

CARLA ANDREA LEITE

**"Avaliação do processo de
produção de cefamicina C por
Streptomyces clavuligerus"**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, com parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

L533a Leite, Carla Andrea
Avaliação do processo de produção de cefamicina C por
Streptomyces clavuligerus / Carla Andrea Leite. –
Araraquara : [s.n], 2014
104 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

1. Biotecnologia. 2. *Streptomyces clavuligerus*.
3. Biorreator. 4. Antibióticos beta-lactâmicos.
5. Planejamento experimental. I. Título.

Carla Andréa Leite

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Carla Andréa Leite
Nascimento 02/06/1986 - Matão/SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2010 - 2014** Doutorado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Avaliação do processo de produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*
Orientador: Maria Lucia Gansales da Costa Araujo
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- 2008 - 2010** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Influência Das Condições De Cultivo E Métodos De Extração Na Produção De Metabólitos Antioxidantes Por Fungos Isolados Do Litoral Paulista. Ano de obtenção: 2010
Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- 2004 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas.
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
Título: Contaminação por Bactérias do Gênero *Staphylococcus* e Enterobactérias em Telefones Públicos do Município de Araraquara.
Orientador: Wilton Rogério Lustrí
-

Formação complementar

- 2008 - 2008** Extensão universitária em Técnicas de Separação Cromatográficas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Resíduos na Pesquisa.
Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Brasil
- 2007 - 2007** O Aquecimento Climático em Debate.
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Terapia celular. Células-tronco: A polêmica da ciência regenerativa.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Meio Ambiente e Biocombustíveis.
Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Brasil
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Produção de Fármacos Através do Uso da Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Organização do Genoma.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Proteínas Recombinantes e Suas Aplicações. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Aspectos Ecológicos e Patogênicos de Fungos. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LEITE, CARLA A, CAVALLIERI, ANDRÉ P, ARAUJO, MARIA L. G. C. Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. BMC Microbiology (Online). , v.13, p.296 - 307, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. LEITE, C. A., ARAUJO, M. L. G. C. Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em meios contendo diaminas e L-lisina In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos.** , 2011.
2. LEITE, C. A., ARAUJO, M. L. G. C. Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em meios contendo substâncias potencialmente indutoras da biossíntese do antibiótico In: 4º SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO FAPESP, 2010, São Carlos. **4º SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO FAPESP.** , 2010. p. 89 - 92

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LEITE, C. A., BERLINCK, R. G. S., CILLI, E. M., SPONCHIADO, S.R.P. Effect of solvent, time and temperature in extration of antioxidant compounds from fungi *A. niger* e *T. terrestris* In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010, Foz do Iguaçu. **XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq).** , 2010.
2. LEITE, C. A., GONCALVES, R. C. R., PRETTI, T. S., MARQUES, M. P., CAPORALIN, J. B., BERLINCK, R. G. S., SPONCHIADO, S. R. P. Evaluation of antioxidant activity of extracts from *Aspergillus terreus* obtained in different culture conditions In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009, Rio Claro. **Suplemento 1 - IV Simpósio de Microbiologia Aplicada.** Rio Claro: HOLOS ENVIRONMENT, 2009. v. 9. p. 55 – 55

Trabalhos apresentados em eventos (coautor)

1. NASCIMENTO, T. A., LEITE, C. A., CAVALLIERI, A. P., ARAUJO, M. L. G. C. **Influência do efeito combinado de putrescina e lisina na produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***, 2013. (XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP)
2. OLIVEIRA, J. P. S., CAVALLIERI, A. P., LEITE, C. A., BAPTISTA, A. S. **Purificação de Holomicina produzida por uma linhagem mutante de *Streptomyces clavuligerus***, 2013. (XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP)
3. LEITE, C., LEITE, C. A., CAVALLIERI, A. P., ARAUJO, M. L. G. C.

Diferenciação da capacidade de produção de compostos bioativos em linhagens de *Streptomyces clavuligerus*, 2012. (XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP)

4. D'AVOGLIO, J. B. C., **LEITE, C. A.**, BERLINCK, R. G. S., SPONCHIADO, S. R. P. **Biossorção de lantânio por Fungos isolados do Litoral Paulista**, 2006. (XXXVI Semana da Química – UNESP/Araraquara)

Supervisões Científicas

Iniciação científica

1. Thiago Augusto Nascimento. **Avaliação da capacidade produtiva de bioativos pela linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064**. 2013. Bolsista PIBIC Ensino Médio (CNPq) - Escola Municipal Adelino Bordignon.
2. Caroline Leite. **Cultivo de mutante de *Streptomyces clavuligerus* com maior capacidade produtiva de cefamicina C**. 2012. Bolsista PIBIC Ensino Médio (CNPq) - Escola Municipal Adelino Bordignon.

Eventos

Participação em eventos

1. **Seminário WATERS – Workshop Metabolômica**, 2014. (Instituto de Química – UNESP/Araraquara)
2. **I International Symposium of Medical Chemistry and Regenerative Medicine**, 2014. (Centro Universitário de Araraquara – UNIARA).
3. Apresentação de Painel no **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2011. (Caxias do Sul – Rio Grande do Sul).
Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em meios contendo diaminas e L-Lisina.
4. Apresentação Oral no **4º Seminário do Projeto Temático FAPESP**, 2010. (UFSCar/São Carlos).
Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em meios contendo substâncias potencialmente indutoras da biossíntese do antibiótico.
5. Apresentação de Painel no **XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2010. (Foz do Iguaçu - Paraná).
Effect of solvent, time and temperature in extration of antioxidant compounds from fungi *A. Niger* e *T. terrestre*.
6. Apresentação de Painel no **Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia**, 2009. (Instituto de Química – UNESP/Araraquara)
Antioxidant activity of intra and extracellular extracts from *Aspergillus niger* associated with the phase of fungal growth.
7. Apresentação de Painel no **IV Simpósio de Microbiologia Aplicada**, 2009. (Instituto de Biociências – UNESP/Rio Claro).
Evaluation of antioxidant activity of extracts from *Aspergillus terreus* obtained in different culture conditions.
8. **III Encontro Nacional de Pós-Graduação em Microbiologia**, 2008. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Jaboticabal).
9. **XXXVIII Semana da Química**, 2008. (Instituto de Química – UNESP/Araraquara)
10. Apresentação de Painel no **5º Congresso Internacional de Iniciação Científica COINT-SEMESP**, 2007. (Universidade de Sorocaba - UNISO)

Contaminação por Bactérias do gênero *Staphylococcus* e Enterobactérias em telefones públicos do município de Araraquara/SP.

11. Apresentação de Painel no **7º Congresso de Iniciação Científica CONIC – SEMESP**, 2007. (Universidade de Sorocaba - UNISO)

Contaminação por bactérias do gênero *Staphylococcus* e Enterobactérias em telefones públicos do município de Araraquara/SP.

12. Apresentação de Painel no **II Congresso de Iniciação Científica da UNIARA**, 2007. (UNIARA/Araraquara).

Perfil de Sensibilidade/Resistência das cepas de Enterobactérias isoladas a partir de telefones públicos do município de Araraquara.

13. **XXXVII Semana da Química**, 2007. (Instituto de Química – UNESP/Araraquara)

14. **I Simpósio Interação Parasito-Hospedeiro: Modelos de Estudo**, 2007. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara).

15. **XXXII SECITAP - Semana de Ciência e Tecnologia Agropecuária**, 2007. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Jaboticabal).

16. Apresentação de Painel no **III Simpósio Da Engenharia Ambiental**, 2006. (Escola de Engenharia de São Carlos - USP/São Carlos).

Biossorção de lantânio e neodímio por fungos isolados do litoral paulista.

17. Apresentação de Painel no **XVIII Congresso de Iniciação Científica - UNESP**, 2006. (UNESP/Botucatu).

Extração e Quantificação da Melanina Produzida pelo Fungo *Aspergillus nidulans*.

18. Apresentação de Painel no **I Congresso de Iniciação Científica da UNIARA**, 2006. (UNIARA/Araraquara).

Identificação de Fungos Coletados no Litoral Paulista.

19. **VI Workshop de Genética**, 2006. (Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu)

20. **XXXVI Semana da Química**, 2006. (Instituto de Química – UNESP/Araraquara)

21. **XXXI SECITAP - Semana de Ciência e Tecnologia Agropecuária**, 2006. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Jaboticabal)

22. **IX Semana de Biologia**, 2004. (Centro Universitário de Araraquara – UNIARA)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

Participação em banca de Maria Lucia Frade. **Avaliação da Estabilidade da Capacidade de produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***, 2012.

(Farmácia e Bioquímica) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Outras informações relevantes

Estágio-docência realizado no primeiro semestre/2012 na disciplina de *Desenho Técnico* ministrada pela professora Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo ao 3º ano do curso Química Tecnológica.

Estágio-docência realizado no segundo semestre/2012 na disciplina de *Introdução à Biologia* ministrada pelas professoras Daniela Alonso Bocchini Martins e Maria Célia Bertolini ao 4º ano do curso de Licenciatura em Química.

CARLA ANDREA LEITE

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 04 de abril de 2014.

BANCA EXAMINADORA



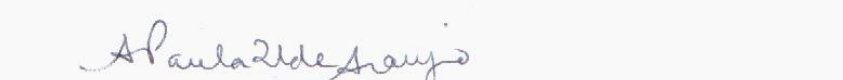
Prof^a. Dr^a. MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI
Centro Universitário de Araraquara / UNIARA / Araraquara



Prof^a. Dr^a. ANA PAULA ULIAN DE ARAUJO
Instituto de Física de São Carlos / USP / São Carlos



Prof^a. Dr^a. CRISTINA PAIVA DE SOUSA
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFSCar / São Carlos

Agradecimento aos meus professores

*Primeiramente eu gostaria de agradecer a todos os professores que passaram pela minha vida. Cada um deles contribuiu de forma única na minha formação acadêmica e pessoal, e por essa razão merecem ser sempre lembrados! Dentre todos os professores que tive, alguns merecem um agradecimento especial. A minha professora de biologia do ensino médio **Gisele Maria Chiquito** que encanta os seus alunos com as suas aulas teóricas e práticas ministradas sempre com muita sabedoria e bom humor! A sua paixão pela biologia é tão contagiante que tendo você como professora foi impossível pensar em seguir outra profissão! Fico feliz em dizer que toda a sua dedicação rendeu frutos...*

*No curso de Biologia devo destacar o professor **Wilton Rogério Lustri** que me orientou no Trabalho de Conclusão de Curso, sempre com muita paciência e disposição. A ele agradeço todo o conhecimento adquirido em técnicas de manipulação microbiológica e boas práticas de laboratório. A sua excepcional orientação abriu os meus olhos para um “mundo invisível” e me encaminhou para uma vida cheia de descobertas na área da Microbiologia!*

*Também devo agradecer à professora **Sandra Regina Pombeiro Sponchiado** que me acolheu em seu laboratório de fungos filamentosos. A ela eu devo todo o meu conhecimento científico. Sempre serei grata por acreditar em mim e ter me dado à oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação.*

*Por último, mas não menos importante, agradeço de todo o meu coração à professora **Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo**. Muito obrigada pela oportunidade de realizar o Doutorado no laboratório de bioprocessos e compartilhar os seus conhecimentos de Engenheira Química com uma Bióloga! Posso dizer com certeza que aprendi muito durante esses anos. A nossa parceria foi muito além do orientador-orientado; em você eu encontrei uma verdadeira amiga e conselheira.*

Agradecimentos especiais

*Ao meu namorado e companheiro de laboratório **André Pastrelo Cavallieri**. Eu agradeço a você de todas as formas possíveis: profissional e pessoal! Obrigada por me acompanhar nas fermentações em biorreator, pelos auxílios nas análises de HPLC, pelas ideias para a elaboração de experimentos e por tantas outras “coisinhas” rotineiras de laboratório. Agradeço também por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e de tristeza, me apoiando e aconselhando. Eu sei que nem sempre é fácil separar o pessoal do profissional, mas felizmente sobrevivemos a essa experiência! Foi um prazer poder compartilhar o meu doutorado com você. Espero que a nossa parceria dure por muitos anos.*

*À minha família, os meus pais **Rose e Carlos** e em especial as minhas irmãs **Karina Raquel Leite e Caroline Leite**. Apesar dos momentos difíceis que passamos devemos sempre nos lembrar que “A família é a coisa mais importante do mundo”.*

Agradecimento geral

*A todos que passaram pelo laboratório: **Tatiana Antônio** (doutorado), **Amanda Salvador Baptista** (mestrado) e alunos de iniciação científica: **Maria Lúcia Frade, Caroline Leite** (irmã), **Thiago Augusto Nascimento** e **João Pedro Sacrato de Oliveira**. Muito obrigada pela contribuição para o desenvolvimento desse projeto e também pelos momentos divertidos que passei ao lado de vocês.*

*A todos os **amigos** que fiz durante o mestrado e doutorado, em especial a **Marina Marques e Natália Marques** por tornar as viagens entre Matão e Araraquara mais divertidas! Espero que nossa amizade se perpetue.*

*A todos os **funcionários do IQ** pela amizade e auxílio nos momentos de necessidade.*

*Também devo agradecer aos meus três Pit Bulls: **Pandora, Maia e Rambo** pelo amor incondicional e por me escutarem quando ninguém mais podia.*

*A **CAPES** pela bolsa concedida.*

“Só conheço uma liberdade, e essa é a liberdade do pensamento”

Antoine de Saint-Exupéry

"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante"

O Pequeno Príncipe

RESUMO

Streptomyces clavuligerus produz vários compostos β -lactâmicos, com destaque para a cefamicina C. Vários autores sugerem que a natureza e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio, adicionadas ao meio de cultura, podem favorecer a produção de maiores quantidades deste antibiótico. A lisina exerce um papel importante, atuando no catabolismo, via cadaverina, e no metabolismo secundário, através do qual é convertida, via 1-piperideína-6-carboxilato, em ácido alfa-aminoadípico, precursor de todos os antibióticos β -lactâmicos. O aumento da produção de cefamicina C em meios contendo concentrações de lisina acima de 50 mM tem sido bem explorado na literatura. Há também alguns relatos sobre a influência positiva da adição das multifuncionais diaminas e de compostos precursores do antibiótico como o alfa-cetoglutarato. Não há, porém, estudos acerca da influência conjunta destes compostos na produção de antibióticos. Dessa forma, esta Tese buscou explorar tal influência visando elaborar um meio de cultivo economicamente viável e favorável à produção de cefamicina C. Para isto, avaliaram-se os efeitos do meio de cultura (sintético, semi-sintético ou complexo) e da natureza da fonte de carbono (amido ou maltose), bem como do modo de operação do cultivo (batelada ou cultivo contínuo). A influência da interação de lisina com putrescina ou 1,3 diaminopropano no metabolismo secundário de *Streptomyces clavuligerus* foi investigada por meio da Metodologia de Superfície de Resposta. A adição de 100 mM de lisina ao meio base (sem aditivos) propiciou uma produção de 120 mg/L do antibiótico, cerca de 445% maior que a obtida em meio base. Entretanto, houve um residual de cerca de 30 mM ao final do cultivo, inviabilizando economicamente o processo. A adição de putrescina (0,2 g/L) e lisina (40 mM) ao meio base, tendo a maltose como fonte de carbono, mostrou uma produção de cerca de 150 mg/L em cultivos no modo contínuo intermitente. Entretanto, para este modo de operação, a maior produção de cefamicina C, cerca de 240 mg/L, foi obtida em meio contendo amido, iniciando-se a fermentação com 30 mM de lisina e sem adição de qualquer diamina. Por outro lado, concentrações de putrescina acima de 1,0 g/L adicionadas em cultivos no modo batelada elevou a produção de ácido clavulânico, um resultado indesejado. A adição de α -cetoglutarato, por sua vez, causou o aumento do pH ($\sim 9,0$) e consequente queda da produção do antibiótico. No presente estudo obteve-se um meio ideal para a produção de cefamicina C combinando-se 40 mM de lisina e 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano em cultivos do tipo batelada com amido. Este novo meio de cultura resultou em um rendimento de 800% na produção de cefamicina C, comparado ao meio base sem aditivos, e o dobro da produção com relação ao meio de cultivo com adição de 100 mM de lisina. Assim, a adição conjunta de 1,3 diaminopropano e lisina resultou em um meio de cultivo altamente produtivo e vantajoso economicamente pois reduziu-se 60% na adição de lisina no meio de cultura.

Palavras-chave: *Streptomyces clavuligerus*; Cefamicina C; Lisina; Diamina; Planejamento Experimental; Biorreator.

ABSTRACT

Streptomyces clavuligerus produces various beta-lactam compounds, especially the cephamycin C. Some authors suggest that the nature and concentration of carbon and nitrogen added to the culture medium may favor the production of larger quantities of the antibiotic. Lysine plays an important role in *Streptomyces clavuligerus*, acting on its catabolism, via cadaverine, and secondary metabolism, in which it is converted via 1-piperideine-6-carboxylate to alpha-aminoadipic acid, a beta-lactam antibiotic precursor. The role of lysine as a cephamycin C inducer, when added to production medium at concentrations above 50 mM, has been widely explored in the literature. Moreover there are some reports on the positive influence of multifunctional diamines and antibiotic precursor compounds such as alpha-ketoglutarate. However, there is not studies on the combined influence of these inducers on beta-lactam antibiotic production. Thus, this Thesis explores such influences to devise a culture medium economically viable and which promotes the production of cafamicina C. For this, we evaluated the effect of culture medium (synthetic, semi-synthetic or complex), carbon source (starch or maltose) and different modes of operation (batch or continuous culture). Was adopted the Response Surface Methodology to investigate the interaction of lysine with putrescine or 1,3-diaminopropane and its influence on cephamycin C biosynthesis of *Streptomyces clavuligerus*. The addition of lysine (100 mM) in basal medium (without additives) led to an cephamycin C production of 120 mg/L, an increase of 445% in the production of this antibiotic. However, there was a residual of 30 mM at the end of cultivation, becoming the process uneconomical. The addition of putrescine (0.2 g/L) and lysine (40 mM) in the culture medium with maltose as a carbon source, showed a production around 150 mg/L in the intermittent cultivation mode. However, in this mode of operation, the increased production of cephamycin C, about 240 mg/L was obtained in a medium containing starch and lysine (30 mM), without adding any diamine. On the other hand, in the batch mode cultivation, putrescine concentrations above 1.0 g/L increased the production of clavulanic acid, an undesired result. The addition of α -ketoglutarate caused the increase in pH (~ 9.0) and the consequent drop in production of antibiotic. In the present study, the optimal medium for the production of cephamycin C was obtained with the combination of lysine (40 mM) and 1,3-diaminopropane (5.0 g/L) in batch cultures containing starch as carbon source. With this new culture medium was obtained a yield of 800% in the production of cephamycin C, compared to the basal medium without additives, and a yield two times higher with respect to basal medium supplemented with lysine (100 mM). Thus, the addition of 1,3-diaminopropane plus lysine resulted in a highly productive and economically advantageous culture medium, reduced by 60% the addition of lysine in the culture medium.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*; Cephamycin C; Lysine; Diamines; Experimental Design; Bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão dos fármacos quanto a sua origem	25
Figura 2 - Distribuição dos antibióticos descobertos até 2001, de acordo com sua origem..	27
Figura 3 - Estrutura molecular de (A) ácido clavulânico (AC), (B) penicilinas (Pen), (C) cefalosporinas (CP) e (D) cefamicinas (em CefC, o radical R = OCONH ₂).	31
Figura 4 - Rotas biossintéticas de (A) cefamicina C (IPN – isopenicilina N; PenN – penicilina N; DAOC - deacetoxicefalosporina C; DAC - deacetilcefalosporina C) e (B) ácido clavulânico em <i>S. clavuligerus</i>	32
Figura 5 - Via biossintética de Cefamicina C em <i>Streptomyces clavuligerus</i> : L-lisina, cisteína e valina são os três precursores primários; α -cetogluturato é usado como co-fator de três enzimas da via.....	37
Figura 6- Síntese de putrescina por meio de duas vias: (1) ornitina – também ocorre em célula eucariotica e (2) arginina – apenas em procariotos.....	39
Figura 7 - Esquema geral do procedimento experimental utilizado em todos os cultivos de <i>S. clavuligerus</i> realizados mesa rotativo-incubadora.....	48
Figura 8 – Curva de calibração para quantificação de cefamicina C.....	50
Figura 9 – Esquema geral do “screening” a partir do criotubo de esporos do mutante 45.41 obtido da linhagem selvagem de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064.	54
Figura 10- Biomassa (A), CefC (B) e produção específica (C) em 48 e 72 horas de processo, em meio de cultivo submerso contendo amido como fonte de carbono.	56
Figura 11- Residual do aminoácido L-lisina ao final do processo fermentativo.....	56
Figura 12 - Resultados de biomassa (A), produção de CefC (B) e produção específica (C), obtidos durante o cultivo de <i>S. clavuligerus</i> , em frascos agitados no modo contínuo intermitente até 144 horas. Meio padrão sem alimentação (M1), meios com 100 e 30 mM de lisina inicial, ambos alimentados (M2 e M3).....	58
Figura 13- Estrutura química da putrescina; 1,3 diaminopropano e ácido diaminopimélico (DAP).....	60
Figura 14- Resultados de biomassa (A), produção de CefC (B) e produção específica (C) obtidos durante o cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em diferentes condições: sem L-lisina (0), putrescina (Put), 1,3 diaminopropano (1,3D) e ácido diaminopimélico (DAP), em diferentes concentrações. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....	60
Figura 15 - Resultados de (A) produção de CefC, (B) biomassa e (C) produção específica obtidos durante o cultivo de <i>S. clavuligerus</i> , em frascos agitados no modo contínuo intermitente, em meios contendo 1,3 diaminopropano (2,5 e 5,0 g/L) e L-lisina (30 mM e 100 mM). Amostras coletadas em horas:.....	63
Figura 16 - Planejamento experimental 3 ⁿ : consumo do aminoácido L-lisina.	66

Figura 17- Superfície de reposta (A), produção de CepC totais em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de CefC previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,95$	67
Figura 18 - Superfície de reposta (A), biomassa em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de biomassa previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,95$	70
Figura 19 - Concentração de cefamicina C (CefC), produção específica e biomassa; meio basal contendo lisina (40 mM) e 1,3 diaminopropano (5,0 g/L).	71
Figura 20 - Biomassa (A), produção de cefalosporinas totais (B) e produção específica (C) de <i>S. clavuligerus</i> em diferentes condições de cultivo utilizando maltose como fonte de carbono.....	73
Figura 21 - Biomassa (A), produção de cefamicina C (B) e produção específica (C) de <i>S. clavuligerus</i> em meios contendo diferentes concentrações de diaminas e maltose como fonte de carbono.....	75
Figura 22 - Cultivo contínuo intermitente de <i>S. clavuligerus</i> , pH inicial 7,2, alimentação com maltose e L-lisina. (A) biomassa, (B) produção de cefamicina C e (C) produção específica. 76	
Figura 23 - Cultivo contínuo intermitente de <i>S. clavuligerus</i> , pH inicial 7,2, em meio contendo 0,2 g/L de putrescina, com 100 e 40mM de L-lisina inicial, alimentação com maltose e lisina. (A) biomassa, (B) produção de cefamicina C e (C) produção específica.....	77
Figura 24 - Resultados de biomassa, produção de CefC e consumos de maltose e lisina em processo contínuo em biorreator convencional em meio padrão contendo 40mM de L-lisina e 0,2g/L de putrescina iniciais.....	79
Figura 25 - Biomassa (A), produção de CefC (B) e ácido clavulânico (C) obtidos em cultivo de <i>S. clavuligerus</i> com diversas concentrações de putrescina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.	80
Figura 26 - Via simplificada da formação de putrescina a partir de L-arginina e sua degradação gerando succinato.....	81
Figura 27 - Planejamento experimental 3^n com putrescina e lisina: consumo do aminoácido L-lisina.	83
Figura 28 - Superfície de reposta (A), produção de CefC em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de CefC previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,92$	84
Figura 29 - Superfície de reposta (A), biomassa em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de biomassa previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,92$	86
Figura 30 – Produção de CefC (A), pH (B) e produção específica (C) em 24, 48 e 72 horas em meio de cultivo submerso com diferentes concentrações de alfa-cetoglutarato (0% (padrão), 25%, 50%, 75% e 100%).....	88

Figura 31 - Consumo de L-lisina (A), maltose (B) e alfa-cetoglutarato (C) por <i>S. clavuligerus</i> . Meios com diferentes concentrações de alfa-cetoglutarato (0% (padrão), 25%, 50%, 75% e 100%).	89
Figura 32 - Produção de biomassa (A), CefC (B) e ácido clavulânico (C) obtidas em cultivo submerso da linhagem selvagem (1) e mutante 45.41(2), em 48 e 72 horas de processo, em meio contendo amido como fonte de carbono e diversas concentrações de lisina.	91
Figura 33 - Perfil do consumo do aminoácido L-lisina em cultivo submerso da linhagem mutante 45.41, em 48 e 72 horas de processo.	91
Figura 34 - Bioatividade das colônias isoladas a partir do mutante 45.41 frente à linhagem selvagem ATCC 27064.	92
Figura 35 - Biomassa (A), produção de CefC (B) e ácido clavulânico (C) obtidos em cultivo submerso tipo batelada, até 72 horas, com amido e lisina. Colônias isoladas do mutante 45.41 e ATCC 27064.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento	23
Tabela 2 - Antibióticos com o princípio ativo isolado do gênero <i>Streptomyces</i> que estão em análise clínica.	28
Tabela 3 - Principais fármacos com o princípio ativo isolado do gênero <i>Streptomyces</i>	29
Tabela 4 - Composição dos meios de inóculo.	44
Tabela 5- Composição dos meios de produção.	45
Tabela 6- Composição do meio de alimentação.	45
Tabela 7- Combinação entre os meios de inóculo e produção.	46
Tabela 8- Combinação entre o ácido α -cetoglutarato e a matose.	47
Tabela 9 - Composição dos meios de produção e dos meios suplementares de fermentações contínuas intermitentes em frascos agitados (volume constante 45 mL, $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$); alimentação a partir de 36 horas.	57
Tabela 10 - Composição dos meios de produção e concentrações de amido e lisina no meio reacional, a cada suplementação, nos cultivos contínuos intermitentes em frascos agitados (volume constante 45 mL, $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$); alimentação a partir de 36 horas.	62
Tabela 11 - Planejamento experimental de faces centradas 3^n : condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de 1,3 diaminopropano no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtida em 72 horas de fermentação.	65
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de CefC obtidos com a adição de 1,3 diaminopropano e lisina no meio de cultivo.	68
Tabela 13- Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de biomassa obtidos com a adição de 1,3 diaminopropano e lisina no meio de cultivo.	71
Tabela 14 – Aumentos na produção de cefamicina C: comparação entre o meio de cultivo contendo 40 mM de lisina + 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano e os demais meios de cultivos sem aditivos ou com apenas a adição de um composto (lisina ou 1,3 diaminopropano).	72
Tabela 15 - Composição dos meios de produção e concentrações de maltose e lisina no meio reacional, a cada suplementação, nos cultivos contínuos intermitentes em frascos agitados (volume constante 45 mL, $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$); alimentação a partir de 48 horas.	77
Tabela 16 - Planejamento fatorial 3^n : condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de Putrescina no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtidas em 72 horas de fermentação.	83

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de CefC obtidos com a adição de putrescina e lisina no meio de cultivo. 85

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de biomassa obtidos com a adição de putrescina e lisina no meio de cultivo..... 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3D – 1,3 diaminopropano

AAA - α -aminoadípico

AC – Ácido Clavulânico

ANOVA – Análise de Variância

ccaR - cephamycin and clavulanic acid Regulator

CefC – Cafamicina C

CepC – Cefalosporina C

DAC - deacetilcefalosporina C

DAOC - deacetoxicefalosporina C

DAP – Ácido Diaminopimérico

DCCF - Delineamento Composto Central de Face centrada

HPLC - High-performance Liquid Chromatography

IPN – isopenicilina N

LAT - lisina α -aminotransferase

MMS - metil-metanosulfonato

MOPS - ácido 3-[N-Morpholino]-propanosulfônico

NEQs – Novas Entidades Químicas

P6C desidrogenase -1-piperideina-6-carboxilato desidrogenase

PenN – penicilina N

Put – Putrescina

RSM – Response Surface Methodology

UCepC - Unidade de Cefalosporina C

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1. História dos produtos naturais como fármacos	20
1.2. Produtos naturais na atualidade	22
1.3. Bactérias do gênero <i>Streptomyces</i>	25
1.4. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	31
1.5. Influência da composição do meio de cultura na biossíntese de cefamicina C	33
1.5.1. Fonte de Carbono.....	34
1.5.2. Aminoácido L-lisina.....	34
1.5.3. Alfa-cetoglutarato	35
1.5.4. Diaminas	37
2. Objetivos.....	41
3. Materiais e métodos	42
3.1 Micro-organismos e forma de estocagem	42
3.2 Meios de Cultura e Alimentação	42
3.2.1 Amido como fonte de carbono	43
3.2.2 Maltose como fonte de carbono.....	43
3.2.3 Fontes de Nitrogênio	46
3.2.4 Adição de Diaminas.....	46
3.2.5 Adição de α -cetoglutarato.....	47
3.3 Condições gerais do processo de cultivo	47
3.3.1 Alimentação dos cultivos	48
3.4 Quantificação da biomassa.....	49
3.5 Quantificação de cefalosporinas totais.....	49
3.6 Quantificação de ácido clavulânico	50
3.7 Análise de maltose	51
3.8 Análise de lisina.....	51
3.9 Análise do α -cetoglutarato	51

3.10	Planejamento Experimental	52
4.	Resultados e Discussão	55
4.1	Cultivos em meio contendo amido	55
4.1.1	Efeito da concentração do aminoácido L-lisina na produção de cefamicina C	55
4.1.2	Efeito das Diaminas	59
4.1.3	Planejamento Experimental 3 ^o : 1,3 Diaminopropano e L-lisina	65
4.2	Cultivos em meio contendo maltose	72
4.2.1	Avaliação dos diferentes meios de inóculo e produção.....	72
4.2.2	Efeito das diaminas	74
4.2.3	Planejamento Experimental 3 ^o : Putrescina e L-lisina	82
4.3	Efeito do alfa-cetoglutarato	87
4.4	Mutante de <i>S. clavuligerus</i> super produtor de cefamicina C	90
4.5	Screening do mutante 45.41	92
5.	Conclusões	95
	REFERÊNCIAS	97

1. Introdução

1.1. História dos produtos naturais como fármacos

Por milhares de anos, os produtos naturais têm desempenhado um papel importante em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas. Desde a pré-história a humanidade procura por compostos capazes de aliviar e curar as enfermidades. A ingestão de plantas e ervas foi o primeiro relato do uso de produtos naturais pelo ser humano (VIEGAS JUNIOR et al. 2006). Historicamente, no oriente foi encontrado o livro médico mais completo e abrangente já escrito na história da medicina, o *Pen Tsao*, de autoria do imperador Shen-Nung (3000 a.C.), com 1892 receitas à base de ervas e plantas (LEE, 1936).

No ocidente, as mais antigas fontes escritas farmacêuticas são provenientes da Mesopotâmia e do Egito. Uma *tabuinha* de argila suméria, escrita em 2200 a.C., contém quinze receitas medicinais, sendo o documento ocidental mais antigo (MENEZES, 2005). Entretanto, em Luxor, no Egito, foi descoberto o documento mais importante para a História da Farmácia, o *Papiro de Ebers*, (1500 anos a.C.). Com mais de 20 metros de comprimento, este papiro descreve cerca de 900 doenças e mais de 7000 substâncias medicinais com 800 fórmulas quantitativas para seus tratamentos (SOUZA DIAS, 2003). Durante séculos o *Papiro de Ebers* foi considerado uma referência medicinal. Apenas no Império Romano surge um médico grego Pedanius Dioscórides (40-90 d.C.) que descreveu em seu livro *De Matéria Médica* cerca de 600 plantas, 35 fármacos de origem animal e 90 de origem mineral. Dioscórides é considerado o pai da Farmacognosia, pois classificou e testou clinicamente todas suas fórmulas (MENEZES, 2005).

Outro médico grego Claudius Galeno (129-200) também testou vários fármacos qualitativamente e quantitativamente referindo-se não apenas ao poder da cura, mas também à toxicidade dos fármacos de origem mineral; baixa atividade dos fármacos de origem animal e os riscos do uso exagerado do ópio (DUARTE, 2005).

Na Índia antiga, no século 5 d.C., foi escrito o *Sushruta Samhita*, uma obra que relata 1200 patologias e o uso de 700 plantas em preparados orgânicos. O texto médico propõe que o tratamento para infecções do trato urinário fosse uma mistura de giz, folhas de rosas, sementes de pepino e pílulas de gordura (NICKEL, 2005). O

uso desses preparos na cura de doenças foi largamente utilizado até a Idade Moderna. Neste período, os médicos-alquimistas, procurando aumentar a longevidade humana introduziram nas formulações principalmente o uso do ouro e outros metais como mercúrio, enxofre e ferro, além de sais de metais. (COSTA, 2009).

Apenas no século 19, em 1807, o químico-médico Jöns Jacob Berzelius introduziu os termos *orgânicos* e *inorgânicos* referindo respectivamente, a substâncias químicas produzidas por organismos vivos e aquelas encontradas em minerais. Na mesma época, um farmacêutico chamado Friedrich Adam Sertürner isolou a morfina da planta *Papaver somniferum* (DEWICK, 2011). Este foi o primeiro composto bioativo isolado e comercializado pela empresa química Merck em 1827. Iniciou-se uma era em que os fármacos derivados de plantas podiam ser purificados, estudados, e administrados em dosagens precisas, que não variam com a fonte ou a idade do material (LI & VEREDAS, 2009). Apesar da grande euforia pela comercialização de bioativos, somente 70 anos depois, em 1897, a empresa Bayer lançava o ácido acetil salicílico (aspirina[®]), um fármaco sintético inspirado no ácido salicílico isolado da árvore *Salix alba* (salgueiro)(BARROS, 2010).

As pesquisas farmacêuticas tiveram o seu auge na década de 90 depois que o professor Alexander Fleming descobriu a penicilina, um antibiótico produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum* capaz de matar culturas de *Staphylococcus* (FLEMING, 1929). O sucesso da penicilina na Segunda Guerra Mundial e no tratamento de infecções como a gonorreia e a conjuntivite levou a um intenso “screening” por micro-organismos produtores de bioativos. Com isso, surgiram as primeiras empresas químicas-farmacêuticas mundialmente conhecidas como a Merck, Eli Lilly & Co., Pfizer e Squibb.

Em 1964 várias classes de antibióticos, tais como, clortetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, eritromicina, rifamicina, lincomicina, cefalosporina C, vancomicina, eritromicina e o ácido nalidíxico foram descobertas, além de agentes antifúngicos (anfotericina B e nistatina) e antitumorais (daunorrubicina) (STROH, 2000). A aplicação terapêutica de metabólitos extraídos de micro-organismos expandiu-se para agentes imunossupressores, combate ao colesterol e diabete, anti-helmínticos, antiparasitários, antimalariais e até anticancerígenos. Desta forma, ao

final da década de 90, cerca de 80% dos medicamentos comercializados derivavam de produtos naturais (CLARDY et al., 2006).

1.2. Produtos naturais na atualidade

Com um histórico tão bem sucedido é de se esperar que os bioativos produzidos por micro-organismos fossem o cerne da pesquisa farmacêutica. Entretanto, muitas empresas eliminaram suas pesquisas com produtos naturais na última década (LI & VEREDAS, 2009).

O desenvolvimento do processo produtivo e a transposição da escala laboratorial para piloto e desta para a escala industrial são etapas críticas, pois os micro-organismos são afetados por variáveis desconhecidas ou mais difíceis de serem controladas, dificultando sua reprodução em grande escala (BNDES, 2013). Além do mais, o processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de um medicamento natural é caracterizado como um dos mais exigentes, custosos e longos entre todos os setores da economia (BNDES, 2009).

Desde a etapa de “screening” até a comercialização de um novo medicamento são necessários ao menos nove anos, podendo chegar a 15 anos, dependendo da classe do medicamento (BNDES, 2009).

Estima-se que as indústrias farmacêuticas que investem em produtos naturais destinam ao menos 10% das vendas de todos os seus medicamentos apenas em atividades de P&D (BNDES, 2013). De acordo com a revista Forbes Pharma & Healthcare, uma empresa de porte pequeno gasta em média 350 milhões de dólares para lançar no mercado um único composto bioativo. Entretanto, as grandes empresas que lançaram no mercado de oito a 13 medicamentos nos últimos 10 anos, gastaram cerca de 5 bilhões de dólares (Herper, 2013). A tabela 1 mostra o número de novos bioativos lançados no mercado, assim como o custo em pesquisa e desenvolvimento ao longo de 10 anos e o investimento médio por remédio comercializado.

Tabela 1- Investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento

	Empresa Farmacêutica	Número de novos medicamentos	Custo em P&D por 10 anos (\$MIL)	Custo em P&D por medicamento (\$ MIL)
1	Abbott	1	13183	13183
2	Sanofi	6	60768	10128
3	AstraZeneca	4	38245	9561
4	Hoffmann-La Roche	8	70928	8866
5	Pfizer	10	77786	7779
6	Wyeth	3	22702	7567
7	Eli Lilly	4	26710	6678
8	Bayer	5	33118	6624
9	Schering-Plough	3	18845	6282
10	Novartis	10	60727	6073
11	Takeda	4	24132	6033
12	Merck&Co	9	49133	5459
13	GlaxoSmithKline	11	57595	5236
14	J&J	13	67624	5202
15	Novo Nordisk	2	9251	4625

Fonte: Herper, M.: Forbes Pharma & Healthcare (2013) Adaptado

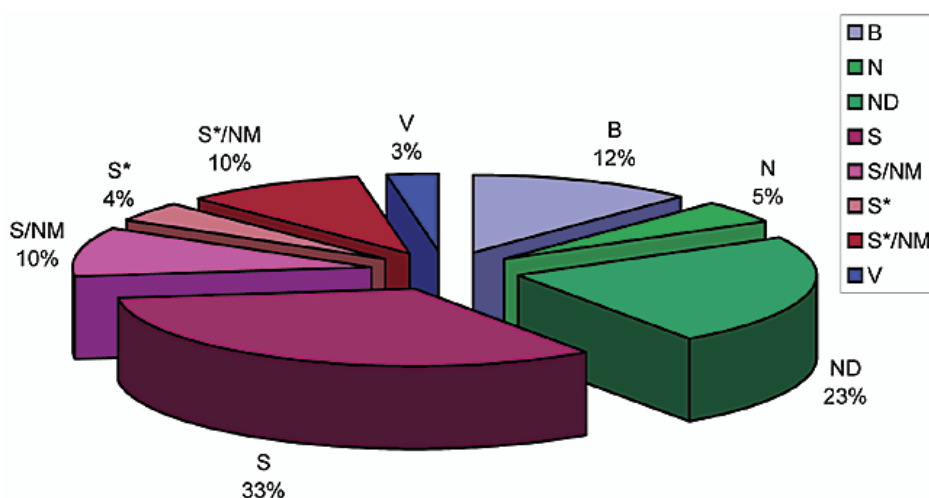
Apesar do alto investimento, ainda é rentável investir em produtos naturais. Muitos fármacos de origem natural têm sido aprovados para o tratamento de doenças neurológicas, infecciosas, cardiovasculares, imunológicas, inflamatórias além de vários tipos de câncer, ou seja, estes fármacos englobam as doenças humanas mais comuns. Por exemplo, a empresa farmacêutica Bristol-Myers Squibb (BMS) lançou um inibidor mitótico utilizado na quimioterapia (Paclitaxel), obtido da casca da árvore *Taxus brevifolia* e vendeu cerca de 1.6 bilhões de dólares no primeiro ano (WON CHIN et al, 2006). Outro bioativo, o docetaxel, utilizado no tratamento do câncer de mama metastático após falha de quimioterapia, foi registrado pela Sanofi-Aventis com o nome Taxotere® e rendeu a empresa uma receita de três bilhões de dólares em 2002 (WON CHIN et al, 2006).

Recentemente, com o advento de novas tecnologias na área da biotecnologia (a *metagenômica* - análise genômica do micro-organismo em seu ambiente por técnicas independentes de cultivo; a *genômica* - sequenciamento genético, a *proteômica* - identificação e quantificação de proteínas, a *metabolômica* - identificação e quantificação do conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo; a *engenharia metabólica* - propõe estratégias para aumentar a produção dos biocompostos e a *síntese de peptídeos* – peptídeos bioativos quimicamente sintetizados e modificados de forma a melhorar sua estabilidade a atividade *in vivo*), vários fármacos de origem natural tendem a surgir no mercado.

Um estudo mostrou que 20 compostos obtidos a partir de produtos naturais foram aprovados entre 2005 a 2007, sendo cinco pertencentes a novas classes: Exenatida (nome comercial: Byetta - Eli Lilly), para o tratamento de diabetes tipo 2; Ziconotida (uma alternativa à morfina); Ixabepilona (nome comercial: Ixempra - Bristol-Myers Squibb), para tratamento de câncer de mama; *Retapamulina* – *antibiótico* e Trabectedina, usado no tratamento de câncer nos sarcomas de tecidos moles do tipo avançado, após tratamento com outros fármacos não resultar efetividade (HARVEY, 2008).

Uma análise recente da origem dos medicamentos mostrou que os produtos naturais ou medicamentos derivados de produtos naturais ainda compreendem 28% de todas as Novas Entidades Químicas (NEQs) lançadas no mercado. Além disso, mais 24% representam fármacos sintéticos ou semi-sintéticos, com o farmacóforo baseado em um produto natural. Esta percentagem combinada (52% de todas NEQs) sugere que os produtos naturais são fontes importantes de novos medicamentos e também compostos adequados para modificações adicionais durante o desenvolvimento de fármacos. (WON CHIN et al, 2006). O esquema a seguir mostra como os fármacos estão divididos quanto a sua origem (Figura 1).

Figura 1 - Divisão dos fármacos quanto a sua origem



B: biológico – peptídeo ou proteína isolado de um organismo e produzido por biotecnologia.

N: produtos naturais

ND: derivado de um produto natural com modificação semi-sintética.

NM: produto natural mimetizado

S: fármacos totalmente sintéticos.

S*: totalmente sintética, mas o farmacóforo baseado em um produto natural.

V: vacina.

Fonte: Newman e Cragg (2012).

Dentre os produtores de metabólitos secundários de interesse comercial, os actinomicetos têm provado ser uma fonte abundante de produtos naturais descobertos até hoje, mostrando um inestimável valor econômico e biotecnológico. O grupo mais representativo são as bactérias do gênero *Streptomyces* que sozinhas foram responsáveis pela maioria das moléculas bioativas comercializadas nos anos de 1950 até 2000. Esse enorme potencial biossintético ainda permanece insuperado (BÉRDY, 2005).

1.3. Bactérias do gênero *Streptomyces*

O surgimento das primeiras bactérias fotossintetizante a 3.5 bilhões de anos atrás modificou a atmosfera do nosso planeta. A presença de oxigênio livre criou novas possibilidades de vida. Logo, uma diversidade bacteriana dominava a Terra. Entretanto, os primeiros estreptomicetos só surgiram há 450 milhões de anos, dando origem a todas as espécies de *Streptomyces* conhecidas atualmente (CHATER, 2006). Acredita-se que o estímulo para o desenvolvimento foi à colonização da Terra por plantas verdes há cerca de 550 milhões de anos, uma vez que esses micro-organismos utilizam as plantas em decomposição como sua principal fonte de energia. Os micélios em forma de hifas filamentosas e ramificadas penetram e

liberam enzimas como, por exemplo, celulase, xilanase e quitinase, sendo esta última utilizada como supressor da parede celular fúngica quando havia competição (CHATER et al, 2006).

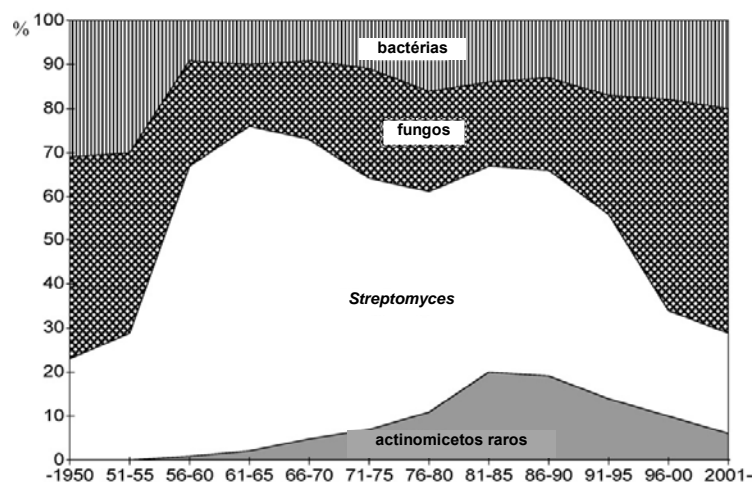
Nessa época, a fragmentação de hifas era a única forma de dispersão da espécie. Contudo, foi o surgimento dos artrópodes que possivelmente exerceu grandes pressões seletivas sobre a evolução dos *Streptomyces*, tais como a capacidade de esporular e colonizar lugares mais distantes (MUELLER & GERARDO, 2002). Atualmente o gênero coloniza não somente as plantas e o solo, mas está presente também no ambiente marinho em sedimentos, algas e esponjas (BLUNT et al., 2013).

Com organização filamentosa e produtores de cadeias de esporos semelhantes à conídeos, os estreptomicetos foram por muito tempo confundidos com fungos filamentosos. Somente em 1942, Waksman & Henrici classificaram o gênero como pertencentes ao filo dos Actinomicetos, classe de bactérias gram-positivas que possuem o DNA com alto teor de G+C (EMBLEY et al, 1994).

O interesse de Waksman pelo gênero *Streptomyces* estava diretamente relacionado à descoberta da estreptomicina, um potente antibiótico contra tuberculose isolado da espécie *S. griseus*, trabalho que lhe rendeu o prêmio Nobel em 1952 (CHATER, 2006).

Nas décadas seguintes houve uma explosão de antibióticos isolados de diferentes espécies de *Streptomyces*. Em 1940 eram apenas 10 a 20 compostos, em 1950 eram 300 a 400, em 1960, foram aproximadamente 1000 e em 1970 já eram mais de 2500 antibióticos conhecidos, representando cerca de 70-80% de todo fármaco comercializado (BÉRDY, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição dos antibióticos descobertos até 2001, de acordo com sua origem



Fonte: Bérdy (2005)

É difícil descrever todos os antibióticos comercializados que foram isolados do gênero *Streptomyces*. Entretanto, Scheffler e colaboradores relatam os antimicrobianos que estão em fase de análise clínica no ano de 2013 (Tabela 2).

Além dos antibióticos, vários pesquisadores isolaram outros compostos bioativos produzidos por *Streptomyces*, tais como antitumorais, antivirais, antiparasitários, anti-inflamatórios e enzimas.

Com isso, ao final do ano de 2002 mais de 22.000 bioativos (incluindo antibióticos) foram publicados e patenteados. Atualmente, o número exato de bioativos microbianos é indeterminado, mas estima-se algo em torno de 200.000 a 250.000 compostos (MILIND et al., 2001). A Tabela 3 mostra alguns medicamentos comercializados e o bioativo isolado das mais diversas espécies de *Streptomyces*, assim como a empresa que os patenteou.

Em relação aos bioativos conhecidos, os compostos β -lactâmicos representam, ainda hoje, um dos grupos de fármacos mais importantes, tanto do ponto de vista terapêutico como comercial. Dados relativamente recentes indicam que a comercialização desta classe de compostos corresponde a aproximadamente 60% do mercado mundial de antibióticos, com destaque para penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas derivadas de compostos naturais produzidos por fungos filamentosos e por várias espécies de *Streptomyces* (TIWARI, 2012).

Tabela 2 - Antibióticos com o princípio ativo isolado do gênero *Streptomyces* que estão em análise clínica.

Antibiótico	Empresa (origem)	Espécie	Descrição	Fase
Daptomycin	Cubist Pharmaceutical (EUA)	<i>S. roseosporus</i>	Infecções de tecidos moles e pele por bactérias resistentes	Registrado
Dalbavancin	Pfiser (EUA)	<i>S. fulvissimus</i>	Infecções de tecidos moles e pele por bactérias resistentes	Pré-registro
Telavancin	Theravance (EUA)	<i>S. telavancin</i>	Tratamento de infecções complicadas da pele e pneumonia	Fase III
Oritavancin	Targanta Therapeutics (Canadá)	<i>S. orientalis</i>	Infecções de tecidos moles e pele por bactérias gram-positivas resistentes	Fase III
Ramoplanin	Pfiser (EUA)	<i>S. fungicidicus</i>	Age contra infecção nosocômial e enterococos resistentes	Fase III
Ramoplanin	Oscient Pharmaceuticals (EUA)	<i>S. macrosporeus</i>	Tratamento de diarreia causada por <i>Clostridium difficile</i>	Fase II
RPR106972	Grant & Appelbaum, P.C. (EUA)	<i>S. pristinaespiralis</i>	Contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas aeróbias	Fase II
Efiprestin	Sanofi Aventis (França)	<i>S. avermitilis</i>	Infecções por bactérias Gram-positivas	Fase II
Lyoistaphin	Biosynexus (EUA)	<i>Streptomyces</i> sp	Infecções por <i>Staphylococcus</i> sp	Fase II
WAP8394A₂	aRigen (Japão)	<i>Streptomyces</i> sp	Age contra infecções por <i>S. aureus</i> resistente	Fase I
LBM4155	Pfiser (EUA)	<i>S. griseus</i>	Tratamento de infecções do trato respiratório e pele	Fase I
Arylomycin1	Elanco (USA)	<i>S. scabies</i>	Antibiótico contra <i>Enterococcus faecium</i>	Pré-clínico
AC98-64466	Pfiser (EUA)	<i>S. hygroscopicus</i>	Infecções por bactérias Gram-positivas	Pré-clínico
Muraymycin7	Fujisama Pharmaceutical Co. (Japão)	<i>Streptomyces</i> sp	Combate a micro-organismos resistentes	Pré-clínico
Platensimycin10	Affinium Pharmaceuticals (Canadá)	<i>Streptomyces</i> sp	Tratamento de tuberculose por <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Pré-clínico

Fonte: Scheffler et al (2013) Adaptado

Tabela 3 - Principais fármacos com o princípio ativo isolado do gênero *Streptomyces*.

Nome Comercial	Princípio ativo	Empresa fabricante	Utilização	Espécie produtora	Ref.
Antimicina	Antimicina A	Ibercare	Bronquite, diarreias, pneumonia, salmoneloses e fungicida.	<i>S. antibioticus</i>	Chen et al. (2005)
Blenoxano®	Bleomicina A ₂	Bristol	Carcinoma e linfoma	<i>S. verticillus</i>	Barreiro et al. (2009)
Cefalexina	Cefalexina	DSM Pharmaceuticals	Infecções respiratórias, da pele, dentárias, urinárias, faringites, otites e sinusites.	<i>S. lactamdurans</i>	DSM (2012)
Clavulin®	Ácido Clavulânico	Merck	Inibição da quebra do anel β-lactâmico	<i>S. clavuligerus</i>	Birnbaum et al. (1978)
Cloridrato de Daunorubicina	Daunorubicina	Pharmacia & Upjohn	Tratamento de leucemia	<i>Streptomyces</i> sp	Barreiro et al. (2009)
Coccifin	Coccidicida	Ouro Fino	Antiparasitário de coccídias	<i>S. avermitilis</i>	Davies (2011)
Cyamycin LA® 20%	Xiamicina	Bayer	Contra HIV e Antibiótico	<i>Streptomyces</i> sp	Xuefeng et al. (2013)
Dectomax	Doramectina	Pfiser	Anti-helmíntico e inseticida	<i>S. hygrosopicus</i> sub sp. <i>aureolacrimosus</i>	Mishima et al. (1983)
Desferal	Desferal	Novartis®	Quelação do ferro	<i>S. pilosus</i>	Chung (1986)
Doxifin	Doxiciclina (oxitetraciclina)	Ouro Fino	Tetraciclina semi-sintética mais lipofílica. Garante ótima distribuição e maior penetração nos fluidos e tecidos orgânicos	<i>S. rimosus</i>	Petkovic et al. (2006)
Estreptomycin	Estreptomycin	Wyeth consumer	Potente antibiótico para tuberculose	<i>S. griseus</i>	Waksman et al (1942)
Etna®	Trifosfato trissódico de uridina	Laboratório ETNA	Doença dos nervos periféricos	<i>S. microflavus</i>	Milind et al. (2001)
Humatin	Sulfato de paromomicina	Pfiser	Infecções severas causadas por <i>E. coli</i> e Leishmaniose	<i>S. krestomuceticus</i>	Davidson et al (2009)
Iberol®	Desferrioxamine	IBEROL	Anemia ferropriva	<i>Streptomyces</i> sp	Stapley (1982)

Continuação da Tabela 3

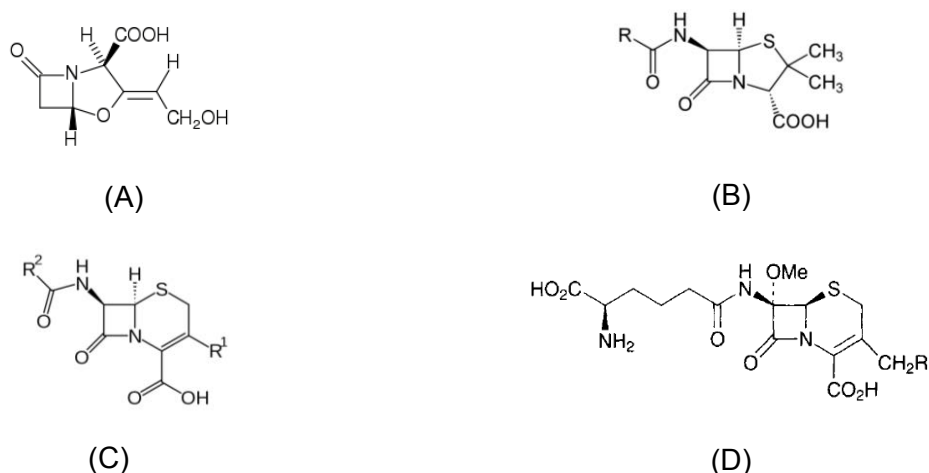
Nome Comercial	Princípio ativo	Empresa fabricante	Utilização	Espécie produtora	Ref.
Ivomec®	Ivermectina	Sanofi Aventis	Antiparasitário	<i>S. aoermitilis</i>	Koehn et al. (2005)
Kantrex	aminoglicosídeo	Pfiser	Tuberculose	<i>S. kanamyceticus</i>	Souza (2005)
Mefoxin	Derivado da Cefamicina C	Merck	Eficaz contra micro-organismos gram positivo e negativo, resistentes à penicilina	<i>S. clavuligerus</i>	Nagarajan (1971)
Quinaldina	Quinoline-2-methanol	V&V Pharma Industries	Hipoglicemia e anestésico	<i>Streptomyces</i> sp AM 2431	Blunt et al. (2013)
Rubromicin	Griseorhodin A	Prati	Inibem a transcriptase reversa do HIV e a telomerase humana	<i>Streptomyces</i> sp JP95	Xuefeng et al. (2013)
Rumensin® 100 Premix	Monesina	Rumenpac	Auxilia na digestão da celulose no rumem	<i>Streptomyces</i> sp	Blunt et al. (2013)
Stromectol®	Avermectins®	Merck & Co	Anti-helmíntico e inseticida	<i>S. avermitilis</i>	Stapley (1982)
Synercid	Pristinamicina	Sanofi Aventis	Antibiótico (enterococos e estafilococos resistentes)	<i>S. pristinaespiralis</i>	Demain (1999)
Tetraciclina	Tetromicina	EMS	Atividade contra <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Leishmania major</i>	<i>S. axinellae</i>	Pimentel-Elardo et al. (2011)
Tienam®	Tienamicina	Merck & Co	Antibiótico amplo espectro	<i>S. cattleya</i>	Merck (1979)
Torisel	Temsirolimus	Pfiser	Tratamento do carcinoma renal avançado	<i>S. hygrosopicus</i>	Wyeth (2008)
Zolinza®	Vorinostat	Merck & Co	Tratamento de linfoma cutâneo quando a doença persiste ou piora	<i>S. hygrosopicus</i>	Singh et al. (2010)

1.4. *Streptomyces clavuligerus*

A espécie *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 foi isolada do solo da América do Sul e descrita por Higgins e Kastner em 1971. É uma bactéria gram-positiva pertencente ao filo das Actinobactérias. Seu nome está relacionado à forma em que suas hifas ramificadas dispõem os esporos: *clavula* em Latim significa pequena clava e o sufixo *-igerus* significa tendo; adjetivo *clavuligerus* tendo pequenas clavas. Os esporóforos são produzidos no micélio aéreo que consistem de uma rede de hifas ramificadas. Geralmente são suportados de um a quatro esporos em pequenas ramificações claviformes. As cadeias de esporos são formadas pelas segmentações dos esporóforos. Os esporos são oblongos a ligeiramente cilíndricos com paredes lisas e coloração cinza ao verde acinzentado. (HIGGENS et al. 1971).

S. clavuligerus produz vários compostos β -lactâmicos, com destaque para os antibióticos intermediários da rota biossintética da cefalosporina C (penicilina N, deacetoxicefalosporina C e deacetylcefalosporina C), a cefamicina C (CefC) e o ácido clavulânico (AC), um inibidor de ampla gama de β -lactamases produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas (BUTTERWORTH, 1984). As estruturas de AC, penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas estão apresentadas na Figura 3.

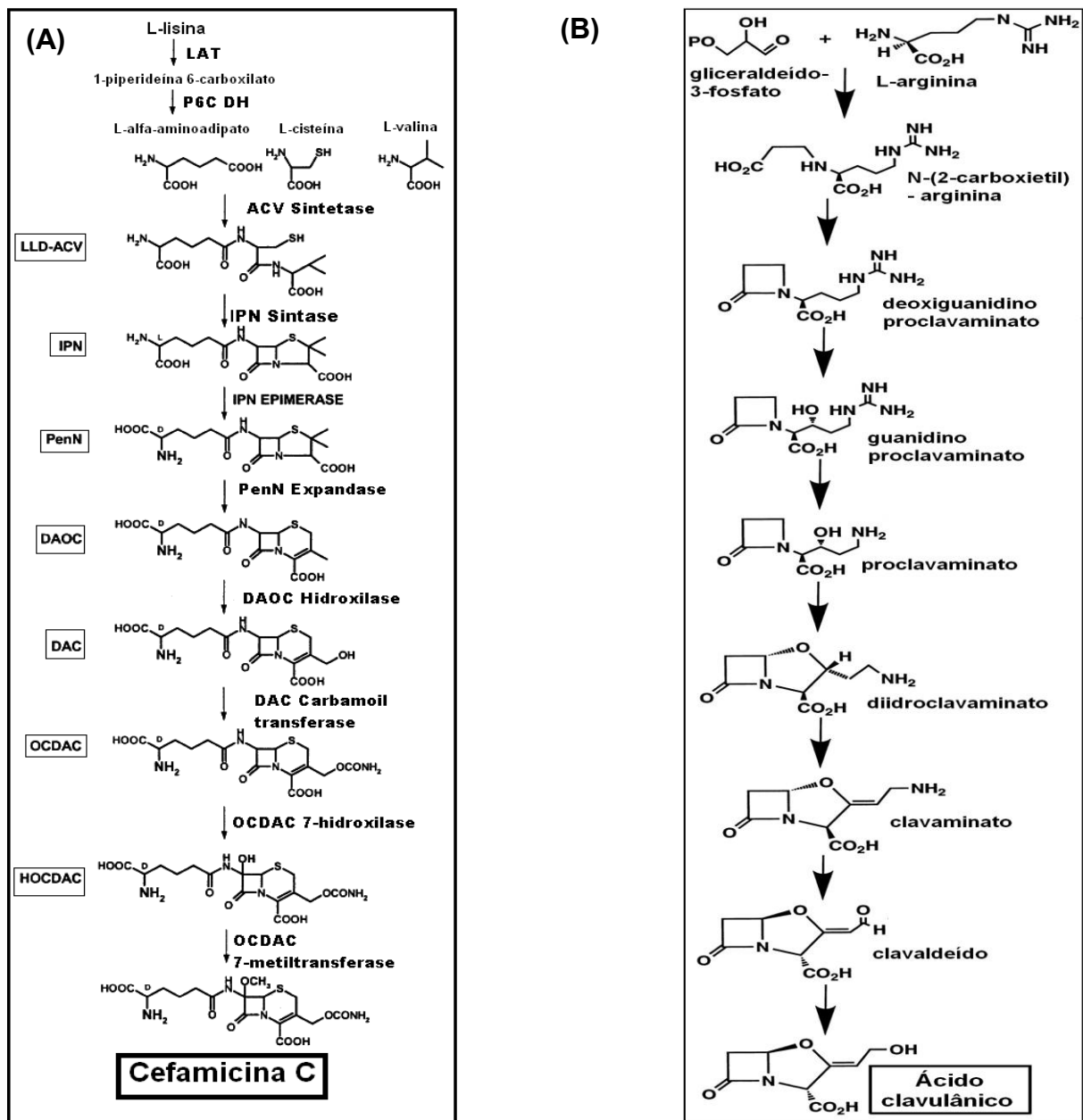
Figura 3 - Estrutura molecular de (A) ácido clavulânico (AC), (B) penicilinas (Pen), (C) cefalosporinas (CP) e (D) cefamicinas (em CefC, o radical R = OCONH₂).



Fonte: Liras (1999)

CefC e AC são os compostos β -lactâmicos mais importantes dentre os produzidos por *S. clavuligerus*. Ambos são produzidos simultaneamente em uma mesma fermentação, porém, através de rotas biossintéticas totalmente distintas (Figura 4) (LIRAS, 1999).

Figura 4 - Rotas biossintéticas de (A) cefamicina C (IPN – isopenicilina N; PenN – penicilina N; DAOC - deacetoxicefalosporina C; DAC - deacetilcefalosporina C) e (B) ácido clavulânico em *S. clavuligerus*.



Fonte: Liras (1999)

Enquanto a biossíntese de CefC é iniciada com a conversão de lisina em ácido α -aminoadípico que, juntamente com valina e cisteína, integra o tripeptídeo precursor de todos os antibióticos β -lactâmicos, a biossíntese de AC requer arginina e glicerol como precursores. CefC é um antibiótico (7-metoxi-cefalosporina) com estrutura semelhante à cefalosporina C (CepC), porém é mais potente e resistente a β -lactamases, sendo utilizada como matéria prima para a obtenção de vários antibióticos semi-sintéticos utilizados clinicamente (cefexetina, cefotetam, cefmetazole) (GOLDSTEIN e CITRON, 1988). O AC, por sua vez, é utilizado em sinergia com penicilinas e cefalosporinas (Clavulin[®]), atuando como bloqueador do sítio ativo de β -lactamases e evitando, assim, a inativação dos antibióticos (BRAKHAGE et al, 2005).

Assim como ocorre com a maioria dos metabólitos secundários, as rotas biossintéticas de AC e CefC são rigorosamente controladas por fatores intra e extracelulares por meio de mecanismos complexos de regulação. As produções destes compostos são indissociáveis, uma vez que suas sínteses são reguladas simultaneamente pelo mesmo elemento multifuncional *ccaR* ("cephamycin and clavulanic acid Regulator"), codificado pelo gene *ccaR*, localizado no agrupamento de genes da biossíntese de CefC (CHALLIS e HOPWOOD, 2003).

1.5. Influência da composição do meio de cultura na biossíntese de cefamicina C

Vários autores sugerem que a natureza e a concentração de determinados nutrientes no meio de cultura, tais como C, N, P, S e sais, além de substâncias integrantes da rota biossintética, podem favorecer a produção de maiores quantidades de um ou outro composto (CHEN et al., 2002), assim como também, afetar a velocidade de crescimento permitindo a obtenção de maiores valores de produção específica (PUMBRIDGE, 2009).

Em *S. clavuligerus*, a via biossintética de CefC e AC são fortemente reguladas pelas fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultivo (AHARONOWITZ et al. 1978). Desse modo, é possível manipular o meio de cultura para obter altas concentrações de cefamicina C (ROMERO et al. 1984).

1.5.1. Fonte de Carbono

Uma característica particular de *S. clavuligerus* é a incapacidade de utilizar a glicose como fonte de carbono, além de outros açúcares como D-galactose, D-manitol, D-ribose, lactose, arabinose, ramnose, frutose, xilose, rafinose, celobiose, sucrose e celulose. (HIGGENS et al. 1971; AHARONOWITZ et al. 1978).

Um estudo realizado por Aharonowitz e Demain em 1978 mostrou que a produção de cefalosporinas por *S. clavuligerus* foi significativamente maior quando a fonte de carbono utilizada foi glicerol, maltose ou amido solúvel, obtendo produções específicas de 74, 108 e 200 µg/mg, respectivamente. Estes autores observaram que o amido solúvel agiu como uma fonte de carbono limitante, devido a sua hidrólise lenta, levando a uma produção específica alta e associada ao crescimento.

Chen et al. 2002 realizaram cultivos contendo glicerol como fonte de carbono e observaram que a produção de ácido clavulânico foi de 115 mg/L em frascos agitados, chegando a 250 mg/L em batelada alimentada. Bellão et al. 2013 utilizaram glicerol e amido solúvel como fontes de carbono e avaliaram a produção de AC e CefC. Estes autores observaram que todos os cultivos onde se utilizou glicerol, a produção de ácido clavulânico foi maior que a produção de CefC. Assim como na presença de amido, a produção de CefC foi duas vezes maior que AC.

1.5.2. Aminoácido L-lisina

O aminoácido L-lisina é amplamente investigado desde o início da década de 80. *S. clavuligerus* metaboliza a lisina por meio de duas vias diferentes: uma para o crescimento (via cadaverina) e a outra para a biossíntese de cefamicina C (via lisina α -aminotransferase (LAT) a ácido α -aminoadípico) (DEMAIN, 2006). Por exemplo, um mutante de *S. clavuligerus* sem a enzima LAT não é capaz de produzir CefC, entretanto, a lisina ainda é utilizada para o crescimento (ROMERO et al 1984). Em actinomicetos, a síntese de LAT ocorre principalmente na fase de crescimento, mas a enzima é ativa durante a fase estacionária (idiofase) (DEMAIN, 2006).

lisina>>>cadaverina>>>[1-piperideina] >>> δ -aminovalerato+CO₂+H₂O+NH₂

lisina	cadaverina	1-piperideina
descarboxilase	aminotransferase	deidrogenase

lisina >>>> 1-piperideina-6-carboxilato >>>> ácido α -aminoadípico

lisina 6-amino-	1-piperideina-6-carboxilato
transferase	desidrogenase

O ácido α -aminoadípico (AAA) é um precursor direto da cefamicina C, cefalosporina C, e de outros compostos β -lactâmicos e a sua disponibilidade é um passo limitante na biossíntese destes antibióticos (RICO et al. 2001). Desta forma, a adição de L-lisina no meio de cultura torna-se de extrema importância. Mendelovitz e Aharonowitz (1982) foram os primeiros a demonstrar que a lisina exógena (10 mM e 20 mM) estimulou de 50-100% a produção de antibióticos β -lactâmicos. Fang e colaboradores (1996) obtiveram um aumento de até 500% na produção de CefC por *S. clavuligerus* adicionando altas concentrações de lisina no meio de cultura (50 mM a 150 mM). Rius et al. (1996) também investigaram o efeito da adição de lisina no meio de cultura e concluíram que altas concentrações do aminoácido aumentam a produção de CefC de duas maneiras diferentes: como substrato de LAT, proporcionando o ácido α -aminoadípico e como indutor de LAT, produzindo ainda mais AAA. Um estudo realizado por Leitão et al 2001 mostrou que a adição de lisina no meio de cultura elevou a produção de CefC por *Nocardia lactamdurans*, sendo mais significativa nas primeiras horas do processo fermentativo, entretanto, este efeito positivo da lisina foi dependente da disponibilidade da fonte de carbono no meio de cultura. Estes autores também investigaram o efeito da lisina exógena na expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de CefC e observaram que apesar do consumo de lisina, o nível de RNA mensageiro destes genes não foi afetado, indicando, portanto, que este aminoácido é necessário não somente para a biossíntese de antibióticos, mas também como fonte de carbono ou nitrogênio.

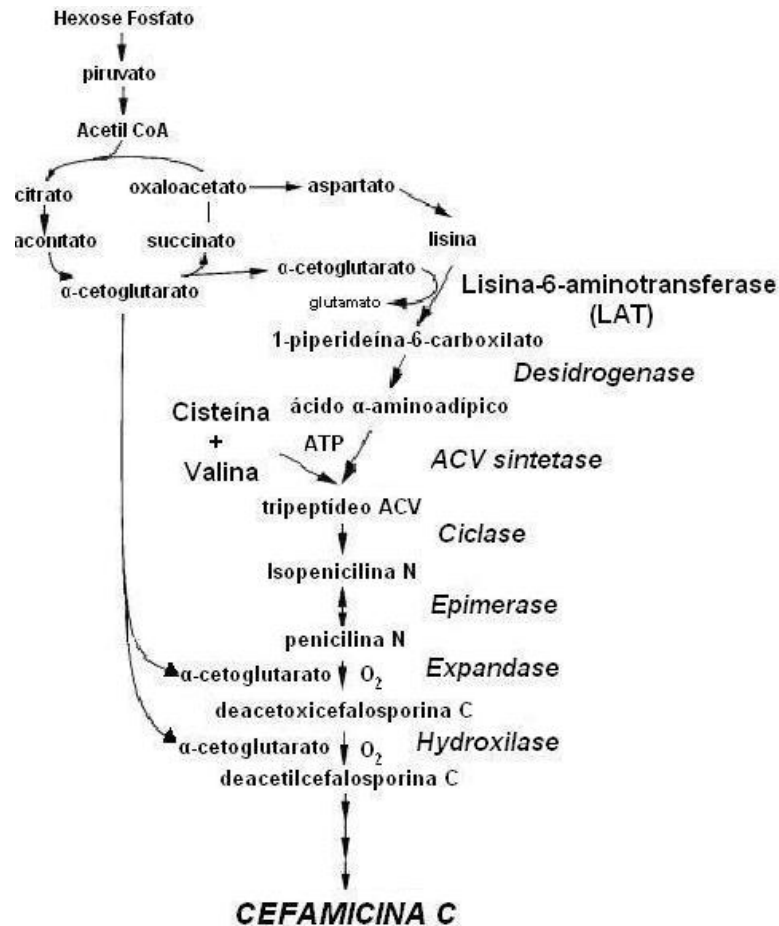
1.5.3. Alfa-cetoglutarato

Outro composto que exerce um papel importante na biossíntese de cefamicina C é o α -cetoglutarato, que atua como cofator da primeira enzima da rota biossintética, LAT, responsável pela transformação de lisina em ácido α -

aminoadípico. Dados de K_m obtidos *in vitro* por Khetan et al. (1999), relativos à afinidade da enzima LAT por lisina e α -cetogluturato, e dados da concentração intracelular destes compostos ao longo do cultivo de *S. clavuligerus* em meio sintético, sugerem que ambas as substâncias atuam conjuntamente na regulação da biossíntese de cefalosporinas. A Figura 5 mostra como o α -cetogluturato participa da biossíntese de CefC. Estes autores também observaram que a exigência da enzima LAT pelo α -cetogluturato como acceptor do grupo amino parece ser bem específica. A substituição do α -cetogluturato pelo piruvato, nas mesmas concentrações, reduziu em mais de 90% a atividade da LAT. Outro dado interessante obtido por esses autores é a concentração intracelular de α -cetogluturato durante as fases de crescimento microbiano. Durante a fase exponencial, a concentração medida variou entre 0,3 a 0,7 mM, enquanto que na fase estacionária esta concentração foi de 1,0 a 1,3 mM. Esses resultados corroboram com Demain (2006) que afirma que a enzima LAT é ativa durante a idiofase.

Aharonowitz et al 1978 também estudaram o efeito de ácidos orgânicos como fonte de carbono na biossíntese de cefalosporinas. Dentre os vários compostos avaliados, a produção de CefC por *S. clavuligerus* foi observada apenas com fumarato, succinato e α -cetogluturato obtendo uma produção específica de 86, 164 e 344 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente.

Figura 5 - Via biossintética de Cefamicina C em *Streptomyces clavuligerus*: L-lisina, cisteína e valina são os três precursores primários; α -cetogluturato é usado como co-fator de três enzimas da via.



Fonte: Kethan et al. (1999) adaptado

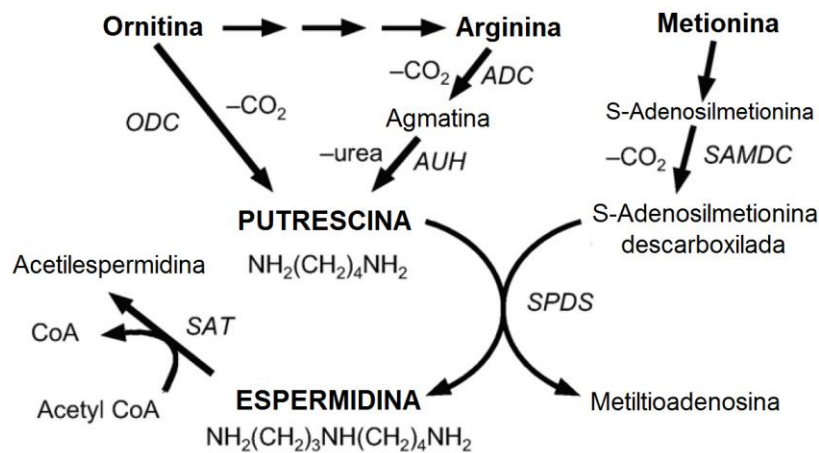
1.5.4. Diaminas

Tanto em animais como em bactérias, as diaminas são moléculas importantes que regem a proliferação, manutenção e apoptose celular (BASUROY e GERNER, 2006). Vários autores descrevem a correlação entre os níveis de diaminas e perturbações fisiológicas, tais como seus efeitos protetores observados em resposta ao estresse ambiental, incluindo metais pesados (BOUCHEREAU et al., 1999; KAKKAR et al., 2002; URANO et al., 2003; ALCÁZAR et al., 2006 e GROPPA et al., 2008). Pillai e Shankel (1997) estudaram o potencial antimutagênico das diaminas e

confirmaram que a putrescina têm alta capacidade de reduzir mutações espontâneas. Devido as suas cargas positivas, as diaminas ligam-se as macromoléculas, tais como DNA, RNA e proteínas, e, portanto, estão envolvidas na regulação, expressão e tradução gênica (KUSANO et al. 2008). Berwanger et al., 2010 mostram que elas são capazes de modular a força eletrostática da interação proteína-proteína afetando as interações DNA-proteína. Estudos mais recentes têm indicado que as diaminas podem interagir com o DNA e estabilizar sua estrutura e conformação, agindo diretamente na expressão dos genes (BUSSE, 2011). De acordo com Groppa e Benavides (2008) e Janicka-Russak et al. (2010) as diaminas também estabilizam macromoléculas e proteínas além de atuar indiretamente na seletividade da membrana plasmática e a longo prazo contribuem para manter o equilíbrio de cátions e ânions no citoplasma.

Segundo Altenburger et al., (1997) e Wortham et al., (2007) as diaminas mais abundantes em bactérias são a putrescina, espermidina e cadaverina (menos abundante). A via de síntese da putrescina em procarioto é mostrada na Figura 6. Estes autores descrevem várias funções para as diaminas bacterianas: (1) são componentes frequentes da membrana exterior de bactérias Gram-negativas; (2) estão envolvidas na biossíntese de sideróforos (peptídeos de síntese não ribossômica com altíssima afinidade por ferro); (3) são importantes para a resistência a ácidos; (4) protegem contra a toxicidade do oxigênio; (5) agem na sinalização da diferenciação celular e, (6) são essenciais para a formação da placa bacteriana (biofilme).

Figura 6- Síntese de putrescina por meio de duas vias: (1) ornitina – também ocorre em célula eucarióticas e (2) arginina – apenas em procariotos.



ODC: ornitina descarboxilase; ADC: arginina descarboxilase; AUH: agmatina ureohidrolase; SAMDC: S-adenosilmetionina.

Fonte: Igarashi e Kashiwagi (2010)

Em actinomicetos produtores de antibióticos β -lactâmicos, como por exemplo, *S. clavuligerus* e *N. lactamdurans*, as diaminas são capazes de induzir a produção de CefC (MERCK, 1976). Aharonowitz et al. (1983) observou que a adição do ácido diaminopimélico no meio de cultivo aumentou os níveis dos aminoácidos envolvidos na biossíntese de CefC por *S. clavuligerus*, estimulando a produção do antibiótico. Um estudo realizado por Leitão e colaboradores (1999) mostrou um aumento de 100% na produção de CefC por *N. lactamdurans* em culturas suplementadas com 2,5 g/L de 1,3 diaminopropano. Estudos genéticos realizados pelos mesmos pesquisadores mostraram que esta diamina induz as enzimas LAT e 1-piperideína-6-carboxilato desidrogenase (P6C desidrogenase), responsáveis pela conversão da lisina em ácido α -aminoadípico, além de aumentar os níveis da enzima P7 responsável pela metoxilação da cefamicina. Outro resultado interessante indica que 1,3 diaminopropano age induzindo a expressão gênica e estabilizando o RNA mensageiro responsável pela enzima LAT.

Leitão et al. (1999) também estudaram o efeito de putrescina e cadaverina na biossíntese de CefC e concluíram que ambas afetaram positivamente a produção de antibiótico, nas concentrações de 0,2 g/L e 5,0 g/L, respectivamente. Estes resultados indicam que a biossíntese de CefC é estimulada por diferentes diaminas, obtendo melhores resultados com diaminas de três carbonos.

Kagliwal et al. (2009) avaliaram a biossíntese de CefC por *N. lactamdurans* em cultivo sólido e obtiveram uma produção três vezes maior quando adicionado 1,3 diaminopropano. Estudos recentes mostraram que a produção de CefC por *S. clavuligerus* aumentou em mais de 100% quando o meio de cultura base foi acrescido de 1,3 diaminopropano e lisina (LEITE et al., 2013). Os autores concluíram ainda que a adição de 0,4 g/L de putrescina afetou negativamente a biossíntese de CefC. Os mesmos resultados foram obtidos por Martín et al. (2011) que observou, em 72 horas de processo, um aumento de 100% na produção de penicilina por *P. chrysogenum* quando o meio base foi suplementado com 5 mM de 1,3 diaminopropano ou espermidina. Entretanto, a adição de putrescina ou espermina, não afetou significativamente a produção do antibiótico β -lactâmico. Estudos posteriores mostraram que um dos efeitos de 1,3 diaminopropano e espermidina foi a capacidade de manter os níveis elevados de transcrição dos genes *pcbAB*, *pcbC* e *penDE*, responsáveis pela biossíntese de penicilina em *P. chrysogenum* (MARTÍN et al., 2012). Uma análise proteômica revelou que estas diaminas também são capazes de reprogramar o metabolismo deste micro-organismo levando a uma superprodução de penicilina (GARCÍA-ESTRADA et al., 2013).

Todos os trabalhos mencionados demonstraram a atuação individual dos compostos estimuladores da biossíntese de antibióticos β -lactâmicos no metabolismo microbiano. Entretanto, não existem estudos que relatam a influência conjunta destes compostos na produção de cefamicina C. No presente projeto foi proposta a investigação de meios de cultivos contendo um ou mais compostos estimuladores da biossíntese de cefamicina C por *S. clavuligerus*, visando aumentos na produção deste antibiótico β -lactâmico.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Explorar a influência conjunta dos compostos indutores da biossíntese de cefamicina C, tais como lisina, diaminas e α -cetoglutarato.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Avaliar a melhor fonte de carbono (amido ou maltose) na produção de cefamicina C por *S. clavuligerus* ATCC 27064;
- b) Selecionar as melhores composições dos meios de inóculo e produção (sintéticos, semi-sintéticos e complexos);
- c) Selecionar diaminas potencialmente qualificadas que induzam a produção de Cefamicina C;
- d) Determinar concentrações ótimas de L-lisina e diaminas que induzam a produção de Cefamicina C,
- e) Validar a melhor condição em biorreator de bancada;
- f) Realizar um estudo comparativo entre a linhagem selvagem e mutante com maior potencial produtivo obtido em nosso laboratório.

Com este estudo pretende-se buscar condições favoráveis de desenvolvimento microbiano que conduzam a melhorias na produção de cefamicina C pela linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

3. Materiais e métodos

3.1 Micro-organismos e forma de estocagem

Para o processo de produção de CefC foi utilizada a linhagem selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064 (BUTTERWORTH, 1984) e a linhagem mutante 45.41 obtida em nosso laboratório, por meio de mutagênese clássica com o agente metilmetanosulfonato (MMS) (ANTÔNIO et al. 2009). Os micro-organismos foram estocados na forma de esporos a -80°C em solução de glicerol a 20% v/v e na forma de células vegetativas (micélios) liofilizados em ampolas.

Escherichia coli ESS 2235 supersensível a antibióticos β -lactâmicos foi empregada como organismo teste. Esta linhagem gentilmente cedida pela Dra. Paloma Liras (Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade de León, León, Espanha) foi estocada em criotubos de 2 mL na forma de células vegetativas e armazenada em ultra freezer a -80°C .

3.2 Meios de Cultura e Alimentação

A bactéria teste *E. coli* ESS 2235 foi cultivada em Meio Agar Nutriente, indicado pela ATCC, contendo (em g/L) peptona (5,0), extrato de carne (3,0), agar (15,0), pH $7,0 \pm 0,1$. Esporos de *S. clavuligerus* foram obtidos em meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996), contendo (em g/L) glicose (5,0), caseína hidrolisada ácida (1,0), extrato de levedura (0,5), extrato de carne (0,5), tampão biológico MOPS (21,0), ágar (20,0), pH $7,0 \pm 0,1$. O micro-organismo foi cultivado por 7 a 10 dias em estufa incubadora com temperatura controlada $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Os micélios liofilizados ou células provenientes de criotubos contendo suspensão de esporos ($\sim 10^8$ esporos/mL) das linhagens de *S. clavuligerus* ATCC 27064 e mutante 45.41, foram mantidos em solução crioprotetora 20% v/v glicerol, a -80°C , e reativados (ou germinados, no caso de esporos) em meio de reativação e/ou germinação contendo (em g/L) triptona (5,0), extrato de levedura (3,0), extrato

de malte (10,0) e tampão biológico MOPS (ácido 3-[N-Morpholino]-propanosulfônico) (21,0), pH $6,8 \pm 0,1$.

O meio de preparo de inóculo conteve os mesmos componentes essenciais do meio de produção (fontes de C e de N) para ambientar o micro-organismo previamente e, assim, minimizar a fase lag durante a fermentação principal. Na(s) alimentação(es) foram adicionadas fontes de C e N ou apenas C, suplementadas com soluções de sais e/ou elementos traços (Tabela 6).

3.2.1 Amido como fonte de carbono

De acordo com a literatura, o amido é uma fonte de carbono amplamente utilizada na produção de cefamicina C. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, mostraram que o amido é mais eficaz na produção de CefC, por *S. clavuligerus*, quando comparado ao glicerol, nas mesmas concentrações (Bellão et al., 2013). Meios de inóculo e produção definidos previamente em trabalhos anteriores, em nosso laboratório, foram utilizados como padrão na produção de CefC. O meio de preparo do inóculo continha (em g/L) amido (10,0), extrato bruto de semente de algodão – Proflo® (8,5), extrato de levedura (1,0), K_2HPO_4 (0,8), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,75), tampão biológico MOPS (21,0) e solução de sais concentrada (10,0 mL/L) contendo (em g/L) $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), pH $6,8 \pm 0,1$. A capacidade produtiva foi avaliada em cultivos submersos, em meio contendo (em g/L), amido (10,0), extrato filtrado de semente de algodão - Proflo® (8,5), extrato de levedura (0,5), lisina (30 ou 100 mM), K_2HPO_4 (1,75), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,75), CaCl (0,2), NaCl (2,0), MOPS (21,0), solução concentrada de sais (5,0 mL/L), e tiosulfato de sódio (1,0), adicionado após 30 horas de processo, pH $6,8 \pm 0,1$. Os meios de alimentação continham MOPS 21,0 g/L, solução de sais (5,0 mL/L), amido 10,0 g/L e lisina (30 ou 100 mM) ou apenas amido 10,0 g/L.

3.2.2 Maltose como fonte de carbono

A maltose foi testada para substituir o amido, uma vez que podemos analisar o seu perfil de consumo por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando uma coluna de açúcares.

Além da alteração da fonte de carbono, a formulação dos meios de inóculo (tabela 4) e produção (tabela 5) também sofreram modificações. Os meios foram classificados em sintéticos, semi-sintéticos e complexos. A tabela 7 mostra a combinação entre os meios de inóculo e produção. O tiosulfato de sódio (1,0 g/L), continuou sendo adicionado após 30 horas de processo.

Tabela 4 - Composição dos meios de inóculo.

Componentes	Quantidade (g/L)	SINTÉTICO	SEMI-SINTÉTICO	COMPLEXO
Maltose	10,0	X	X	X
Lisina	4,0	X	-	-
Glutamato de Na	5,5	X	-	-
Extrato de Levedura	1,0	-	X	X
Proflo® bruto	8,5	-	-	X
Proflo® filtrado	8,5	-	X	X
K₂HPO₄	0,8	X	X	X
MgSO₄·7H₂O	0,75	X	X	X
MOPS	21,0	X	X	X
Solução de sais^(a)	10,0 mL	X	X	X
Elementos traços^(b)	1,0 mL	X	-	-

(a) solução de sais (g/L): MnCl₂·4H₂O (1,0), FeSO₄·7H₂O (1,0), ZnSO₄·7H₂O (1,0)

(b) solução de elementos traços (g/L): CuSO₄·5H₂O (0,49), CoCl₂ (0,28), Na₂MoO₄(0,15)

Tabela 5- Composição dos meios de produção.

Componentes	Quantidade (g/L)	SINTÉTICO	SEMI-SINTÉTICO	COMPLEXO
Maltose	10,0	X	X	X
Lisina*	18,3	X	X	X
Extrato de Levedura	0,5	-	X	X
Proflo® filtrado	8,5	-	-	X
K₂HPO₄	1,75	X	X	X
MgSO₄·7H₂O	0,75	X	X	X
CaCl	0,2	X	X	X
NaCl	2,0	X	X	X
MOPS	21,0	X	X	X
Solução de sais^(a)	5,0 mL	X	X	X
Elementos traços^(b)	1,0 mL	X	X	-

* A quantidade de Lisina pode variar de acordo com os experimentos realizados alterando a concentração da fonte de N.

(a) solução de sais (g/L): MnCl₂·4H₂O (1,0), FeSO₄·7H₂O (1,0), ZnSO₄·7H₂O (1,0)

(b) solução de elementos traços (g/L): CuSO₄·5H₂O (0,49), CoCl₂ (0,28), Na₂MoO₄(0,15)

Tabela 6- Composição do meio de alimentação.

Componentes	Concentração (g/L)
Maltose	36,2
Lisina*	8,6
MOPS	21,0
Solução de sais^(a)	5,0 mL/L
Solução de elementos traços^(b)	2,0 mL/L

* A quantidade de Lisina pode variar de acordo com os experimentos realizados alterando a concentração da fonte de N.

(a) solução de sais (g/L): MnCl₂·4H₂O (1, FeSO₄·7H₂O (1,0), ZnSO₄·7H₂O (1,0)

(b) solução de elementos traços (g/L): CuSO₄·5H₂O (0,49), CoCl₂ (0,28), Na₂MoO₄(0,15)

Tabela 7- Combinação entre os meios de inóculo e produção.

Combinação	Meio de Inóculo	Meio de Produção
1	Complexo	Complexo
2	Complexo	Sintético
3	Complexo	Semi-sintético
4	Semi-sintético	Complexo
5	Semi-sintético	Sintético
6	Semi-sintético	Semi-sintético
7	Sintético	Complexo
8	Sintético	Sintético
9	Sintético	Semi-sintético

3.2.3 Fontes de Nitrogênio

Na composição geral dos meios de cultura podemos destacar três fontes de nitrogênio: L-lisina, Proflo® e Glutamato de Sódio. Entretanto, apenas o aminoácido L-Lisina foi empregado como fonte de nitrogênio padrão para análises de consumo, uma vez que além de participar da rota biossintética de CefC, está presente em todas as formulações, independentemente da fonte de carbono utilizada e da complexidade dos meios. O proflo e o glutamato de sódio são incorporados ao cultivo apenas em meios complexos e inóculos com maltose, respectivamente.

Para cada meio de fermentação utilizou-se uma concentração de L-lisina máxima (100 mM) e mínima (definida de acordo com as análises de consumo em HPLC, descritas no item 3.8).

3.2.4 Adição de Diaminas

As diaminas foram avaliadas como possíveis fonte de nitrogênio para o crescimento de *S.clavuligerus* e indutores da biossíntese de CefC. Foram utilizados os compostos 1,3 diaminopopropano 2,5 g/L e 5,0 g/L (GARCÍA-ESTRADA et al., 2013; MARTÍN et al., 2011; LEITÃO et al 1999); putrescina 0,2 g/L e 0,4 g/L (MARTÍN et al., 2011; LEITÃO et al., 1999) e o ácido diaminopimélico (DAP) nas

concentrações de 1,0 g/L e 2,0 g/L (AHARONOWITZ et al., 1983). Esses compostos foram adicionados na fermentação principal, no início do processo.

3.2.5 Adição de α -cetogluturato

Estudos anteriores já haviam demonstrado que a adição de ácidos orgânicos como fontes de carbono, elevaram a produção específica de cefalosporinas (AHARONOWITZ et al., 1978). Sendo o α -cetogluturato um co-fator de três enzimas da via de CefC, foram avaliados os efeitos da adição de diversas concentrações deste composto no início do processo fermentativo (Tabela 8). Foi realizada uma equivalência de carbonos entre α -cetogluturato e maltose, a fim de assegurar que o micro-organismo teria a mesma concentração de carbono (4,0 g/L) em todos os meios de cultivo. A concentração de lisina mante-se em 100 mM, pois o α -cetogluturato é co-fator da enzima LAT.

Tabela 8- Combinação entre o ácido α -cetogluturato e a maltose.

Combinação	Ácido α -cetogluturato (g/L)	Maltose (g/L)
1	0,00	10,00
2	3,75	7,50
3	7,50	5,00
4	11,25	2,50
5	15,00	0,00

3.3 Condições gerais do processo de cultivo

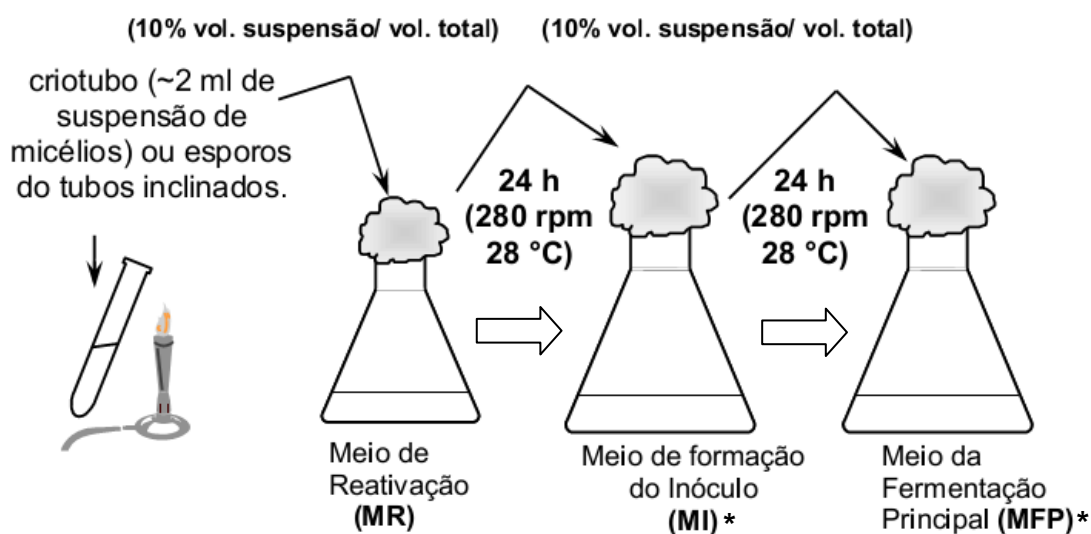
As etapas dos cultivos de *S. clavuligerus* em mesa rotatória estão esquematizadas na Figura 7. Esporos do micro-organismo foram primeiramente inoculados em um meio de reativação contendo (em g/L) triptona (5,0), extrato de levedura (3,0), extrato de malte (10,0), MOPS (21,0), pH $6,8 \pm 0,1$, por um período de 24 horas. Após a etapa de reativação a bactéria passa para o meio de preparo de inóculo por mais um período de 24 horas. Uma alíquota do meio de preparo de inóculo correspondente a 10% do volume do meio de fermentação principal foi

utilizada para iniciar a etapa de produção. No período de 36 a 48 h, conforme resultados de análise de açúcares, inicia-se a alimentação dos cultivos.

Para cultivos em mesa rotatória incubadora utilizou-se frascos Erlenmeyer (500 mL) que foram agitados a 260 rpm (5 cm excentricidade), com temperatura controlada em 28 °C. A capacidade produtiva foi avaliada em cultivos submersos, tipo batelada de 72 horas e no modo contínuo intermitente (volume constante de 45 mL, a uma taxa de diluição $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$), até 120 ou 144 horas. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

No caso de cultivo contínuo em biorreator (volume de trabalho 1,5L) manteve-se os controles de pH em 6.8, de temperatura em 28°C, do nível de DO em 50% com relação a saturação, e a taxa de aeração em 1vvm.

Figura 7 - Esquema geral do procedimento experimental utilizado em todos os cultivos de *S. clavuligerus* realizados mesa rotativo-incubadora.



* Os meios de inóculo (MI) e fermentação principal (MFP) foram alterados de acordo com a fonte de carbono utilizada e estão descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

3.3.1 Alimentação dos cultivos

Para cultivos contínuos intermitentes em mesa rotatória, o processo de retirada/alimentação de meio foi realizado a cada 24 horas, ou seja, a cada intervalo estabelecido retirava-se uma alíquota de meio fermentado e adicionava-se meio

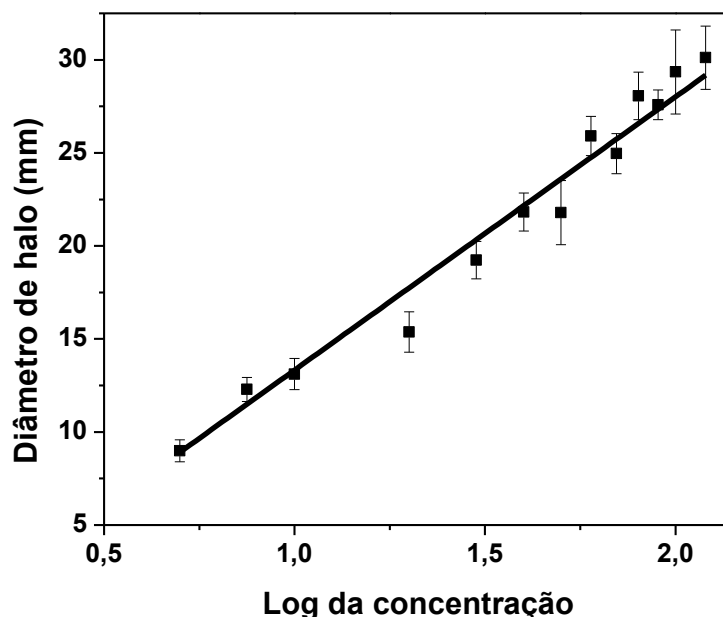
fresco. Para os cultivos em biorreator no modo contínuo, até 116 horas, a retirada e alimentação eram realizadas simultaneamente. O modo de cultivo foi submetido a uma taxa de diluição (D) igual a 0,0056, mantendo-se a alimentação da fonte de carbono em aproximadamente $0,2 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ e a de lisina em $0,05 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.4 Quantificação da biomassa

Cada alíquota de amostra foi submetida ao processo de centrifugação a 15.550 g durante 10 min a 4° C , utilizando uma centrífuga modelo 5810 R Eppendorf. O sobrenadante obtido foi armazenado em eppendorf e a biomassa foi submetida a dois processos de lavagem com água destilada, a fim de eliminar as impurezas residuais do meio de cultura. A concentração celular foi determinada como massa seca de células (g/L), após secagem em estufa a 105° C por 24 horas.

3.5 Quantificação de cefalosporinas totais

Devido à indisponibilidade do padrão de CefC, a dosagem deste composto foi realizada por meio de bioensaio utilizando como padrão CepC, devido à semelhança de halos de inibição produzidos por estes dois bioativos (LIRAS e MARTÍN, 2005). Nesse método, foi realizada uma curva de calibração utilizando-se de 5 a 120 mg/L de Cefalosporina C (CepC) sal de zinco (Sigma) em 24 replicatas para cada concentração. A quantificação de CefC foi definida em termos de unidades de CepC, onde 1 Unidade de Cefalosporina C (UCepC) corresponde à quantidade de CefC requerida para produzir uma zona de inibição igualmente à produzida por 1 mg de CepC. A curva de calibração e a equação para estimar a concentração de CefC está demonstrada na Figura 8.

Figura 8 – Curva de calibração para quantificação de cefamicina C

$$D_{Halo}(mm) = 14,68 \cdot \text{Log} [\text{CefC}] - 1,35$$

Para assegurar que as penicilinas produzidas ao longo da via de biossíntese de CefC não interferissem na análise, as amostras obtidas foram tratadas com a enzima Penase[®] (BD Difco[™]), 20 µL por ml de amostra, reagindo a 25° C por 20 min. Para os bioensaios foram utilizadas placas de Petri (150X15 mm) contendo 40 mL de Ágar Nutriente acrescidos de *E. coli* (1 mL por 100 mL de ágar, para absorvância = 1 a 600 nm de densidade ótica – DO) com seis poços de 5 mm diâmetro, por placa. Em cada poço, foram aplicados 20 µL de cada amostra tratada. As placas foram incubadas por 18 horas a 30° C e a formação de halos de inibição indicou a presença de CefC.

3.6 Quantificação de ácido clavulânico

A metodologia de quantificação utilizada consiste na reação da amostra com solução de imidazol (60 g·L⁻¹), em banho a 30°C por 12 minutos e posterior resfriamento em banho termostatizado a 20°C. O produto da reação (1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo) oct-2-en-1-oylimidazol) foi determinado através de leitura em espectrofotômetro UV a 312 nm (BIRD et al. 1982). Uma curva de calibração com

um padrão da substância foi previamente construída. Este método é específico para ácido clavulânico, sendo que penicilinas não são detectadas pelo método.

3.7 Análise de maltose

A análise de maltose por HPLC (*High-performance Liquid Chromatography*) ou cromatografia líquida de alta eficiência, consistiu em um método isocrático, tendo como fase móvel 100 % de água. Utilizou-se coluna Shim-Pack SCR-101P (7,9 mm x 30 cm), em forno a 80°C e o açúcar foi detectado por índice de refração (Modelo RID-10A/ Shimadzu). O tempo de retenção médio foi de 11,8 minutos.

3.8 Análise de lisina

A análise de lisina residual no meio de cultura foi realizada utilizando a coluna de troca iônica Shim pack NA, em um analisador automático Shimadzu LC-20AT, acoplado a um detector de refração modelo RID-10A. O seguinte esquema de eluição foi utilizado:

- 0 a 25 minutos: 100% de Borato de Sódio 0,05 M
- 25 a 30 minutos: gradiente de Hidróxido de Sódio 0,2 M de 0 a 100%
- 30 a 35 minutos: 100% de Hidróxido de Sódio 0,2 M
- 35 a 40 minutos: gradiente de Borato de Sódio de 0 a 100%
- 40 a 55 minutos: 100% de Borato de Sódio 0,05 M

O tempo médio de retenção foi de 20,4 minutos com forno a 60°C.

3.9 Análise do α -cetogluturato

O consumo do ácido α -cetogluturato foi acompanhado por HPLC. Nesse método utilizou-se uma coluna de ácidos orgânicos Shim-Pack SCP -102(H) fabricada pela Shimadzu em forno a 40° C. O tempo de retenção foi de aproximadamente 31 minutos, com fluxo a 0,2 mL/min e fase móvel contendo 100%

de ácido acético 10 mM (método isocrático). Para a detecção do ácido α -cetoglutarato utilizou-se o índice de refração (Modelo RID-10A/ Shimadzu).

3.10 Planejamento Experimental

Tendo como objetivo averiguar a interação entre os compostos indutores da biossíntese de CefC, e estabelecer uma faixa de concentração ideal de adição no meio de cultura, tornou-se necessário a realização de um planejamento experimental para minimizar o número de experimentos e otimizar os resultados.

Dentre os inúmeros tipos de planejamentos experimentais, foi escolhido o Delineamento Composto Central de Face centrada (DCCF) com dois fatores em três níveis e quatro replicatas do ponto central, uma vez que avaliamos o efeito de 2 variáveis independentes (lisina e diamina) em 3 concentrações distintas para cada uma, obtendo como resposta a máxima produção do antibiótico (variável dependente) (RODRIGUES e LEMMA, 2005).

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM – *Response Surface Methodology*) foi usada para averiguar a relação entre a produção de CefC e os compostos que afetam a produção de antibióticos beta-lactâmicos. A estrutura do planejamento experimental (DCCF) e as concentrações dos compostos investigados (variáveis independentes) mostraram-se adequados para aproximar o comportamento dos cultivos por meio de modelos quadráticos na forma de polinômios de segunda ordem, conforme equação a seguir:

$$\hat{y} = a_0 + a_1 x_{Lys} + a_i x_i + a_{11} x_{Lys}^2 + a_{ii} x_i^2 + a_{1i} x_{Lys} x_i$$

onde, \hat{y} representa a variável resposta, produção de CefC (mg/L), a_0 é o coeficiente de intercepção (valor médio de CefC, em mg/L), x representa a variável independente em unidades codificadas: x_{Lys} = lisina, e x_i representa os outros compostos estudados ($i = 1,3$ diaminopropano ou putrescina); a_1 e a_i são os termos lineares, a_{11} e a_{ii} são os termos quadráticos, a_{1i} é o termo de interação. O software 'Statistica' (versão 7.0) foi utilizado para regressão e análises gráficas dos dados experimentais.

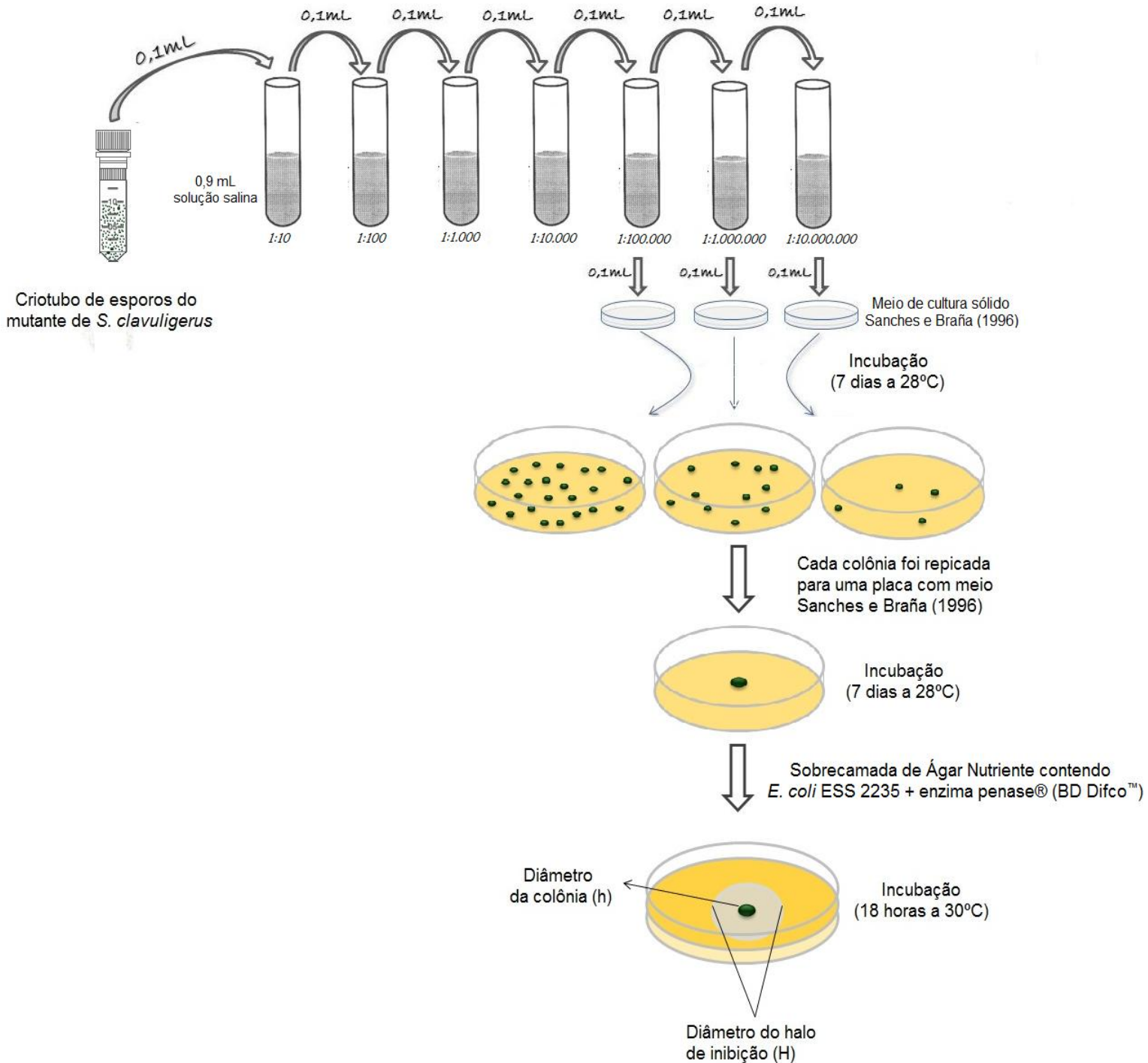
3.11 “Screening” da linhagem mutante 45.41 proveniente da linhagem selvagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064

O processo esquematizado do “screening” está exemplificado na Figura 9. A partir do criotubo contendo 10^8 esporos do mutante de *S. clavuligerus* 45.41, foi realizado o procedimento de seleção da colônia com a melhor capacidade produtiva do antibiótico. Para isso, utilizou-se a técnica de espalhamento em superfície (*spread-plate*) que consiste em diluições seriadas a partir da suspensão de esporos do mutante em salina 0,9%. Com o auxílio da alça de Drigalski foram inoculados 0,1 mL das diluições 10^{-5} a 10^{-7} em placas de Petri (150X15 mm) contendo o meio de cultivo próprio para a esporulação de *S. clavuligerus*, descrito por Sánchez e Braña (1996). Para cada diluição utilizou-se cinco placas de Petri e o tempo de incubação foi de sete dias a 28° C.

Dentre todas as placas, um total de 106 colônias foram selecionadas, considerando as diferenças fenotípicas entre elas e testadas em termos de produção de CefC, em meio sólido. Nesse procedimento, cada colônia foi repicada para uma única placa (90X15 mm) contendo 20 mL do meio Sánchez e Braña (1996) e incubada por sete dias a 28°C. Após o crescimento das colônias, foi adicionada na própria placa de Petri, uma camada do meio ágar nutriente (20 mL) contendo a bactéria teste *E. coli* (0,2 OD a 600 nm para 20 mL de meio), e 0,1 mL de enzima Penase® (BD Difco™) para degradar a penicilina. Após incubação por 18 horas, a 30°C, os diâmetros dos halos de inibição (H, mm) foram medidos. O critério de seleção foi a relação entre o halo de inibição (H) e o diâmetro da colônia (*d*). As colônias que apresentaram valores de $(H)/(d)$ maiores que a linhagem selvagem foram selecionadas. A bioatividade avaliada foi expressa em Unidade de Cefalosporina C por mm^2 (UCepC/ mm^2).

A terceira etapa foi o cultivo submerso, por 72 horas, das colônias que apresentaram os maiores valores de (UCepC/ mm^2). Utilizou-se o meio padrão contendo amido como fonte de carbono, acrescido de 100 mM de lisina, para obter o máximo de produção de CefC de cada colônia. Para fins de comparação, a linhagem selvagem e uma colônia que apresentou a pior relação $(H)/(d)$ também foram cultivadas em meio líquido.

Figura 9 – Esquema geral do “screening” a partir do criotubo de esporos do mutante 45.41 obtido da linhagem selvagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064.



4. Resultados e Discussão

4.1 Cultivos em meio contendo amido

4.1.1 Efeito da concentração do aminoácido L-lisina na produção de cefamicina C

Vários pesquisadores relatam a importância da adição de altas concentrações de L-lisina no meio de cultura para se obter o máximo de cefalosporinas. Neste experimento, investigamos o efeito da adição de lisina na biossíntese de CefC, afim de estabelecer a melhor concentração do aminoácido no processo fermentativo. Esporos foram utilizados para realizar fermentações em bateladas até 72 horas, no meio padrão contendo amido como fonte de carbono e L-lisina nas concentrações de 0 a 100 mM.

Os resultados apresentados na Figura 10(A) mostram que a biomassa é diretamente proporcional à concentração de lisina, alcançando o máximo de $7,5 \pm 0,5$ g/L com 100 mM do aminoácido, em 72 horas de processo. Assim como a biomassa, a produção volumétrica de CefC (Figura 10 B) aumentou com maiores concentrações de lisina, obtendo valores ao redor de 120 mg/L com 80 ou 100 mM do aminoácido. Isso significa um acréscimo de cerca de 500% na produção de CefC, comparado ao meio base sem adição de lisina. Esses dados corroboram com Fang et al., (1996) que também obtiveram um aumento de 500% na produção de CefC por *S. clavuligerus* com a adição até 150 mM do aminoácido. Não foram avaliadas concentrações acima de 100 mM de lisina, uma vez que a produção específica foi a mesma com 80 e 100 mM, indicando uma estabilidade na produção de CefC (Figura 10 C).

Como podemos observar na Figura 11, o consumo de L-Lisina foi total nos cultivos com até 60 mM do aminoácido, enquanto que nas fermentações iniciadas com 80 e 100 mM de lisina, houve um residual de aproximadamente 18 e 30 mM do aminoácido, respectivamente.

Figura 10- Biomassa (A), CefC (B) e produção específica (C) em 48 e 72 horas de processo, em meio de cultivo submerso contendo amido como fonte de carbono.

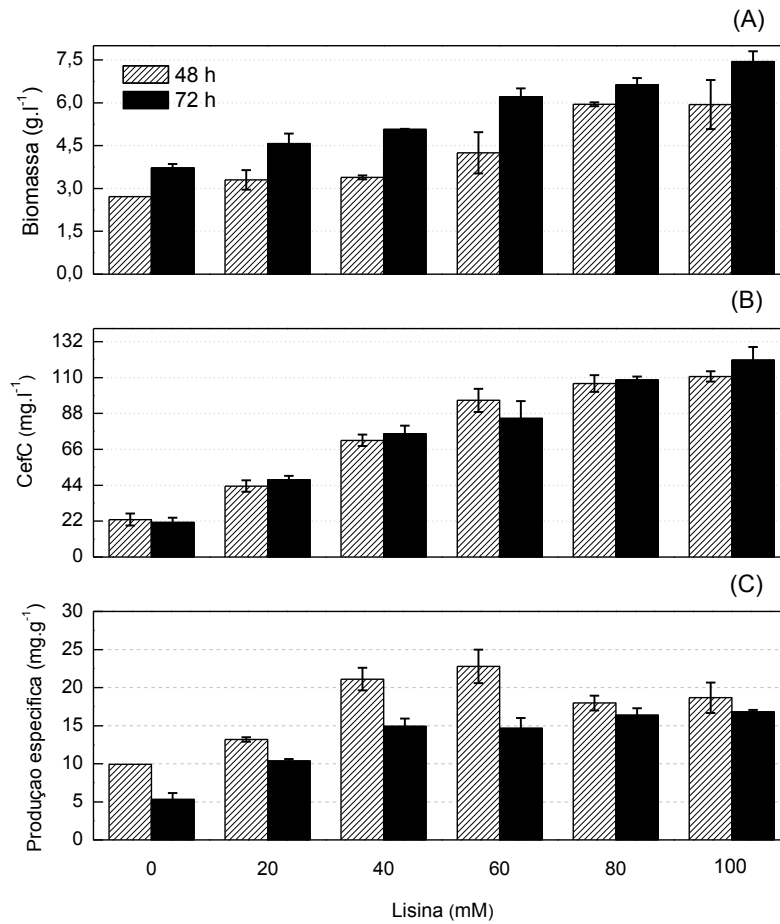
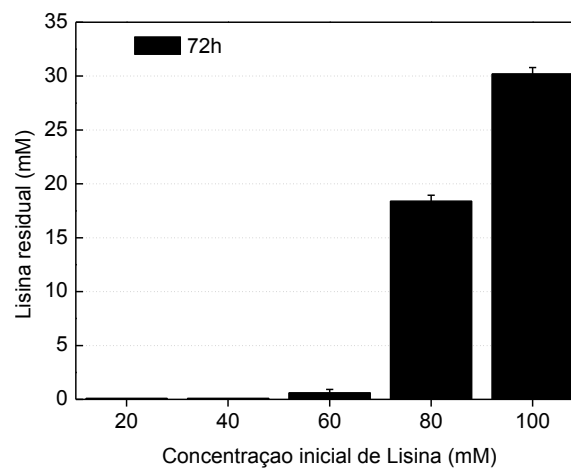


Figura 11- Residual do aminoácido L-lisina ao final do processo fermentativo.



Visando aprofundar o conhecimento sobre efeito da lisina no cultivo de *S. clavuligerus*, foram realizados experimentos no modo contínuo intermitente (volume constante de 45 mL, a uma taxa de diluição $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$), com 100 ou 30 mM de

L-lisina iniciais e alimentação com amido ou amido + lisina, respectivamente, de forma a se atingir a concentração final no meio reacional de 75 mM do aminoácido (Tabela 9). A concentração de amido no meio suplementar foi estimada com base em dados de consumo para manter a biomassa constante durante a fase estacionária. Dados, obtidos em experimentos em batelada realizados em fermentador no nosso laboratório, mostraram que a concentração final de amido no meio reacional, devido à suplementação, deve ser de 21,7 g/L.

Tabela 9 - Composição dos meios de produção e dos meios suplementares de fermentações contínuas intermitentes em frascos agitados (volume constante 45 mL, $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$); alimentação a partir de 36 horas.

Componentes	Meio de produção			Meio Suplementar		
	M1	M2	M3*	M1	M2	M3*
Amido (g/L)**	10			-	36,2	
Proflo (g/L)	8,5			-		
L-lisina (mM)	100	100	30	-		75
MOPS (g/L)	21					

* A concentração final de L-lisina foi de 75mM

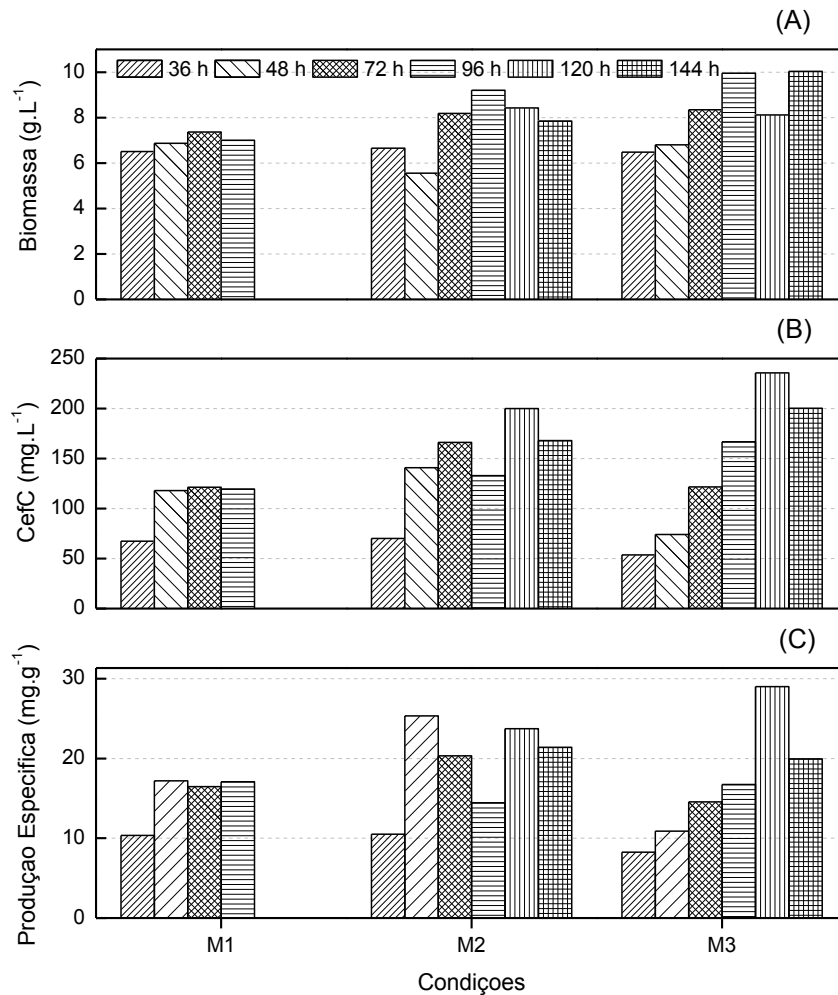
**A concentração final nos frascos devido à suplementação foi de 21,7 g/L de amido.

No meio padrão (M1), batelada até 96 horas, contendo 100 mM de lisina, observamos que a maior biomassa foi de 7,5 g/L em 72 horas de processo (Figura 12 A) e a produção de CefC máxima foi de aproximadamente 120 mg/L a partir de 48 horas, mantendo-se constante até o final do cultivo (Figura 12 B).

Em relação aos meios alimentados (M2 e M3) observamos uma diferença no perfil de produção do antibiótico. No meio que inicia com 100 mM de lisina (M2) observamos que a biossíntese de CefC é alta no início do processo fermentativo, sendo que em 72 horas de processo, a produção do antibiótico foi cerca de 1,4 vezes maior que no meio padrão, alcançando o máximo de 200 mg/L em 120 horas de cultivo (Figura 12 B). Diferentemente de M2, no meio de cultivo que continha 30 mM de lisina inicial e foi alimentado com amido + lisina (M3) houve uma produção gradativa de CefC, mostrando em 48 horas de processo uma produção menor que o meio padrão (1,6 vezes) e em 72 horas a mesma concentração de CefC (120 mg/L). Entretanto, em 120 horas de processo, observamos uma produção de 235 mg/L de CefC na condição M3, ou seja, um aumento de aproximadamente 17% na

biossíntese do antibiótico comparado ao M2 (Figura 12 B). A biomassa em M2 e M3 foi semelhante, obtendo uma concentração celular acima de 8g/L a partir de 72 horas (Figura 12 A). Assim como na biossíntese de CefC, a produção específica em M3 foi gradativa, atingindo o máximo em 120 horas, enquanto que em M2 observam-se oscilações (Figura 12 C). Comparando a composição do meio e alimentação, (Tabela 9), concluímos que a condição M3 é mais vantajosa, pois se utilizou 25% menos L-lisina em relação à condição M2.

Figura 12 - Resultados de biomassa (A), produção de CefC (B) e produção específica (C), obtidos durante o cultivo de *S. clavuligerus*, em frascos agitados no modo contínuo intermitente até 144 horas. Meio padrão sem alimentação (M1), meios com 100 e 30 mM de lisina inicial, ambos alimentados (M2 e M3).



4.1.2 Efeito das Diaminas

A próxima etapa foi avaliar o efeito das diaminas como fonte de nitrogênio no crescimento de *S. clavuligerus* e na indução da biossíntese de CefC, tendo o amido como fonte de carbono. Segundo a revisão feita por Demain (2006), 1,3 diaminopropano nas concentrações de 2,5 g/L e 5,5 g/L influenciaram positivamente a biossíntese de antibióticos β -lactâmicos por fungos e actinomicetos, respectivamente. Leitão et al (1999) observaram que 1,3 diaminopropano 2,5 g/L estimulou a biossíntese de CefC em *Nocardia lactamdurans*, enquanto a concentração de 5,0 g/L foi favorável para *S. clavuligerus*. Martín e colaboradores (2011) também relataram que a adição de 1,3 diaminopropano ao meio de cultura aumentou em até cinco vezes a produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum*. O efeito da putrescina também foi avaliada por Leitão et al (1999), que relataram um aumento na produção de CefC por *N. lactamdurans* quando o composto foi adicionado ao meio de cultivo em uma concentração de 0,2 g/L. Aharonowitz et al (1983) testaram o ácido diaminopimélico (DAP) nas concentrações de 1,0 g/L e 2,0 g/L em mutantes de *Streptomyces clavuligerus* e observaram que este composto estimulou a biossíntese de CefC, obtendo o melhor resultado com 2,0 g/L.

O aminoácido L-lisina, que é um estimulante da biossíntese CefC, foi retirado do meio padrão e substituído pelas diaminas para que não houvesse interferência nos resultados. Os experimentos foram realizados em batelada (72 horas) e as condições testadas foram: meio padrão sem L-lisina (0), putrescina 0,2 g/L; putrescina 0,4 g/L, 1,3 diaminopropano 2,5 g/L, 1,3 diaminopropano 5,0 g/L; DAP 1,0 g/L e DAP 2,0 g/L. A Figura 13 mostra a estrutura química de cada diamina adicionada ao meio de cultura e na Figura 14 estão os resultados de biomassa, produção volumétrica de CefC e produção específica obtidos durante o cultivo de *S. clavuligerus* com as diaminas.

Figura 13- Estrutura química da putrescina; 1,3 diaminopropano e ácido diaminopimélico (DAP).

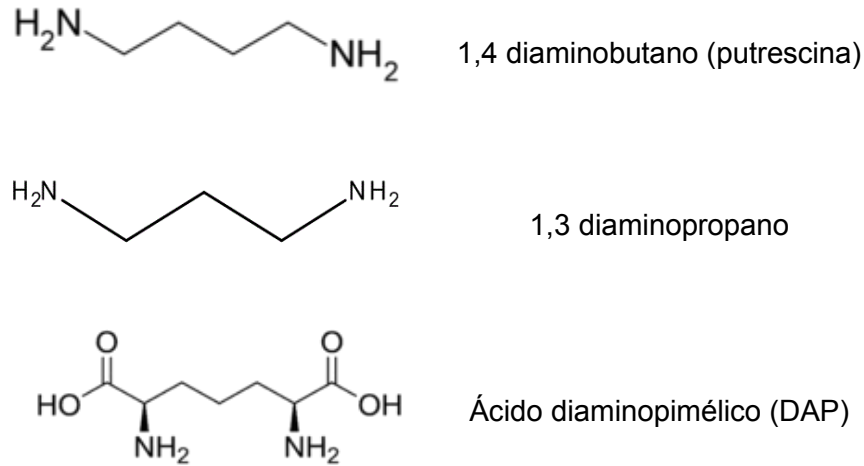
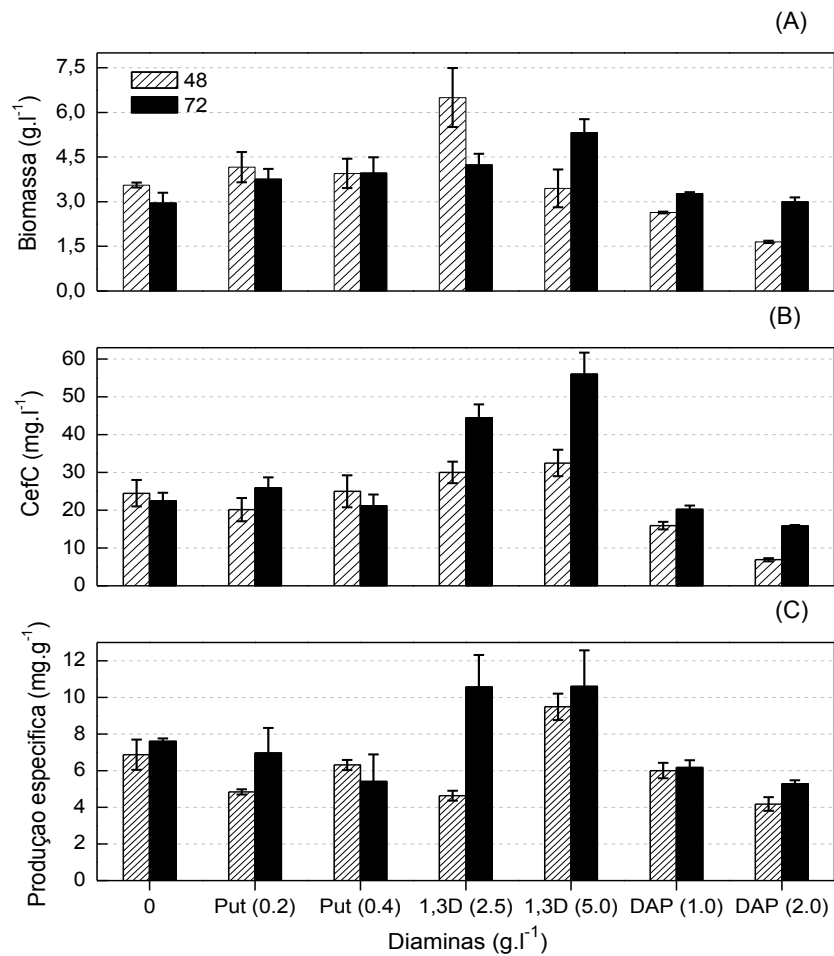


Figura 14- Resultados de biomassa (A), produção de CefC (B) e produção específica (C) obtidos durante o cultivo de *S. clavuligerus* em diferentes condições: sem L-lisina (0), putrescina (Put), 1,3 diaminopropano (1,3D) e ácido diaminopimélico (DAP), em diferentes concentrações. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



O ácido diaminopimélico (DAP), afetou negativamente a biossíntese de CefC e biomassa, obtendo os piores resultados com 2,0 g/L do composto. A adição de 2,0 g/L de DAP resultou em uma produção volumétrica 70% menor que o meio base sem aditivos em 48 horas de cultivo e 30% menor ao final do processo fermentativo (Figura 14 B). Apesar do ácido diaminopimélico apresentar sete carbonos em sua estrutura, a maior biomassa obtida foi de 3,2 g/L, em 72 horas com 1,0 g/L da diamina, sugerindo que o micro-organismo não utiliza o DAP como fonte de carbono. (Figura 14 A).

A putrescina 0,2 g/L não apresentou um efeito significativo na produção volumétrica de CefC, comparado ao meio padrão sem L-lisina. A adição de 0,4 g/L de putrescina teve um efeito negativo na produção do antibiótico em 72 horas de processo (Figura 14 B). A biomassa apresentou um aumento de 16% em relação ao meio base (Figura 14 A), e portanto, a produção específica com putrescina foi menor (Figura 14 C). Martín et al. 2012 observou que a putrescina na mesma concentração (0,2 g/L) não aumentou os níveis de RNA mensageiro dos genes responsáveis pela biossíntese de penicilina por *P. chrysogenum* e por essa razão não obteve aumentos na produção do antibiótico.

No perfil do crescimento celular mostrado na (Figura 14 A), vemos que a concentração de 2,5 g/L de 1,3 diaminopropano (1,3D) antecipou o crescimento, obtendo uma biomassa de 6,5 g/L em 48 horas de fermentação. Entretanto, de 48 para 72 horas observou-se uma queda pronunciada de biomassa (cerca de 50%), provavelmente por escassez de nutriente e/ou intoxicação pelos produtos gerados no metabolismo. Com a adição de 5,0 g/L de 1,3D, a biomassa foi de 3,5 g/L e 5,5 g/L em 48 e 72 horas, respectivamente. O crescimento mais lento levou a uma alta produção volumétrica (Figura 14 B) e específica (Figura 14 C).

Em relação à produção volumétrica (Figura 14 B), em 48 horas observamos uma produção semelhante (cerca de 30 mg/L) em ambas as concentrações de 1,3D, entretanto, ao final do processo fermentativo a produção foi de 56 mg/L e 44,5 mg/L com a adição de 5,0 g/L e 2,5 g/L de 1,3D, respectivamente. Comparando com o meio base, em 72h de cultivo, a adição de 5,0 g/L de 1,3D propiciou um aumento de aproximadamente 150% na biossíntese de CefC, mostrando a grande vantagem da adição desta diamina no meio de cultivo.

Segundo Leitão et al. (1999), em *Nocardia lactamdurans*, o composto 1,3 diaminopropano exerce efeito em nível transcricional aumentando a estabilidade de mRNAs policistrônicos responsáveis pela formação de enzimas ligadas à biossíntese de CefC, tais como, LAT (lisina-6-aminotransferase) e o sistema de metoxilação (proteínas P7 e P8). Martín et al. 2012 também relatou que 1,3D aumentou os níveis de RNA mensageiros em *P. chrysogenum*. Este efeito pode explicar a obtenção de maiores concentrações de CefC em 72 horas de cultivo em meios contendo 1,3 diaminopropano 5,0 g/L, comparativamente à produção em meio padrão. Assim como observou Martín et al. (2012), a baixa produção volumétrica de CefC obtida com a adição de putrescina e DAP sugere que a biossíntese de antibióticos β -lactâmicos é afetada positivamente apenas por diaminas de três carbonos, como 1,3 diaminopropano.

Para testar o efeito de 1,3 diaminopropano em *S. clavuligerus*, foi realizada uma fermentação no modo contínuo intermitente, com meios contendo L-lisina (30 mM ou 100 mM) + 1,3diaminopropano 2,5 g/L ou 5,0 g/L. Como padrão utilizou-se os meios contendo L-lisina 100 mM sem alimentação e L-lisina (30 mM e 100 mM) alimentados. A Tabela 10 exemplifica os meios básicos de produção e a composição do meio suplementar.

Tabela 10 - Composição dos meios de produção e concentrações de amido e lisina no meio reacional, a cada suplementação, nos cultivos contínuos intermitentes em frascos agitados (volume constante 45 mL, $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$); alimentação a partir de 36 horas.

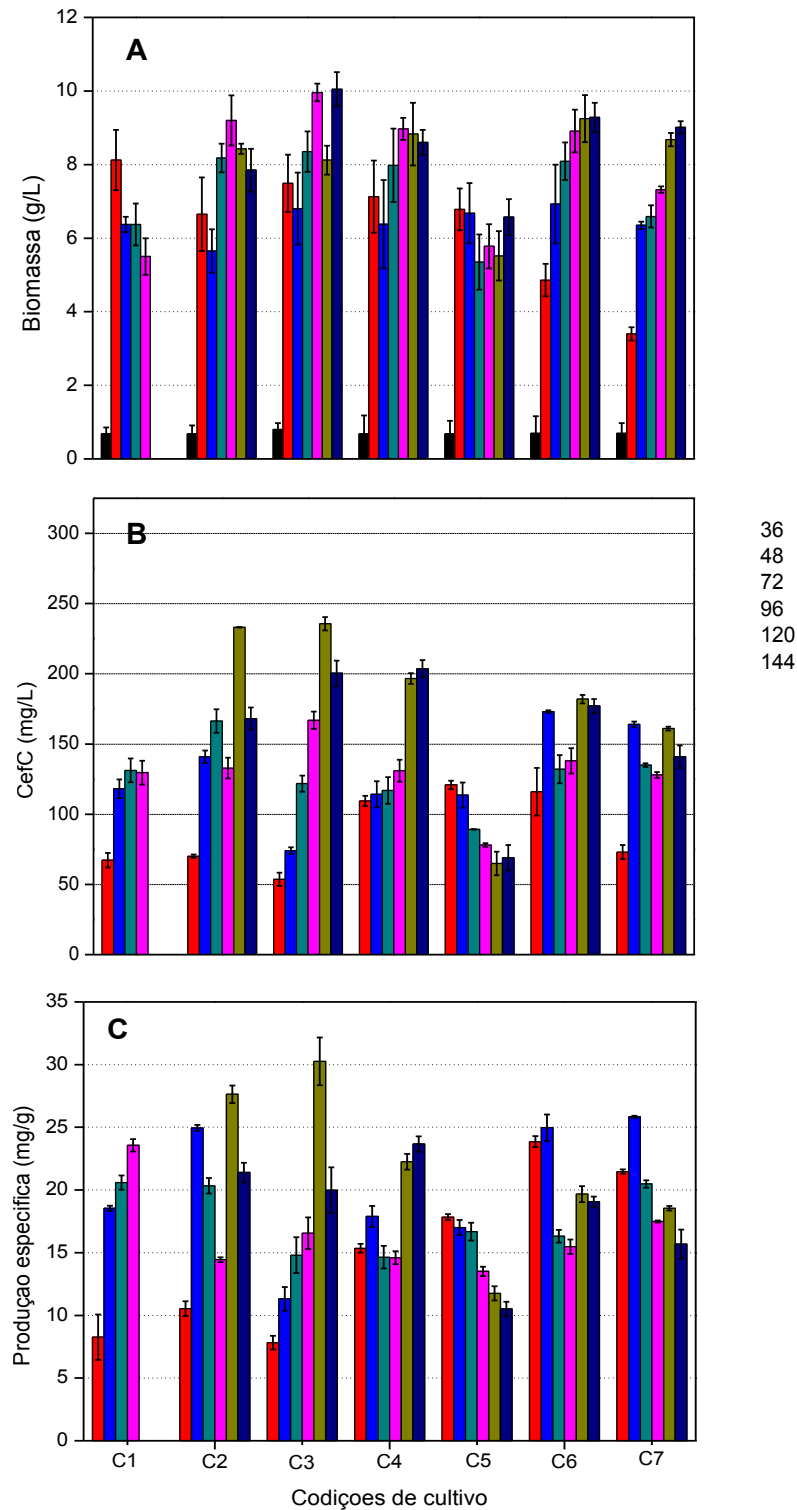
Componentes	Meio de produção							Suplementação*						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Amido (g/L)	10							-	36,2					
L-lisina (mM)	100	100	30	100	30	100	30	-	-	75	75	75	75	75
1,3 diaminopropano (g/L)	-	-	-	2,5	2,5	5,0	5,0	-						
MOPS (g/L)	21													

* a concentração nos frascos ao final do processo devido à suplementação foi de 21,7 g/L de amido em todos os meios e de 45 mM de L-lisina adicionada somente nos meios C3 a C7.

Pela Figura 15 B, observa-se que logo no início da fermentação (36 a 48 horas), as condições contendo 1,3 diaminopropano (C4 a C7) resultaram na

antecipação da produção de CefC em relação à condição padrão (C1). A biomassa obtida até 48 horas (Figura 15 B) em todas as condições foi semelhante.

Figura 15 - Resultados de (A) produção de CefC, (B) biomassa e (C) produção específica obtidos durante o cultivo de *S. clavuligerus*, em frascos agitados no modo contínuo intermitente, em meios contendo 1,3 diaminopropano (2,5 e 5,0 g/L) e L-lisina (30 mM e 100 mM). Amostras coletadas em 0 36 48 72 96 120 144 horas:



Isto sugere, portanto, que a produção aumentada de CefC nas condições em que se adicionou 1,3 diaminopropano (C4 a C7) não está relacionada ao crescimento de *S. clavuligerus*, assim como mostra a produção específica (Figura 15 C) mas, possivelmente, ao aumento da estabilidade de mRNAs policistrônicos, como sugeriu Leitão et al. (1999) e Martín et al. (2012) .

Sob a condição contendo 2,5 g/L de 1,3 diaminopropano e 30 mM de lisina inicial (C5), houve uma queda acentuada na produção após 48 horas de processo, não observada em nenhuma outra condição. Já a condição contendo 100 mM de lisina inicial (C4) comportou-se de forma contrária, promovendo uma estabilidade da produção até 96 horas, tendendo a um crescimento após esse período. Porém, de uma maneira geral, ambas as condições apresentam pontos desfavoráveis: uma por apresentar queda drástica na produção ao longo da suplementação e a outra pela alta concentração de lisina utilizada (145 mM ao final do processo fermentativo).

As condições C6 e C7 que apresentam 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano em suas formulações mostraram uma produção de CefC menor quando comparado à condição C3 que contém apenas 30 mM de lisina (Figura 15 A). Dessa forma, podemos concluir que a adição deste diamina em cultivos contínuos não favorece a produção de CefC. Assim, o meio de cultura contendo 30 mM de lisina inicial sem adição de 1,3 diaminopropano (C3) é mais viável economicamente.

O efeito mais evidente da adição de 1,3 diaminopropano que foi a antecipação da produção de CefC, torna esta diamina mais adequada para utilização em cultivos do tipo batelada. Por outro lado, a condição sem diamina e menos lisina (C3) mostrou-se mais promissora para utilização em cultivos contínuos de longa duração.

As análises de lisina residual dos meios com 1,3 diaminopropano mostraram que não houve uma diferença significativa no perfil de consumo, independentemente da concentração de lisina ou da diamina. Para as condições que iniciaram o cultivo com 30 mM ou 100 mM de lisina houve um consumo de cerca de 76% e 80% do aminoácido, respectivamente.

4.1.3 Planejamento Experimental 3ⁿ: 1,3 Diaminopropano e L-lisina

As faixas de concentrações selecionadas para as variáveis independentes (x_1 = 1,3 diaminopropano e x_2 = L-lisina) deste planejamento de faces centradas com replicatas do ponto central estão apresentadas na Tabela 11. Nesta tabela também estão apresentados os resultados de produção de CefC (variável resposta) obtidos em 72 horas e previstos pelo modelo.

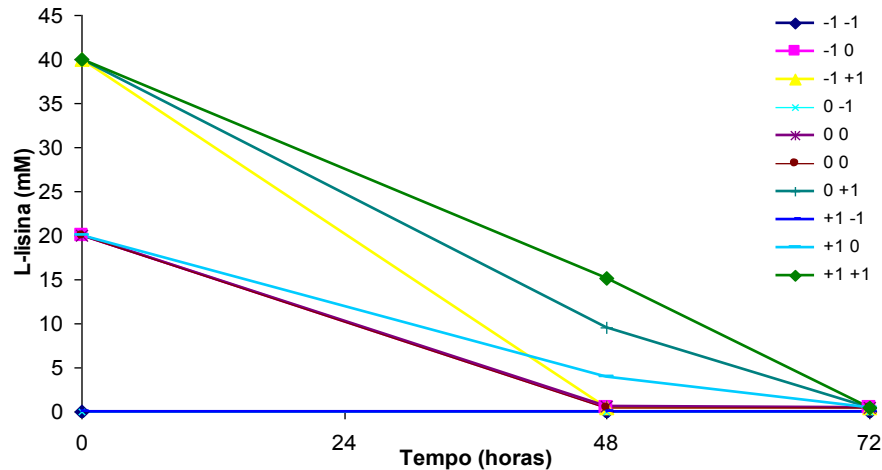
Tabela 11 - Planejamento experimental de faces centradas 3ⁿ: condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de 1,3 diaminopropano no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtida em 72 horas de fermentação.

Meio	Variáveis Independentes				Variável Resposta	
	Unidades Codificadas		Unidades Reais		CepC totais (mg/L)	
	1,3diaminopropano (x_1)	L-lisina (x_2)	1,3diaminopropano (g/L)	L-lisina (mM)	Medido	Previsto
1	-1	-1	0	0	18,1 ± 3,0	10,6
2	-1	0	0	20	45,6 ± 7,2	59,9
3	-1	1	0	10	72,3 ± 4,1	64,9
4	0	-1	2,5	0	47,6 ± 3,9	53,9
5	0	0	2,5	20	108,9 ± 0,0	109,2
6	0	0	2,5	20	122,1 ± 0,0	109,2
7	0	0	2,5	20	100,7 ± 0,0	109,2
8	0	0	2,5	20	120,0 ± 0,0	109,2
9	0	+1	2,5	10	114,4 ± 13,6	120,2
10	+1	-1	5,0	0	62,2 ± 2,6	62,4
11	+1	0	5,0	20	125,3 ± 0,8	123,7
12	+1	+1	5,0	40	140,2 ± 8,0	140,7

Foram retiradas amostras em 48 e 72 horas para acompanhar o consumo de L-lisina e relacioná-lo com a produção. A Figura 16 apresenta os dados de concentração do aminoácido L-lisina ao longo dos cultivos. Observou-se que em 48 horas, o aminoácido foi totalmente consumido apenas nos meios contendo inicialmente 20 mM de L-lisina. Somente na condição (+1 0), onde há maior concentração do composto 1,3 diaminopropano (5 g/L), vemos um resíduo de L-

lisina de aproximadamente 4 mM. Nos meios que iniciaram com 40 mM, houve o consumo total do aminoácido em 72 horas de processo fermentativo (Figura 16).

Figura 16 - Planejamento experimental 3ⁿ: consumo do aminoácido L-lisina.

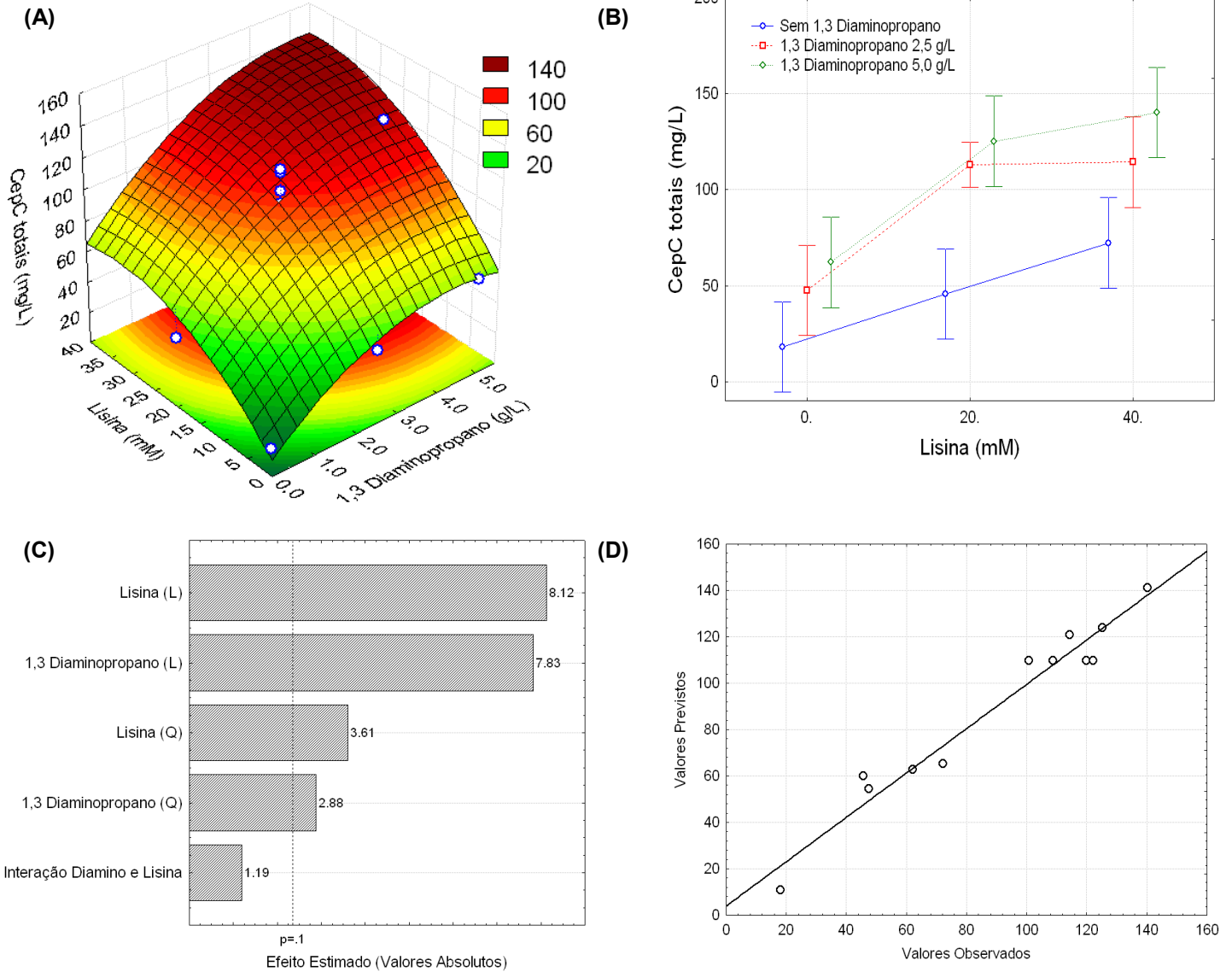


Novamente, apenas a condição que contém a maior concentração de 1,3 diaminopropano (+1+1), mostrou um consumo mais lento de lisina em relação às outras condições.

Os resultados obtidos em 48 e 72 horas geraram superfícies de respostas com alto coeficiente de determinação, por esse motivo resolvemos apresentar apenas os resultados com 72 horas de cultivo, período no qual foram obtidos os maiores valores de CefC. A superfície de resposta (Figura 17 A) apresentou um coeficiente de determinação de $r^2 = 0,95$ e propiciou visualizar a faixa ótima de concentração de cada composto para se obter o máximo do antibiótico (vermelho).

Como podemos observar no diagrama de Pareto (Figura 17 C), para $p = 0,1$, apenas a interação entre a diamina e a lisina não foi significativo, ou seja, ambas as variáveis (1,3 diaminopropano e lisina) são positivas apenas individualmente. Os demais parâmetros foram aceitos pelo modelo matemático sendo o efeito linear mais evidente para ambos os compostos, assim, a produção de CefC tende a aumentar proporcionalmente com a adição de 1,3 diaminopropano e lisina. O termo quadrático também foi aceito pelo modelo, entretanto, exerceu um efeito menor na biossíntese de CefC, comparado ao termo linear. A produção máxima de CefC prevista matematicamente, foi de 141 mg/L com a adição de 5,14 g/L de 1,3 diaminopropano e 37,86 mM de lisina.

Figura 17- Superfície de reposta (A), produção de CepC totais em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de CefC previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,95$.



A equação do modelo quadrático é expressa a seguir para intervalos de confiança de 90% (Equação 1), com variáveis independentes em valores codificados.

$$\text{CefC} (\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}) = 83,2 (\pm 3,2) + 63,9 (\pm 8,2) \cdot x_1 + 17,6 (\pm 6,1) \cdot x_1^2 + 66,3 (\pm 8,2) \cdot x_2 + 22,1 (\pm 6,1) \cdot x_2^2$$

Equação 1

A Tabela 12 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo obtido. Como podemos observar, o valor de $F_{\text{calculado}}$ para o modelo (25,83) é bem maior que o valor de $F_{\text{tabelado}(5,6)}$ (3,11), além do valor de p ser menor que 10% ($p < 0,1$). Esses valores mostram que o modelo se ajusta muito bem aos dados experimentais. Outra informação importante da Tabela 12 é a falta de ajuste do modelo, como podemos observar o $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste é menor que 3,11 e o p valor é maior que 0,1, dessa forma, rejeitamos a hipótese da falta de ajuste do modelo matemático.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de CefC obtidos com a adição de 1,3 diaminopropano e lisina no meio de cultivo.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	**F	p
Modelo	16042,55	5	3208,51	25,83	0,000546
Residual	745,35	6	124,22		
Falta de ajuste	445,46	3	148,48	1,48	0,376455
Erro puro	299,89	3	99,96		
Total	16787,90	11			

*R² = 0,9556; SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MQ: Média dos quadrados

** $F_{(5,6)}$ a 90% de confiança = 3.11

Com relação à biomassa, não há estudos que relacionam o composto 1,3 diaminopropano ao crescimento celular de *S. clavuligerus*, assim, tornou-se necessário realizar um planejamento experimental para averiguar a influência da diamina no metabolismo primário.

Pela Figura 18 A vemos que a biomassa cresce proporcionalmente com a adição de ambos os compostos (faixa vermelha). Entretanto, a combinação de 40 mM de lisina e 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano levou a uma leve dobra na superfície de resposta, indicando que o efeito combinado destes compostos atua negativamente no metabolismo primário.

Esse efeito negativo também é observado no diagrama de Pareto (Figura 18 C) que mostrou uma interação negativa significativa entre 1,3 diaminopropano e lisina. Esses resultados podem estar relacionados diretamente à biossíntese de

CefC, pois, com a máxima adição de ambos os compostos, obtemos altas produções do antibiótico em detrimento da biomassa.

Observando o efeito individual de cada composto, vemos que a lisina atua fortemente no metabolismo primário de *S. clavuligerus*, visto que seu efeito linear é o parâmetro mais significativo (Figura 18 C), corroborando com os dados da literatura (Rico et al., 2001).

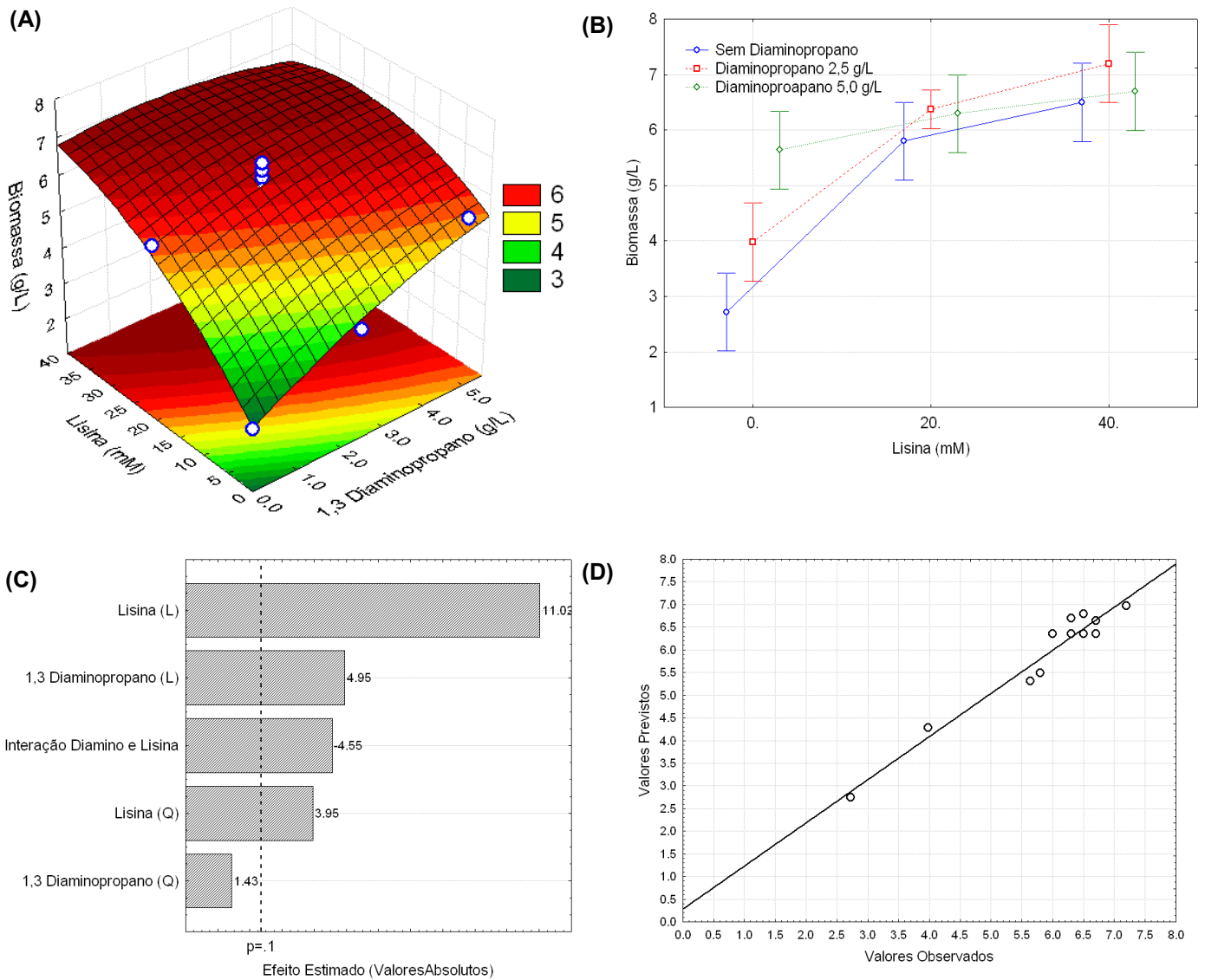
O efeito linear de 1,3 diaminopropano também foi aceito pelo modelo (Figura 18 C), tal fato nos permite concluir que esta diamina contribui para o crescimento de *S. clavuligerus*, uma vez que foi adicionada em altas concentrações 2,5 e 5,0 g/L. Entretanto, pelos valores críticos fornecidos pelo modelo matemático, ficou claro que a maior influência sobre a biomassa foi do aminoácido lisina. Os valores críticos gerados pelo modelo foram de 6,98 g/L de biomassa com 2,15 g/L de 1,3 diaminopropano e 40 mM de lisina.

A equação do modelo quadrático (coeficiente de determinação $r^2=0,95$) é expressa a seguir para intervalos de confiança de 90% (Equação 2), com variáveis independentes em valores codificados. Podemos observar que o efeito quadrático da diamina não foi significativo e por essa razão foi retirado da equação.

$$\text{Biomassa (g} \cdot \text{l}^{-1}\text{)} = 5,7 (\pm 0,1) + 1,2 (\pm 0,2) \cdot x_1 + 2,7 (\pm 0,2) \cdot x_2 + 0,7 (\pm 0,2) \cdot x_2^2 - 1,4 (\pm 0,3) \cdot x_1 \cdot x_2$$

Equação 2

Figura 18 - Superfície de reposta (A), biomassa em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de biomassa previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,95$.



De acordo com a Tabela 13, podemos concluir que o modelo matemático proposto se ajusta aos dados experimentais, pois, a falta de ajuste mostra um valor de F maior que 3,11 e p valor $> 0,1$, e o $F_{\text{calculado}}$ para o modelo (Tabela 13) é muito menor que 3,11 e p valor é menor que 10% ($p < 0,1$).

Tabela 13- Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de biomassa obtidos com a adição de 1,3 diaminopropano e lisina no meio de cultivo.

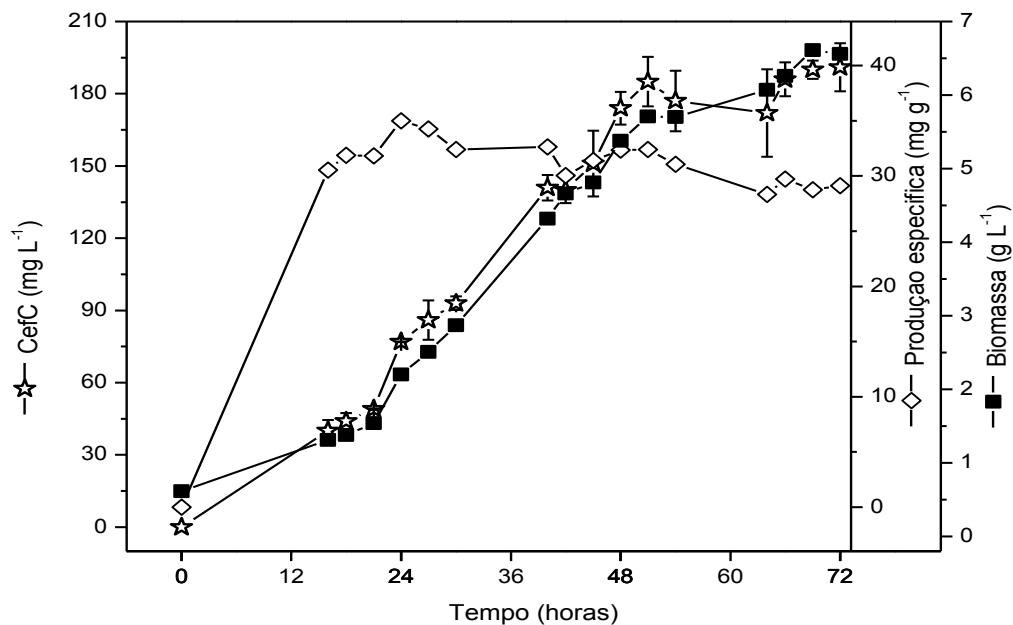
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	**F	p
Modelo	17,02	5	3,41	23,58	0,000705
Residual	0,86	6	0,14		
Falta de ajuste	0,60	3	0,20	2,24	0,262826
Erro puro	0,27	3	0,09		
Total	17,88	11			

*R² = 0,95157; SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MQ: Média dos quadrados

** F_(5,6) a 90% de confiança = 3.11

O cultivo em biorreator convencional de bancada com as concentrações ótimas de lisina e 1,3 diaminopropano previstas pelo modelo mostraram um aumento de cerca de 42% na produção do antibiótico, quando comparado ao valor crítico gerado pelo modelo (141 mg/L).

Figura 19 - Concentração de cefamicina C (CefC), produção específica e biomassa; meio basal contendo lisina (40 mM) e 1,3 diaminopropano (5,0 g/L).



A adição de 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano propiciou uma produção de aproximadamente 200 mg/L de CefC e biomassa de 6,5 g/L com uma redução de

60% de lisina no meio (Figura 19). A Tabela 14 mostra o aumento na produção de cefamicina C que este meio de cultura propiciou, em relação aos demais meios de cultivo utilizados em processos do tipo batelada até 72 horas. De acordo com os resultados obtidos, este novo meio de cultivo é altamente produtivo e vantajoso economicamente, comparado aos demais meios de culturas descritos na literatura, uma vez que altas produções do antibiótico são alcançadas apenas com a adição de 100 mM de lisina no meio basal (OZCENGIZ et al., 2013; FANG et al., 1996; RIUS et al., 1996).

Tabela 14 – Aumentos na produção de cefamicina C: comparação entre o meio de cultivo contendo 40 mM de lisina + 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano e os demais meios de cultivos sem aditivos ou com apenas a adição de um composto (lisina ou 1,3 diaminopropano).

Meios de cultivo	Produção de Cefamicina C (mg/L)	Aumentos na produção de Cefamicina C (%)
Meio base com adição de 40 mM de lisina e 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano (Figura 19)	200	Produção máxima
Meio base sem adição de lisina ou diamina	22	800
Meio base contendo apenas a adição de 1,3 diaminopropano (5,0 g/L)	55	260
Meio base contendo apenas a adição de lisina (40 mM)	75	166
Meio base contendo apenas a adição de lisina (100 mM)	120	66

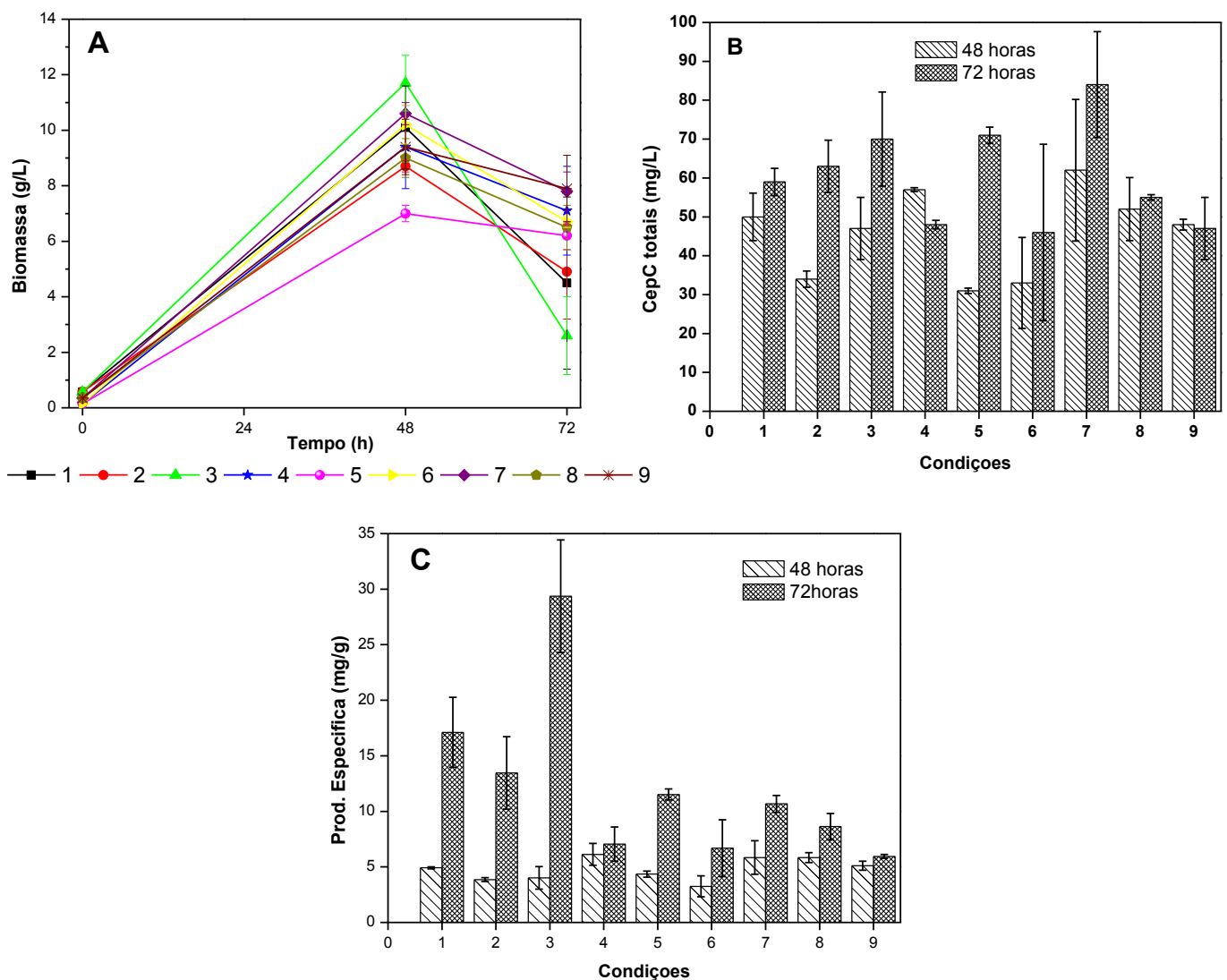
4.2 Cultivos em meio contendo maltose

4.2.1 Avaliação dos diferentes meios de inóculo e produção

Para selecionar os meios de inóculo e produção (complexo, semi-sintético e sintético), descritos no item material e métodos (Tabela 4 e 5), realizaram-se bateladas de 72 horas, em mesa rotatória, combinando-se esses meios (Tabela 7 - do item material e métodos), com o objetivo de avaliar o perfil de produção de cefamicina C por *S.clavuligerus*.

Analisando os resultados da Figura 20, ficou evidente que a maltose foi consumida bem antes do término do cultivo, pois houve um decréscimo da concentração celular em todas as condições (Figura 20A). A condição 3 apresentou a maior biomassa em 48 horas e a maior produção específica em 72 horas decorrente da queda da concentração celular. A combinação 7 foi a que apresentou a melhor produção do antibiótico, aproximadamente 85 mg/L (Figura 20 B) e uma biomassa mais constante até o final da fermentação. Dessa forma, foi estabelecido como padrão para os cultivos com maltose, o meio de inóculo sintético e o meio de fermentação principal complexo (condição 7).

Figura 20 - Biomassa (A), produção de cefalosporinas totais (B) e produção específica (C) de *S. clavuligerus* em diferentes condições de cultivo utilizando maltose como fonte de carbono.



4.2.2 Efeito das diaminas

Foi avaliado o meio padrão com maltose (condição 7), frente à adição das diaminas: ácido diaminopimérico (DAP), nas concentrações de 1,0 g/L e 2,0 g/L, putrescina 0,2 g/L e 0,4 g/L e por último o composto 1,3 diaminopropano 2,5 g/L e 5,0 g/L. O cultivo submerso foi do tipo batelada (72 horas), em mesa rotatória. Observando a Figura 21 B vemos que os meios contendo putrescina 0,2 g/L e 1,3 diaminopropano 5,0 g/L resultaram em cerca de 120 mg/L de cefamicina C. Comparado à putrescina, o composto 1,3 diaminopropano promoveu o adiantamento da produção, além de apresentar alta produção específica (Figura 21 C) devido ao baixo crescimento (Figura 21 A). Esse mesmo perfil também foi anteriormente observado com amido como fonte de carbono.

Desse modo, os compostos 1,3 diaminopropano e putrescina foram escolhidos para o teste em cultivos tipo contínuo intermitente.

No cultivo contínuo intermitente, a putrescina (0,2 g/L) estimulou a produção do antibiótico, obtendo aproximadamente 175 mg/L de CefC em 120 horas de processo (Figura 22 B), ou seja, 75% a mais que a produção obtida na condição padrão (sem diaminas). A produção específica em meio contendo putrescina também foi maior (14 mg/g) em relação aos meios padrão e contendo 1,3 diaminopropano, os quais apresentaram ao final da fermentação, respectivamente, 7 mg/g e 11 mg/g (Figura 22 C). Com o composto 1,3 diaminopropano, a produção de cefamicina C foi antecipada, obtendo-se aproximadamente 100 mg/L em 48 horas, e mantendo-se constante até o final do processo (Figura 22 B). Dessa forma, a sua produção específica é maior apenas no início do processo fermentativo (Figura 22 C). Assim, em cultivos contínuos intermitentes utilizando maltose como fonte de carbono e 100 mM de lisina inicial, a putrescina foi a diamina com a qual foram obtidos os melhores resultados de produção de CefC.

Figura 21 - Biomassa (A), produção de cefamicina C (B) e produção específica (C) de *S. clavuligerus* em meios contendo diferentes concentrações de diaminas e maltose como fonte de carbono.

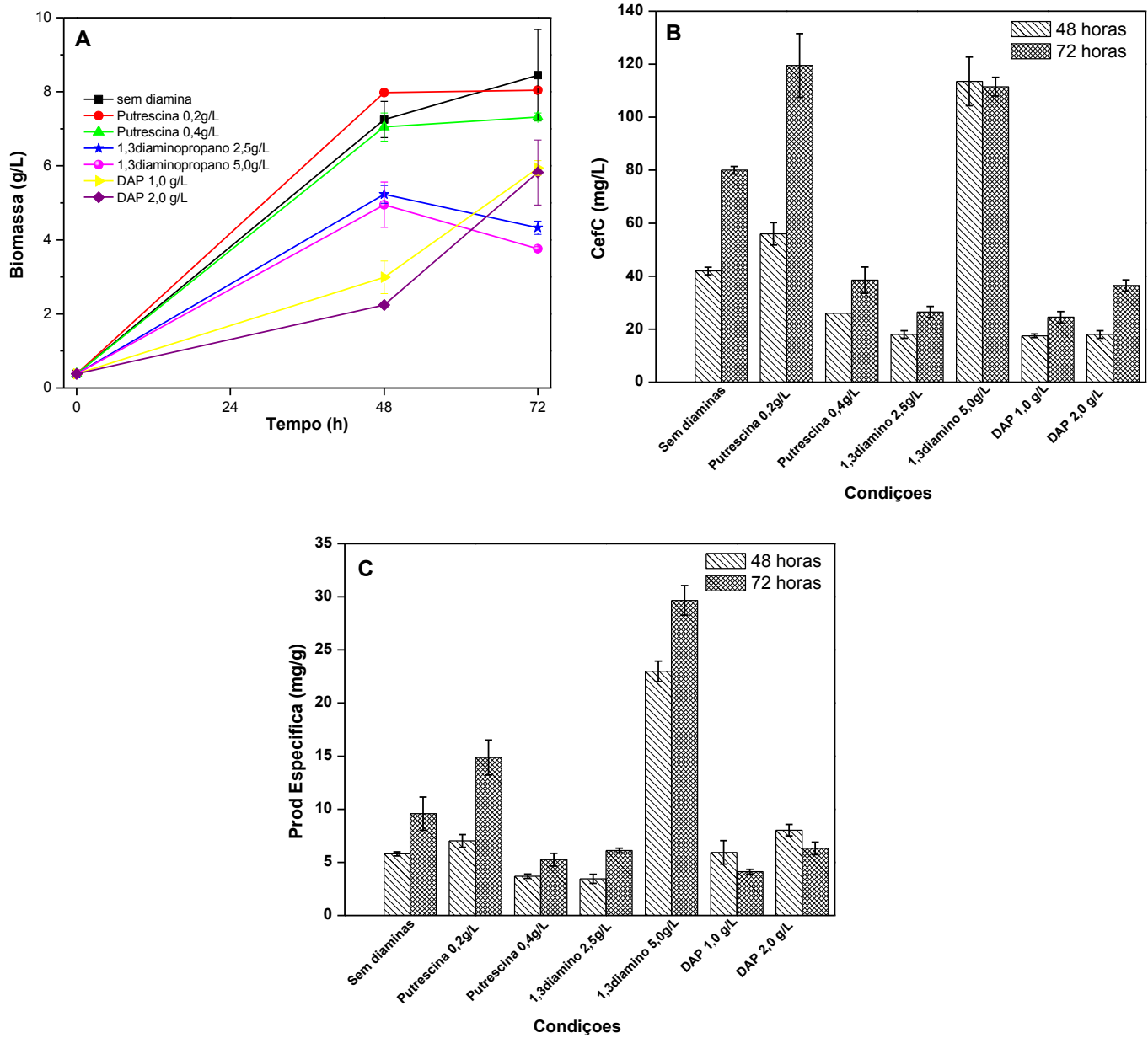
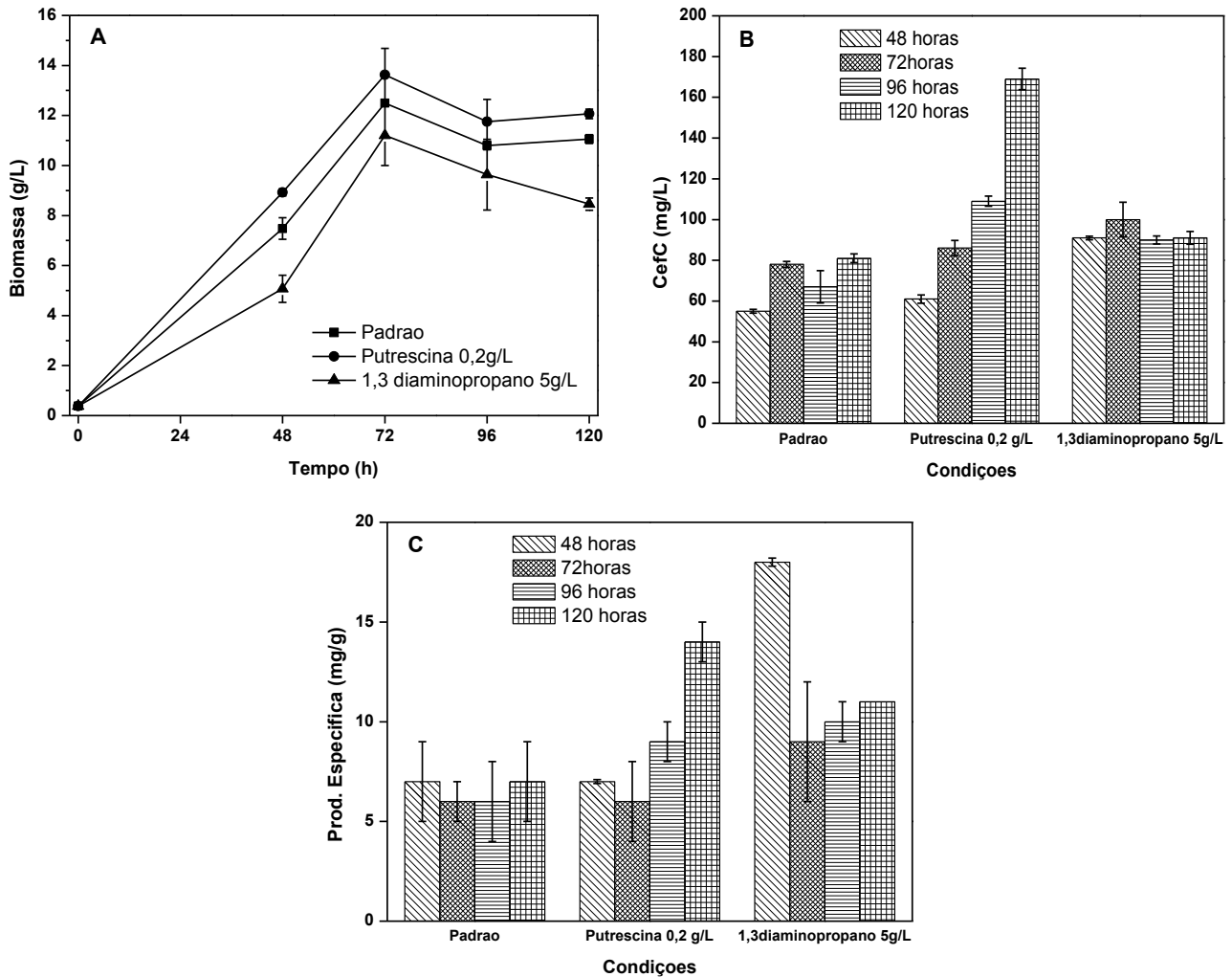


Figura 22 - Cultivo contínuo intermitente de *S. clavuligerus*, pH inicial 7,2, alimentação com maltose e L-lisina. (A) biomassa, (B) produção de cefamicina C e (C) produção específica.



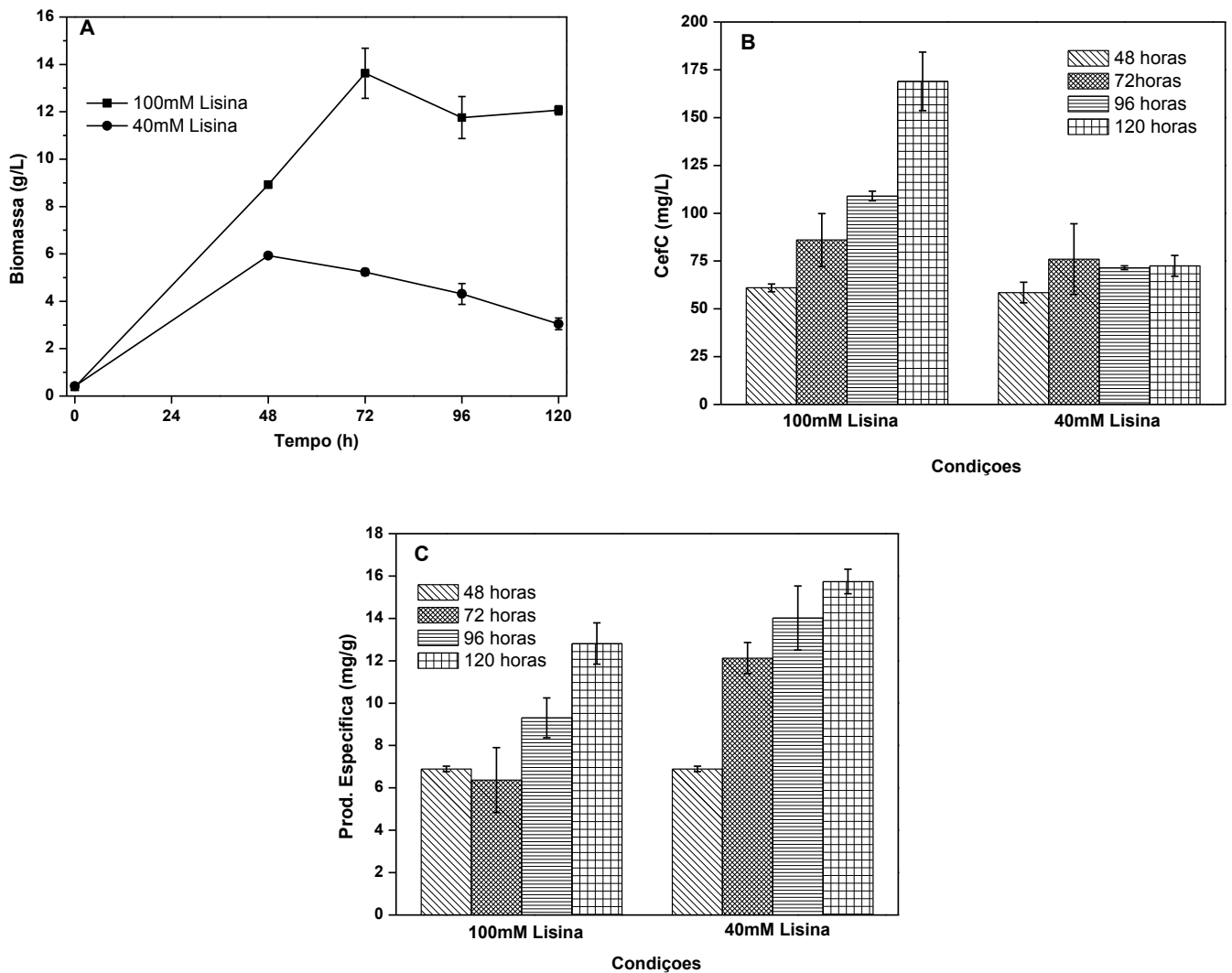
A etapa seguinte foi avaliar o efeito da concentração inicial de L-lisina (40 mM ou 100 mM) em cultivo contínuo intermitente, em meio padrão contendo maltose e 0,2 g/L de putrescina, alimentado com maltose e L-lisina. Todos os meios foram suplementados com 18,75 mM de L-lisina ao longo da fermentação, de forma a totalizar 118,75 mM ou 58,75 mM do aminoácido ao final do processo (Tabela 15).

Tabela 15 - Composição dos meios de produção e concentrações de maltose e lisina no meio reacional, a cada suplementação, nos cultivos contínuos intermitentes em frascos agitados (volume constante 45 mL, $D = 0,0056 \text{ h}^{-1}$); alimentação a partir de 48 horas.

Componentes	Meio de produção		Suplementação*	
	C1	C2	C1	C2
Maltose (g/L)	10,0		36,2	
L-lisina (mM)	40	100	46,8	
Putrescina (g/L)	0,2		Não há	

* a concentração nos frascos ao final do processo devido à suplementação foi de 14,5 g/L de maltose em todos os meios e de 18,75 mM de L-lisina.

Figura 23 - Cultivo contínuo intermitente de *S. clavuligerus*, pH inicial 7,2, em meio contendo 0,2 g/L de putrescina, com 100 e 40mM de L-lisina inicial, alimentação com maltose e lisina. (A) biomassa, (B) produção de cefamicina C e (C) produção específica.

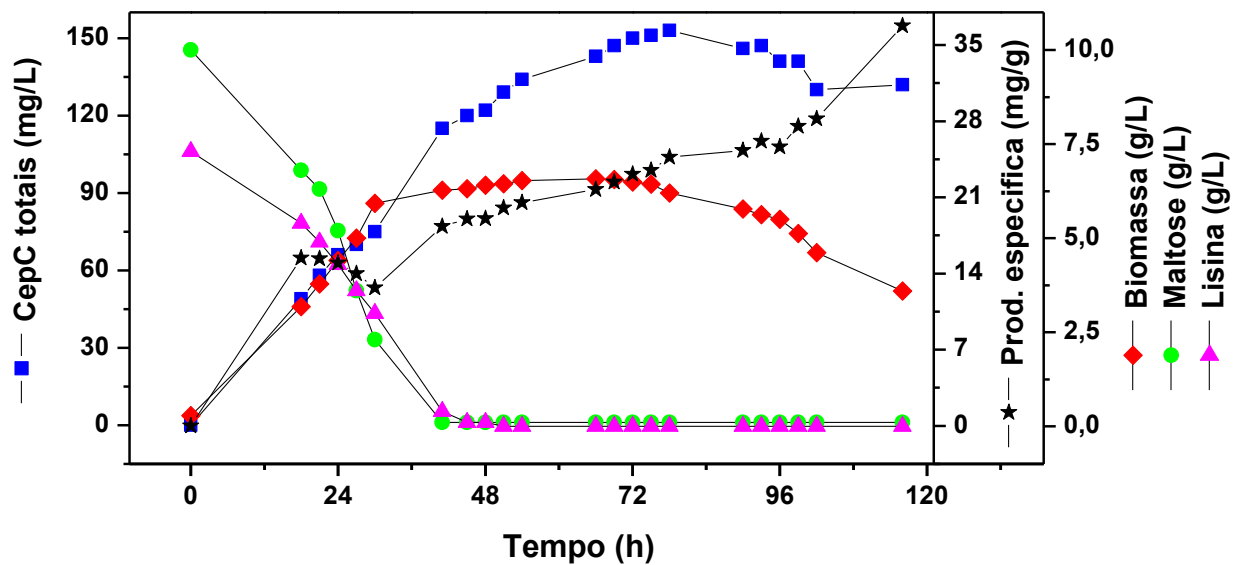


Em relação à biomassa (Figura 23 A), podemos observar que a adição de 100 mM de lisina propiciou um aumento de até 3 vezes quando comparado ao meio com apenas 40 mM do aminoácido, mostrando a grande influência da lisina no metabolismo primário de *S. clavuligerus*. A maior produção volumétrica de CefC (Figura 23 B) também foi obtida em meio contendo 100 mM de L-lisina inicial. Entretanto, observamos na Figura 23 C uma produção específica maior quando há adição de menores concentrações de lisina. Esses resultados mostram que o rendimento de CefC ao final do processo fermentativo (120 horas) foi cerca de 22% maior quando iniciamos a fermentação com 40 mM de lisina. Além do mais, análises do aminoácido mostraram que o micro-organismo não consome o total de 118,75 mM, sobrando entre 30 e 40 mM de lisina. Isso significa uma grande desvantagem econômica. Por outro lado, no processo com 40 mM de L-lisina inicial, o aminoácido foi totalmente consumido. Assim, um cultivo com 40 mM de L-lisina inicial e 0,2 g/L de putrescina foi realizado em biorreator de bancada (Figura 24) com o objetivo de avaliar um meio de cultura com condições economicamente viáveis e, assim, minorar as perdas de matéria prima. As alimentações com maltose e lisina foram iniciadas com 41 horas de processo e mantidas continuamente (cultivo contínuo), para que o micro-organismo continuasse em fase estacionária de crescimento. Durante cada intervalo de amostra, observou-se o consumo total, tanto da fonte de carbono como do aminoácido, por esta razão, a Figura 24 mostra as concentrações de maltose e lisina ao redor de zero.

Como podemos observar na Figura 24, quando iniciamos a fermentação com 40 mM de L-lisina (7,3 g/L), mesmo alimentando, todo o aminoácido é consumido antes de 48 horas de processo. O mesmo aconteceu com a maltose. A biomassa em biorreator manteve o mesmo perfil daquele observado em mesa agitada, máximo de 6,0 g/L e terminando em 3,0 g/L. Esta queda da concentração celular foi provavelmente devido à insuficiência de maltose para manter o micro-organismo em fase estacionária de crescimento. A produção de CefC em biorreator foi o dobro (150 mg/L) da obtida em meio base acrescido apenas de 40 mM de lisina (cultivos do tipo batelada – Figura 10). Assim, podemos concluir que a adição de 0,2 g/L de putrescina ao meio de cultura favoreceu a produção de CefC. Entretanto, maiores concentrações do antibiótico (240 mg/L – Figura 15) foram obtidas no processo contínuo intermitente sem a adição de qualquer diamina, reduzindo a concentração

inicial de lisina para 30 mM e utilizando o amido como fonte de carbono. Diante destes resultados, optou-se por avaliar o efeito da putrescina em cultivos do tipo batelada.

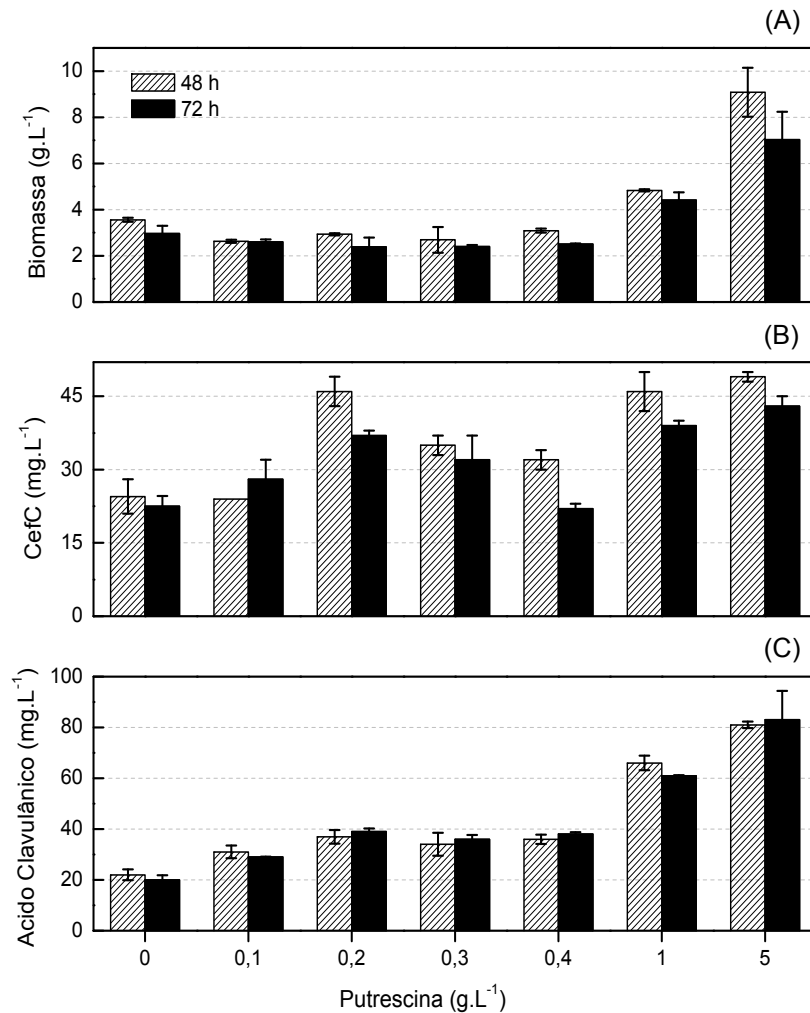
Figura 24 - Resultados de biomassa, produção de CefC e consumos de maltose e lisina em processo contínuo em biorreator convencional em meio padrão contendo 40mM de L-lisina e 0,2g/L de putrescina iniciais.



4.2.2.1 Investigação da melhor concentração de putrescina no meio de cultivo.

Para investigar a melhor concentração de putrescina no meio de cultura, foi avaliada a adição de 0,1 g/L a 0,4 g/L e concentrações mais elevadas como 1,0 g/L e 5,0 g/L (Figura 25) para averiguar se este composto atua como fonte de carbono. O aminoácido L-lisina foi retirado do meio de cultivo para não interferir nos resultados. Além de biomassa e CefC também foram realizadas análises de ácido clavulânico com o objetivo conhecer o efeito da putrescina na regulação da rota de CefC e AC.

Figura 25 - Biomassa (A), produção de CefC (B) e ácido clavulânico (C) obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* com diversas concentrações de putrescina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



Como podemos observar na Figura 25 A, concentrações de até 0,4 g/L de putrescina não influenciam no metabolismo primário de *S. clavuligerus*, entretanto, a adição de 5,0 g/L da diamina propiciou um aumento de 2,5 vezes na biomassa. Provavelmente o succinato resultante da degradação da putrescina (Figura 26) foi utilizado no ciclo de Krebs, gerando mais energia e consequente aumento de biomassa.

Em relação à produção de CefC, observamos que nas concentrações de 0,2 g/L, 1,0 g/L e 5,0 g/L a produção do antibiótico foi praticamente a mesma, cerca de 47 mg/L e 40 mg/L, em 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 25 B). Essas altas produções de CefC obtidas com 1,0 g/L e 5,0 g/L podem estar relacionadas ao

crescimento da biomassa (Figura 25 A), uma vez que as produções específicas, ao final da fermentação foram de aproximadamente 8,8 e 6,1 mg/g, respectivamente, enquanto que com a adição de 0,2 g/L a produção específica foi de 15,5 mg/g (dados não mostrados). Isso comprova que a putrescina em baixas concentrações (0,2 g/L) agiu como indutor da biossíntese de CefC, embora a adição de 0,4 g/L da diamina tenha sido prejudicial na biossíntese do antibiótico, como observado em experimentos anteriores (Figura 25 B).

A produção de ácido clavulânico nunca havia sido investigada, e curiosamente observamos que a adições de até 0,4 g/L de putrescina, mantêm a produção de AC abaixo de 40 mg/L (Figura 25 C). Entretanto, a adição de concentrações a partir de 1,0 g/L de putrescina favorecem a produção de AC.

De acordo com a base de dados MetaCys (responsável pela descrição de 2988 vias metabólicas), em bactérias a via mais comum de formação e degradação da putrescina está simplificada na Figura 26. Além da formação do succinato, a putrescina também pode gerar outra diamina (espermidina), por meio da via de biossíntese de poliaminas descrita na introdução (IGARASHI e KASHIWAGI, 2010).

Figura 26 - Via simplificada da formação de putrescina a partir de L-arginina e sua degradação gerando succinato.

L-arginina → agmatina → PUTRESCINA → glutamato → succinato

Fonte: MetaCyc Pathways. Disponível em: <<http://biocyc.org/META/new-image?object=Putrescine-Degradation>>. Acesso em: 19 fev. 2013.

Um estudo realizado por Romero e colaboradores (1986) mostrou que a suplementação do meio de cultura com 1,74 g/L de arginina aumentou a formação de ácido clavulânico e diminuiu a biossíntese de cefamicina em *S. clavuligerus*, sendo a produção de AC diretamente proporcional à concentração de arginina no meio de cultura.

De acordo com os dados obtidos neste experimento, adições a partir de 1,0 g/L de putrescina favorecem a produção de AC sendo que quanto maior a concentração da diamina no meio, maior a produção de ácido clavulânico. O máximo

de AC produzido (80 mg/L) foi obtido com o máximo de putrescina adicionada no cultivo (5,0 g/L), mantendo baixa a biossíntese de CefC, apenas 45 mg/L (Figura 25 C), assim como observou Romero et al., 1986 com a adição de arginina no meio de cultura. Para relatar com exatidão o efeito da putrescina na biossíntese de AC, seriam necessários mais experimentos com concentrações maiores da diamina no meio de cultivo. Mesmo assim, com esses resultados podemos inferir que concentrações acima de 1,0 g/L de putrescina no meio de cultivo inibe a degradação da arginina por mecanismo de *feedback* propiciando uma maior disponibilidade deste composto para a biossíntese de AC. Assim, a produção de um determinado bioativo (AC ou CefC) depende diretamente da concentração de putrescina no meio de cultura.

Tendo como objetivo a produção de CefC sem interferência da biomassa, o planejamento experimental a seguir foi realizado com as concentrações de 0,2 g/L e 0,4 g/L de putrescina, afim de mostrar o perfil matemático desta diamina na biossíntese do antibiótico.

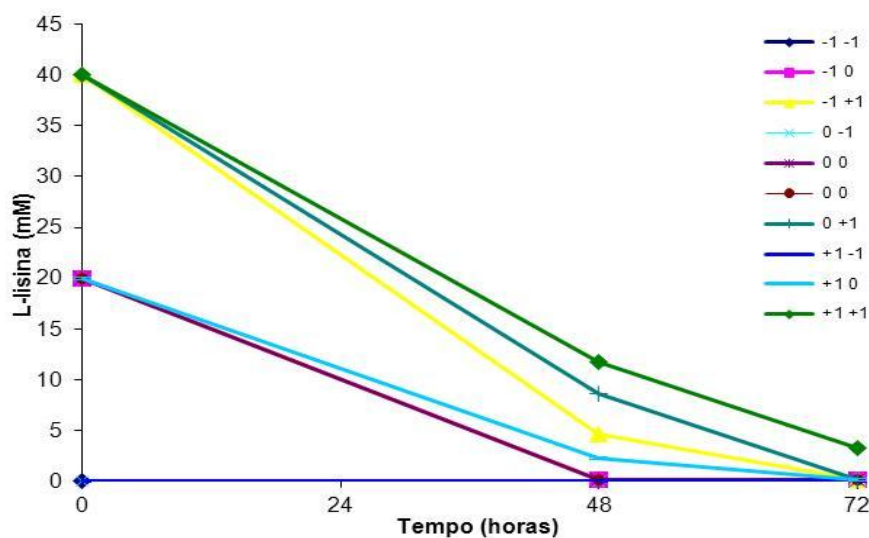
4.2.3 Planejamento Experimental 3ⁿ: Putrescina e L-lisina

Com o objetivo de investigar a relação entre os compostos putrescina e lisina em diferentes concentrações, foi realizado um planejamento experimental 3ⁿ (faces centradas), cujas condições são mostradas na Tabela 16. O consumo de L-lisina foi analisado em 48 e 72 horas de produção. Observamos pela Figura 27 que em 72 horas de cultivo, o consumo do aminoácido foi praticamente total, com uma pequena diferença apenas na condição (+1+1). Analisando os dados de consumo em 48 horas, podemos notar que nas condições em que há maior concentração de putrescina (0,4 g/L), o consumo de lisina é mais lento. Esse pode ser o motivo pelo qual a produção de CefC é menor quando adicionamos 0,4 g/L desta diamina ao meio de cultivo.

Tabela 16 - Planejamento fatorial 3ⁿ: condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de Putrescina no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtidas em 72 horas de fermentação.

Meio	<i>Variáveis Independentes</i>				<i>Variável Resposta</i>	
	<i>Unidades Codificadas</i>		<i>Unidades Reais</i>		<i>CepC totais (mg/L)</i>	
	Putrescina (x ₁)	L-lisina (x ₂)	Putrescina (g/L)	L-lisina (mM)	Medido	Previsto
1	-1	-1	0	0	18,0 ± 1,0	10,8
2	-1	0	0	20	38,0 ± 0,9	42,5
3	-1	1	0	40	60,0 ± 0,4	62,7
4	0	-1	0,2	0	24,0 ± 1,5	37,5
5	0	0	0,2	20	65,8 ± 0,0	62,8
6	0	0	0,2	20	70,0 ± 0,0	62,8
7	0	0	0,2	20	58,0 ± 0,0	62,8
8	0	0	0,2	20	65,0 ± 0,0	62,8
9	0	+1	0,2	40	83,0 ± 1,3	76,8
10	+1	-1	0,4	0	15,0 ± 0,4	8,6
11	+1	0	0,4	20	25,0 ± 1,9	27,8
12	+1	+1	0,4	40	30,0 ± 0,9	35,5

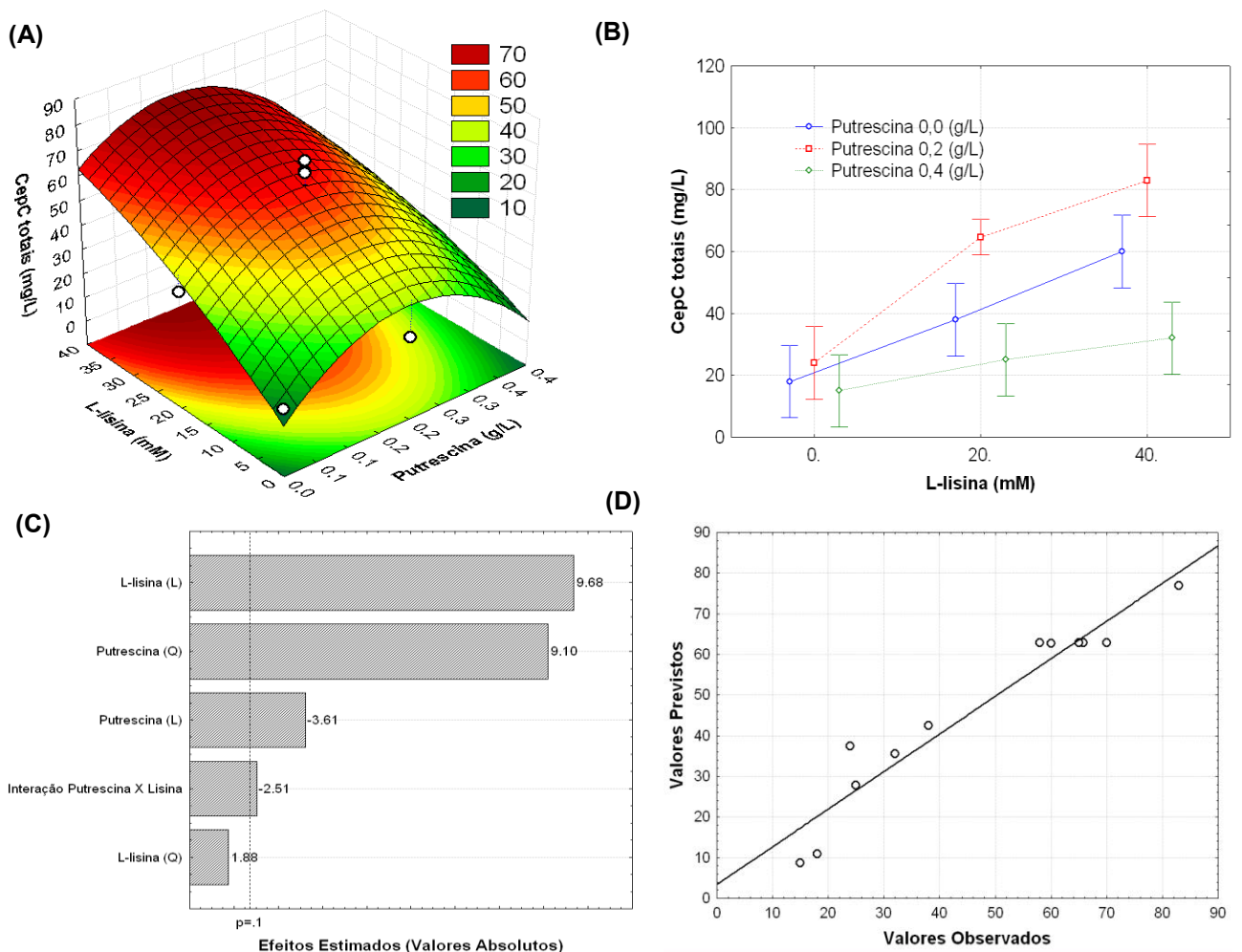
Figura 27 - Planejamento experimental 3ⁿ com putrescina e lisina: consumo do aminoácido L-lisina.



As superfícies de repostas obtidas a partir do tratamento dos dados de 48 e 72 horas de processo apresentaram coeficientes de determinação de $r^2 = 0,76$ e

$r^2 = 0,92$, respectivamente. Por esse motivo, descartamos o modelo gerado em 48 horas e apresentamos apenas os dados obtidos em 72 horas de cultivo. Dentro da faixa estudada, observa-se que a concentração ótima de putrescina para a produção de CepC ficou em torno de 0,20 g/L (Figura 28 A).

Figura 28 - Superfície de reposta (A), produção de CefC em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de CefC previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,92$.



De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 28 C), o efeito linear da lisina e o efeito quadrático da putrescina foram altamente significativos, isso que mostra que a produção de CefC aumenta proporcionalmente com a adição de lisina, mas decai conforme a concentração de putrescina aumenta. O efeito linear da diamina e sua interação com a lisina são significativos, mas atuam de modo negativo na biossíntese do antibiótico (Figura 28 C).

A equação do modelo quadrático é expressa para intervalos de confiança de 90% (Equação 3), com variáveis independentes em valores codificados. Como podemos observar o efeito quadrático da lisina não está descrito na equação 3.

$$\text{CefC}(\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}) = 40,6(\pm 1,5) - 14,7(\pm 4,1)\cdot x_1 + 27,7(\pm 3,1)\cdot x_1^2 + 39,3(\pm 4,1)\cdot x_2 - 12,5(\pm 5,0)\cdot x_1\cdot x_2$$

Equação 3

Pelo modelo matemático (Equação 3), o máximo de CefC obtido será de aproximadamente 83 mg/L com a adição de 0,13 g/L de putrescina e 58,14 mM de L-lisina. Este rendimento é semelhante ao obtido experimentalmente (condição 0 +1 da Tabela 16), onde adicionamos 0,2 g/L de putrescina e 40 mM de lisina. Desta forma, a adição de 0,2g/L de putrescina ao meio de cultura é favorável à produção de CefC, comparando-se a cultivos sem adição do composto.

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de CefC obtidos com a adição de putrescina e lisina no meio de cultivo.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	**F	p
Modelo	5548,39	5	1109,68	14,91	0,002488
Residual	446,38	6	74,40		
Falta de ajuste	372,10	3	124,03	5,01	0,109302
Erro puro	74,28	3	24,76		
Total	5967,77	11			

*R² = 0,9252; SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MQ: Média dos quadrados

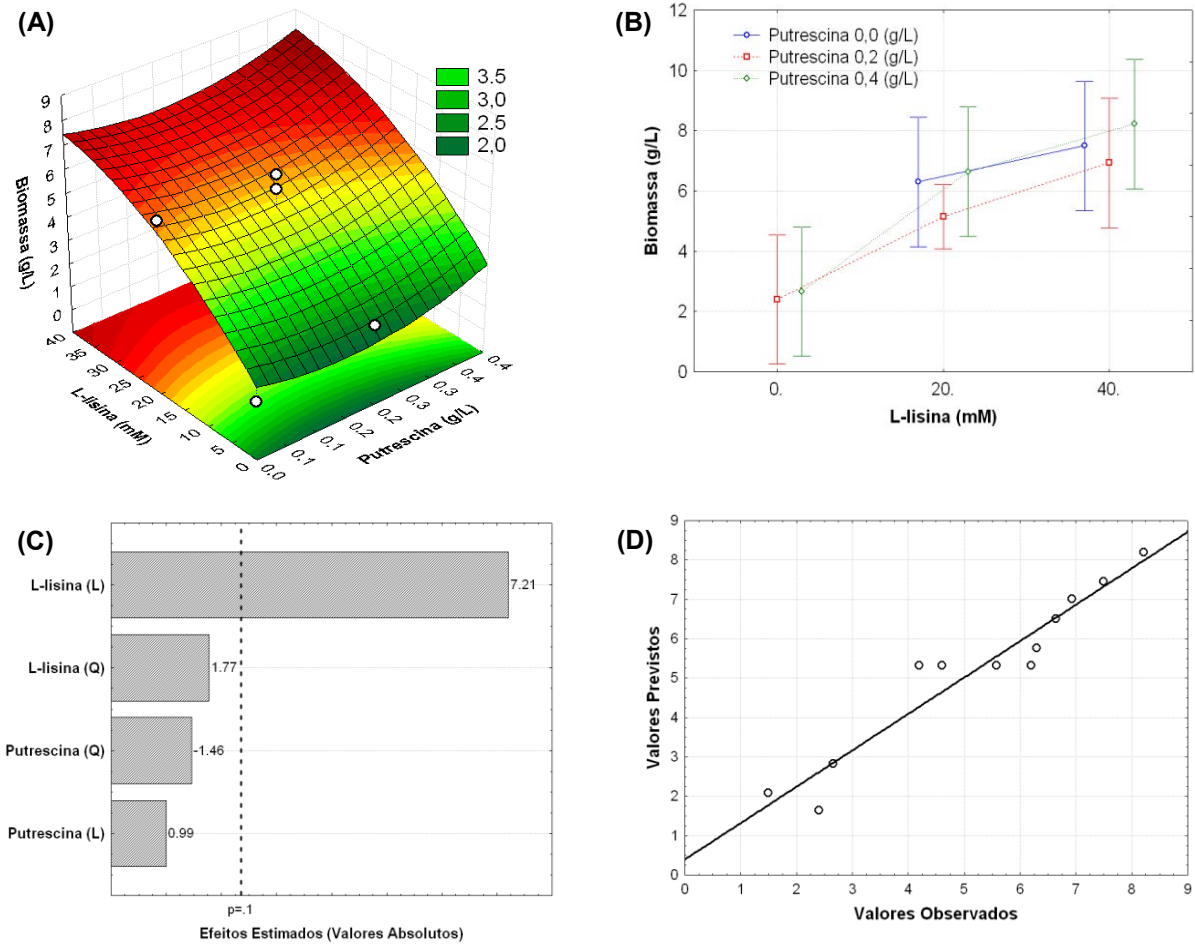
** F_(5,6) a 90% de confiança = 3.11

A tabela ANOVA (Tabela 17) mostra por meio de F_{calculado} e p valor que o modelo se ajustou muito bem aos dados experimentais.

Em relação à biomassa, como podemos observar no diagrama de Pareto (Figura 29 C), para um intervalo de 90% de confiança, somente o aminoácido L-lisina exerce efeito sobre o crescimento. Os parâmetros linear e quadrático da putrescina foram rejeitados no tratamento estatístico (Figura 29 C). Com esse resultado concluímos que esta diamina não influencia o metabolismo primário de

Streptomyces clavuligerus. Esse efeito está demonstrado graficamente na Figura 29 A.

Figura 29 - Superfície de reposta (A), biomassa em 72 horas de cultivo (B), diagrama de Pareto (C) e valores de biomassa previstos e observados (D). Nível de significância igual a 0,1 (linha vertical tracejada) e $r^2=0,92$.



Equação do modelo em valores codificados:

$$\text{Biomassa (g} \cdot \text{l}^{-1}) = 5,2 (\pm 0,3) + 5,4 (\pm 0,7) \cdot x_2 \quad \text{Equação 4}$$

Esses dados obtidos por meio de planejamento experimental corroboram com os experimentos realizados anteriormente onde mostram que baixas concentrações de putrescina não influenciam na biomassa.

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático* a 90% de confiança, para os dados de biomassa obtidos com a adição de putrescina e lisina no meio de cultivo.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	**F	p
Modelo	47,29	5	9,46	14,78	0,002548
Residual	3,87	6	0,64		
Falta de ajuste	1,38	3	0,46	0,42	0,791873
Erro puro	2,49	3	0,83		
Total	51,16	11			

*R² = ; SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MQ: Média dos quadrados

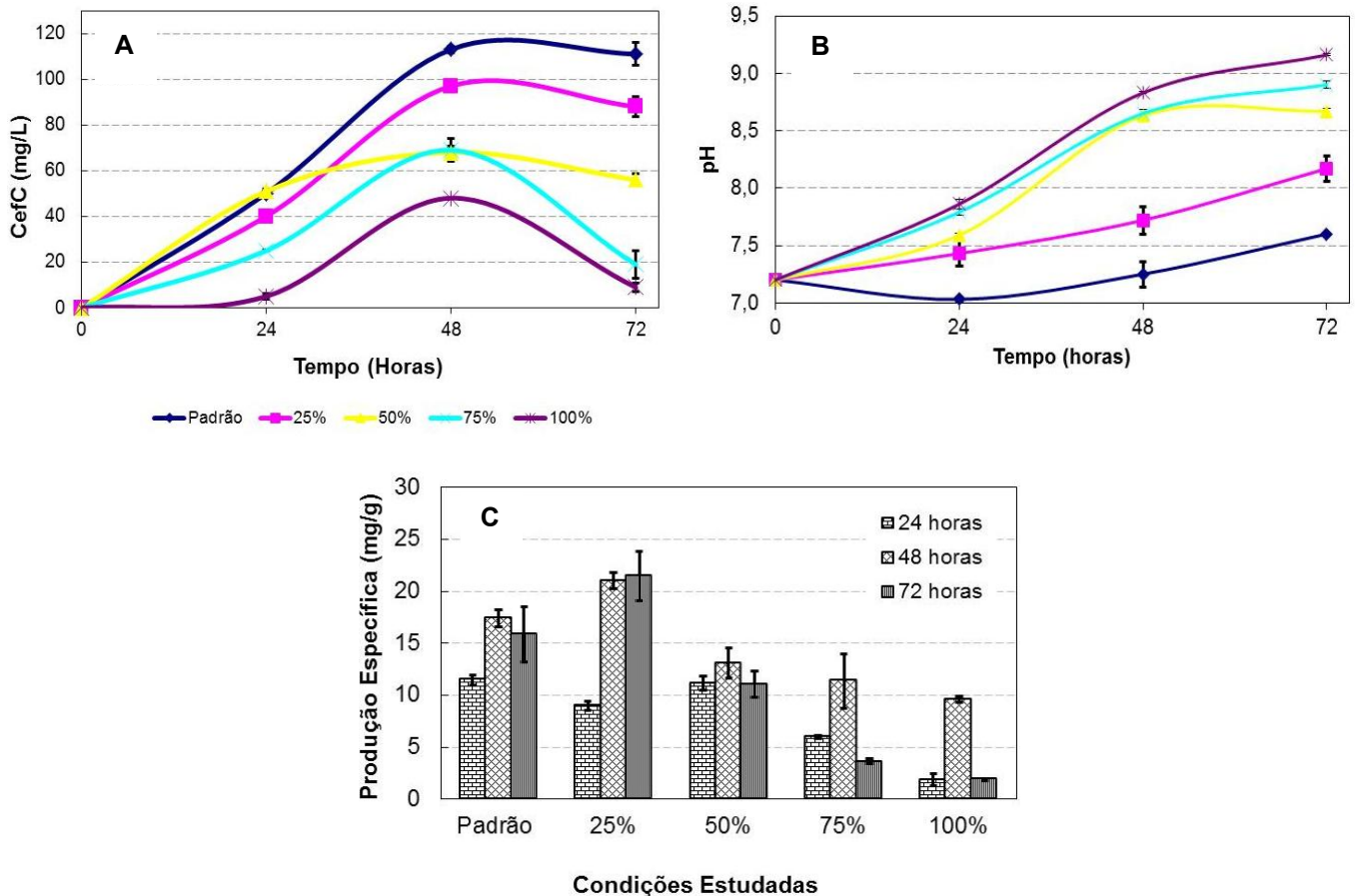
** F_(5,6) a 90% de confiança = 3.11

Pela Tabela 18 mostra que o modelo se ajustou aos dados experimentais, rejeitando a hipótese da falta de ajuste.

4.3 Efeito do alfa-cetoglutarato

Aharonowitz e Demain (1978) observaram que ácidos orgânicos como fontes de carbono, por exemplo, ácido α -cetoglutarato, succinato e fumarato, elevaram a produção específica de cefalosporinas, sendo o ácido alfa-cetoglutárico o melhor para a produção de cefamicina C. Entretanto, ao contrário do observado com carboidratos, o crescimento em sais orgânicos é acompanhado por um aumento acentuado do pH. Para contornar este problema, foram preparados meios de cultura com diferentes proporções de ácido alfa-cetoglutárico e maltose (descritos no material e método), uma vez que o consumo de maltose promove uma ligeira queda do pH. Considerou-se para os cálculos de concentração que a molécula de maltose apresenta 1,5 vezes mais carbono do que a molécula de alfa-cetoglutarato (Tabela 7 – Materiais e métodos). Os resultados estão demonstrados na Figura 30.

Figura 30 – Produção de CefC (A), pH (B) e produção específica (C) em 24, 48 e 72 horas em meio de cultivo submerso com diferentes concentrações de alfa-cetoglutarato (0% (padrão), 25%, 50%, 75% e 100%).

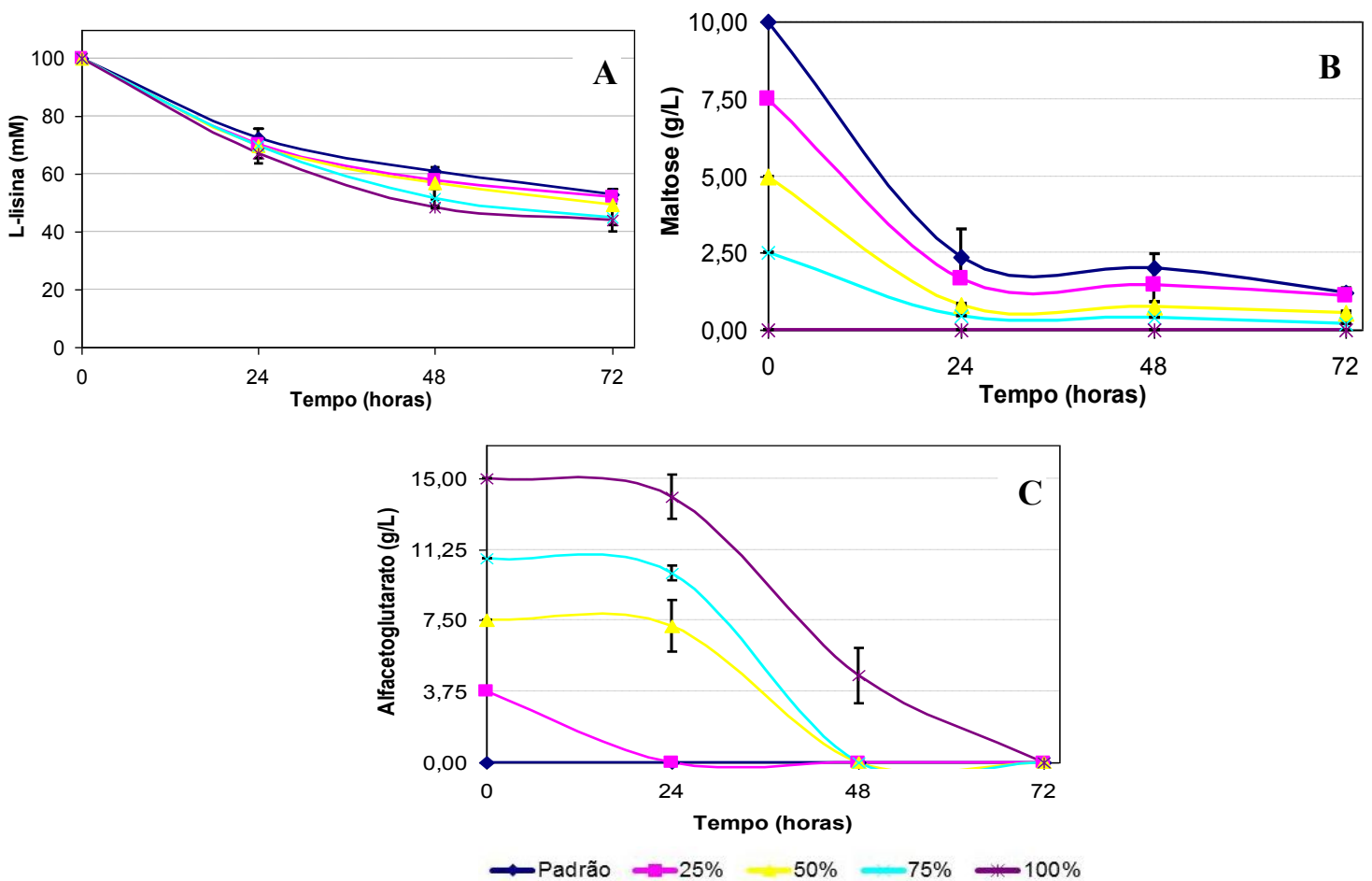


De acordo com a Figura 30 A, a produção de CefC mostrou-se inversamente proporcional à concentração de alfa-cetoglutarato, possivelmente devido ao aumento do pH (Figura 30 B). Desta forma, pode-se concluir que a queda brusca de CefC de 48 para 72h de fermentação nos meios com 75% e 100% de alfa-cetoglutarato, Figura 29 A, foi consequência da degradação do antibiótico em meio mais alcalino, cujo pH foi maior que 9,0. Estes valores altos de pH também afetaram negativamente a formação de biomassa, levando a baixos valores de produção específica (Figura 30 C).

Análises em HPLC (Figura 31) mostraram que no meio com 100% de alfa-cetoglutarato, o consumo do aminoácido L-lisina foi 20% maior que o observado em meio padrão (Figura 31 A). Um fato interessante foi observado quanto ao consumo de maltose e α -cetoglutarato. Enquanto a maltose foi quase totalmente consumida

até 24 horas (Figura 31 B), o alfa-cetogluturato foi consumido entre 24 e 48 horas (Figura 31 C). Para o meio que continha apenas alfa-cetogluturato, tal fato pode significar que o micro-organismo utilizou-se de outra fonte de carbono para o crescimento inicial. Levantamos a hipótese de que a Lisina tenha sido esta fonte de carbono e, talvez por isto, tenha ocorrido a diferença de 20% no consumo deste aminoácido.

Figura 31 - Consumo de L-lisina (A), maltose (B) e alfa-cetogluturato (C) por *S. clavuligerus*. Meios com diferentes concentrações de alfa-cetogluturato (0% (padrão), 25%, 50%, 75% e 100%).



De acordo com os resultados, a adição de alfa-cetogluturato como fonte de carbono não favoreceu a produção de CefC, sendo que quanto maior a proporção de alfa-cetogluturato no meio de cultura, menor a produção do antibiótico.

4.4 Mutante de *S. clavuligerus* super produtor de cefamicina C

Após a realização de inúmeros experimentos com *S. clavuligerus*, objetivamos estudar uma linhagem mutante denominado 45.41 que se mostrou 2 a 3 vezes mais produtivo que a selvagem em meio padrão. Este mutante foi obtido por meio de mutagênese clássica com o agente MMS (metil- metanosulfonato) a partir da linhagem selvagem ATCC 27064, em nosso laboratório (ANTONIO, 2012).

Inicialmente foram realizados experimentos adicionando várias concentrações de lisina (0 a 100 mM) no meio padrão, a fim de comparar a biomassa e o perfil produtivo de cefamicina C e ácido clavulânico entre a linhagem selvagem e mutante (Figura 32).

Na Figura 32 - 1A, podemos ver que a biomassa da linhagem selvagem foi crescente de acordo com a adição de lisina no meio de cultivo, alcançando o máximo de 7,5 g/L em 72 horas de processo, com 100 mM do aminoácido. Para a linhagem mutante, a biomassa máxima foi de 4,5 g/L, independentemente da concentração de lisina adicionada ao meio e do tempo de cultivo (Figura 32 - 2A). Em relação à biossíntese de CefC observamos que a produção foi diretamente proporcional à adição de lisina, alcançando o máximo de 120 mg/L e 110 mg/L, em 72 horas de processo, para a linhagem selvagem e mutante, respectivamente (Figura 32 B). Comparando as duas linhagens, vemos uma produção volumétrica semelhante, mas a produção específica do mutante foi 1,5 vezes maior que *S. clavuligerus*.

Figura 32 - Produção de biomassa (A), CefC (B) e ácido clavulânico (C) obtidas em cultivo submerso da linhagem selvagem (1) e mutante 45.41(2), em 48 e 72 horas de processo, em meio contendo amido como fonte de carbono e diversas concentrações de lisina.

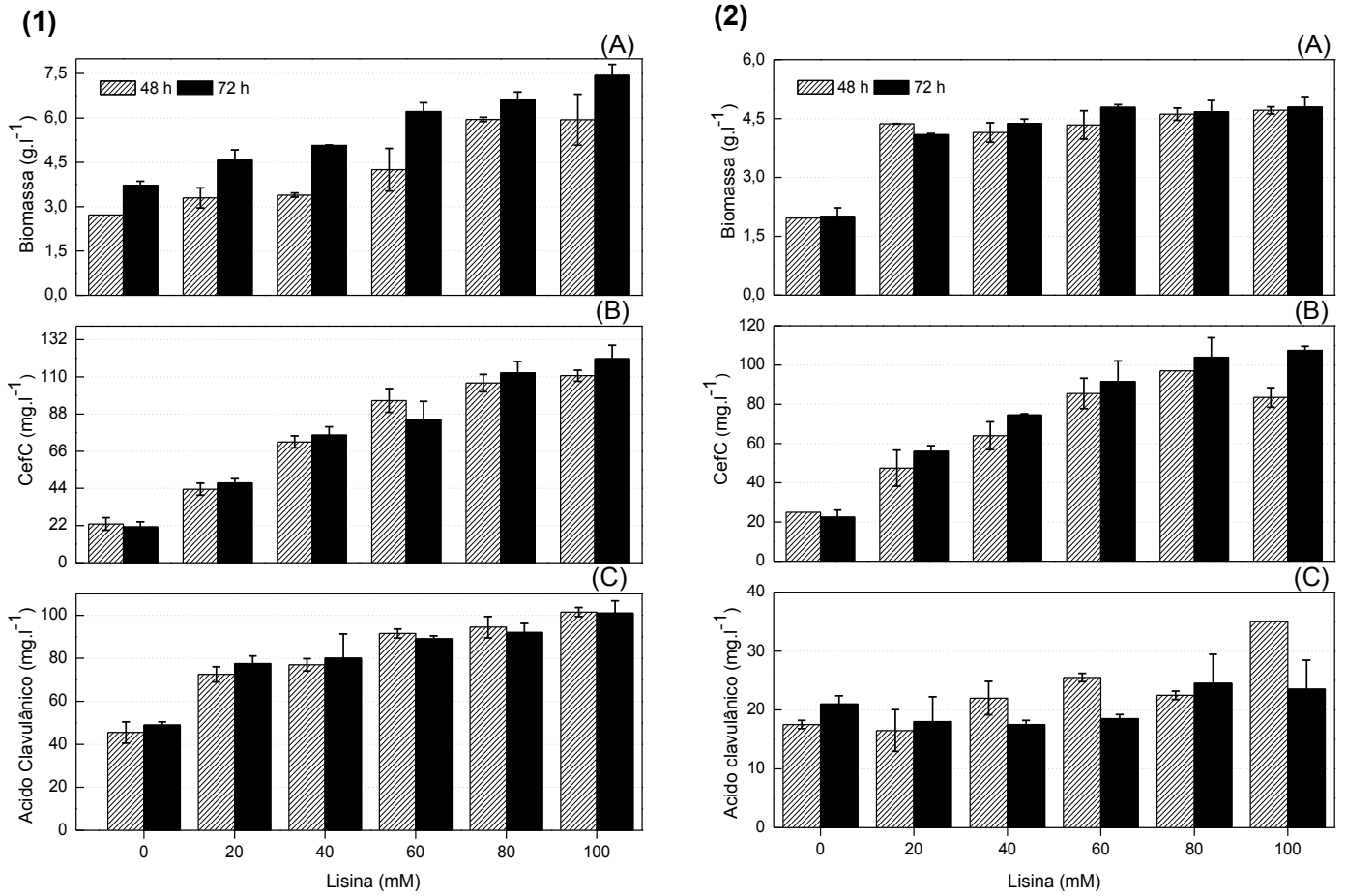
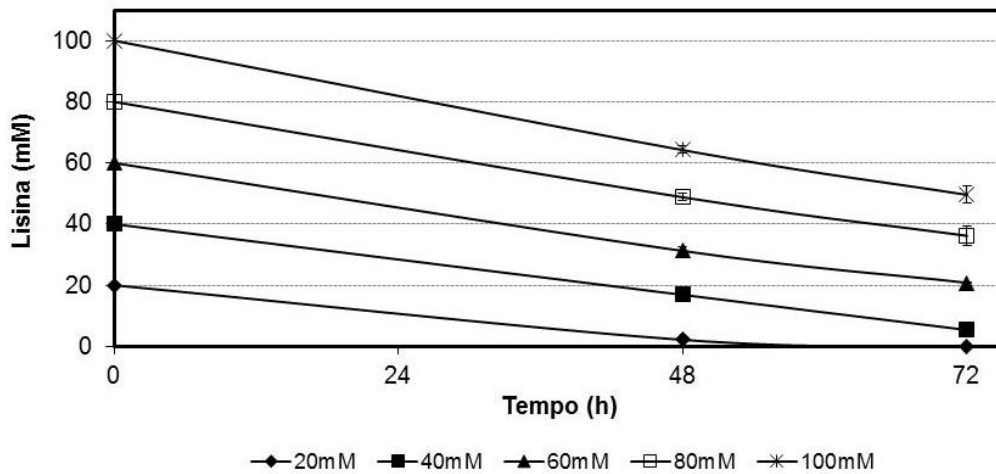


Figura 33 - Perfil do consumo do aminoácido L-lisina em cultivo submerso da linhagem mutante 45.41, em 48 e 72 horas de processo.



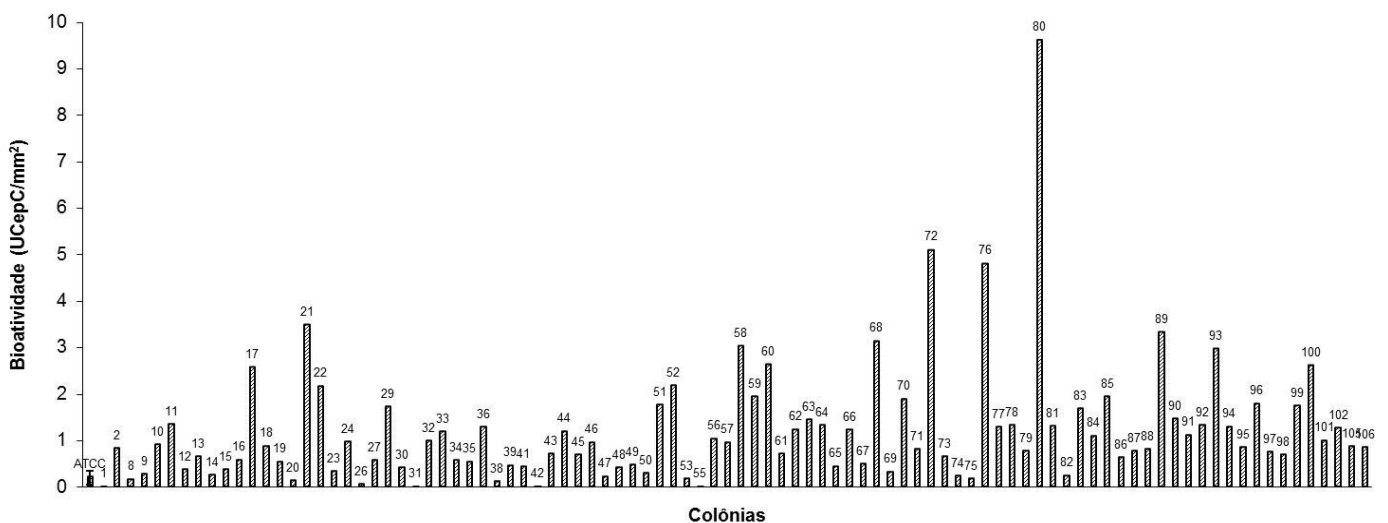
Uma diferença significativa foi observada em relação à produção do ácido clavulânico. Enquanto a linhagem selvagem produz as mesmas concentrações de AC e CefC, a biossíntese de AC para o mutante foi 80% menor, não chegando a 40 mg/L (Figura 32 C). Outra grande diferença está no consumo do aminoácido L-lisina. Na linhagem selvagem não houve residual com adições de até 60 mM do aminoácido, diferentemente da linhagem mutante que mostrou baixo consumo de lisina. A adição de apenas 40 mM de lisina já mostrou um residual de 13% do aminoácido, aumentando para 33% com 60 mM; 45% com 80 mM e até mesmo 50% com 100 mM de lisina inicial (Figura 33).

Por alguma razão a linhagem mutante 45.41 perdeu a sua capacidade super produtora de CefC, assim como a capacidade de utilizar lisina. Por essa razão, foi necessário realizar um “screening” com o objetivo de encontrar uma colônia que manteve o antigo perfil produtor do mutante.

4.5 Screening do mutante 45.41

Foram avaliados os halos de inibição de 106 colônias. Algumas colônias não apresentaram halos, por isso não aparecem no gráfico. Todos os halos foram comparados com a média dos halos obtidos da linhagem selvagem ATCC que foi cultivada seis vezes. A bioatividade de todas as colônias, inclusive da linhagem selvagem estão mostradas na Figura 34.

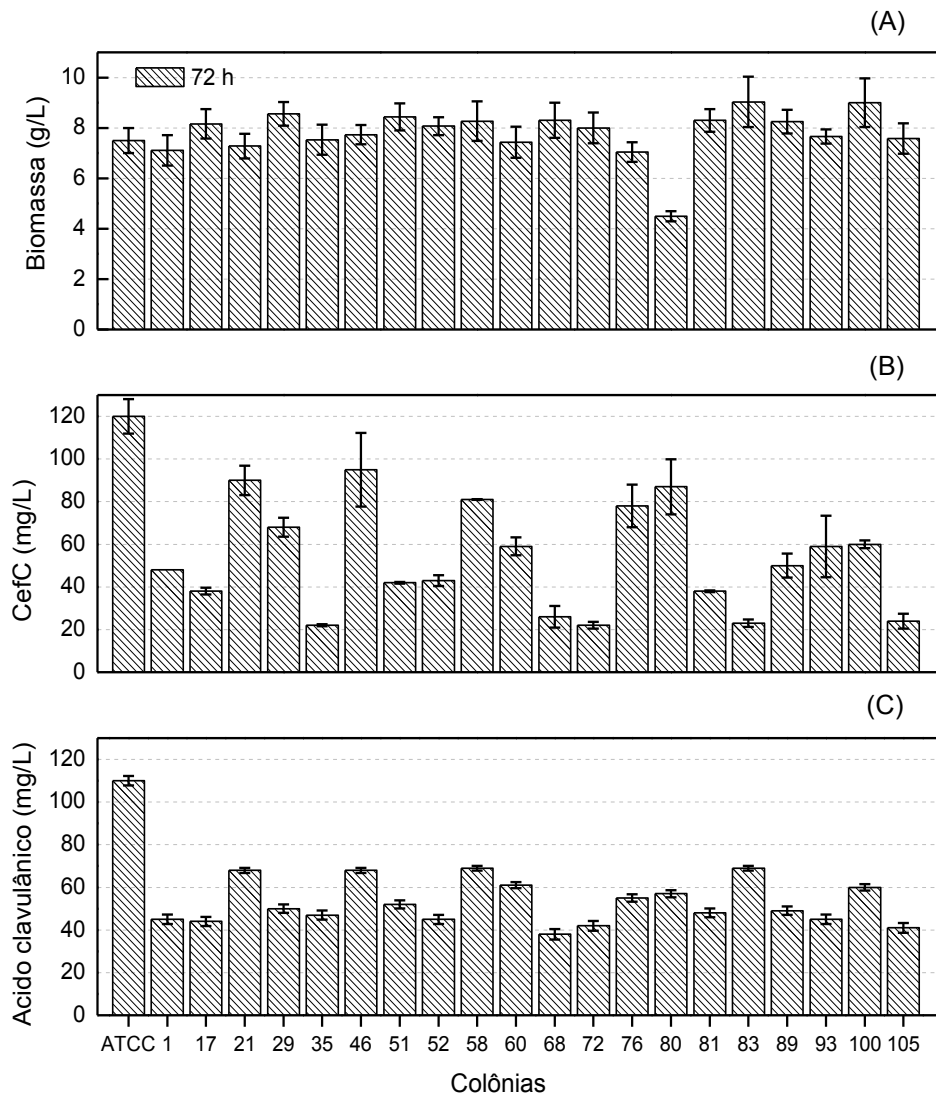
Figura 34 - Bioatividade das colônias isoladas a partir do mutante 45.41 frente à linhagem selvagem ATCC 27064.



Foram selecionadas 19 colônias com maior bioatividade e uma colônia com a pior bioatividade (nº 01) para a realização do cultivo submerso em meio padrão com amido e adição de 100 mM de lisina com o objetivo de produzir o máximo de CefC. Também foi avaliada a biossíntese de ácido clavulânico. Todos os cultivos foram realizados em duplicata e comparados com ATCC 27064.

Como podemos observar na Figura 35 A, a colônia numero 80 apresentou a menor biomassa, cerca de 4,5 g/L. As demais colônias, assim como o ATCC e a colônia que mostrou a menor bioatividade (1) tiveram um crescimento acima de 7,0 g/L. De acordo com a Figura 35 B, a linhagem selvagem ainda apresenta a maior produção volumétrica de CefC (120 mg/L), as demais colônias tiveram uma produção abaixo de 100 mg/L. Apenas a colônia 80 mostrou uma produção específica maior que o ATCC, cerca de 19 mg/g e 16 mg/g, respectivamente. Entretanto, a produção volumétrica e específica da colônia 80 ainda não a classifica como um micro-organismo mutante super produtor de CefC. Em relação à produção de ácido clavulânico, observamos que todos os mutantes produziram menos que 80 mg/L, contrariamente a linhagem selvagem que produziu 110 mg/L (Figura 35 C). Apenas as colônias 21, 29, 46, 58, 76 e 80 mostraram uma produção de CefC maior que AC, as demais colônias apresentaram uma produção de AC maior ou igual a produção de CefC (Figura 35 C). Diante desses resultados não foi possível obter uma colônia super produtora de CefC para realizar os teste com as diaminas.

Figura 35 - Biomassa (A), produção de CefC (B) e ácido clavulânico (C) obtidos em cultivo submerso tipo batelada, até 72 horas, com amido e lisina. Colônias isoladas do mutante 45.41 e ATCC 27064.



5. Conclusões

Com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. A produção de cefamicina C foi altamente dependente da composição do meio de cultivo (adição de diferentes fontes de carbono e estimuladores de antibióticos β -lactâmicos) e do processo fermentativo (batelada ou modo contínuo intermitente);
2. A adição de apenas lisina (100 mM) ao meio base de produção de cefamicina C mostrou um aumento de 445% na produção do antibiótico. Entretanto, este meio de cultivo mostrou grande desvantagem econômica, uma vez que houve um excedente de 30 mM deste aminoácido ao final do processo fermentativo.
3. A adição conjunta de compostos estimuladores da biossíntese de cefamicina C promoveu um aumento significativo na produção do antibiótico, obtendo altos rendimentos com a adição de 1,3 diaminopropano e lisina em processos do tipo batelada.
4. Em cultivos do tipo batelada, a adição de 5,0 g/L de 1,3 diaminopropano e 40 mM de lisina, tendo o amido como fonte de carbono, propiciou um aumento na produção de cefamicina C de cerca de 800% em relação ao meio base sem adição de indutores. Além disso, não houve residual de lisina ao final do processo.
5. Para os cultivos no modo contínuo intermitente, a adição de 1,3 diaminopropano não foi promissora.
6. A adição de putrescina (0,2 g/L) e lisina (40 mM) no meio de cultura, tendo a maltose como fonte de carbono, mostrou uma produção de cerca de 150 mg/L quando realizado cultivos no modo contínuo intermitente. Entretanto, neste modo de operação, a maior produção de cefamicina C (240 mg/L), foi obtida iniciando a fermentação com 30 mM de lisina e alimentando com amido e lisina até o final do processo.

7. Concentrações de putrescina acima de 1,0 g/L, adicionada ao meio de cultivo, inibe a degradação da arginina por mecanismo de *feedback*, propiciando maior disponibilidade deste composto e conseqüentemente induzindo a maiores produções de ácido clavulânico.
8. A adição de α -cetoglutarato no meio de cultivo promoveu o aumento do pH (~9,0) e conseqüente queda da produção de cefamicina C, além da degradação do antibiótico ao final do processo, por razão do meio alcalino.
9. O mutante da linhagem selvagem ATCC 27064 mostrou perda da capacidade super produtora de cefamicina C. Como não foi possível recuperar a linhagem mutante por metodologia de "screening", os experimentos com adição conjunta de diaminas e lisina no meio de cultivo não foram realizados.

REFERÊNCIAS

- AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A. L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.14, p.159-164, 1978.
- AHARONOWITZ, Y.; MENDELOVITZ, S.; KIRENBERG, F.; KUPER, V. Regulatory mutants of *Streptomyces clavuligerus* affected in free diaminopimelic acid content and antibiotic biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 157, p. 337-340, 1983.
- ALCÁZAR, R.; MARCO, F.; CUEVAS, J. C.; PATRON, M.; FERRANDO, A.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1867-1876, 2006.
- ALTENBURGER, P.; KAMPFER, P.; AKIMOV, V. N.; LUBITZ, W.; BUSSE, H. J. Polyamine distribution in Actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 270-277, 1997.
- ANTONIO, T. **Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* e avaliação de condições de cultivo para a melhoria de produção de cefamicina C**. 2012. 62 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Terceirização da P&D de medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil**. 2009. n. 29, p. 131-158.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Biotecnologia para saúde no Brasil**. 2013. n. 32, p. 193-230.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARROS, H. M. T. 1968 a 2008: 40 anos de história recente dos medicamentos. In: GUILHERMANO, L. G.; SCHWARTSMANN, L. B.; SERRES, J. C. P.; LOPES, M. H. I. **Páginas da história da medicina**. Porto Alegre: Ed. PUCRS, 2010. p. 54-64.
- BASUROY, U. K.; GERNER, E. W. Emerging concepts in targeting the polyamine metabolic pathway in epithelial cancer chemoprevention and chemotherapy. **Journal of Biochemistry**, v. 139, p. 27-33, 2006.
- BELLÃO, C.; ANTONIO, T.; ARAUJO, M. L. G. C.; BADINO, A. C. Production of clavulanic acid and cephamycin c by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 257-266, 2013.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites (review article). **Journal of Antibiotic**, v. 58, p. 1-26, 2005.

- BERWANGER, A.; EYRISCH, S.; SCHUSTER, I.; HELMS, V.; BERNHARDT, R. Polyamines: naturally occurring small molecule modulators of electrostatic protein–protein interactions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 118-125, 2010.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v. 107, n. 1279, p. 1241-1245, 1982.
- BIRNBAUM, J.; STAPLEY, E. O.; MILLER, A. K.; WALLICK, H.; HENDLIN, D.; WOODRUFF, H. B. Cefoxitin, a semi-synthetic cephamycin: a microbiological overview. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 4, p. 15-32, 1978.
- BLUNT, J. H.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNROA, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 237-323, 2013.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARTHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v. 140, p. 103-125, 1999.
- BRAKHAGE, A. A.; AL-ABDALLAH, Q.; TÜNCHER, A.; SPRÖTE, P. Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1200-1210, 2005.
- BUSSE, H. J. Polyamines. **Methods in Microbiology**, v. 38, p. 239-259, 2011.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 3-31.
- CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **National Academy of Science of the USA**. v. 100, p. 14555-14561, 2003.
- CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, p. 761-768, 2006.
- CHATER, K. F.; CHANDRA, G. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 5, p. 651-672, 2006.
- CHEN, G.; LIN, B.; LIN, Y.; XIE, F.; LU, W.; FONG, W. F. A new fungicide produced by a *Streptomyces* sp. GAAS7310. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 519-522, 2005.
- 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**, v. 24, p. 455-458, 2002.

CHUNG, T. D.; MATZANKE, B. F.; WINKELMANN, G.; RAYMOND, K. N. Inhibitory effect of the partially resolved coordination isomers of chromic desferricoprogen on coprogen uptake in *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology**, v. 165, p. 283-287, 1986.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, 1541-1550, 2006.

COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 58-66, 2009.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 653-660, 2009.

DAVIES, J. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 5-10, 2011.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.

DEMAIN, A. L. Involvement of nitrogen-containing compounds in β -lactam biosynthesis and its control. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, p. 67-82, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Nottingham: John Wiley & Sons, 2011. 550 p.

DSM SINOCEM PHARMACEUTICALS (Netherlands). D. Schipper; K. Richard; L. M. Raamsdonk; R. A. L. Bovenberg; S. J. Jenne; Y. Chen; Y. H. Chen; X. Gao; A. Krebber; C. Krebber; C. To La; T. Matthew. **Mutant Expandases**. EP 1799817, 11 Out. 2005, 21 Nov. 2012.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, p. 135-146, 2005.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 48, p. 257-289, 1994.

FANG, A.; KEABLES, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected enhancement of β -lactam antibiotic formation in *Streptomyces clavuligerus* by very high concentrations of exogenous lysine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 705-709, 1996.

GADELHA, C. Perspectivas do investimento em saúde. In: BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Perspectivas do investimento no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 2009. Cap. 11, 217 p.

GARCÍA-ESTRADA, C.; BARREIRO, C.; JAMI, M. C.; MARTÍN-GONZÁLEZ, J.; MARTÍN, J. F. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine cause the reprogramming of metabolism in *Penicillium chrysogenum*, leading to multiple vesicles and penicillin overproduction. **Journal of Proteomic**, v. 86, p. 129-159, 2013.

GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M. Annual incidence, epidemiology, and comparative *in vitro* susceptibilities to cefoxitin, cefotetan, cefmetazole, and ceftizoxime of recent community-acquired isolates of the *Bacteroides fragilis* group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2361-2366, 1988.

GROPPIA, M. D.; BENAVIDES, M. P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. **Amino Acids**, v. 34, p. 35-45, 2008.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HERPER, M. How much does pharmaceutical innovation coast? A look at 100 companies. **Forbes Pharma & Healthcare**, Nov. 2013. [online]. Disponível em: <<http://www.forbes.com/sites/matthewherper/2013/08/11/the-cost-of-inventing-a-new-drug-98-companies-ranked/>>. Acesso em: 06 abr. 2014.

HIGGINS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a β -lactam antibiotic producer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, p. 326-331, 1971.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 39-51, 2010.

JANICKA-RUSSAK, M.; KABALA, K.; MŁODZIŃSKA, E.; KLOBUS, G. The role of polyamines in the regulation of the plasma membrane and the tonoplast proton pumps under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 261-269, 2010.

KAGLIWAL, L. D.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. A novel medium for the production of cephamycin C by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2600-2606, 2009.

KAKKAR, R. K.; SAWHNEY, V. K. Polyamine research in plants-a changing perspective. **Physiologia Plantarum**, v. 116, n. 3, p. 281-292, 2002.

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*. **Biothecnology Progress**, v. 15, p. 1020-1027, 1999.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KUSANO, T.; BERBERICH, T.; TATEDA, C.; TAKAHASHI, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, v. 228, n. 3, p. 367-381, 2008.

LEE, S. J. Pen-Tsao-Kun-Mu. In: READ, B. E. **Chinese medical plants from the Pen Tsao Kang Mu**. 3rd ed. Beijing: Peking Natural History Bulletin, 1936. p. 57-60.

LEITÃO, A. L.; ENGUITA, F.; MARTÍN, J.; OLIVEIRA, S. J. Effect of exogenous lysine on the expression of early cephamycin C biosynthetic genes and antibiotic production in *Nocardia lactamdurans* MA4213. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 670-675, 2001.

LEITÃO, A. L.; ENGUITA, F. J.; FUENTE, J. L.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Inducing effect of diamines on transcription of the cephamycin C genes from the *lat* and *pcbAB* promoters in *Nocardia lactamdurans*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p. 2379-2384, 1999.

LEITE, C. A.; CAVALLIERI, A. P.; ARAUJO, M. L. G. C. Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-11, 2013.

LI, J. W. H.; VEREDAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 109-124, 1999.

LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: BARREDO, J. L. **Microbial processes and products**. New York: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149-164.

MARTÍN, J.; GARCÍA-ESTRADA, C.; KOSALKOVÁ, K.; ULLÁN, R. V.; ALBILLOS, S. M.; MARTÍN, J. F. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine produce a drastic increase in the expression of the penicillin biosynthetic genes for prolonged time, mediated by the LaeA regulator. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, p. 1004-1013, 2012.

MARTÍN, J.; GARCÍA-ESTRADA, C.; RUMBERO, A.; RECIO, E.; ALBILLOS, S. M.; ULLÁN, R. V.; MARTÍN, J. F. Characterization of an autoinducer of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 5688-5696, 2011.

MENDELOVITZ, S.; AHARONOWITZ, Y. A. I. R. Regulation of cephamycin C synthesis, aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthetase, and homoserine dehydrogenase by aspartic acid family amino acids in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, p. 74-84, 1982.

MENEZES, R. F. De histórias de medicamentos, reações adversas e vigilância sanitária à farmacovigilância: o pioneirismo do centro de vigilância sanitária do estado de São Paulo – parte I. **Boletim SOBRAVIME**, n. 44/45, p. 1-21, 2005.

MERCK & Co. (Rahway). E. Inamine; J. Birnbaum. **Fermentation of cephamycin C**. US 3977942, 21 Nov. 1975, 31 Aug. 1976.

MERCK & Co. (Rahway). J. S. Kahan. **Antibiotic N-acetyl-dehydro-thienamycin**. US 4162323, 18 Apr. 1977, 24 July 1979.

MILIND, G.; WATVE, R. T.; MAITHILI, M. J.; BHALACHANDRA, D. B. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v. 176, p. 386-390, 2001.

MISHIMA, H.; IDE, J.; MURAMATSU, S.; ONO, M. Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics. Structure determination of milbemycins D, E, F, G, H, J and K. **The Journal of Antibiotics**, v. 36, p. 980-990, 1983.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 15247-15249, 2002.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L. D.; GORMAN, M.; HAMILL, R. L.; HIGGINS, C. E.; HOEHN, M. M.; STARK, W. M.; WHITNEY, J. G. Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2308-2310, 1971.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NICKEL, J. C. Management of urinary tract infections: historical perspective and current strategies: part 1 - before antibiotics. **The Journal of Urology**, v. 173, p. 21-26, 2005.

PILLAI, S. P.; SHANKEL, D. M. Polyamines and their potential to be antimutagens. **Mutation Research**, v. 377, p. 217-224, 1997.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; BUBACK, V.; GULDER, T. A. M.; BUGNI, T. S.; REPPART, J.; BRINGMANN, G.; IRELAND, C. M.; SCHIRMEISTER, T.; HENTSCHEL, U. New tetromycin derivatives with anti-trypanosomal and protease inhibitory activities. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1682-1697, 2011.

PUMBRIDGE, J. A. Regulation of carbon assimilation in bacteria. **Encyclopedia of microbiology**. Paris: Elsevier, 2009. p. 375-394.

RICO, V. H.; MARTÍN, J. F.; SANTAMARTA, I.; LIRAS, P. Structure of the *ask-asd* operon and formation of aspartokinase subunits in the cephamycin producer '*Amycolatopsis lactamdurans*'. **Microbiology**, v. 147, p. 1547-1555, 2001.

RIUS, N.; MAEDA, K.; DEMAINE, A. L. Induction of l-lysine ϵ -aminotransferase by l-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 144, p. 207-211, 1996.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulânico acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and 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 and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 892-897, 1986.

SÁNCHEZ, L.; BRAÑA, A. F. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 142, p. 1209-1220, 1996.

SCHEFFLER, R. J.; COLMER, S.; TYNAN, H.; DEMAIN, A. L.; GULLO, V. P. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 969-978, 2013.

SINGH, B. K.; MacDONALD, C. A. Drug discovery from uncultivable microorganisms. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17, p. 792-799, 2010.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

SOUZA DIAS, J. P. **A Farmácia e a História**. Lisboa: Gabinete de Estudos Históricos e Sociais da Farmácia; Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2003. [online]. Disponível em: <http://www.ff.ul.pt/~jpsdias/histfarm/cursos_hsf_indx.html>. Acesso em: 05 jul. 2013.

STAPLEY, E. O.; WOODRUFF, H. B. Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan. In: UMEZAWA, H.; DEMAIN, A. L.; HATA, T.; HUTCHINSON, C. R. (Ed.). **Trends in antibiotic research**. Tokyo: Antibiotic Research Association, 1982. p. 154-170.

STROH, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Merck Research Laboratories**, n. 2, p. 39-41, 2000.

TIWARI, K.; GUPTA, R. K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, p. 108-132, 2012.

URANO, K.; YOSHIB, Y.; NANJO, T.; IGARASHI, Y.; SEKI, M.; SEKIGUCHI, F.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, p. 1917-1926, 2003.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 49, p. 207-210, 1942.

WON CHIN, Y.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **The American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, p. 239-253, 2006.

WORTHAM, B. W.; OLIVEIRA, M. A.; PATEL, C. N. Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. In: PERRY, R. D.; FETHERSON, J. D. **The genus *Yersinia***: from genomics to function. New York: Springer, 2007. p. 106-115.

WYETH (Madison). G. Dukart; J.J. Gibbons Jr.; A. Berkenblit; J. M. Feingold. **Anti-tumor activity of temsirolimus in papillary renal cell cancer**. US 20080255177A1, 10 Apr. 2007, 16 Oct. 2008.

XUEFENG, Z.; JUAN, L.; BIN, Y.; XIUPING, L.; XIAN-WEN, Y.; YONGHONG, L. Marine natural products with anti-HIV activities in the last decade. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 953-973, 2013.