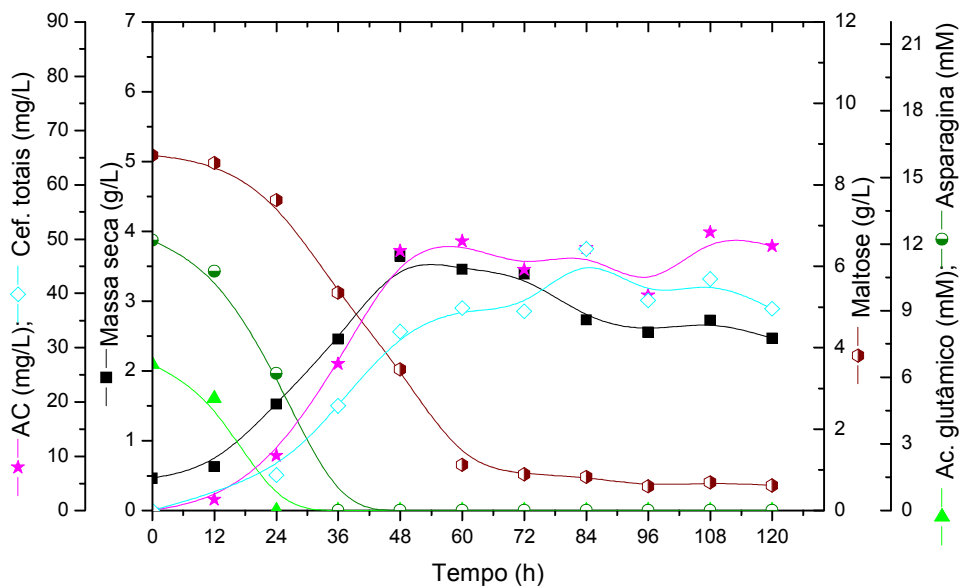


**Figura 4.6** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio GA.

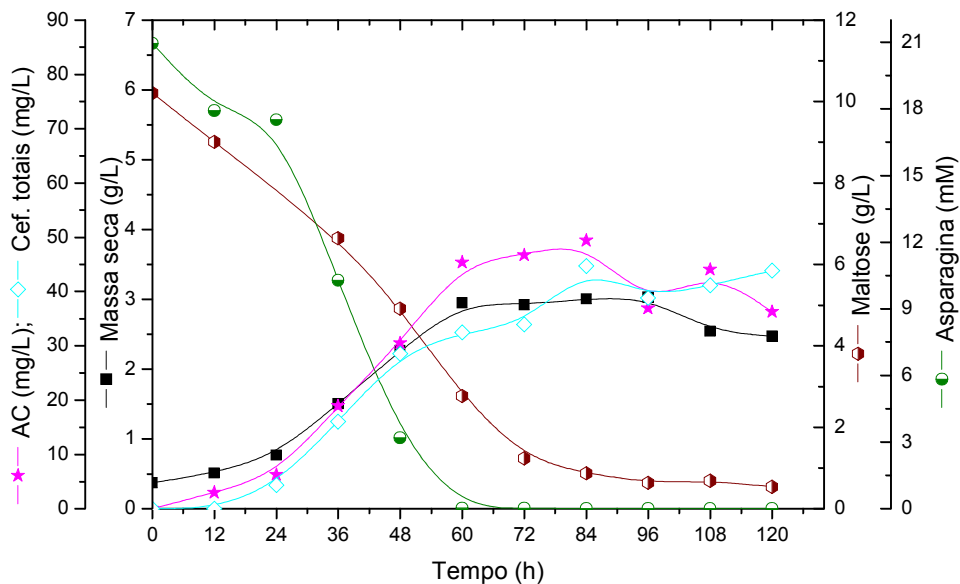


**Figura 4.7** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio MA.





**Figura 4.8** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio MAG.



**Figura 4.9** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico (AC) e cefamicina C (Cef. totais) em meio MAA.

**Tabela 4.1** – Dados de crescimento e produção máximos atingidos nos cultivos realizados e os respectivos tempos de cultivo em que esses valores foram atingidos.

Meio de cultura	Crescimento		Produção			
	Massa seca (g/L)	Tempo de cultivo (h)	Ácido clavulânico (mg/L)	Tempo de cultivo (h)	Cefamicina C (mg/L)	Tempo de cultivo (h)
GPG	5,9	60	34,9	72	33,3	72
GPG+M	4,9	72	27,6	84	18,2	72
GPG+glu	5,7	72	36,1	120	35,2	84
GPO	3,4	108	18,7	108	-	-
GA	3,0	60	27,4	60	22,6	96
MA	2,6	84	52,2	72	42,5	120
MAG	3,6	48	49,6	60	48,2	84
MAA	3,0	60	49,4	84	44,7	84

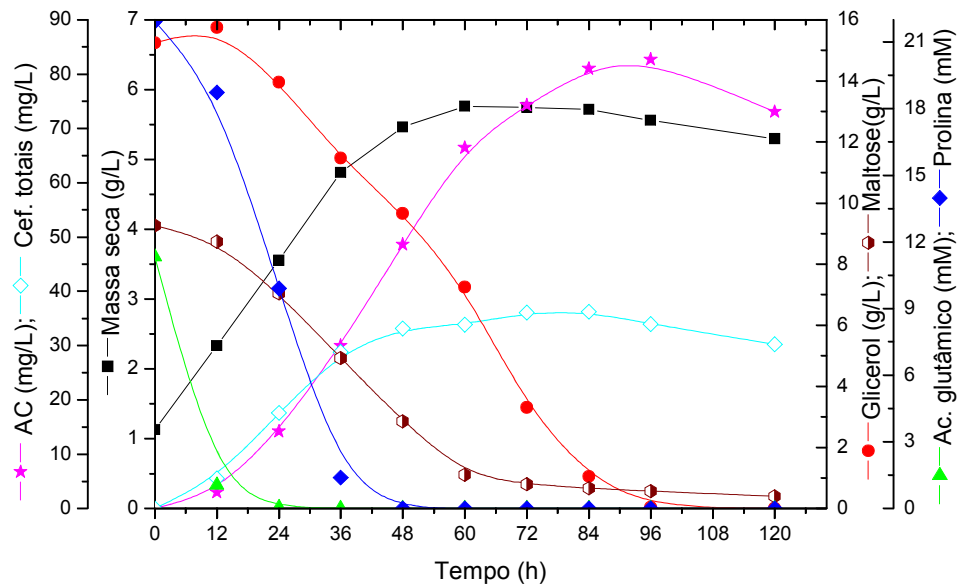
Os meios com maltose como principal fonte de energia (Figuras 4.7 a 4.9) propiciaram um crescimento celular menor que os meios com glicerol (Figura 4.2 a Figura 4.6), exceto o meio GPO, mas a produção de ácido clavulânico e cefamicina C foi maior (Tabela 4.1). Comparando os cultivos nos meios GA e MA (Figuras 4.6 e 4.7), o crescimento celular do primeiro foi maior, mas a produção foi menor. Esse comportamento talvez indique que o glicerol seja melhor para o crescimento, i.e., melhor fonte de energia do que a maltose, e desta forma inibindo o metabolismo secundário e reduzindo a produção de ácido clavulânico e cefamicina C. O glicerol é uma fonte de carbono mais simples que a maltose, que é um dissacarídeo, e fontes de carbono rapidamente assimiláveis geralmente favorecem o crescimento, reprimindo a síntese de metabólitos secundários (MARTIN E DEMAIN, 1980). Analisando os resultados dos cultivos com os meios MA e MAA (Figuras 4.7 e 4.9), o crescimento do meio MAA foi um pouco maior, mas a produção de metabólitos secundários foi parecida. O crescimento pode ter sido um pouco maior devido à maior disponibilidade de fonte de nitrogênio, já que este é um meio pobre neste nutriente. Comparando os cultivos nos meios MAA e MAG, observa-se que a substituição da asparagina pelo ácido glutâmico favoreceu o crescimento celular - o crescimento foi maior e mais rápido, e a morte celular começou mais cedo e foi mais

acentuada (Figuras 4.8 e 4.9). Apesar das diferenças no crescimento, as produções de ácido clavulânico e cefamicina C foram semelhantes. Isso significa que o ácido glutâmico exerceu um efeito maior sobre o crescimento celular que a asparagina, mas nenhum dos dois aminoácidos favoreceu a produção dos metabólitos secundários em estudo. Aharonowitz e Demain (1978), estudando a associação de glicerol e aminoácidos para composição do meio de cultura, estes últimos sendo a única fonte de nitrogênio disponível no meio, verificaram que a asparagina foi o aminoácido que proporcionou a maior produção de cefalosporinas, em 144h de cultivo. Mas comparando-se os resultados dos meios MA e MAA, observou-se que a asparagina adicional não favoreceu a produção de cefamicina C.

A adição de um pulso de ácido glutâmico ao meio GPG, no meio GPG+glu, (Figuras 4.2 e 4.4), causou um atraso no crescimento celular e na produção de ácido clavulânico e cefamicina C, mas o crescimento máximo e produção máxima atingidos foram semelhantes ao meio sem adição. Estes resultados sugerem que, neste caso, o ácido glutâmico não favoreceu o crescimento, como no meio MAG, nem exerceu efeito inibidor na produção dos metabólitos, como observado por Romero et al. (1984). Estes autores observaram que a adição de 20 e 40mM de ácido glutâmico em culturas de *Streptomyces clavuligerus* no sistema “resting cells” (células em repouso), em meio GSPG, exerceram um efeito inibitório na produção de cefamicina C e ácido clavulânico. Neste trabalho, a concentração de ácido glutâmico adicionada foi pequena (4,6 mM) e talvez não tenha sido suficiente para exercer algum efeito significativo no sistema.

Comparando os cultivos nos meios GPG e GPG com pulso de maltose (GPG + M) (Figuras 4.2 e 4.3), observou-se comportamentos diferentes. Após a adição, a velocidade de crescimento celular diminuiu, a velocidade de produção de cefamicina C foi diminuindo, até que a síntese parou em 72 h de cultivo, e a velocidade de produção de ácido clavulânico também diminuiu nas 24 h de cultivo após a adição da maltose, aumentando novamente entre 60 e 72 h, e a partir daí a produção praticamente estacionou. A maltose foi lentamente consumida nas 48 h após a sua adição, e se esgotou rapidamente nas 12 h seguintes. O início do seu rápido consumo coincidiu com a exaustão do glicerol. Possíveis explicações para o comportamento do consumo da maltose seriam que a célula não estaria adaptada ao seu consumo e estaria passando por uma fase de adaptação, ou então o glicerol seria o substrato preferencial, ou seja, crescendo em glicerol e maltose

*Streptomyces clavuligerus* apresentaria um crescimento diáuxico. Para verificar essas hipóteses, foi feito um outro cultivo, no meio GMPG, que continha glicerol e maltose na composição. A Figura 4.10 mostra os perfis de crescimento, produção de ácido clavulânico e cefamicina C, e consumo de substratos neste meio de cultura.



**Figura 4.10** – Perfis de crescimento, consumo de substratos e produção de ácido clavulânico e cefamicina C em meio GMPG.

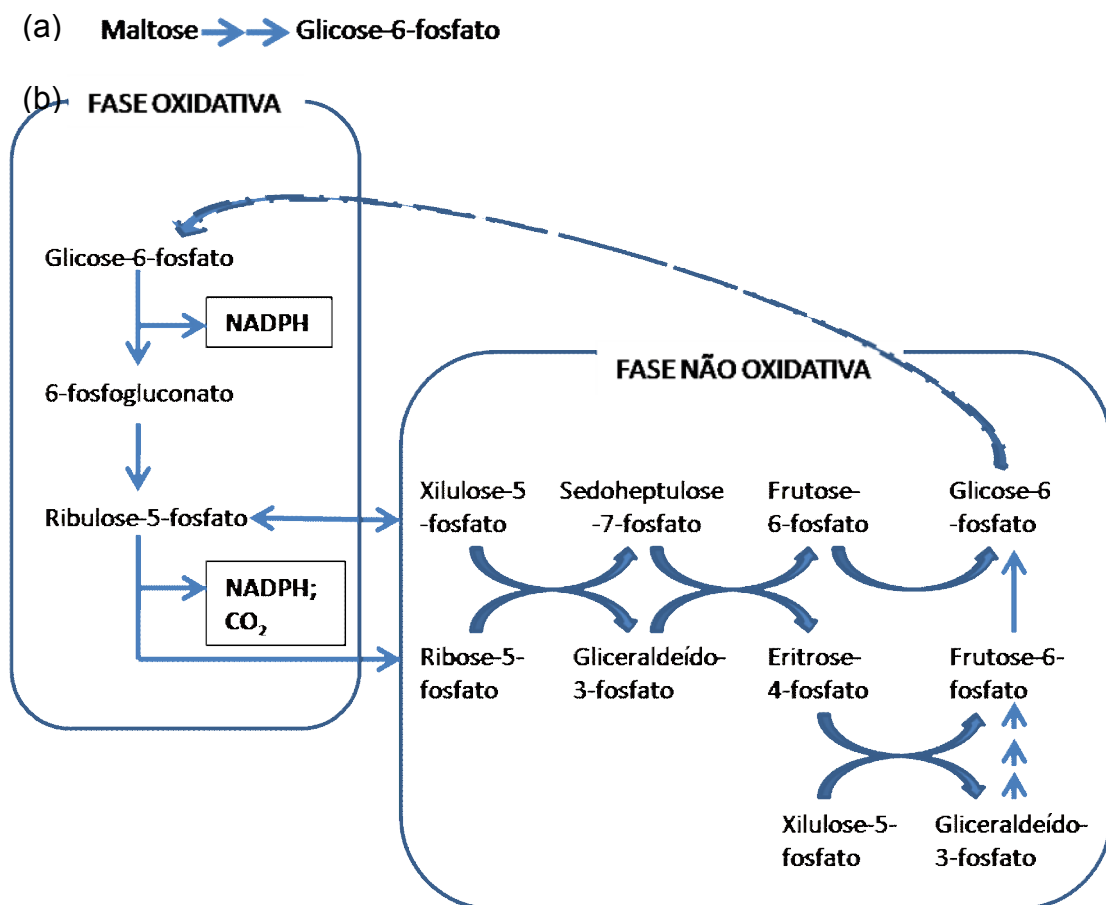
**Tabela 4.2** – Dados de crescimento e produção máximos atingidos no cultivo realizado com o meio GMPG e os respectivos tempos de cultivo em que esses valores foram atingidos.

Crescimento		Produção			
Massa seca (g/L)	Tempo de cultivo (h)	Ácido clavulânico (mg/L)	Tempo de cultivo (h)	Cefamicina C (mg/L)	Tempo de cultivo (h)
5,76	60	82,7	96	36,03	72

Como pode ser observado, o consumo de glicerol e maltose ocorreu simultaneamente. Logo, a hipótese de diauxia não se aplica neste caso. Assim, o que possivelmente ocorreu no cultivo com o meio GPG com pulso de maltose foi que as células não estavam adaptadas ao consumo deste carboidrato. Após a sua adição, as células começaram uma fase de adaptação, sintetizando as enzimas necessárias para a utilização da maltose. E como ocorre na fase lag de crescimento microbiano, a célula não cresce; ela apenas direciona seu metabolismo para a síntese das biomoléculas necessárias para a fase posterior, de crescimento

exponencial. E como o metabolismo está direcionado para a síntese de biomoléculas essenciais, o metabolismo secundário estaria pouco ativo.

O crescimento celular e produção de cefamicina C nos meios GPG e GMPG foram parecidos, contudo a produção de ácido clavulânico foi bem maior no meio GMPG (Tabelas 4.1 e 4.2). A presença da maltose parece ter estimulado a produção do ácido clavulânico. Uma possível explicação para o comportamento observado seria que a maltose teria ativado a via oxidativa do ciclo das pentoses, uma das rotas de metabolismo do carbono (Figura 4.11).



**Figura 4.11:** a) Maltose é convertida a dois resíduos de glicose-6-P. b) Glicose-6-P seguindo a via das pentoses ( LEHNINGHER et al., 2002)

A fase oxidativa do ciclo das pentoses tem como produto moléculas de NADPH, agente redutor muito importante nas reações anabólicas de biossíntese de componentes celulares, e também a ribose-5-fosfato, precursor da síntese de nucleotídeos, coenzimas, DNA, RNA, etc. Na fase não-oxidativa, as pentoses fosfato produzidas na fase oxidativa são recicladas a glicose-6-fosfato, gerando uma molécula de CO<sub>2</sub>.

O NADPH é também um cofator necessário para biossíntese do ácido clavulânico, mas não é necessário na biossíntese da cefamicina C (Tabela 4.3). Artigos que investigaram o fluxo metabólico da produção de ácido clavulânico por *S. clavuligerus* consideraram que a via oxidativa do ciclo das pentoses não estaria ativa quando apenas o glicerol era usado como fonte de carbono (KIRK et al., 2000; BUSHEL et al., 2006). Neste caso, haveria uma menor produção de NADPH, resultando, assim, numa menor disponibilidade deste cofator para a produção de ácido clavulânico. A adição de maltose ao meio pode ter ativado essa parte da rota catabólica, o que proporcionaria uma maior produção de NADPH. Como o crescimento foi semelhante nos meios GPG e GMPG, a quantidade de NADPH destinado para a biossíntese de componentes celulares foi a mesma, sendo o sobressalente possivelmente disponibilizado para a biossíntese de ácido clavulânico, tornando possível um aumento na produção deste composto.

**Tabela 4.3:** Cofatores e grupos funcionais necessários para a biossíntese do ácido clavulânico e cefamicina C

β-lactâmicos	Cofatores/ grupos funcionais						
	NADPH	NAD <sup>+</sup>	ATP	TDP <sup>(1)</sup>	α-cetoglutarato	Carbamoil	SAM <sup>(2)</sup>
Ác. clavulânico	1	0	1	1	3	0	0
Cefamicina C	0	1	3	0	4	1	1

<sup>(1)</sup>TDP - Tiamina bifosfato; <sup>(2)</sup> SAM – S-adenosilmetionina

Uma maior produção de antibióticos já foi relacionada a um fluxo maior através a via das pentoses, para antibióticos que também necessitam de NADPH como cofator na rota biossintética (BORODINA et al., 2005). Observou-se um aumento na produtividade com um concomitante aumento na atividade da via das pentoses na produção de avermectina por *Streptomyces avermitilis* (IKEDA et al., 1988) e metilenomicina por *Streptomyces coelicor* (OBANYE et al., 1996).

Em todos os meios adicionados de ácido glutâmico, este componente foi sempre o primeiro que se esgotou em 24 h de cultivo (Fig. 4.2 a fig.4.5 e fig. 4.8). Quando foi adicionado um pulso de ácido glutâmico ao meio GPG, em 36 h de cultivo, este se esgotou em 12h (Fig. 4.4). Resultados experimentais indicam que

*Streptomyces clavuligerus* não é capaz de utilizar este aminoácido como fonte de carbono e energia, apenas como fonte de nitrogênio, pois quando cultivada em meio mínimo adicionado de ácido glutâmico, não houve crescimento (VASCONCELOS, 2008). O glutamato é o carreador do grupo amino para a biossíntese de muitos outros aminoácidos. Através das reações de transaminação, o grupo amino do glutamato é transferido para uma molécula intermediária na biossíntese do outro aminoácido. Em muitos microrganismos, o ácido glutâmico está presente em concentrações bem maiores que os outros aminoácidos. Em *Escherichia coli*, por exemplo, ele é um dos solutos de maior concentração no citosol (LEHNINGER, 2002). Logo, este aminoácido é de extrema importância para a biossíntese, e talvez esta seja a razão para o seu rápido consumo.

A prolina, assim como o ácido glutâmico, pode ser considerada apenas uma fonte de nitrogênio, já que *Streptomyces clavuligerus* não foi capaz de crescer em meio mínimo adicionado de prolina (VASCONCELOS, 2008). O seu consumo foi mais lento que o do ácido glutâmico, geralmente acabando em 48 h de cultivo (Figuras 4.2 e 4.3). A adição de um pulso de ácido glutâmico ao meio GPG, em 36h de cultivo (Figura 4.4), provocou uma diminuição na velocidade de consumo da prolina, que se esgotou entre 48 e 60h de cultivo. A presença de mais uma fonte de nitrogênio no meio possa ter causado essa mudança no consumo.

No meio GPO (Figura 4.5), no qual o ácido glutâmico foi substituído pela ornitina, o crescimento e a produção de ácido clavulânico foi bem menor que nos outros meios utilizados, e não houve produção de cefamicina C. Observou-se que a prolina começou a ser consumida somente após 72 h de cultivo, e um consumo bem pequeno. Destes resultados, pode ser inferido que a ornitina não se apresentou como uma boa fonte de nitrogênio neste meio simples.

Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, outras pesquisas mostram que a adição de ornitina ao meio de cultura favorece a produção de ácido clavulânico. Em *S. clavuligerus*, a ornitina é convertida em arginina através de uma rota análoga ao ciclo da uréia presente em mamíferos (IVES e BUSHEL, 1997). Desta forma, a adição de ornitina estaria disponibilizando arginina para a biossíntese do ácido clavulânico. Romero et al. (1986), trabalhando com *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, obtiveram uma produção de ácido clavulânico maior em GSPO do que em meio GSPG e também constataram a inibição da biossíntese de cefamicina C no meio contendo ornitina. Chen et al. (2002), trabalhando com meio

complexo, obtiveram uma produção duas vezes maior de ácido clavulânico no meio com adição de ornitina quando comparado ao meio sem adição. Teodoro (2008), também trabalhando com meio complexo, verificou em experimentos em batelada e em batelada alimentada que a adição de ornitina ao meio de cultura provocou um aumento na produtividade volumétrica máxima de ácido clavulânico, mas não alterou a produção máxima deste composto. Uma possível explicação para os resultados desfavoráveis encontrados no presente trabalho é a escassez nutricional do meio GPO. Como observado na figura 4.5, a ornitina inibiu o consumo da prolina, sendo a única fonte de nitrogênio utilizada pela célula. O seu consumo lento, e o baixo e lento crescimento celular talvez signifique que a ornitina não seja facilmente metabolizável pela célula. A limitação por fonte de nitrogênio também provocou a baixa produção dos metabólitos secundários. Já os meios utilizados por Chen et al. (2002) e Teodoro (2008) eram meios complexos, ricos em outras fontes de nitrogênio. Assim, possivelmente a demanda de nitrogênio para crescimento celular era suprida por essas fontes mais complexas e a ornitina adicionada era direcionada para a produção de ácido clavulânico.

### 4.3. Ajuste do modelo aos dados experimentais

Para cada meio de cultura ajustado, as equações matemáticas do modelo foram simplificadas, conforme a presença ou ausência das fontes de carbono, energia e nitrogênio no meio, e à forma de produção, se associada ou não-associada ao crescimento. A seguir, estão listadas as equações utilizadas para ajuste do modelo aos dados experimentais nos meios GPG e GPG+glu. Os símbolos utilizados estão descritos na tabela 3.5, em materiais e métodos, ou na lista de símbolos no início da dissertação.

- Equações para simulação do crescimento celular

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_1 + \mu_2 - kd1) * C_X \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$\mu_1 = \mu_{\text{máx1}} \frac{C_{S_1}}{k_{S_1} + C_{S_1}} * \frac{C_{S_3'}}{k_{S_3'} + C_{S_3'}} \quad (\text{C3.1})$$



$$\mu_2 = \mu_{\max 2} \frac{C_{S_1}}{k_{S_1} + C_{S_1}} * \frac{C_{S_4'}}{k_{S_4} + C_{S_4'}} \quad (\text{C3.2})$$

• Equações para simulação do consumo de substratos – glicerol, prolina e ácido glutâmico – presentes no meio de cultura

$$\frac{dC_{S_1}}{dt} = - \left( \frac{1}{Y_{13}} * \mu_1 + \frac{1}{Y_{14}} * \mu_2 + m_1 \right) * C_X \quad (\text{Eq. 4.2})$$

$$\frac{dC_{S_3}}{dt} = -v_3 \frac{C_{S_3}}{km_3 + C_{S_3}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.23})$$

$$\frac{dC_{S_4}}{dt} = -v_4 \frac{C_{S_4}}{km_4 + C_{S_4}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.24})$$

• Equações para simulação da assimilação e consumo dos aminoácidos no interior celular

$$\frac{dC_{S_3'}}{dt} = v_3 \frac{C_{S_3}}{km_3 + C_{S_3}} * C_X - \left( \frac{1}{Y_{31}} * \mu_1 \right) * C_X \quad (\text{Eq. 4.3})$$

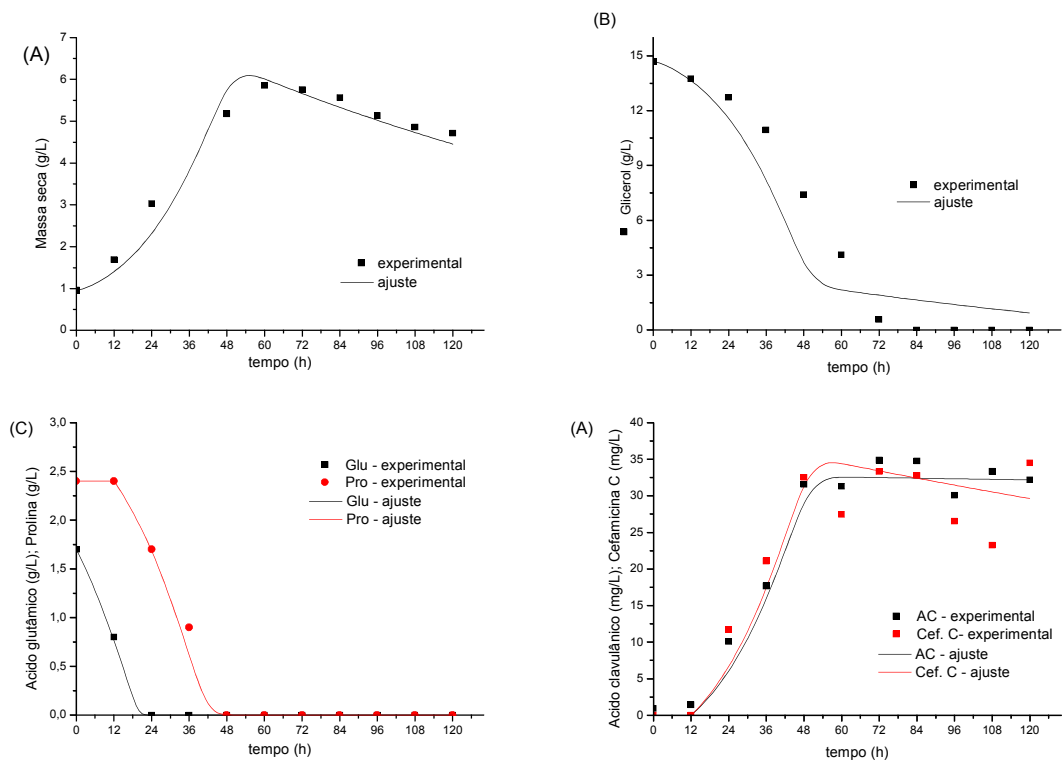
$$\frac{dC_{S_4'}}{dt} = v_4 \frac{C_{S_4}}{km_4 + C_{S_4}} * C_X - \left( \frac{1}{Y_{41}} * \mu_2 \right) * C_X \quad (\text{Eq. 3.27})$$

• Equações para simulação da produção de ácido clavulânico e cefamicina C. Nestes meios de cultura, observou-se que a produção dos metabólitos foi associada ao crescimento. Assim, as equações de produção foram simplificadas, retirando-se a parcela representando a produção não-associada.

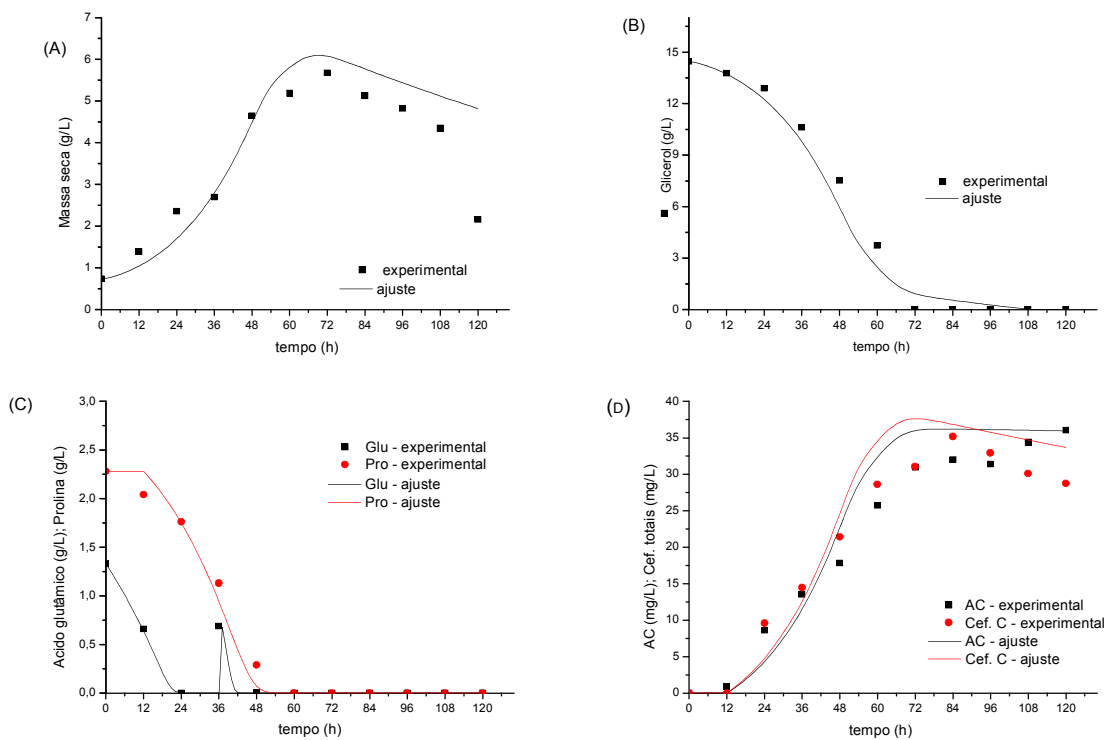
$$\frac{dC_{P_1}}{dt} = \alpha_{11} (\mu_1 + \mu_2) * C_X - kdp1 * C_{P_1} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

$$\frac{dC_{P_2}}{dt} = \alpha_{21} (\mu_1 + \mu_2) * C_X - kdp2 * C_{P_2} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

As figuras 4.12 e 4.13 mostram o ajuste do modelo aos dados experimentais para estes dois meios de cultura e as tabelas a seguir (Tabela 4.4 à Tabela 4.6) mostram os valores dos parâmetros ajustados.



**Figura 4.12** - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GPG. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de glicerol; (C) Consumo de ácido glutâmico e prolina; (D) Produção de AC e Cef. C.



**Figura 4.13** - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GPG+glu. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de glicerol; (C) Consumo de ácido glutâmico e prolina; (D) Produção de AC e Cef. C.

**Tabela 4.4** - Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para os meios GPG e GPG+glu

$\mu_{máx1}$ ( $h^{-1}$ )	0,035	$k_{s1}$ (g/L)	2,0
$\mu_{máx2}$ ( $h^{-1}$ )	0,028	$k_{s3}$ (g/L)	0,08
$kd1$ ( $h^{-1}$ )	0,005	$k_{s4}$ (g/L)	0,1

**Tabela 4.5** - Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para os meios GPG e GPG+glu

$Y_{13}$ (gX/gS)	0,5	$v_3$ ( $h^{-1}$ )	0,075
$Y_{14}$ (gX/gS)	0,55	$km_3$ (g/L)	0,1
$Y_{31}$ (gX/gS)	2,2	$v_4$ ( $h^{-1}$ )	0,038
$Y_{41}$ (gX/gS)	0,8	$km_4$ (g/L)	0,3
$m_1$ (gS/gX/h)	0,004		

**Tabela 4.6** - Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para os meios GPG e GPG+glu

$\alpha_{11}$ (mg/g)	0,0059	$kdp1$ ( $h^{-1}$ )	0,0002
$\alpha_{21}$ (mg/g)	0,0066	$kdp2$ ( $h^{-1}$ )	0,0025

Foram utilizados os mesmos parâmetros para os meios GPG e GPG+glu, sendo que neste último foi acrescentado o pulso de ácido glutâmico em 36h de cultivo. A simulação do modelo com o conjunto de parâmetros estimados mostrou como resultado um crescimento celular ligeiramente maior que o real, para o meio GPG+glu, e como a produção foi associada ao crescimento, os valores simulados da produção de ácido clavulânico e cefalosporinas totais também foi um pouco maior do que os valores experimentais. Porém, como pode ser visto pelas figuras 4.12 e 4.13, o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais.

As equações utilizadas para simulação dos meios MAA e MA estão listadas a seguir.

- Equações para simulação do crescimento celular

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_5 + \mu_6 - kd2) * C_X \quad (\text{Eq. 4.6})$$

$$\mu_5 = \mu_{máx5} \frac{C_{S_2}}{k_{S_2} + C_{S_2}} * \frac{C_{S_5'}}{k_{S_5'} + C_{S_5'}} \quad (\text{C3.5})$$

$$\mu_6 = \mu_{máx6} \frac{C_{S_5'}}{k_{S_5'} + C_{S_5'}} \quad (\text{C3.6})$$

- Equações para simulação do consumo de substratos – maltose e asparagina – presentes no meio de cultura

$$\frac{dC_{S_2}}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{25}} * \mu_5 + m_2\right) * C_X \quad (\text{Eq. 4.7})$$

$$\frac{dC_{S_3}}{dt} = -v_5 \frac{C_{S_3}}{km_5 + C_{S_3}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.25})$$

- Equações para simulação da assimilação e consumo da asparagina no interior celular

$$\frac{dC_{S_5'}}{dt} = v_5 \frac{C_{S_5}}{km_5 + C_{S_5}} * C_X - \left(\frac{1}{Y_{52}} * \mu_5 + \frac{1}{Y_5} * \mu_6\right) * C_X \quad (\text{Eq. 4.8})$$

- Equações para simulação da produção de ácido clavulânico e cefamicina C. Nestes meios de cultura, observou-se que a produção dos metabólitos foi parcialmente associada ao crescimento. Assim, as equações de produção utilizadas continham a parte associada e a não-associada ao crescimento.

$$\frac{dC_{P_1}}{dt} = \alpha_{12}(\mu_5 + \mu_6) * C_X + \beta_{12} * C_X - kdp1 * C_{P_1} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

$$\frac{dC_{P_2}}{dt} = \alpha_{22}(\mu_5 + \mu_6) * C_X + \beta_{22} * C_X - kdp2 * C_{P_2} \quad (\text{Eq. 4.10})$$

A estimação dos parâmetros e o ajuste aos dados experimentais foi feita para o meio MAA (Tabelas 4.7 a 4.9 e figura 4.14), e os valores ajustados foram utilizados para simulação do bioprocessamento para o meio MA.

**Tabela 4.7** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para os meios MAA e MA

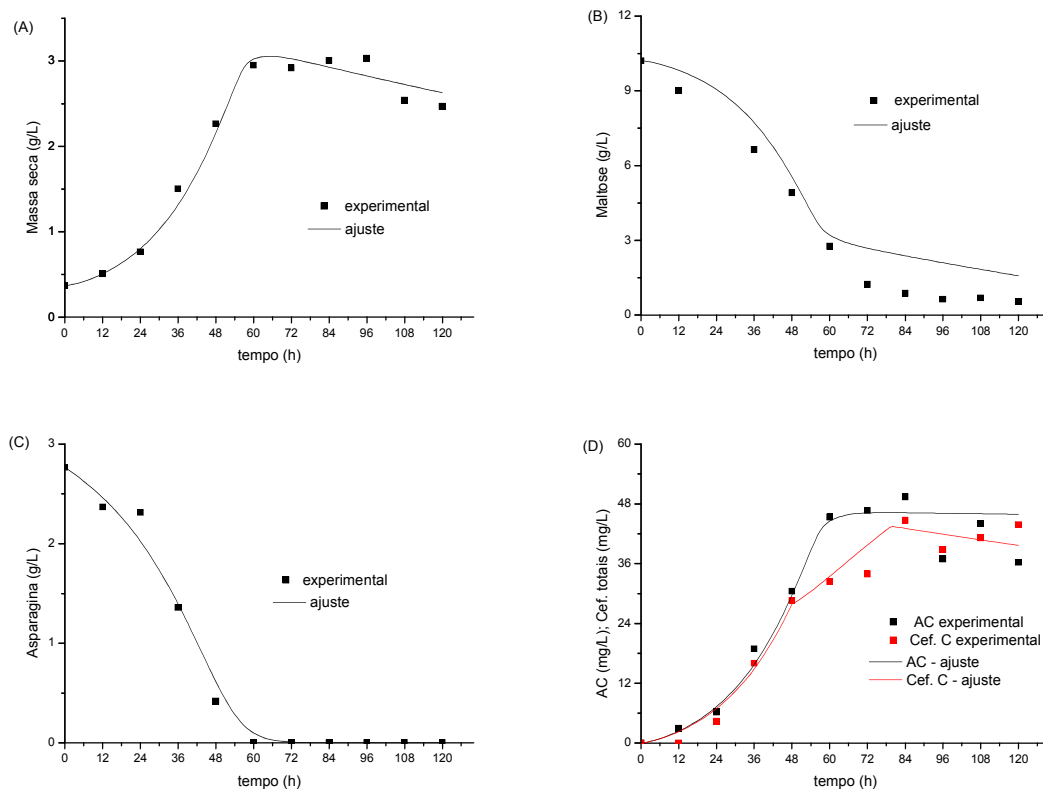
$\mu_{\text{máx}5}(\text{h}^{-1})$	0,039	$k_{S2}(\text{g/L})$	1,0
$\mu_{\text{máx}6}(\text{h}^{-1})$	0,017	$k_{S5}(\text{g/L})$	0,066
$kd2(\text{h}^{-1})$	0,003		

**Tabela 4.8** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para os meios MAA e MA

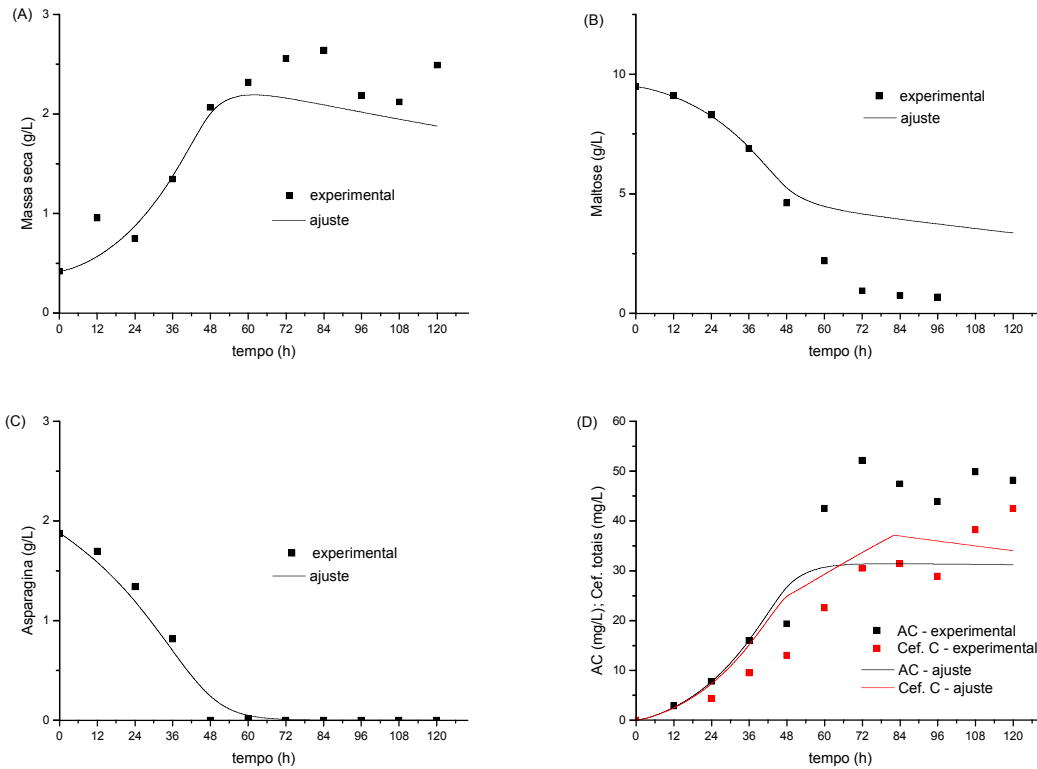
$Y_{25}(\text{gX/gS})$	0,3	$m_2(\text{gS/gX/h})$	0,008
$Y_{52}(\text{gX/gS})$	1,2	$v_5(\text{h}^{-1})$	0,09
$Y_5(\text{gX/gS})$	0,908	$km_5(\text{g/L})$	1,3

**Tabela 4.9** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para os meios MAA e MA

$\alpha_{12}$ (mg/g)	0,0155	kdp1 ( $\text{h}^{-1}$ )	0,0002
$\beta_{12}$ (mg/g/h)	0	kdp2 ( $\text{h}^{-1}$ )	0,0023
$\alpha_{22}$ (mg/g)	0,015		
$\beta_{22}$ (mg/g/h)	0,0002		

**Figura 4.14** - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio MAA. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina; (D) Produção de AC e Cef. C.

Apesar de diferirem apenas na concentração inicial de asparagina, o comportamento observado nos meios MA e MAA foi diferente. No meio MAA observou-se que a produção do ácido clavulânico foi totalmente associada ao crescimento, enquanto que a da cefamicina C foi parcialmente associada. Já para o meio MA, a produção de ambos foi associada e não-associada ao crescimento. O modelo também subestimou o crescimento celular no meio MA. Devido a essas diferenças, a simulação do meio MA não se ajustou muito bem aos dados experimentais (Figura 4.15).



**Figura 4.15** - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio MA. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina; (D) Produção de AC e Cef. C.

No meio MAA, em 60h de cultivo a asparagina se esgotou e não houve mais crescimento celular. Já no meio MA, a asparagina acabou em 48h de cultivo, e a partir deste momento observou-se uma mudança na velocidade de crescimento celular. Neste ponto, as células podem ter mudado o metabolismo de assimilação de substratos, crescimento e produção de metabólitos, o que não foi previsto no modelo. Medidas experimentais adicionais seriam necessárias para formulação de hipóteses sobre essa mudança no metabolismo, como por exemplo quantificação de amônia no meio.

Para o meio MAG, foram utilizadas as mesmas equações para o meio MAA acrescentadas de outros termos e outras equações, de forma a incluir o ácido glutâmico no modelo. As equações modificadas e as equações adicionadas são mostradas a seguir.

- Equações para simulação do crescimento celular

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_4 + \mu_5 + \mu_6 - kd2) * C_X \quad (\text{Eq. 4.11})$$

$$\mu_4 = \mu_{\text{máx4}} \frac{C_{S_2}}{k_{S_2} + C_{S_2}} * \frac{C_{S_3'}}{k_{S_3'} + C_{S_3'}} \quad (\text{C3.4})$$

As equações de  $\mu_5$  e  $\mu_6$  são as equações C3.5 e C3.6 mostradas anteriormente.

- Equações para simulação do consumo de substratos – maltose, asparagina e ácido glutâmico – presentes no meio de cultura

A equação de consumo da asparagina é a mesma equação do meio MAA (Eq. 3.25).

$$\frac{dC_{S_2}}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{23}} * \mu_4 + \frac{1}{Y_{25}} * \mu_5 + m_2\right) * C_X \quad (\text{Eq. 3.22})$$

$$\frac{dC_{S_3}}{dt} = -v_3 \frac{C_{S_3}}{km_3 + C_{S_3}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.23})$$

- Equações para simulação da assimilação e consumo do ácido glutâmico no interior celular. A equação equivalente para a asparagina é a mesma para o meio MAA (Eq. 4.8).

$$\frac{dC_{S_3'}}{dt} = v_3 \frac{C_{S_3}}{km_3 + C_{S_3}} * C_X - \left(\frac{1}{Y_{32}} * \mu_4\right) * C_X \quad (\text{Eq. 4.12})$$

- Equações para simulação da produção de ácido clavulânico e cefamicina C. Como no meio MAA, a produção de ácido clavulânico foi associada ao crescimento ( $\beta_{13}=0$ ), e a produção de cefalosporinas totais ocorreu das duas formas, associada e não-associada ao crescimento.

$$\frac{dC_{P_1}}{dt} = \alpha_{13}(\mu_4 + \mu_5 + \mu_6) * C_X + \beta_{13} * C_X - kdp1 * C_{P_1} \quad (\text{Eq. 4.13})$$

$$\frac{dC_{P_2}}{dt} = \alpha_{23}(\mu_4 + \mu_5 + \mu_6) * C_X + \beta_{23} * C_X - kdp2 * C_{P_2} \quad (\text{Eq. 4.14})$$

Na simulação, foram mantidos os mesmos valores para os parâmetros comuns aos meios MAA e MAG. As tabelas 4.10 a 4.12 mostram os valores dos parâmetros presentes apenas no meio MAG, e a figura 4.16 o ajuste do modelo aos dados experimentais.

**Tabela 4.10** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para o meio MAG

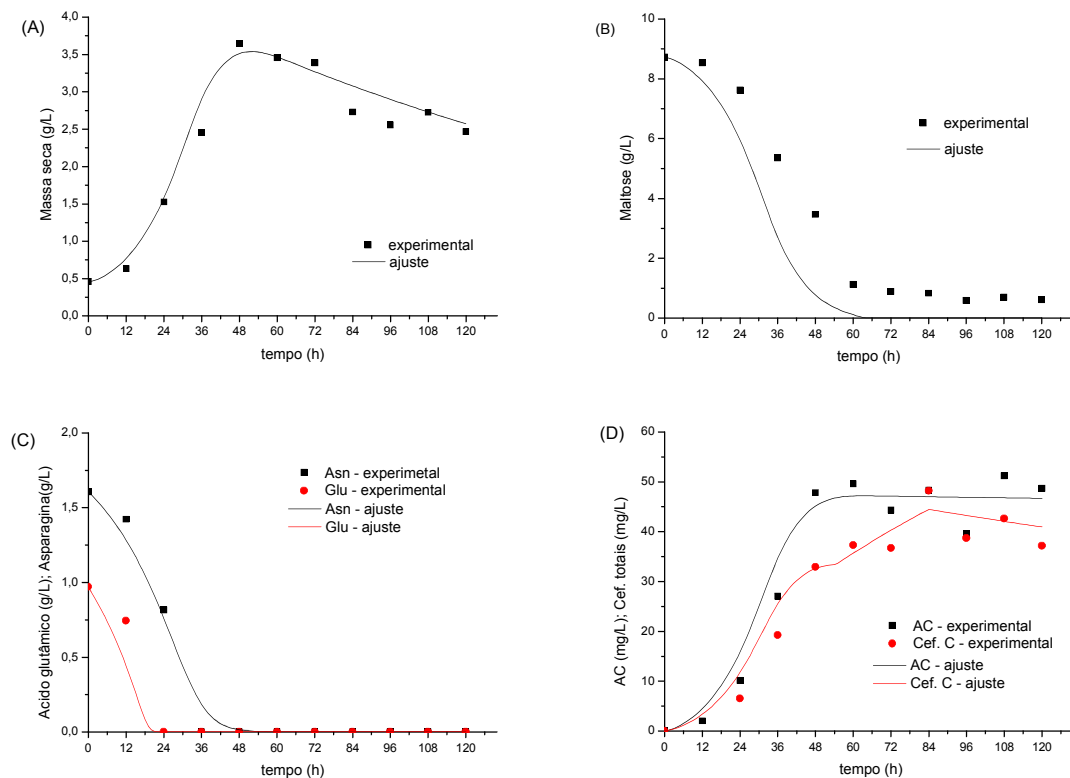
$\mu_{\text{máx4}}(\text{h}^{-1})$	0,035	$k_{S3}$ (g/L)	0,08
$kd1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,005		

**Tabela 4.11** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para o meio MAG

$Y_{23}$ (gX/gS)	0,5	$v_3$ (h <sup>-1</sup> )	0,085
$Y_{32}$ (gX/gS)	2,0	$km_3$ (g/L)	0,07

**Tabela 4.12** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para o meio MAG

$\alpha_{13}$ (mg/g)	0,013	$\beta_{23}$ (mg/g/h)	0,00014
$\alpha_{23}$ (mg/g)	0,0098		



**Figura 4.16** - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio MAG. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina e ácido glutâmico; (D) Produção de AC e Cef. C.

A figura 4.16 mostra que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

As equações do modelo do bioprocesso para o meio GA são mostradas a seguir.

- Equações para simulação do crescimento celular

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_3 + \mu_6 - kd_2) * C_X \quad (\text{Eq. 4.15})$$

$$\mu_3 = \mu_{m\acute{a}x3} \frac{C_{S_1}}{k_{S_1} + C_{S_1}} * \frac{C_{S_5'}}{k_{S_5'} + C_{S_5'}} \quad (\text{C3.5})$$



$$\mu_6 = \mu_{\max 6} \frac{C_{S_5'}}{k_{S_5} + C_{S_5'}} \quad (\text{C3.6})$$

- Equações para simulação do consumo de substratos – glicerol e asparagina – presentes no meio de cultura

$$\frac{dC_{S_1}}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{15}} * \mu_3 + m_1\right) * C_X \quad (\text{Eq. 4.16})$$

$$\frac{dC_{S_5}}{dt} = -v_5 \frac{C_{S_5}}{km_5 + C_{S_5}} * C_X \quad (\text{Eq. 3.25})$$

- Equações para simulação da assimilação e consumo da asparagina no interior celular

$$\frac{dC_{S_5'}}{dt} = v_5 \frac{C_{S_5}}{km_5 + C_{S_5}} * C_X - \left(\frac{1}{Y_{51}} * \mu_3 + \frac{1}{Y_5} * \mu_6\right) * C_X \quad (\text{Eq. 4.17})$$

- Equações para simulação da produção de ácido clavulânico e cefamicina C. Neste meio de cultura, foram propostos dois modelos de produção diferentes: um em que a produção era associada ao crescimento e outro em que a produção era parcialmente associada.

Equações para o modelo de produção associado ao crescimento:

$$\frac{dC_{P_1}}{dt} = \alpha_{13} (\mu_3 + \mu_6) * C_X - kdp1 * C_{P_1} \quad (\text{Eq. 4.18})$$

$$\frac{dC_{P_2}}{dt} = \alpha_{23} (\mu_3 + \mu_6) * C_X - kdp2 * C_{P_2} \quad (\text{Eq. 4.19})$$

Equações para o modelo de produção parcialmente associado ao crescimento:

$$\frac{dC_{P_1}}{dt} = \alpha_{13}' (\mu_3 + \mu_6) * C_X + \beta_{13} * C_X - kdp1 * C_{P_1} \quad (\text{Eq. 4.20})$$

$$\frac{dC_{P_2}}{dt} = \alpha_{23}' (\mu_3 + \mu_6) * C_X + \beta_{23} * C_X - kdp2 * C_{P_2} \quad (\text{Eq. 4.21})$$

Os valores dos parâmetros e o ajuste do modelo aos dados experimentais são mostrados nas tabelas 4.13 a 4.15 e nas figuras 4.17 e 4.18. Os valores de  $\mu_{\max 6}$ ,  $k_{S_1}$ ,  $k_{S_5}$ ,  $kd2$ ,  $v_5$ ,  $km_5$ ,  $Y_5$ ,  $kdp1$  e  $kdp2$  são os mesmos valores ajustados para os outros meios.

**Tabela 4.13** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o crescimento celular para o meio GA

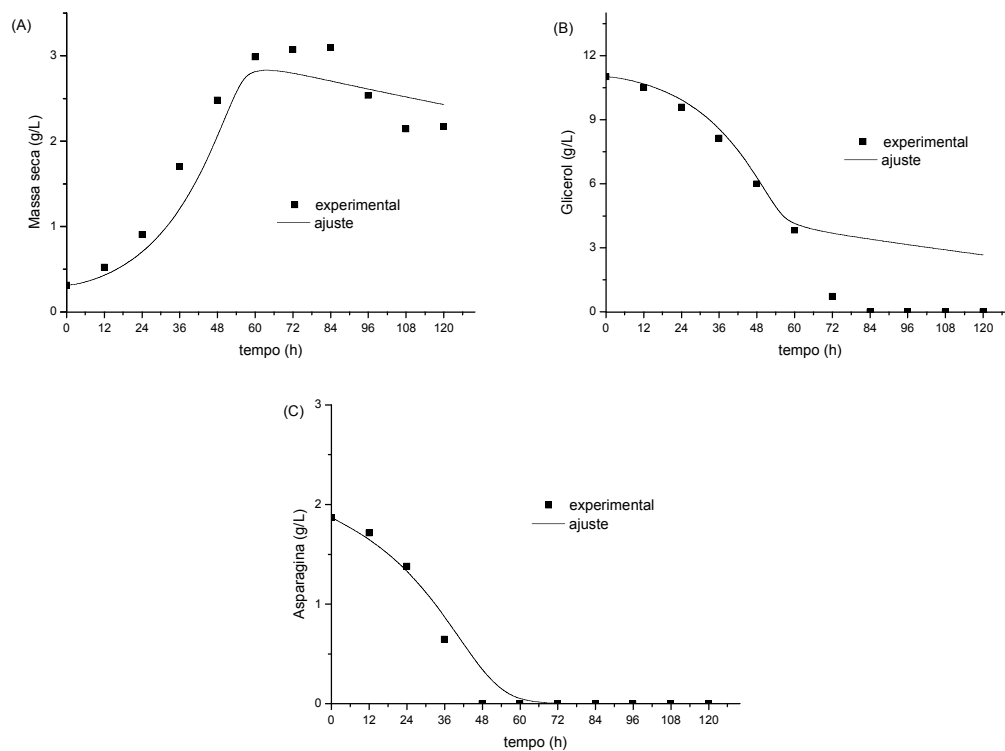
$\mu_{\text{máx3}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,05	$k_{\text{S1}}$ (g/L)	2,0
$\mu_{\text{máx6}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,017	$k_{\text{S3}}$ (g/L)	0,066
		$k_{\text{d1}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,003

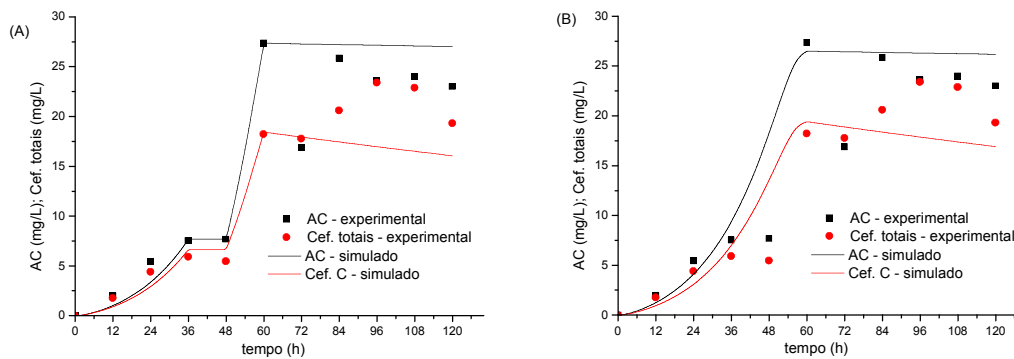
**Tabela 4.14** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo o consumo de substratos para o meio GA

$Y_{15}$ (gX/gS)	0,3	$v_5$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,09
$Y_{51}$ (gX/gS)	2,1	$k_{\text{m5}}$ (g/L)	1,3
$Y_5$ (gX/gS)	0,908	$m_2$ (gS/gX/h)	0,008

**Tabela 4.15** – Parâmetros estimados das equações do modelo descrevendo a formação dos produtos para o meio GA

$\alpha_{13}$ (mg/g)	0,0098	$\beta_{13}$ (mg/g/h)	0,00065
$\alpha_{23}$ (mg/g)	0,0075	$\beta_{23}$ (mg/g/h)	0,0004
$\alpha_{13}'$ (mg/g)	0,008	$k_{\text{dp1}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,0002
$\alpha_{23}'$ (mg/g)	0,0071	$k_{\text{dp2}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,0023

**Figura 4.17** - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GA. (A) Crescimento celular; (B) Consumo de maltose; (C) Consumo de asparagina.



**Figura 4.18** - Ajuste do modelo aos dados experimentais do cultivo em meio GA. (A) Modelo de produção misto: associado e não associado ao crescimento (B) Modelo de produção associado ao crescimento.

A figura 4.17 mostra que houve um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo simulado. O crescimento celular previsto pelo modelo ficou um pouco abaixo do valor real, e o consumo de substrato nas horas finais também desviou-se do experimental. Os dados experimentais mostram que em 72 h de cultivo, as células iniciaram a fase estacionária de crescimento, e de 72 a 84 h, a velocidade de consumo de glicerol continuou a mesma, até que este se esgotou, provavelmente antes de completar 84 h. Como o glicerol consumido não foi utilizado para crescimento, e não houve aumento significativo na produção de ácido clavulânico e cefamicina C, possivelmente a energia necessária para a manutenção celular aumentou. Essa mudança no metabolismo não está prevista no modelo, que considera a mesma manutenção durante todo o bioprocessamento. Por isso o desvio dos dados experimentais dos valores simulados após as 72 h de cultivo.

A figura 4.18 mostra o ajuste do modelo aos dados experimentais nos dois modelos de produção propostos. Observou-se que a produção estagnou entre 36 e 48 h de cultivo. Considerando os resultados no tempo de 48 h um erro experimental, o modelo de produção associado ao crescimento ajustou-se bem aos dados experimentais. Mas esta estagnação pode também significar uma mudança no metabolismo celular, em que as células passam de uma forma de produção para outra. O modelo de produção misto prevê este comportamento – a célula passa da forma de produção associada para não associada ao crescimento. O ajuste a esse segundo modelo ficou um pouco grosseiro, sendo necessário alguns refinamentos para um ajuste melhor.

Na tabela 4.16 são apresentados os valores de  $\mu_i$ 's calculados a partir das equações C3.1 a C3.6 do modelo proposto, considerando os valores dos parâmetros ajustados e a concentração dos substratos no tempo inicial do bioprocessamento. A soma dos  $\mu_i$ 's representa o valor global de  $\mu$  segundo o qual a bactéria estaria crescendo no tempo inicial, de acordo com o modelo proposto.

**Tabela 4.16** – Valores calculados de  $\mu_i$  utilizando as equações do modelo

Meios de cultura	$\mu_i$ 's ( $h^{-1}$ ) calculados a partir das equações do modelo (tempo 0h)			Soma dos $\mu_i$ 's ( $h^{-1}$ )
	$\mu_1$	$\mu_2$	$\mu_4$	
GPG	0,029	0,024		0,053
GPG+glu	0,030	0,024		0,053
MA	$\mu_5$ 0,034	$\mu_6$ 0,016		0,051
MAA	0,035	0,017		0,051
MAG	0,033	0,016	0,029	0,078

Os valores de  $\mu_{máxexp}$ , apresentados na tabela 4.17, foram obtidos a partir de dados experimentais, utilizando-se a equação 3.32.

Comparando os valores da velocidade específica de crescimento  $\mu_{máxexp}$  (Tabela 4.17) e a soma dos valores de  $\mu_i$  calculados a partir das equações do modelo (Tabela 4.16), verificou-se que este último é sempre maior que o primeiro, para todos os meios de cultura. Ou seja, o modelo estaria superestimando este valor. Isto ocorreu porque, quando se adotou os valores calculados de  $\mu_{máxexp}$  para estimativa dos  $\mu_{máxi}$  e dos outros parâmetros, na etapa inicial de ajuste, o crescimento previsto pelo modelo, após integração das equações, foi bem menor que o observado. Por isso, na etapa seguinte, aumentaram-se os valores de  $\mu_{máxi}$  até que a resposta do modelo apresentasse um bom ajuste aos valores experimentais. O que poderia estar levando a essa diferença é a morte celular, considerada desde o início do bioprocessamento. No modelo em batelada proposto por Baptista-Neto (2000), a morte celular só foi levada em consideração abaixo de uma determinada concentração de glicerol, obtendo-se um valor para a constante de morte  $k_d = 0,030$  ( $h^{-1}$ ), maior que os valores obtidos no presente trabalho, de  $k_{d1} = 0,003$  ( $h^{-1}$ ) e  $k_{d2} = 0,005$  ( $h^{-1}$ ). Apesar da diferença nos valores de  $\mu_{máx}$ 's

calculados e ajustados, é importante ressaltar que todos estão na mesma ordem de grandeza, ou seja, os valores ajustados estão coerentes.

**Tabela 4.17** - Comparação dos valores experimentais de  $\mu_{\text{máxexp}}$  e os valores ajustados de  $\mu_{\text{máxi}}$

Valores experimentais		Valores ajustados de $\mu_{\text{máxi}}$ 's				
Meios de cultura	$\mu_{\text{máxexp}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Meios de cultura	$\mu_{\text{máxi}}$ 's ( $\text{h}^{-1}$ )		Soma dos $\mu_{\text{máxi}}$ 's( $\text{h}^{-1}$ ) *	
GPG	0,0348	GPG	$\mu_{\text{máx1}}$ 0,035	$\mu_{\text{máx2}}$ 0,028	0,063	
GPG+glu	0,0363	GPG+glu	$\mu_{\text{máx1}}$ 0,035	$\mu_{\text{máx2}}$ 0,028	0,063	
MAA	0,0383	MAA	$\mu_{\text{máx5}}$ 0,039	$\mu_{\text{máx6}}$ 0,017	0,056	
MAG	0,0479	MAG	$\mu_{\text{máx5}}$ 0,039	$\mu_{\text{máx4}}$ 0,035	$\mu_{\text{máx6}}$ 0,017	0,091
MA	0,0335	MA	$\mu_{\text{máx5}}$ 0,039	$\mu_{\text{máx6}}$ 0,017	0,056	
GA	0,0441	GA	$\mu_{\text{máx3}}$ 0,05	$\mu_{\text{máx6}}$ 0,017	0,067	

\*Esta soma foi feita considerando a Eq. 3.35, considerando a hipótese de que a concentração do substrato  $C_{\text{si}} \gg K_{\text{si}}$ .

Segundo o modelo proposto, a velocidade específica de crescimento máxima em que os microrganismos poderiam estar crescendo em cada meio de cultura, representada pela soma dos  $\mu_{\text{máxi}}$ 's, tabela 4.17, não foi atingida. Estes valores foram sempre maiores que a velocidade específica de crescimento calculada no tempo inicial de cultivo, representado pelos valores de soma de  $\mu$ 's, na tabela 4.16. Isto significa que a condição em que  $C_{\text{si}} \gg K_{\text{si}}$  não existiu.

Considerando um cultivo hipotético em um meio de cultura contendo todas as fontes de carbono e nitrogênio avaliadas neste trabalho, e a situação em que  $C_{\text{si}} \gg K_{\text{si}}$ , a equação de velocidade que descreveria o crescimento celular poderia ser expressa da seguinte maneira:

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_{\text{máx1}} + \mu_{\text{máx2}} + \mu_{\text{máx3}} + \mu_{\text{máx4}} + \mu_{\text{máx5}} + \mu_{\text{máx6}} - kd2) * C_X \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Simplificando:

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_{\text{máxglobal}} - kd_2) * C_X \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Neste caso, os microrganismos estariam crescendo com uma velocidade específica de crescimento  $\mu_{\text{máxglobal}} = 0,204 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , valor próximo ao que foi obtido por Baptista-Neto et al. (2005),  $0,207 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ . O modelo destes autores foi proposto para um meio de cultura complexo, rico em fonte de carbono e nitrogênio. O cultivo hipotético citado acima simularia um meio rico em fonte de carbono e energia.

O coeficiente de manutenção obtido foi menor que o coeficiente obtido por Baptista-Neto (2005), de  $0,363 \text{ (g}_{\text{glicérol}} \cdot \text{g}_{\text{célula}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$ . Segundo os autores, o valor obtido por eles foi alto, e justamente pelo fato de não ter sido considerado a morte celular desde o início do bioprocessamento.

A constante de degradação obtida para o ácido clavulânico foi baixa em comparação com os valores encontrados na literatura –  $0,017 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  (BAPTISTA-NETO et al., 2005);  $0,029 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  (BERSANETTI et al., 2005) . Com relação à cefamicina C, não foram encontrados trabalhos na literatura sobre a sua degradação. Os coeficientes de proporcionalidade de produção do ácido clavulânico e cefamicina C,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , e  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , também foram baixos, comparados com o valor ajustado por Baptista-Neto et al. (2005). Contudo, vale a pena salientar que o meio de cultura empregado nos dois trabalhos era bem diferente. Baptista-Neto et al. (2005) empregaram meio complexo e obtiveram uma alta concentração de ácido clavulânico. Já no presente trabalho, o meio utilizado era pobre em fonte de carbono e nitrogênio, e proporcionou uma menor produção. Este fato vem justificar a obtenção de menores valores dos coeficientes de produção no presente trabalho.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados realizados nos diferentes cultivos, pode-se concluir que a maltose como componente no meio de cultura favoreceu a produção de ácido clavulânico e cefamicina C, quando este era a principal fonte de carbono e energia disponível. O glicerol favoreceu o crescimento e, por isso, a produção dos beta-lactâmicos foi menor, devido aos mecanismos de repressão da biossíntese de metabólitos secundários. A asparagina não influenciou a produção de ácido clavulânico e de cefamicina C. A adição de pequena quantidade de ácido glutâmico ao meio GPG também não alterou as cinéticas de produção e crescimento. A ornitina não se mostrou uma boa fonte de nitrogênio – este aminoácido inibiu completamente a biossíntese da cefamicina C, inibiu o consumo da prolina, proporcionou um crescimento pequeno e a produção de ácido clavulânico muito baixa. A maltose presente no meio GMPG favoreceu a produção de ácido clavulânico, comparado ao meio GPG. Este fato talvez tenha ocorrido devido a uma maior produção de NADPH pela célula, disponibilizando uma maior quantidade deste cofator para biossíntese do ácido clavulânico.

O ajuste do modelo matemático proposto para os meios GPG, GPG + glu, MAA e MAG foi satisfatório. No meio MA parece ter havido uma mudança no metabolismo celular durante o bioprocessamento, o que não estava previsto pelo modelo matemático. Desta forma, não foi possível obter um ajuste fiel aos dados experimentais. Já o meio GA obteve-se um bom ajuste em relação ao consumo de substratos e crescimento celular. Quanto à formação dos produtos, foram propostos dois modelos diferentes, e seria necessário a repetição do experimento para verificar qual deles realmente se aplica.

## 6.SUGESTÕES

Tendo em vista os resultados do presente trabalho, algumas sugestões são propostas para que haja uma melhor compreensão do bioprocesso:

- Análise de amônia produzida durante os cultivos. Desta forma, seria possível verificar se a célula começa a consumir esta fonte de nitrogênio e se isso causa a mudança no comportamento de crescimento e produção.
- Quantificação de aminoácidos intracelulares durante o processo. Com essa informação, talvez seja possível relacionar a concentração destes aminoácidos à produção de ácido clavulânico e cefamicina C, obtendo-se uma correlação mais precisa de composição do meio e produção.
- Refinamento do modelo proposto, de forma a incluir as mudanças no metabolismo celular observadas nos resultados do cultivo, como a mudança na velocidade de crescimento e produção de metabólitos.
- Aplicação da análise de fluxos metabólicos para este bioprocessos, que disponibilizaria uma grande quantidade de informações sobre como o fluxo de carbono se distribui nas diferentes rotas metabólicas de *Streptomyces clavuligerus* sob diferentes composições de meio de cultura.
- Utilização de um programa computacional de otimização de parâmetros para um melhor ajuste do modelo proposto aos dados experimentais.



## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, Oxford, v. 146, p.837,1940.
- AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A.L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Cambridge, v. 14, p. 159-164, 1978.
- ANTONIO, T. **Estudo da composição de meios de cultura para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***. 2007. 58p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.
- BAGGALEY,K.H.;BROWN,A.G.;SCHOFIELD,C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Product Reports**, Surrey,v.14, p.309-333,1997.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2a. edição. NewYork: McGraw-Hill, 1986. 984p.
- BALLOWS, A. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, applications**, v. 1, 2a. edição, New York, Springer-Verlag, 1992.
- BAPTISTA NETO, A. **Estudo do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular**. 2004.178p. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- BAPTISTA NETO, A.;TEODORO, J.C.; MACEDO FILHO, L.C.C.;HIRATA, D.B.;BANDINO, A.C.;HOKKA, C.O. Kinetic studies on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. In: 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005, Rio de Janeiro, **Anais**, p.1-10.

- BAPTISTA NETO, A.; OLIVEIRA, L.M.; BELLÃO, C.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; BARBOSA, M.; BANDINO JUNIOR, A.; HOKKA, C.O. Determinação da cefamicina C por cromatografia líquida de alta eficiência. In: III Seminário do Projeto Temático: Produção e purificação do ácido clavulânico, cefamicina C e outros compostos bioativos de *Streptomyces*, 2009, São Carlos. **Anais...**, p.111-116.
- BELLGARDT, K.H. Cell Models. In: SCHÜGERL, K. **Biotechnology: Measuring, Modelling and Control**. Weinheim: VHC, 1991. p.267-298.
- BERSANETTI, P.A.; ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; ARAÚJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 31-36, 2005.
- BORODINA, I.; SCHÖLLER, C.; ELIASSON, A.; NIELSEN, J. Metabolic Network Analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* Species with an Active Entner-Doudoroff Pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, Lyngby e Copenhagen, v. 71, p. 2294-2302, 2005.
- BRADFORD, P.A. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, New York, v.14, n.4, p. 933-951, outubro, 2001.
- BROWN, A.G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J.D.; READIND, C.; ROLINSON, G.N. Naturally-occurring  $\beta$ -lactamases inhibitors with antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, Surrey, v.29, n.6, p.668-669, junho, 1976.
- BUSHELL, M.E.; KIRK, S.; ZHAO, H.J.; AVIGNONE-ROSSA, C.A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v.39, p.149-157, 2006.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis, and fermentation. In: **Biotechnology of Industrial Antibiotics**, Ed. E.J. Vandamme, New York, by Marcel Dekker, Inc., 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. **Biotechnology Letters**, Taiwan, 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 and Microbial Technology**, Taiwan, v. 32, p.152-156, 2003.
- CRUZ, A.J.G.; SILVA, A.S.; ARAUJO, M.L.G.C.; GIORDANO, R.C.; HOKKA, C.O. Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. **Chemical Engineering Science**, Brazil, v. 54, p. 3137-3142, 1999.
- DEMAİN, A.L. Biology of antibiotic formation. In: **Biotechnology of Industrial Antibiotics**, Ed. E.J. Vandamme, New York, by Marcel Dekker, Inc., p.33-42, 1984.
- DEMAİN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v.1, p.259-264, 1998.
- DEMAİN, A. L.; ELANDER, R.P. The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 5-19, 1999.
- ELKINS, J. M.; CLIFTON, I. J.; HERNANDEZ, H., DOAN, L. X.; HEWITSON, K. S. Oligomeric structure of proclavaminic acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. **Biochemical Journal**, v.366, p.423-434, 2002.
- ELSON, S.W.; OLIVER, R.S. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. I Incorporation of  $^{13}\text{C}$ -labelled precursors. **The Journal of Antibiotics**, v. 31, n. 6, p 586-592, 1978.
- FOULSTONE, M.; READING, C.; Assay of Amoxillin and Clavulanic Acid, the Components of Augmentin, in Biological Fluids With HPLC, **Ant., Ag. Chem.**, v.22, p.753-762, 1982.
- FUENTE, J.L.; RUMBERO, A.; MARTÍN, J.F.; LIRAS, P.  $\Delta$ -1-Piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms  $\alpha$ -amino adipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes. **Biochemistry Journal**, León e Madrid, v. 327, p. 59-64, 1997.

- GOMBERT, A.K.; NIELSEN, J. Mathematical modelling of metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, São Paulo e Lyngby, v. 11, p.180-186, 2000.
- GOUVEIA, E.R. **Desenvolvimento do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585**. 2001. 156p. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.
- HENRIKSON, R.L.; MEREDITH, S.C., Amino acid analysis by reserve phase high performance liquid chromatography precolumn derivatization with phenylthiocyanate analytical. **Biochemistry**, v. 13, p. 65-72, 1984.
- IVES, P.R.; BUSHELL, M.E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, Guildford, v.143, p. 3573-3579, 1997.
- JENSEN, S.E.; PARADKAR, A.S. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p 125–133, 1999.
- KHALEELI, N.; LI, R.; TOWNSEND, C.A. Origin of  $\beta$ -lactam carbons in clavulanic acid from an unusual thiamine pyrophosphate-mediated reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p 9223-9224, 1999.
- KHETAN, A.; MALMBERG, L.H.; KYUNG, Y.S.; SHERMAN, D.H.; HU, W.S. Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 1020-1027, 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**, Surrey, v. 22, p. 1803-1809, 2000.
- KRESSE, H.; BELSEY, M.J.; ROVINI, H. The antibacterial drugs market. **Natura Reviews Drug Discovery**, v.6, p.19-20, Janeiro, 2007.
- KURYLOWICZ, W. **Antibióticos. Uma revisão crítica**. Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, 1981.

- IKEDA, H.; KOTAKI, H.; TANAKA, H.; OMURA, S. Involvement of Glucose Catabolism in Avermectin Production by *Streptomyces avermitilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Tokio, v. 32, p. 282-284, 1988.
- LECHEVALIER, H. A. ; LECHEVALIER, M. P. Introduction to the order *Actinomycetales*, In: Starr, M. P.; Stalp, H.; Tryper, H. G.; Balawi, A.; Schlegel, H. G.; **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. New York, Springer-Verlag, 1981.
- LEBRIHI, A.; GERMAIN,P.; LEFEBVRE,G. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nancy, v. 26, p. 130-135, 1987.
- LEBRIHI, A.; LEFEBVRE,G; GERMAIN,P. A study on the regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis by *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nancy, v. 28, p. 39-43, 1988.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas. In: **Princípios de Bioquímica**, Ed. Sarvier, São Paulo, p. 833-880, 2002.
- LI, R.; KHALEELI, N.; TOWNSEND, C. Expansion of the Clavulanic Acid Gene Cluster: Identification and In Vivo Functional Analysis of Three New Genes Required for Biosynthesis of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, p. 4097-4095, 2000.
- LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie van Leeuwenhoek**, Leon, v.75, p.109-124, 1999.
- LIRAS, P.; GARCÍA, A.R. Clavulanic acid, a  $\beta$ -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p 467-475, 2000.
- LIRAS P.; MARTÍN J.F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: Barredo J. L., **Methods in Biotechnology**, vol. 18 (Microbial processes and products), cap. 7, p. 149, Humana Press Inc., Totowa, 2005.
- LIRAS,P.; MARTIN, J.F. Gene clusters for  $\beta$ -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? **International Microbiology**, Leon, v. 9, p. 9-19, 2006.

- LORENZANA, L. M.; PEREZ-REDONDO, R.; SANTAMARTA, I.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Two oligopeptide-permease-encoding genes in the clavulanic acid cluster of *Streptomyces clavuligerus* are essential for production of the  $\beta$ -lactamase inhibitor. **Journal of Bacteriology**, v.186, p 3431–3438, 2004.
- MALMBERG, L.H.; HU, W.S. Kinetic analysis of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 941-947, 1991.
- MARTIN, J.; DEMAIN, A.L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological Reviews**, Salamanca e Massachusetts, v.44, n.2, p.230-251, junho, 1980.
- MAYER, A.F.; DECKWER, W.D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.41-46, 1996.
- OBANYE, A.I.C.; HOBBS, G.; GARDNER, D.C.J.; OLIVER, S.G. Correlation between carbon flux through the pentose phosphate pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology**, v. 142, p. 133-137, 1996.
- OSTER, L.M.; LESTER, D.R.; SCHELTINGA, A.T.V.; SVENDA, M.; LUN, M.V.; GENEREUX, C.; ANDERSON, I. Insights into Cephameycin Biosynthesis: the Crystal Structure of Cmcl from *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Molecular Biology**, Uppsala e Liège, v. 358, p. 546-558, 2006.
- PRESS, W.H., FLANNERY, B.P., TEUKOLSKY, S.A., VETTERLING, W.T. Numerical Recipes – The art of scientific computing.1.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1986,818p.
- RIUS, N.; DEMAIN, A.L. Regulation of lysine e-aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Massachusetts e Barcelona, v. 48, p.735-737,1997.
- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F., Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology. Biotechnology**, v.20, p.318-325, 1984.

- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F.; Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. **Applied Environment Microbiology**, v.52, p.892-897, 1986.
- ROSA, J. C. **Influência das Condições de Transferência de O<sub>2</sub> na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***, 2002, 97p., Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.
- SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioresource Technology**, Mumbai, v.98, p. 2010-2017, 2007.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. 1a.ed, v.1. New Jersey: Prentice- Hall Inc, 1992. 477 p.
- STAPLEY, E.O.; JACKSON, M.; HERNANDEZ, S.; ZIMMERMAN, S.B.; CURRIE, S.A.; MOCHALES, S.; MATA, J.M.; WOODDRUFF, H.B.; HENDLIN, D. Cephamycins, a new family of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Nova Jérsei e Madrid, v. 2, n. 3, p.122-131, setembro, 1972.
- TOWNSEND, C.A. New reactions in clavulanic acid biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.6, p 583-589, 2002.
- TEODORO, J.C. **Influência das condições de alimentação de glicerol e ornitina na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2008. 127f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- YEGNESWARAN, P.K.; GRAY, M.R.; THOMPSON, B.G. Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: effect in *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 1203-1209, 1991.
- VALENTINE, B.P.; BAILEY, C.R.; DOHERTY, A.; MORRIS, J.; ELSON, S.W.; BAGGALEY, K.H.; NICHOLSON, N.H. Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Chemical Society**, Chemical Communication, p 1210-1211, 1993.

- VASCONCELOS, E.S. **Caracterização de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 obtidos por aplicação de radiação UV e tratamento químico**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.