



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Efeito da temperatura e de concentração de
amônio na produção de ácido clavulânico por
*Streptomyces clavuligerus***

Gisele Aline Fonseca

Orientador: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

Araraquara - SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Efeito da temperatura e de concentração de
amônio na produção de ácido clavulânico por
*Streptomyces clavuligerus***

Gisele Aline Fonseca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

Araraquara - SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F676e Fonseca, Gisele Aline.
Efeito da temperatura e de concentração de amônio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* / Gisele Aline Fonseca. – Araraquara, 2018.
15 + 47 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marcel Otavio Cerri.

1. Ácido clavulânico. 2. Degradação. 3. Amônio. 4. Temperatura. I. Cerri, Marcel Otavio, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

À Deus, essencialmente por tudo.

À minha irmã Nicole, pelo amor, carinho e dedicação, por acreditar no meu sonho e me dar forças todos os dias, por me incentivar, estar ao meu lado ao longo desta jornada e me fortalecer, sem você eu não teria conseguido chegar até aqui.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, por proporcionar a realização deste trabalho nesta instituição.

Ao Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri, por me receber no laboratório, pela orientação, disponibilidade e aos muitos conhecimentos compartilhados.

À prof^a Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro pela disponibilização de seu laboratório, de alguns reagentes e equipamentos para realização dos experimentos. Neste mesmo pensamento, também agradeço à Prof^a. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.

Ao Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto pelas sugestões, auxílio e acompanhamento prestados ao longo do curso.

Aos demais professores desta Universidade que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Ao técnico Mateus, pela amizade, paciência e enorme ajuda no desenvolvimento das práticas laboratoriais, que tanto contribuiu na conclusão deste trabalho. Também aos técnicos Dani, Flávio e Rodrigo, pela contribuição no laboratório e pela amizade.

Às colegas do grupo de pesquisa pela ajuda e apoio durante realização deste trabalho.

Em especial à amiga Tais, pelo amor e carinho, por me ajudar nas atividades laboratoriais sempre que possível, por estar sempre ao meu lado, por incentivar, aconselhar e não me permitir desistir.

Ao amigo Mateus, pela ajuda no início deste trabalho e pelo companheirismo.

À Sandra, por estar presente em minha vida, pelo tão grande apoio, incentivo e por me aconselhar e ajudar a fazer as melhores escolhas para minha vida profissional e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal do Ensino Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento n. 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)

À todos que não foram citados, mas que de alguma forma participaram e colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um antibiótico β -lactâmico com potente atividade inibitória de β -lactamases, enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico, destruindo o local onde os fármacos β -lactâmicos se ligam às PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), exercendo sua ação. O AC tem sido aplicado como adjuvante no tratamento de infecções em combinação com outros antibióticos sensíveis à ação β -lactamases. O AC é produzido a partir de *Streptomyces clavuligerus*, uma bactéria filamentosa. Em geral, o cultivo para produção de AC é sujeito a efeitos de parâmetros, como temperatura, fontes nitrogênio, agitação e aeração, entre outros. Sabe-se que temperatura influencia o crescimento do microrganismo e a produção do AC, assim como o íon amônio resultante do metabolismo bacteriano é um importante composto quando se trata de degradação e estabilidade da molécula de AC no meio de cultivo. Contudo, não são encontrados na literatura trabalhos que correlacionem o efeito conjunto dois fatores sobre a produção do AC. No presente trabalho foram realizados inicialmente 3 cultivos em mesa incubadora rotativa, C-30 (30°C), C-25 (25°C) E C-20 (20°C), avaliando-se a produção de AC, o consumo de glicerol e a produção de amônio. Um cultivo em biorreator utilizando a melhor condição para produção de AC obtida a partir dos ensaios anteriores, avaliando os mesmos parâmetros dos cultivos iniciais. Por fim foram realizados testes de degradação de AC utilizando solução aquosa e componentes do meio de cultura em diferentes concentrações de amônio. Nos ensaios de degradação observou-se grande influência do íon amônio sobre a estabilidade da molécula de AC. Os resultados mostraram uma correlação entre a produção de íon amônio e temperatura, uma vez que houve maior produção de AC e menor produção de íon amônio com a redução da temperatura. A produção de íon amônio aumentou significativamente após a exaustão do glicerol, possivelmente devido à adaptação do microrganismo ao meio após o consumo total da fonte de carbono. Foi possível concluir que a grande produção do íon amônio influenciou diretamente na degradação da molécula de AC. A maior produção do íon amônio ocorreu quando utilizada temperatura mais elevada, mostrando a influência deste parâmetro no processo. Maior a temperatura, maior produção de íon amônio, menor estabilidade da molécula de AC e maior degradação desta.

Palavras-chave: Ácido clavulânico, Degradação, Amônio, Temperatura.

ABSTRACT

Clavulanic Acid (CA) is a β -lactam antibiotic with a potent inhibitory activity of β -lactamases, enzymes that hydrolyze β -lactam ring binding, destroying the site where β -lactam drugs bind to PBPs (penicillin binding proteins), exercising its actions. The CA has been being applied as an adjuvant in the treatment of infections in combination with other β -lactamases action-sensitive antibiotics. CA is produced from *Streptomyces clavuligerus*, a filamentous bacterium. In general, the cultivation process for CA production is subject to effects of operational parameters, such as temperature, nitrogen sources, agitation and aeration, among others. It is known that temperature influences the growth of microorganism and the production of CA, as well as ammonium, as well as ammonium resulting from bacterial cell metabolism, an important compound when it comes to degradation and stability of the molecule at growing medium. Although, no study has been found in literature, that correlates the effects of these two influents under CA production. In this present study, initially has been elaborated three cultures carried out in a rotating incubator table, C-30 (30°C), C-25 (25 °C) and C- 20 (20 °C), evaluating the production of CA, the consumption of glycerol, the production of ammonium in the growth medium, with growth in a bioreactor, using the best conditions for the production of CA, from previous trials, evaluating the same parameters of the initial cultures and degradation tests of CA using aqueous solution and components of the growth medium in different ammonium concentrations. The results show a correlation between the production of ammonia and temperature, once it had more production of CA and less production of ammonium ion with a decrease of the temperature. Ammonium ion production increased significantly after the glycerol depletion possibly due the adaptation of the microorganism to the medium after the total consumption of the carbon source. It is possible to conclude that the great ammonium production directly influenced the degradation of the CA molecule, this higher ammonium production occurred when the highest temperature was used, showing the influence of this parameter on the CA production, the higher temperature, the higher ammonium ion production, lower stability of the CA molecule and greater degradation thereof.

Keywords: Clavulanic Acid, Degradation, Ammonium, Temperature.

NOMENCLATURA

Abs - Absorbância

AC - Ácido clavulânico (mg/L)

ADH - Alanina desidrogenase

ATCC - American Type Culture Collection

C - Cultivo

Cd - Concentração de amônio ($\mu\text{mol/mL}$)

Cd_{max} - Concentração máxima de amônio ($\mu\text{mol/mL}$)

C_f – Concentração final (mg/L)

C_i – Concentração inicial (mg/L)

C_p - Concentração de AC (mg/L)

C_{pmax} - Concentração máxima de AC (mg/L)

C_s - Concentração de substrato (glicerol) (g/L)

GS - Glutamina sintentase

N - Nitrogênio

PIS – Proteína isolada de soja

PrAC_{max} - Produtividade máxima de AC ($\text{mg/L}\cdot\text{h}^{-1}$)

Prd_{max} - Produtividade máxima de amônio ($\mu\text{mol/mL}$)

r_G – Velocidade de consumo de glicerol ($\text{g/L}\cdot\text{h}^{-1}$)

T - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

T_{ct} – Tempo de consumo total de glicerol (h)

I. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meio de cultura de Rosa <i>et al.</i> (2005).	11
Tabela 2. Composição dos meios de cultura de crescimento e produção, baseados no meio proposto por Teodoro <i>et al.</i> (2006).	12
Tabela 3. Meio de cultura Reading & Cole (1977) modificado.....	12
Tabela 4. Meio de cultura de Sanches e Branã (1996).....	13
Tabela 5. Condições de temperatura utilizada nos experimentos.....	18
Tabela 6. Condições experimentais e principais resultados dos cultivos realizados em mesa incubadora rotativa sob diferentes temperaturas (C-30, C-25 e C-20).....	22
Tabela 7. Concentração molar de amônio, AC e relação entre as concentrações em experimentos realizados sob diferentes temperaturas (C-30, C-25 e C-20)..	31
Tabela 8. Produtividade de ácido clavulânico e amônio e taxa de consumo de glicerol dos cultivos realizados sob diferentes temperaturas (C-30, C-25 e C-20).....	32
Tabela 9. Cinética de degradação de AC em solução aquosa, solução aquosa com 100 µmol/mL de amônio, componentes do meio de cultura, componentes do meio de cultura com diferentes concentrações de amônio e em caldo de cultivo.....	38

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do ácido clavulânico (Royal Society of Chemistry, 2015).....	5
Figura 2. Micélio aéreo de <i>Streptomyces clavuligerus</i> (RODRIGUES, 2015).....	5
Figura 3. Procedimento experimental dos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> para produção de ácido clavulânico (AC) em mesa incubadora rotativa (arquivo próprio).....	18
Figura 3.1. Procedimento experimental dos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> para produção de ácido clavulânico (AC) em biorreator convencional de tanque agitado (arquivo próprio).....	19
Figura 3.2. Procedimento experimental para teste de degradação de ácido clavulânico (arquivo próprio).....	19
Figura 4. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo C-30 (T=30°C).....	23
Figura 5. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo C-25 (T=25°C).....	24
Figura 6. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo C-20 (T=20°C).....	26
Figura 7. Perfis de produção de AC durante os cultivos realizados sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C).....	27
Figura 8. Perfis de consumo de glicerol durante os cultivos realizados sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C).....	29
Figura 9. Perfis de produção de íons amônio durante os cultivos realizados sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C).....	30

Figura 10. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo em biorreator convencional de tanque agitado.....33

Figura 11. Perfil das concentrações de AC em solução aquosa, solução aquosa com 100 µmol/mL de amônio, componentes do meio de cultura e componentes do meio de cultura com diferentes concentrações de amônio.....35

Figura 12. Perfil da degradação de AC a partir de caldo de cultivo a 25°C.....35

Apêndice

Figura 1. Curva de calibração de ácido clavulânico, equação modelo e coeficiente de correlação linear.....45

Figura 2. Curva de calibração de glicerol, equação modelo e coeficiente de correlação linear.....46

Anexo

Figura 1. Curvas de calibração de amônio em diferentes comprimentos de onda (de 420 a 455 nm), equação modelo e correlação dos coeficientes angulares.....47

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão da literatura.....	4
2.1. Ácido clavulânico.....	4
2.2. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	5
2.3. Efeitos da fonte de nitrogênio.....	6
2.4. Efeitos da temperatura na produção de ácido clavulânico.....	6
2.5. Degradação de ácido clavulânico por íon amônio.....	8
3. Objetivo.....	10
4. Materiais e Métodos.....	11
4.1. Microrganismo.....	11
4.2. Meios de cultura.....	11
4.2.1. Meio de cultura de reativação.....	11
4.2.2. Meios de cultura de crescimento e produção.....	11
4.2.3. Meio de cultura para confecção de tubos criogênicos.....	12
4.2.4. Meio de cultura para isolamento e manutenção de linhagem.....	13
4.3. Equipamentos utilizados.....	13
4.4. Preparação do estoque de trabalho.....	15
4.4.1. Isolamento e manutenção de linhagem (screening).....	15
4.5. Procedimento experimental dos cultivo em mesa incubadora rotativa.....	17
4.6. Procedimento experimental dos cultivo utilizando biorreator convencional tipo tanque agitado.....	18
4.7. Procedimento experimental dos testes de degradação de AC.....	19
4.8. Procedimento experimental do teste de degradação de AC em caldo de cultivo.....	20
4.9. Análise da concentração de ácido clavulânico.....	21
4.10. Análise da concentração de glicerol.....	21
4.11. Análise da concentração de amônio.....	21
5. Resultados e discussão.....	22
5.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa.....	22
5.2. Cultivo em biorreator.....	33
5.3. Ensaio de degradação.....	34

6. Conclusões.....	39
Referências.....	40
Apêndice	45
Anexo.....	47

1. Introdução

Antibióticos são metabólitos secundários produzidos por microrganismos específicos, que em concentração inibitória mínima são capazes de impossibilitar o desenvolvimento de patógenos e, portanto, são usados no combate às infecções em seres humanos e animais (BELTER, 1985).

Com a descoberta da penicilina em 1928 tornou-se possível o tratamento de algumas infecções causadas por bactérias. Desde então uma gama de novos antibióticos e métodos mais eficazes tem sido descoberta para o tratamento de infecções (KOHANSKI *et al.*, 2010; LIU e IMLAY, 2013).

A produção de antibióticos é realizada através de processos industriais fermentativos e teve sua origem na década de 1940, impulsionada pelo advento da Segunda Guerra Mundial (CAVALLIERI, 2010).

Embora a aplicação de antibióticos tenha se mostrado eficiente no tratamento de várias infecções causadas por bactérias, o seu uso indiscriminado tem resultado no surgimento de microrganismos patogênicos resistentes. A resistência é uma inevitável consequência de processos seletivos que culminam na adaptação bacteriana a exposição aos antibióticos convencionais (SPELLBERG *et al.*, 2013).

A resistência microbiana a antibióticos β -lactâmicos se deve à capacidade de algumas bactérias patogênicas sintetizarem β -lactamases. Estas enzimas são responsáveis pela clivagem do anel β -lactâmico, resultando na inativação desses antibióticos. Este problema tem consequências evidentes, uma vez que os β -lactâmicos dos grupos penicilina e cefalosporina representam 45% dos antibióticos usados sistematicamente, em virtude de sua eficácia e disponibilidade (HAMAD, 2010; SAUDAGAR *et al.*, 2008).

Os antibióticos mais importantes clinicamente pertencem aos grupos dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclinas. Dentre os compostos β -lactâmicos, destacam-se penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas, que atuam como inibidores da síntese da parede celular bacteriana e o ácido clavulânico (AC) que, embora não tenha uma considerável atividade antimicrobiana, é um potente inibidor de β -lactamases produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas. Inicialmente, conheciam-se apenas os β -lactâmicos sintetizados por fungos filamentosos. Somente a partir da década

de 1970 descobriu-se que bactérias, principalmente actinomicetos do gênero *Streptomyces*, sintetizam uma variedade bem maior de estruturas β -lactâmicas. Os compostos β -lactâmicos têm sido os mais utilizados devido a sua eficácia e por causarem poucos efeitos colaterais (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Dos antibióticos sintetizados por microrganismos 66% são produzidos por actinomicetos, 22% de fungos e 12% de outras bactérias. Dentre os actinomicetos, 80% são obtidos a partir do gênero *Streptomyces* (KIESER *et al.*, 2000). Industrialmente o AC pode ser produzido através de linhagens de *Streptomyces*, dentre elas se destaca o *Streptomyces clavuligerus* (BUTTERWORTH, 1984).

O processo de produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* tem sido extensivamente estudado em diversos aspectos, tais como melhoramento genético de linhagens (SONG *et al.*, 2010), otimização de condições nutricionais e operacionais de biorreatores (ORTIZ *et al.*, 2007; CERRI e BADINO, 2012) e até mesmo melhorias nos processos de recuperação (SILVA *et al.*, 2009). A maioria dos trabalhos tem como objetivo principal a obtenção de melhores rendimentos na produção do antibiótico. Ainda existem poucas informações com relação ao efeito de alguns parâmetros na produção de AC, especialmente no que diz respeito de subprodutos que influenciam na degradação desta molécula. Alguns trabalhos existentes foram realizados em mesa incubadora rotativa (BERSANETTI *et al.*, 2005; COSTA e BADINO, 2012), não simulando reais condições industriais em biorreatores como fornecimento de oxigênio, controle de pH e cisalhamento.

Foram descritos na literatura diversos meios de cultivos para a produção de AC. As composições destes meios são de essencial importância para manutenção e crescimento do microrganismo e na síntese de AC (GOUVEIA, *et al.*, 1999). Os componentes do meio de cultura e suas concentrações podem gerar o acúmulo de diferentes metabólitos e no caso do AC, os níveis das fontes de nitrogênio utilizadas podem influenciar de forma quantitativa a síntese do produto (SAUDAGAR, 2008; GOUVEIA, 2001; ALI, 2010).

Os meios de cultivos mais utilizados na produção de AC apresentam glicerol ou lipídeos como fontes de carbono e energia BERSANETTI *et al.* 2005 e derivados da soja como fontes de nitrogênio, um dos compostos mais importantes na biossíntese de AC. (BROWN, 1976; KIRK, 2000).

A presença de íons amônio, em quantidade suficientemente elevada, limitam as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio como aminoácido e ureia (WHITE, 1995). As fontes de nitrogênio primárias usualmente empregadas em meios de cultura para o crescimento bacteriano, como os sais de amônio, retratam efeito negativo sobre o metabolismo celular secundário (DEMAIN e FANG, 1995).

A quantidade de nitrogênio no meio de cultivo deve ser suficiente para assegurar um bom crescimento (ROMERO, 1984), porém, concentrações elevadas de íons amônio no meio levam a um aumento considerável na taxa de degradação de AC e pode ter efeito inibitório sobre a síntese de AC (ROUBOS *et al.*, 2002; OLIVEIRA, 2009).

Visser-Lwirink *et al.* (2006) avaliaram o efeito de sais de amônio na produção de AC. Observou-se um aumento da produção quando a concentração de íons amônio foi mantida igual ou superior a 50 mg/L. Entretanto, a concentração de íons amônio deve ser baixa o suficiente para não causar citotoxicidade (apud RODRIGUES, 2015 p.9).

De um modo geral, em processos fermentativos a temperatura afeta diretamente o metabolismo celular, resultando em alterações no crescimento e viabilidade de células e na produção de biomoléculas (FURUKAWA e OHSUYE, 1998; HU *et al.*, 2006). Desse modo, os estudos envolvendo a avaliação da temperatura e de metabólitos, como por exemplo o amônio que influenciam a estabilidade da do AC em processos fermentativos são importantes para o melhor entendimento do processo, e assim aumentar a concentração de AC para tornar o processo viável para aplicação industrial.

2. Revisão da literatura

2.1. Ácido clavulânico

À medida que ocorreu o aumento da resistência de algumas bactérias a antibióticos β -lactâmicos devido à ação das β -lactamases, houve a necessidade de encontrar inibidores para estas enzimas. Na década de 1960 tiveram início várias pesquisas para descoberta de novos compostos β -lactâmicos que pudessem ser mais estáveis à ação das β -lactamases, bem como de inibidores para as mesmas (BAGGALEY, 1997).

O ácido clavulânico (AC) foi descoberto por Brown *et al.* em 1976, como um produto de metabolismo de *Streptomyces clavuligerus*, durante um programa de seleção de microrganismos produtores de compostos β -lactâmicos e foi descrito por apresentar uma elevada atividade inibitória de grande parte das β -lactamases. Embora o AC seja efetivo contra um grande espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, comparado à eficácia de outros antibióticos, sua atividade antibacteriana é relativamente baixa. Por isso, não é possível administrar AC como único produto antibacteriano. Desse modo, é recomendável que ele esteja presente em formulações com outros antibióticos β -lactâmicos, que são suscetíveis à ação de β -lactamases.

A aplicação de combinações como estas tem resolvido o problema da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos, aumentando a eficácia do tratamento de infecções, o que faz do AC um composto importante clinicamente e economicamente (CERRI e BADINO 2012).

O mecanismo de ação do AC consiste na sua ligação irreversível ao grupo hidroxila de uma serina no centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário estável e inativando a enzima (LIRAS & RODRIGUEZ-GARCIA, 2000).

A estrutura química desse composto também foi elucidada por Brown *et al.* (1976). O mesmo foi denominado ácido clavulânico, (Z)-(2R,5R)-3-(2-hidroxietilideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo(3.2.0)-heptano-2-ácido carboxílico. A estrutura molecular do AC (Figura 1.) é formada por dois anéis, o β -lactâmico e o oxazolidino.

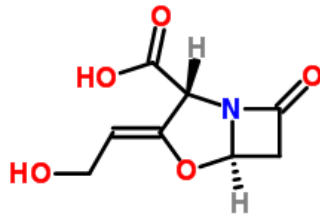


Figura 1. Estrutura molecular do ácido clavulânico (Royal Society of Chemistry, 2015).

2.2. *Streptomyces clavuligerus*

O *Streptomyces clavuligerus* (Figura 2.) é uma bactéria filamentosa Gram-positiva, aeróbia estrita, pertencente ao grupo dos actinomicetos e predominantemente encontrada no solo (LECHEVALIER, 1981). A maioria das espécies do gênero *Streptomyces* são mesofílicas e neutrofílicas, ou seja, crescem bem na faixa de temperatura entre 28 e 45°C em ambientes neutros. O ciclo de vida dos *Streptomyces* é formado por três etapas: germinação dos esporos, crescimento dos micélios e esporulação (BALLOWS, 1992).

A característica mais importante do *Streptomyces clavuligerus* é a sua capacidade de produzir compostos β -lactâmicos, dentre eles o AC um dos mais importantes clinicamente e comercialmente, o que o coloca em destaque no cenário mundial da indústria farmacêutica (Saudagar *et al.*, 2008).

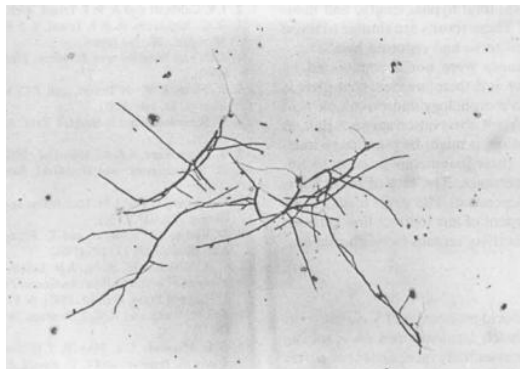


Figura 2. Micélio aéreo de *Streptomyces clavuligerus* (RODRIGUES, 2015).

2.3. Efeitos da fonte de nitrogênio

Existem na literatura vários meios de cultura para a produção de AC. Aqueles mais utilizados apresentam derivados da soja (farinha de soja, isolado proteico de soja, farelo de soja, entre outros) como fonte de nitrogênio. Os componentes do meio de cultura e suas concentrações podem gerar o acúmulo de até 21 metabólitos secundários diferentes, dentre eles o AC. Os níveis das fontes de nitrogênio utilizada podem influenciar de forma quantitativa a síntese do produto (GOUVEIA, 2001; SAUDAGAR, 2008; ALI, 2010).

Geralmente, na escala industrial, os meios de cultura utilizados para a produção de antibióticos contêm fontes complexas de nitrogênio, como farelo de soja, peptona e extrato de levedura, por exemplo, estas fontes são selecionadas para produzir alta concentração de antibióticos que deveria ser devido à liberação lenta de componentes nitrogenados durante o curso de cultura (VOELKER e ATABA, 2001).

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

2.4. Efeitos da temperatura na produção de ácido clavulânico

Dentre os parâmetros mais estudados para produção de AC, os principais têm sido a temperatura de incubação, pH, agitação, aeração e, quantidade do inóculo e suplementação de nutrientes tais como fonte adicional de carbono, nitrogênio e indutores, além de parâmetros para recuperação e purificação de biomoléculas (MANPREET *et al.*, 2005).

Conforme citado, a maioria dos processos fermentativos industriais sofrem influência temperatura no processo, tanto para o crescimento microbiano quanto para a produção de biomoléculas. No processo de produção

do AC, a temperatura também influencia significativamente na estabilidade da molécula presente no meio de cultivo (RODRIGUES, 2015).

Como as temperaturas ideais para crescimento celular e formação de AC são diferentes, o uso de diferentes temperaturas durante o curso do cultivo deve ser capaz de beneficiar a produção de AC (COSTA, 2014).

Bersanetti *et al.* (2005) avaliaram a estabilidade do AC em várias temperaturas (10 a 40°C) a fim de determinar a melhor condição para produção de AC. Neste trabalho constatou-se que a estabilidade diminui com o aumento da temperatura. Os autores também reportaram que as constantes de degradação do AC em soluções aquosas são menores que em meios fermentativos, possivelmente, devido à presença de outros sais no meio, como os compostos de amônio. Roubos *et al.* (2002) avaliaram a degradação de AC em cultivos com *Streptomyces clavuligerus* e foi relatada uma redução na constante de degradação de AC em menores temperaturas.

Santos *et al.* (2009) estudaram a estabilidade do AC ao longo do tempo em diferentes condições de temperatura e na presença de vários níveis de diferentes sais. Foi observado que quanto maior o tempo de exposição, maior é a instabilidade da molécula, sobretudo em valores de altas temperaturas (35°C e 45°C). Eles verificaram que a degradação foi menor utilizando temperaturas mais brandas e que a degradação do AC aumentou na presença dos sais testados.

Marques *et al.* (2009) avaliaram por meio de parâmetros cinéticos e termodinâmicos o efeito da temperatura na formação e degradação do AC durante o cultivo utilizando *Streptomyces* sp. Eles observaram que ambos os fenômenos podem ocorrer simultaneamente. A formação de AC é favorecida no início do cultivo, após certo período a degradação passa a ser o fenômeno predominante. Os autores concluíram que o AC é mais estável em temperaturas na faixa de 10 a 20°C.

Costa e Badino (2012) investigaram a produção de AC por *S. clavuligerus* em mesa incubadora rotativa empregando diferentes condições de temperatura em 15 cultivos. Os resultados mostraram que a produção de AC pode ser aumentada com a redução da temperatura de cultivo, a utilização de menor temperatura na etapa de produção proporciona menores velocidade de degradação de AC, aumentando o acúmulo deste no meio de cultivo.

Para alguns antibióticos, a estratégia de mudança de temperatura durante culturas foram utilizadas para aumentar a concentração final. Por exemplo, após 76 h, um mudança de temperatura de 30 °C para 28 °C promoveu um aumento na concentração final da molécula produzida por *Streptomyces nanchangensis*, em comparação com um processo com um temperatura constante (YAN *et al.*, 2002). A morfologia de *Streptomyces sp.* também foi considerada dependente de temperatura da cultura. Um aumento da temperatura de 30 para 37 ° C causou uma diminuição no tamanho do sedimento em um terço em culturas de *S. griseus* (KIM e HANCOCK, 2000).

Em uma revisão realizada por Ser *et al.* (2016) os autores observaram que há maior produção de ácido clavulânico quando utilizado temperaturas brandas, concluindo então que a temperatura influencia diretamente na produção de AC.

2.5. Degradação de ácido clavulânico por íon amônio

As fontes de N (nitrogênio) usualmente são favoráveis ao crescimento, tais como sais de amônio, porém apresentam efeito negativo sobre o metabolismo secundário (DEMAIN e FANG, 1995). A presença de amônia ou íon amônio em quantidade suficientemente elevada, inibe as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de N, tais como aminoácidos (WHITE, 1995).

Fontes orgânicas de N (aminoácidos, farinhas e/ou extratos proteicos vegetais) são mais adequadas ao desenvolvimento celular do que as inorgânicas como sais de amônio, sendo que concentrações de íon amônio acima de 20 mM podem inibir a produção de AC (ROMERO *et al.*, 1984).

Ishida *et al.* (2006) avaliaram que os sais de amônio contidos no meio de produção tiveram impactos na degradação da AC.

Baptista-Neto *et al.* (2005) descreveram a utilização de meios de cultura com farinha de soja ou extrato de farinha de soja como fontes de N na produção de AC. Nos cultivos em que se utilizou extrato de farinha de soja, a produção teve início já na fase exponencial de crescimento. Nos cultivos em que se utilizou farinha de soja, esta fonte de N fez com que a produção se

iniciasse mais tarde, no entanto as concentrações finais de AC foram superiores.

Em *S. clavuligerus*, a síntese de GS (Glutamina Sintetase) foi reprimida na presença de íon amônio. Por outro lado, o ADH (Alanina desidrogenase) foi induzido pela alanina ou por concentrações de amônio superior a 20 mM (BRANA *et al.*, 1986). A presença de íons amônio no meio de cultura geralmente suporta o crescimento, mas reprime ou atrasa o início da produção de antibióticos. Este fenômeno foi mostrado com *S. flocculus* (WALLACE *et al.*, 1990), no qual a produção ocorreu somente após o esgotamento dos íons de amônio.

Em cultivos com *S. ambofaciens*, a adição de íons de amônio reduziu severamente a produção de espiramicina. Um excesso de amônio levou à inibição da atividade de valina desidrogenase, a enzima responsável pela assimilação das fontes alternativas de nitrogênio que são valina, leucina e isoleucina. As maiores concentrações de espiramicina foram medidas quando valina e isoleucina foram utilizadas como fontes de nitrogênio (LEBRIHI *et al.*, 1992; LOUNES *et al.*, 1995; UNTRAU *et al.*, 1994).

Através da revisão bibliográfica apresentada, nota-se que não há referências disponíveis na literatura relativas ao efeito da temperatura juntamente com a influência do íon amônio no processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Desta forma, o desenvolvimento do presente trabalho teve por finalidade avaliar o efeito do íon amônio sob a degradação do AC, analisar condições de temperatura que melhorassem o processo da produção de AC e correlacionar a temperatura com liberação de íon amônio durante a síntese de AC.

3. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de AC a partir de cultivos utilizando *Streptomyces clavuligerus* em diferentes condições de temperatura e avaliar as influências da temperatura e do íon amônio liberado no meio de cultura na degradação da molécula de AC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado em tubos criogênicos na forma de células vegetativas a -80°C suspensas em solução crioprotetora contendo 20% v/v de glicerol.

4.2. Meios de cultura

4.2.1. Meio de cultura de reativação

Em todos os cultivos foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al.* (2005), descrito na Tabela 1. O pH foi ajustado em 6,8 e o meio de cultura esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Tabela 1. Meio de cultura de Rosa *et al.* (2005).

Componentes	Concentração
Glicerol (g/L)	15,0
Peptona bacteriológica (g/L)	10,0
Extrato de malte (g/L)	10,0
Extrato de levedura (g/L)	1,0
Tampão MOPS ⁽¹⁾ (g/L)	21,0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,75
Solução de sais ⁽²⁾ (mL/L)	1,0

⁽¹⁾ Ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico: utilizado para tamponar o meio.

⁽²⁾ Composição (g/L em água destilada): MnCl₂.4H₂O (1,0); FeSO₄.7H₂O (1,0); ZnSO₄.7H₂O (1,0).

4.2.2. Meios de cultura de crescimento e produção

O meio de cultura de crescimento e de produção tiveram a mesma composição (Tabela 2), ambos foram baseados no meio proposto por Teodoro *et al.* (2006). O pH foi ajustado em 6,8 e o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura de crescimento e produção, baseados no meio proposto por Teodoro *et al.* (2006).

Componentes	Concentração
Glicerol (g/L)	15,0
Proteína isolada de soja (g/L)	20,0
Tampão MOPS ⁽¹⁾ (g/L)	21,0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,75
Solução de sais ⁽²⁾ (mL/L)	1,0

⁽¹⁾ Ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico: utilizado para tamponar o meio.

⁽²⁾ Composição (g/L em água destilada): MnCl₂.4H₂O (1,0); FeSO₄.7H₂O (1,0); ZnSO₄.7H₂O (1,0).

4.2.3. Meio de cultura para confecção de tubos criogênicos

Utilizou-se o meio de cultura proposto por Reading Cole (Tabela 3). Este foi utilizado, na forma líquida, para confecção de tubos criogênicos e utilizou-se também na forma sólida para realização de screening, através da adição de ágar bacteriológico (20 g/L), para utilização deste meio na forma sólida em placas de Petri. O pH foi ajustado para 6,8 e o meio de cultura esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Tabela 3. Meio de cultura de Reading & Cole (1977) modificado.

Componentes	Concentração
Glicerol (g/L)	15,0
Extrato de malte (g/L)	10,0
Peptona bacteriológica (g/L)	20,0
Tampão MOPS ⁽¹⁾ (g/L)	21,0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,75
Solução de sais ⁽²⁾ (mL/L)	1,0

⁽¹⁾ Ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico: utilizado para tamponar o meio.

⁽²⁾ Composição (g/L em água destilada): MnCl₂.4H₂O (1,0); FeSO₄.7H₂O (1,0); ZnSO₄.7H₂O (1,0).

4.2.4. Meio de cultura para isolamento e manutenção de linhagem

Utilizou-se meio de cultura proposto por Sanches e Branã para realização da técnica de screening. O pH foi ajustado em 6,8 e o meio de cultura esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Tabela 4. Meio de cultura de Sanches e Branã (1996).

Componentes	Concentração
Glicose (g/L)	5,0
Extrato de carne (g/L)	10,0
Extrato de levedura (g/L)	20,0
Tampão MOPS ⁽¹⁾ (g/L)	21,0
Caseína ácida (g/L)	1,0
Ágar (g/L)	20,0

⁽¹⁾ Ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico: utilizado para tamponar o meio.

4.3. Equipamentos utilizados

A. Medidor de pH

Medidor de pH de bancada modelo 210 da LUCADEMA foi utilizado para aferir o pH dos meios fermentativos e das soluções em geral envolvidas nos cultivos.

B. Espectrofotômetro

Na realização das análises espectrofotométricas das concentrações de AC e glicerol, utilizou-se o espectrofotômetro GENESYS 10S, THERMO SCIENTIFIC®.

C. Autoclave

Todos os materiais envolvidos diretamente nos ensaios fermentativos (meios de cultura, pipetas, ponteiros, tampões, Erlenmeyers, demais vidrarias e soluções diversas) foram esterilizados em autoclave modelo AV 75, PHOENIX®, a 121°C por 20 minutos.

D. Ultrafreezer

Os tubos criogênicos contendo as suspensões celulares para realização dos cultivos e os microtubos contendo as amostras para as análises de produção de AC e consumo de glicerol foram armazenados em ultrafreezer THERMO FORMA®, modelo 904, em temperatura de -80°C.

E. Mesa incubadora rotativa

As etapas de reativação e crescimento celular e produção de AC foram realizadas em mesa incubadora rotativa TECNAL® TE-421 contendo controles de temperatura e rotação.

F. Centrífuga refrigerada

As amostras retiradas durante os cultivos realizados para posterior análise de ácido clavulânico, glicerol e amônio foram centrifugadas em centrífuga refrigerada modelo UNIVERSAL 320R, HETTICH®.

G. Banho termostático

Utilizou-se o banho termostático com circulação LUCADEMA® modelo 152/10 para análise das concentrações de AC e glicerol no meio de cultivo.

H. Câmara de fluxo laminar

Utilizou-se câmara de fluxo laminar asséptica VECO BIO SEG 12 equipada com lâmpada germicida UV para garantir a assepsia no manuseio de todos os materiais envolvidos nos ensaios.

I. Estufa de Cultura Bacteriológica

Utilizou-se estufa de cultura bacteriológica modelo SP-101 para incubação das culturas utilizadas na etapa de isolamento de linhagem.

J. Leitora de microplacas multimodo

Utilizou-se leitora de microplacas multimodo EnSpire® para análise da concentração de amônio.

K. Incubadora refrigerada B.O.D.

Utilizou-se incubadora refrigerada B.O.D. modelo SL-117\310 para ensaios de degradação de AC por íon amônio.

L. Biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreator comercial tipo tanque agitado e aerado TEC-BIO-FLEX Tecnal-Brasil® equipado com rotâmetro para aeração e bombas de alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e adição de soluções ácidas e básicas. O biorreator dispõe de volume total de

7,5 L, e volume útil de 5,0 L. O sistema foi montado utilizando dois impelidores do tipo turbinas *Rushton*.

4.4. Preparação do estoque de trabalho

A preservação do microrganismo foi feita com a utilização de tubos criogênicos. O estoque de trabalho foi preparado seguindo os passos descritos a seguir:

1. Abriu-se de forma asséptica o tubo criogênico contendo células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, cedido pelo DEQ/UFSCar. Na reativação do microrganismo foi inoculado o conteúdo do tubo em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 22,5 mL de meio de cultura de Reativação (Tabela 1) e incubado em mesa rotativa em 250 rpm a 30°C por 24 horas a fim de realizar um cultivo completo, descrito no item 4.5, etapa de reativação, crescimento e produção.
2. Durante a etapa de crescimento e as 72 horas de etapa de produção, foram realizados repiques a cada 48 horas de 2,5 mL do meio de Reativação para outro Erlenmeyer de 250 mL contendo 22,5 mL de meio de Reativação, com o intuito de manter as células vivas e prepará-las para confecção de novos tubos criogênicos para estoque de trabalho.
3. Ao final do cultivo completo foram retiradas amostras para análise imediata de AC. Posteriormente, 5 mL do meio de reativação contendo a cepa de maior produção de AC foram transferidos para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 45 mL do meio de Reading Cole (1977) (Tabela 3). Incubou-se a 250 rpm e 30°C por 24 horas e diluiu-se a solução em glicerol de forma a conter 20% m/v deste na solução final. Finalmente, a solução foi transferida para tubos criogênicos de 2,5 mL, que foram armazenados em ultrafreezer a -80°C.

4.4.1. Isolamento e manutenção de linhagem (screening)

No decorrer do projeto o microrganismo do estoque de trabalho foi perdendo a viabilidade e diminuindo a capacidade de produzir AC. Desta forma, foi necessária a realização do isolamento e manutenção das cepas produtoras de AC com intuito de garantir um estoque de trabalho que mantenha válido os resultados obtidos experimentalmente ao longo da

pesquisa. Os passos para a realização do isolamento e manutenção de linhagem são descritos a seguir:

1. Utilizou-se um tubo criogênico contendo células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Para a reativação do microrganismo foi inoculado o conteúdo do tubo em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 22,5 mL de meio de cultura de Reativação (Tabela 1) e o mesmo incubados em mesa rotativa a 30°C por 24 horas.
2. Após este período, com o auxílio de uma alça de platina foram estriadas em placas de Petri contendo meio de reativação na forma sólida (Tabela1), meio de Reading e Cole, (1977) em estado sólido (Tabela 3) e meio Sanches e Branã, (1996) (Tabela 4), foram utilizados para obter um crescimento diversificado de bactérias, uma vez que se utilizou de três meios de cultura diferentes nas placas de Petri. Incubou-se em estufa bacteriológica a 30°C por 7 dias até obter bom crescimento de colônias.
4. Decorrido este tempo, foram isoladas variadas colônias em placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura no qual foram estriados inicialmente. Incubou-se a 30°C por 7 dias.
5. Posteriormente foi as placas foram lavadas com 3 mL de solução salina e transferidas para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 22 mL de meio de Reativação e realizado cultivo completo em mesa incubadora rotativa, conforme etapas descritas no item 4.5 (reativação, crescimento e produção). Enquanto ocorriam os cultivos, as placas foram novamente repicadas utilizando alça de platina, a fim de manter uma boa viabilidade celular.
6. Após as 72 horas da etapa de produção, foram retiradas amostras para análise de AC. Posteriormente, a placa de Petri contendo a cepa com máxima produção de AC foi lavada com 3 mL de solução salina e a suspensão obtida foi utilizada como inóculo em 22 mL do meio de Reativação (Tabela 1). Incubou-se a 250 rpm e 30°C por 24 horas.
7. Decorrido este período, foi passado uma alíquota de 2,5 mL para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 22,5 mL de meio de reativação (Tabela 1). Novamente, a fim de desprezar as células mortas e obter o maior número de células viáveis, adquirindo assim um meio homogêneo, incubou-se sob as mesmas condições anteriores.

8. Posteriormente foram transferidos 5 mL do caldo de reativação para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 45 mL de meio de Reading & Cole (1977), Incubou-se a 250 rpm a 30°C por 24 horas. Na sequência diluiu-se a suspensão celular em glicerol de forma a conter 20% m/v deste na solução final. Por fim, a suspensão foi transferida para tubos criogênicos de 2,0 mL e armazenados em ultrafreezer a -80°C.

4.5. Procedimento experimental dos cultivos em mesa incubadora rotativa

O procedimento para efetuação dos cultivos em mesa incubadora rotativa foi descrito por Rosa *et al.* (2005) e consiste de três etapas: reativação do microrganismo, crescimento e produção, sendo que os meios de cultura descritos nas Tabelas 1 e 2.

Inicialmente, 2 mL de suspensão de células vegetativas de *S. clavuligerus* mantidos em tubos criogênicos foram inoculados em frasco Erlenmeyers de 250 mL contendo 23 mL de meio de reativação e estes incubados por 24 h a 30°C e 250 rpm (etapa de reativação).

Em seguida, 2,5 mL de suspensão foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 22,5 mL de meio de cultura de inoculo, de mesma composição do meio de cultura de produção. Estes foram incubados por 24 horas a 30°C e 250 rpm (etapa de crescimento).

No estágio de produção, a suspensão de inoculo foi transferida na proporção de 10% v/v para Erlenmeyers de 250 mL e incubados a 250 rpm durante intervalo de tempo variados, de acordo com a temperatura do cultivo realizado, dando início à etapa principal do processo de produção de AC.

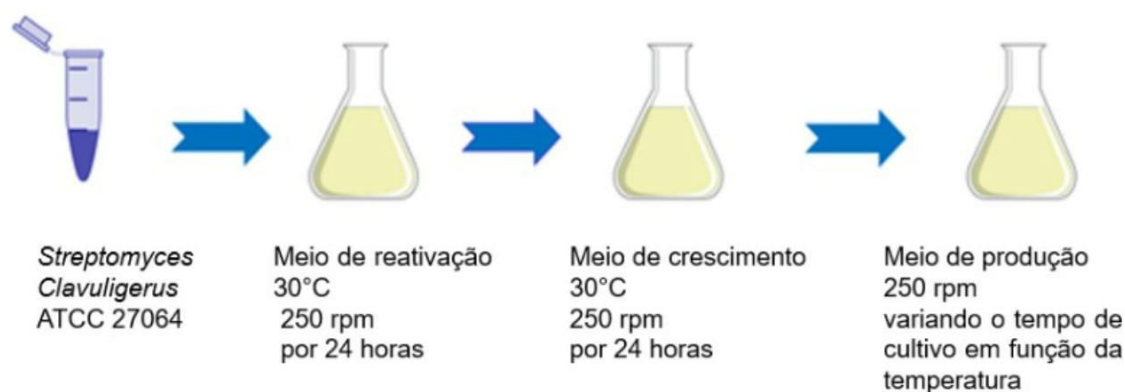


Figura 3. Procedimento experimental dos cultivos de *Streptomyces clavuligerus* para produção de ácido clavulânico (AC) em mesa incubadora rotativa (arquivo próprio).

Inicialmente, para a avaliação dos efeitos da temperatura na produção de AC foram realizados três cultivos (C-30, C-25 e C-20), cujas condições são apresentadas na Tabela 5 as condições escolhidas foram baseadas em informações encontradas na literatura.

Tabela 5. Condições de temperatura utilizada nos experimentos.

Experimento	Temperatura (°C)
C-30	30
C-25	25
C-20	20

4.6. Procedimento experimental dos cultivos utilizando biorreator convencional tipo tanque agitado.

Utilizou-se metodologia baseado no descrito por Rosa *et al.* 2005, constituída por três etapas: reativação, crescimento e produção.

Inicialmente, inoculou-se os conteúdos de dois criotubos contendo 2 mL de suspensão células vegetativas de *S. clavuligerus* em dois frascos

Erlenmeyer contendo 48 mL de meio de cultura para reativação e estes incubados por 24 h a 30°C e 250 rpm (etapa de reativação).

Em seguida, 5,0 mL de suspensão foram transferidos para seis frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de inóculo de mesma composição do meio de cultura de crescimento, afim de obter-se 300 mL de meio de crescimento para inoculação em biorreator. Estes foram incubados por 24 horas a 30°C e 250 rpm (etapa de crescimento).

No estágio de produção, a suspensão de 300 mL inóculo foi transferida ao biorreator contendo 2,7L de meio. O cultivo foi realizado a 20°C, pH controlado em 6,8 pela adição de ácido (HCl 1M) ou base (NaOH 1M), agitação de 1000 rpm, melhor condição obtida para produção de AC no trabalho realizado por Ribeiro, (2017), e vazão específica de 0,5 v_m (1,75 litros. min⁻¹). A etapa de produção realizada em biorreator convencional do tipo tanque agitado e aerado, teve duração de 144 horas (Figura 3.1).

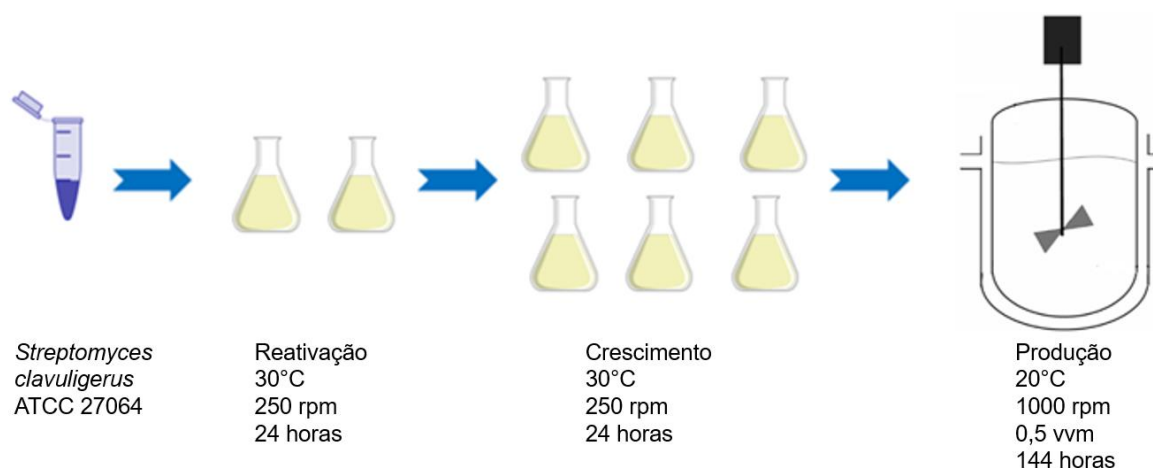


Figura 3.1. Procedimento experimental dos cultivos de *Streptomyces clavuligerus* para produção de ácido clavulânico (AC) em biorreator convencional de tanque agitado (arquivo próprio).

4.7. Procedimento experimental dos testes de degradação de AC

Utilizou-se solução aquosa contendo 500 mg/L de AC (clavulanato de potássio comercial) para realização dos ensaios. Os ensaios foram realizados comparando-se duas variáveis, utilizando solução aquosa de AC com diversas concentrações de sal de amônio, para verificar a interação na solução aquosa

e o quanto o amônio influencia na degradação da molécula de AC e utilizando solução contendo alguns componentes do meio de cultura (tampão MOPS, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e Solução de sais), solução de 500 mg/L de AC e diversas concentrações de sal de amônio, para verificar interação do amônio e demais sais componentes do meio de cultura.

Em um tubo de ensaio (A) usou-se apenas solução aquosa de AC (controle), em outro tubo (B) utilizou-se solução de AC (500 mg/L) com 100 $\mu\text{mol/mL}$ de sal de amônio, no tubo (C) empregou-se alguns compostos utilizados no meio exceto glicerol e PIS (controle), para avaliar a interação somente dos compostos do meio de cultura com a solução de AC, e tubos (D) e (E) com os compostos do meio de cultura com 100 $\mu\text{mol/mL}$ e 200 $\mu\text{mol/mL}$ de amônio respectivamente, para simular o amônio produzido a partir da degradação da PIS (proteína isolada de soja) e avaliar sua interação com os compostos do meio de cultura resultando na degradação do AC. Os tubos de ensaios foram armazenados na temperatura de 25°C e foram realizadas análises a cada 12 horas, todos ensaios foram realizados em triplicata.

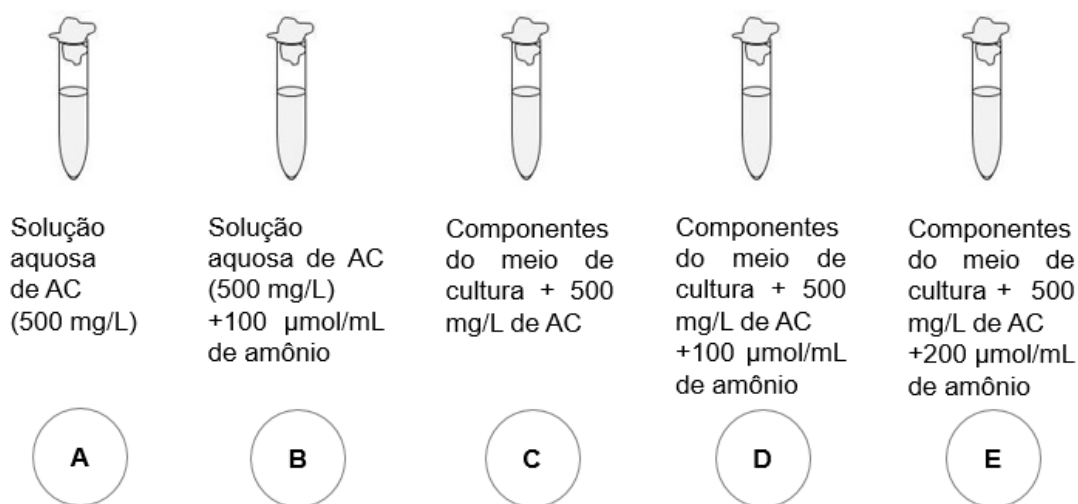


Figura 3.2. Procedimento experimental para teste de degradação de ácido clavulânico (arquivo próprio).

4.8. Procedimento experimental do teste de degradação de AC em caldo de cultivo

Após um cultivo de *Streptomyces clavuligerus*, utilizou-se o sobrenadante obtido a partir de centrifugação de amostras do caldo para realização do teste de degradação de AC. Armazenou-se o sobrenadante em

tubo de ensaio para análises de AC e amônio. Inicialmente foram retiradas alíquotas a cada três horas durante as primeiras análises e posteriormente as análises foram realizadas com intervalo de 6 horas, resultando em um total de 48 horas de experimento. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.9. Análise de concentração de ácido clavulânico

Na determinação da concentração de ácido clavulânico foi utilizado o método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982), que consiste na leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 311 nm do produto da derivação do ácido clavulânico com o reagente imidazol. A curva de calibração (Figura 1, do Apêndice) foi construída utilizando como padrão o AC do produto farmacêutico Clavulin® (Glaxo SmithKline - Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil). As amostras foram retiradas e centrifugadas a 4°C e 3.720 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi congelado em ultrafreezer a -80°C, para posterior análise de AC.

4.10. Análise da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por método enzimático utilizando um kit para triacilglicerídeos (Triglycerides GPO-PAP, Liquid Stable Mono-reagent, Laborlab, Brasil) a partir da curva de calibração (Figura 2, do Apêndice). As amostras foram centrifugadas a 4°C, 3.720 rpm por 15 minutos e o sobrenadante congelado em ultrafreezer a -80°C, para posterior análise de glicerol.

4.11. Análise da concentração de íon amônio

A concentração de amônio foi determinada com base na metodologia descrita por Yao *et al.* (2016) utilizando reagente de Nessler Merck S/A Brasil, a partir da curva de calibração (Figura 1 do Anexo A). As amostras foram centrifugadas a 4°C, 3.720 rpm por 15 minutos e o sobrenadante congelado em ultrafreezer a -80°C, para posterior análise de amônio, realizadas sob comprimento de onda de 420 nm.

5. Resultados e discussão

5.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa

A estratégia utilizada para a realização dos cultivos C-30, C-25 e C-20 foi baseada na literatura. Esta reporta que a produção de AC aumenta com a redução de temperatura que minimiza a degradação (BAPTISTA-NETO *et al.*, 2005; BERSANETTI *et al.*, 2005; COSTA E BADINO, 2012). A degradação de AC é um aspecto importante estudado para aprimorar o processo de produção da AC.

Tabela 6 apresenta os principais resultados dos cultivos conduzidos sob diferentes temperaturas, avaliando sua influência na produção de AC e correlacionando a produção de amônio com a degradação de AC. No cultivo conduzido na maior temperatura (C-30) houve uma menor produção de AC. O cultivo ocorreu mais rapidamente e a produção de amônio foi a maior obtida dentre os cultivos realizados.

Quando o cultivo foi a 20°C (C-20), a produção de AC foi 4,6 vezes maior do que no cultivo C-30. O cultivo ocorreu em um tempo mais prolongado, devido à atenuação do metabolismo celular ocasionado pela redução da temperatura e a produção de amônio foi 4,1 vezes menor do que a obtida no cultivo C-30.

Tabela 6. Condições experimentais e principais resultados dos cultivos realizados em mesa incubadora rotativa sob diferentes temperaturas (C-30, C-25 e C-20).

Parâmetros	C-30	C-25	C-20
Temperatura (°C)	30	25	20
Concentração máxima de AC			
C _{pmax} (mg/L)	241,4	616,7	1100,6
Concentração máxima de amônio			
C _{dmax} (µmol/mL)	97,5	45,0	47,2
Tempo de consumo total de glicerol			
t _{ct} (horas)	36	72	120

Analisando os gráficos posteriores é possível visualizar essa relação entre as variáveis, mais claramente.

A Figura 4 ilustra as concentrações de AC, glicerol e amônio obtidas ao longo do cultivo C-30 (30°C).

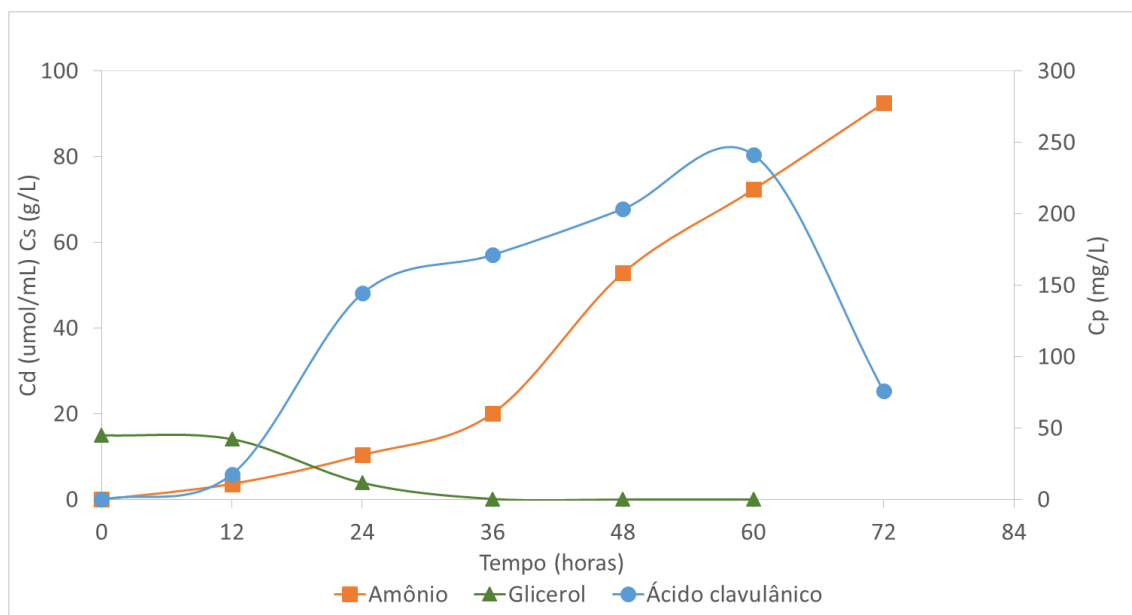


Figura 4. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo C-30 (T=30°C).

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram um decréscimo na concentração de glicerol (Cs) ao longo do tempo, alcançando zero em 36 horas. A produção máxima de AC ($C_{p_{max}}$) foi de 241,4 mg/L em 60 horas, após este tempo, a concentração de AC decresceu. A produção de amônio aumentou durante todo o cultivo, obtendo seu pico ao término do cultivo em 72 horas.

É possível verificar que após o consumo total do glicerol ocorrido em 36 horas, a produção de amônio começou a aumentar, devido provavelmente à adaptação do metabolismo celular bacteriano ao meio de cultura após a exaustão do glicerol, que passou a utilizar a proteína isolada de soja (PIS) como fonte principal de carbono.

No decorrer do cultivo, a concentração de amônio aumentou de 10,4 µmol/mL no tempo 24 horas para 72,3 µmol/mL em 60 horas. Após esse

período de cultivo a velocidade de degradação foi superior à velocidade de produção resultando na sua diminuição da concentração de AC. A produção de amônio continuou aumentando, chegando a 97,5 $\mu\text{mol/mL}$ e a concentração de AC diminuiu de 241,4 mg/L para 75,9 mg/L, mostrando que a concentração elevada de íons amônio degrada a molécula de AC.

Com a utilização da temperatura mais elevada dentre os cultivos realizados (C-30), a resposta mais comum é a alteração na expressão de genes, levando a síntese de proteínas e influenciando diretamente o metabolismo celular. Desta maneira, podem ocorrer alterações na viabilidade e crescimento das células assim como na produção de metabólitos primários e secundários (FURUKAWA e OHSUYE, 1998; KAUFMANN *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2006). Em função disso, com o metabolismo mais rápido, há um elevado consumo de substrato, fazendo com que os nutrientes presentes no meio de cultura fossem consumidos mais rapidamente.

A Figura 5 ilustra as concentrações de AC, glicerol e amônio ao longo do cultivo C-25 (25°C).

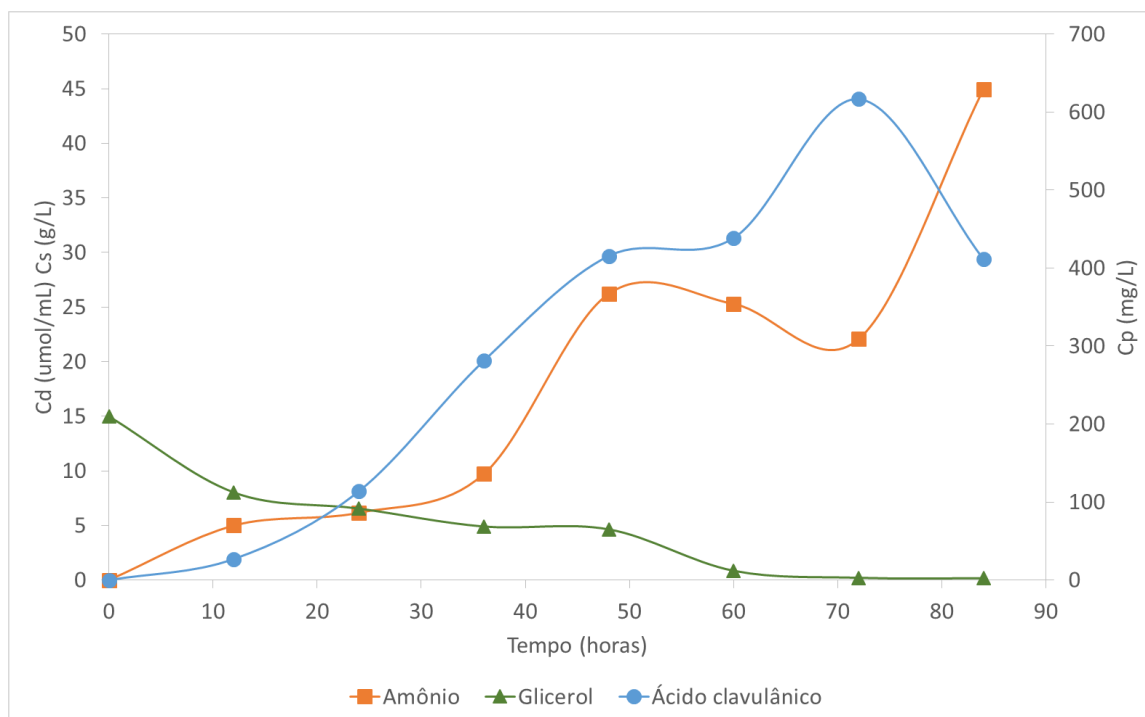


Figura 5. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo C-25 (T=25°C).

No cultivo C-25 a velocidade de consumo de glicerol (r_G) foi menor que no C-30, ocorrendo exaustão entre 60 a 72 horas. A produção máxima de AC foi de 616,7 mg/L, 2,6 vezes superior que a do cultivo na maior temperatura, (C-30). A produção de amônio obteve seu pico ao término do cultivo (84 horas).

É possível observar um aumento gradativo de amônio até a 36ª hora de cultivo, entre 36 e 48 horas a produção aumentou de 9,7 para 21,2 $\mu\text{mol/mL}$. Em 60 horas, a produção de AC manteve-se quase estável em relação à 48 horas de cultivo e o consumo de glicerol cai acentuadamente atingindo aproximadamente seu consumo total em 60 horas. Entre 48 horas e 72 horas de cultivo, durante o decaimento acentuado da concentração de glicerol, há uma sutil queda na produção de amônio. Entre 60 horas a 72 horas, onde se observa uma pequena redução na concentração de amônio, há um repentino aumento de AC de 438,5 para 616,7 mg/L. Após este evento, a concentração de amônio volta a aumentar atingindo seu pico e elevando a degradação do AC que cuja concentração em 84 horas de cultivo diminuiu para 411,5 mg/L.

Rodrigues (2015) realizou um estudo avaliando os efeitos da temperatura e do pH em cultivos de *S. clavuligerus* para produção de AC. Em um dos experimentos realizados em biorreator convencional utilizando temperatura de 25°C e pH 6,8, mesmas condições de cultivo C-25, foi obtida uma concentração máxima de AC de 619,4 mg/L e a exaustão do glicerol ocorreu em 68 horas, muito semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho.

A Figura 6 ilustra as concentrações de AC, glicerol e amônio ao longo do cultivo C-20 (20°C).

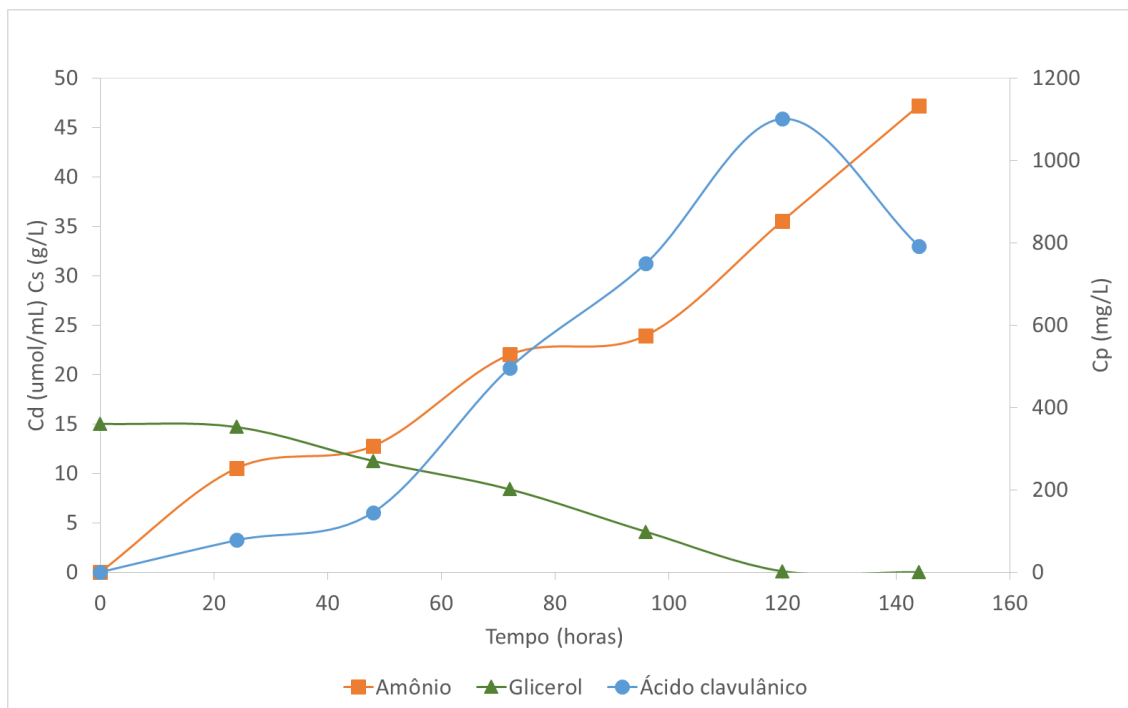


Figura 6. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo C-20 (T=20°C).

Os resultados ilustrados na Figura 6 mostram um cultivo com duração mais extensa de 142 horas, onde a concentração máxima de AC produzida foi de 1100,6 mg/L após 120 horas de cultivo onde coincidiram com a exaustão do glicerol. A concentração máxima de amônio de 47,2 μmol/mL ocorreu no final do cultivo (144 horas).

É possível verificar que nas primeiras horas de cultivo não se obteve um grande consumo de glicerol, fato este relacionado com a adaptação do microrganismo à temperatura da etapa de produção, uma vez que a etapa de crescimento foi realizada sob temperatura de 30°C. A diminuição abrupta para 20°C fez com que houvesse necessidade de uma adaptação do metabolismo celular bacteriano para sua sobrevivência no ambiente em que foi inoculado. Por conseguinte, o fato de uma menor produção de amônio em relação aos cultivos realizados anteriormente se deve também ao fato da adaptação do metabolismo do microrganismo à nova condição de temperatura a qual o microrganismo foi exposto.

Houve um lento consumo de glicerol bem como um lento aumento e quase que constante da produção de AC. Estas condições se mantiveram

estáveis até a 84^a hora de cultivo, onde a concentração de glicerol se encontrava abaixo de 5 g/L houve um intenso aumento na concentração de AC, alcançando 1100,6 mg/L em 120 horas de cultivo, onde se observa a exaustão do glicerol. A produção de amônio aumentou de 35,5 para 47,2 $\mu\text{mol/mL}$ em 144 horas de cultivo, onde a concentração de AC diminuiu para 791,6 mg/L.

É visível neste cultivo uma maior produção de AC do que nos demais cultivos realizados, a elevada produção está relacionada com o aumento da estabilidade do AC em temperaturas menores, conforme relatado por Bersaneti *et al.* (2005).

A Figura 7 ilustra as concentrações de AC para os três cultivos.

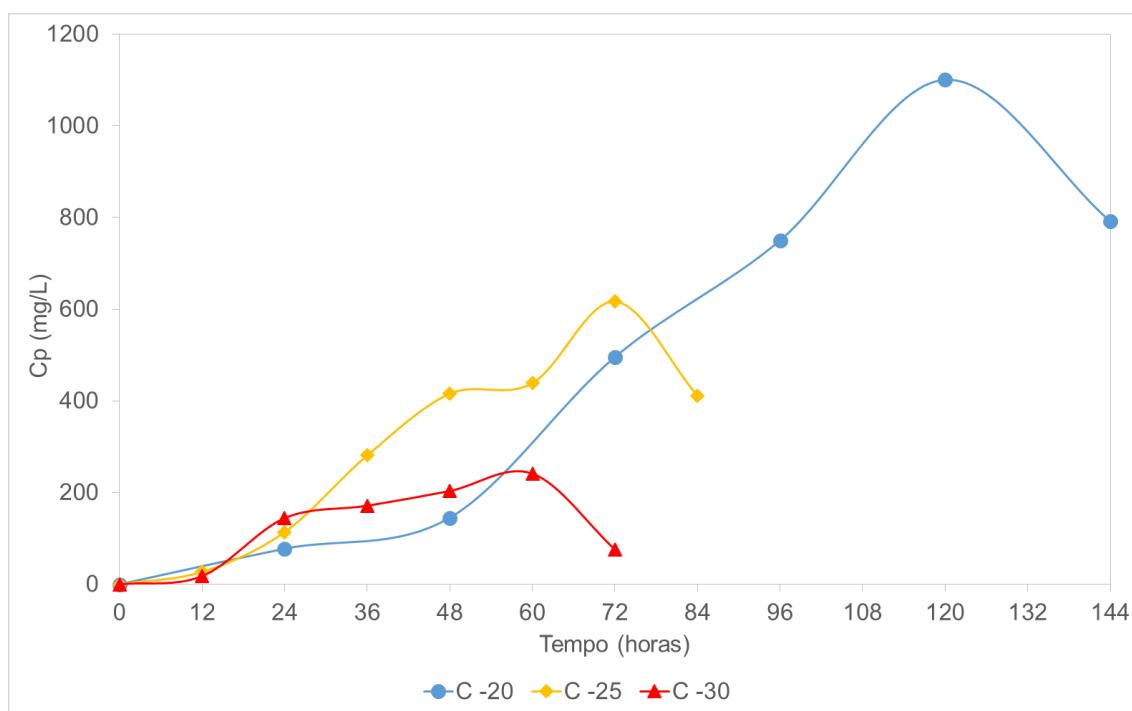


Figura 7. Perfis de produção de AC ao longo dos cultivos realizados sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C).

Observando a figura 7 é relevante salientar que nos cultivos C-30 (30°C) e C-25 (25°C) a produção de AC continuou aumentando mesmo após a exaustão de glicerol, o que não ocorreu no cultivo C-20 (20°C). Isto pode estar relacionado à absorção de glicerol para o interior das células, gerando um acúmulo que permite a continuidade da produção de AC mesmo após a exaustão do glicerol no meio de cultura (COSTA e BADINO, 2012). Provavelmente, a 20°C a absorção de glicerol pelas células de *S. clavuligerus*

foi baixa, a ponto de não gerar acúmulo em seu interior, provocando a queda instantânea na produção de AC logo após a exaustão de glicerol.

Os picos de produção de AC nos cultivos C-30 e C-25 ocorreram em tempos diferentes do tempo de esgotamento de glicerol. Devido a temperatura mais elevada o microrganismo consumiu o glicerol mais rapidamente. Em relação ao cultivo C-20, porém, após o esgotamento passou a utilizar a proteína isolada de soja como principal fonte de carbono, liberando amônio no meio. No cultivo C-20 isso não ocorre, pois nesse cultivo o consumo total de glicerol ocorreu em 120 horas, coincidindo com a concentração máxima de AC.

Comparando os resultados dos cultivos C-30, C-25 e C-20 ilustrados na Figura 7 pode ser notado claramente que a produtividade e concentração máxima de AC com a redução da temperatura, concordando com os resultados de Costa e Badino (2012) realizado em mesa incubadora rotativa e de e Rodrigues (2015) realizado em biorreator convencional.

Na Figura 7 é observa-se que o tempo no qual ocorre a máxima concentração de AC foi estendido com a redução da temperatura, tempo este que nos cultivos em C-30 (30°C), C-25 (25°C) e C-20 (20°C) foram de 60, 72 e 120 horas respectivamente. Este fato está relacionado à redução do metabolismo celular em temperaturas mais brandas. Assim sendo, o microrganismo leva mais tempo para se adaptar à temperatura empregada, utilizando os substratos do meio em um primeiro momento para seu metabolismo primário e, posteriormente, se inicia a produção de metabolitos secundários como o AC.

Costa e Badino (2012) estudaram o efeito da temperatura na produção de AC em mesa incubadora rotativa. No trabalho dos autores foram realizados cultivos a 30°C, 25°C e 20°C, sendo alcançadas produções máximas de AC de 168,7, 631,6 e 1266,2 mg/L, respectivamente. Nas mesmas condições foram alcançados valores de 241,4 mg/L (30°C), 616,7 mg/L (25°C) e 1100,6 mg/L a (20°C) no presente trabalho. Os resultados de Costa e Badino (2012) se assemelham muito ao deste trabalho, onde houve uma produção menor apenas na temperatura de 30°C. As demais temperaturas foram maiores no

trabalho de Costa e Badino (2012). Na temperatura de 20°C os autores obtiveram uma produção 15% maior do que a obtida no presente trabalho.

Rodrigues (2015) realizou estudo em biorreator convencional avaliando o efeito da temperatura e pH na produção de AC. O autor obteve de 478,8 mg/L a 30°C, 619,4 mg/L a 25°C e 684,4 mg/L a 20°C. Houve uma maior produção a 30°C possivelmente, em consequência do aprimoramento na transferência de oxigênio em biorreator juntamente com a altas velocidades de crescimento celular e produção de AC. No entanto, a 20°C o valor alcançado de concentração de AC foi menor que no presente trabalho, devido aos efeitos do cisalhamento que suprimiram o crescimento microrganismo e a produção de AC que ocorrem em velocidades menores quando a temperatura foi reduzida.

A Figura 8 ilustra para fins comparativos o consumo de glicerol nos três cultivos (20°C, 25°C e 30°C).

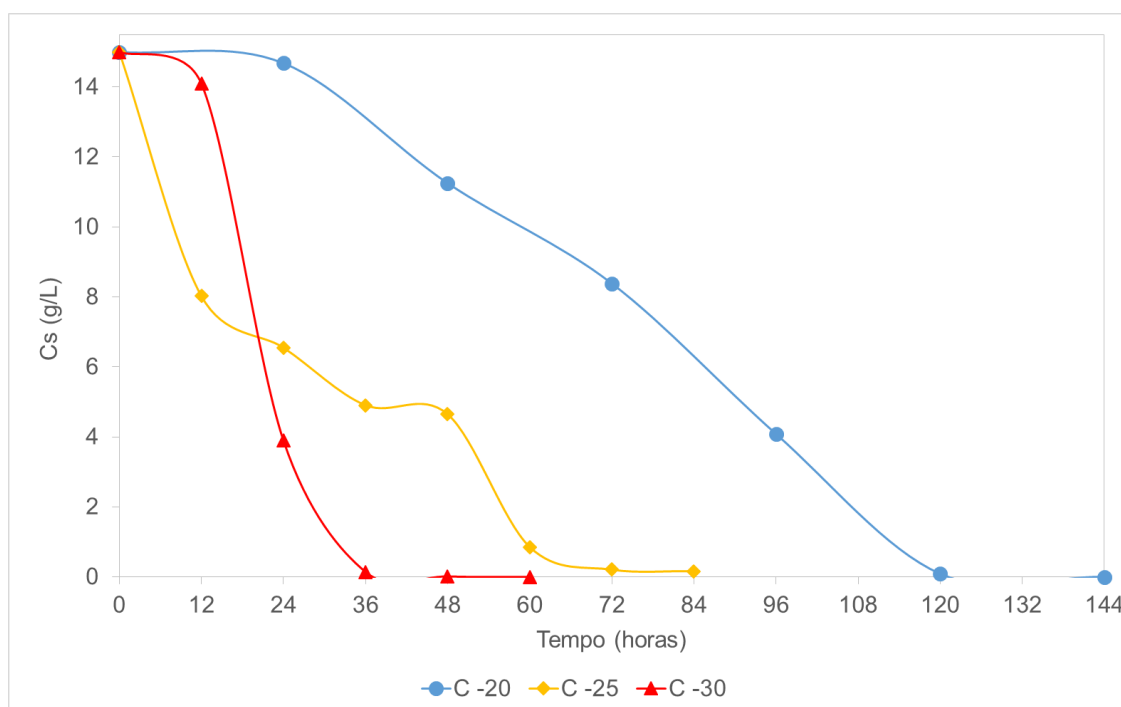


Figura 8. Perfis de consumo de glicerol ao longo dos cultivos realizados sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C).

Analisando a Figura 8 é evidente que o consumo de glicerol se torna mais lento com a diminuição da temperatura, ocorrendo seu consumo total em 36 horas em C-30 (30°C), 72 horas em C-25 (25°C) e em 120 horas em C-20

(20°C). O fato da redução do consumo de glicerol com a redução da temperatura se deve à adaptação do metabolismo celular do microrganismo, assim como quando aplicado temperatura mais elevada (C-30) o metabolismo foi mais acentuado, consumindo mais rapidamente o glicerol.

Os resultados obtidos por Rodrigues (2015) em experimento avaliando efeito da temperatura e pH utilizando biorreator convencional estão de acordo com os obtidos no presente trabalho. O autor observa exaustão do glicerol em 36 horas a 30°C, em 68 horas a 25°C e 138 horas a 20°C.

A Figura 9 ilustra comparação da produção de amônio para os três cultivos.

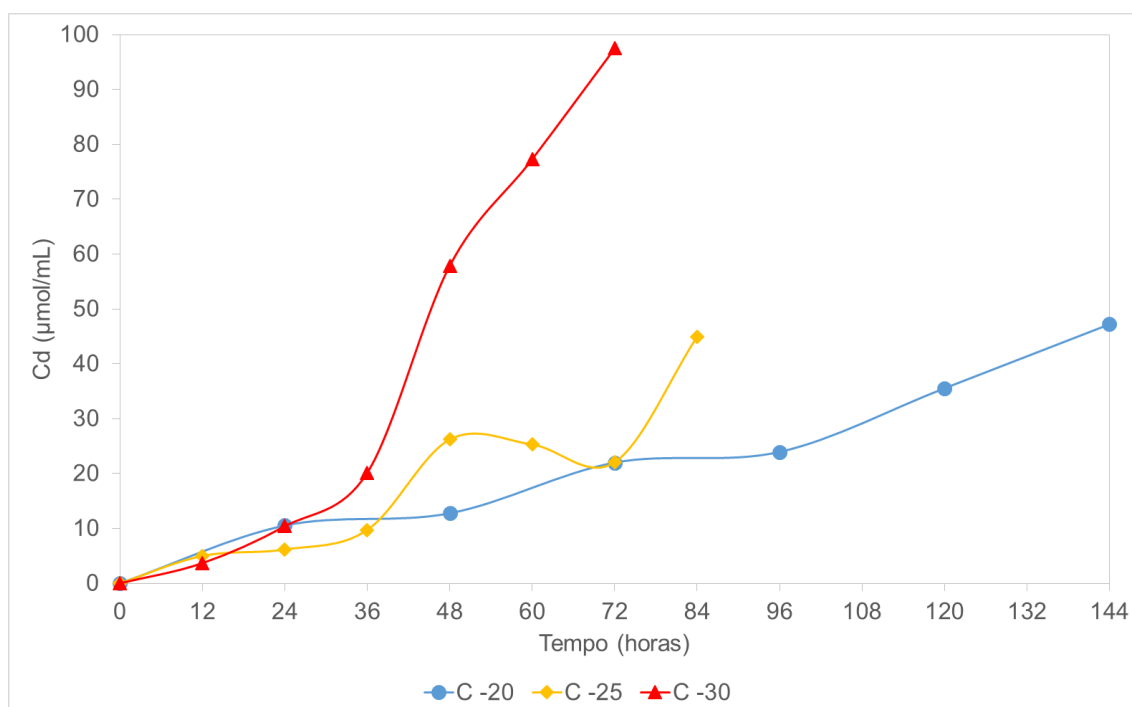


Figura 9. Perfis de concentração de íons amônio ao longo dos cultivos realizados sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C).

Observando a Figura 9 e a comparando com a Figura 8, nota-se que em todos os cultivos ocorre aumento na concentração de íons amônio após a exaustão total do glicerol. No cultivo C-20 acontece um aumento lento e quase que linear devido ao metabolismo celular estar mais lento em razão da utilização de temperatura mais branda. No cultivo C-25 ocorre um relevante pico de produção de amônio em 48 horas. De 36 a 48 horas ocorre uma diminuição na velocidade de consumo de glicerol e há uma pequena queda na produção de amônio de 48 a 72 horas, momento este em que aumenta o

consumo do glicerol até sua exaustão. No início do cultivo C-30 há uma produção menor durante as primeiras 36 horas, porém há um significativo aumento em 48 horas, ao mesmo tempo em que ocorre a exaustão do glicerol. Este fato ocorre possivelmente porque há um redirecionamento no metabolismo celular, para consumo da proteína isolada de soja (PIS) como substrato principal gerando amônio.

Com o aumento da temperatura ocorre uma maior produção de amônio no meio sendo este produzido mais rapidamente. Em C-30 (30°C) a concentração atinge 97,5 $\mu\text{mol/mL}$ com apenas 72 horas de cultivo, em C-25 (25°C) alcança 45,0 $\mu\text{mol/mL}$ em 84 horas e em C-20 (20°C) atinge 47,2 $\mu\text{mol/mL}$ no tempo de 120 horas.

Bersanetti *et al.* (2005), utilizaram os caldos de cultivo utilizados no estudo de degradação de AC em diferentes temperaturas, que foram obtidos de cultivos realizados a 28°C, enquanto no presente trabalho foi avaliado a produção de AC associando a sua degradação em meio de cultivo sob diferentes temperaturas, uma vez que esta influencia o metabolismo celular, gerando diferentes concentrações dos produtos metabólicos extracelulares liberados para o meio de cultivo.

A Tabela 7 apresenta os valores de concentração de amônio, Ace relação entre as concentrações sob diferentes teperatura.

Tabela 7. Concentração molar de amônio, AC e relação entre as concentrações em experimentos realizados sob diferentes temperaturas (C-30, C-25 e C-20).

Temperatura (°C)	NH ₄ (MMo\IL)	AC (MMo\IL)	Relação molar NH ₄ \AC
30	50	0,60	83,3
25	25	1,55	16,1
20	25	2,75	9,1

Observando a Tabela 7 é possível observar que a concentração de íons amônio é superior à concentração de AC em todos os cultivos. Comparando o cultivo realizado em maior temperatura (30°C) com o realizado em menor

temperatura (20°C) observa-se um grande aumento da concentração de íon amônio em relação ao AC, evidenciando a influência dos íons amônio na degradação do AC e sua relação com a temperatura, uma vez que a concentração de amônio em relação ao AC aumentou conforme utilizadas maiores temperaturas.

Roubos (2002) observou que concentração de amônio influenciou de forma importante a constante da velocidade de degradação, além disso as alterações na disponibilidade do substrato contidos no meio de cultura, e também as elevadas concentrações de glicerol provocam um aumento importante da constante da velocidade de degradação

A Tabela 8 apresenta os valores de produtividades de AC em litros, amônio e a velocidade média de consumo de glicerol (r_G).

Tabela 8. Produtividade de ácido clavulânico e amônio e taxa de consumo de glicerol dos cultivos realizados sob diferentes temperaturas (C-30, C-25 e C-20).

Parâmetros	C-30	C-25	C-20
Produtividade máxima de AC $PrAC_{max}$ (mg/L.h)	4,02	8,57	9,17
Produtividade máxima de amônio Pd_{max} (μ mol/mL.h)	1,35	0,54	0,33
Velocidade de consumo de glicerol r_G (g/L.h)	0,41	0,21	0,13

Observando os resultados da Tabela 8 é possível verificar que a produtividade em AC foi maior quando utilizada temperatura mais baixa (C-20), a produtividade de amônio foi a menor dentre os cultivos e o consumo de glicerol ocorreu mais lentamente também a 20°C. Quando utilizado uma temperatura mais elevada (C-30) a produtividade foi mais que 50% menor quando comparada ao cultivo C-20. A produção de amônio foi 4 vezes maior e o consumo de glicerol ocorreu mais rapidamente.

5.2. Cultivo em biorreator

A figura 10 ilustra a produção de AC, consumo de glicerol e formação de íons amônio durante cultivo utilizando biorreator convencional de tanque agitado e aerado a 20°C.

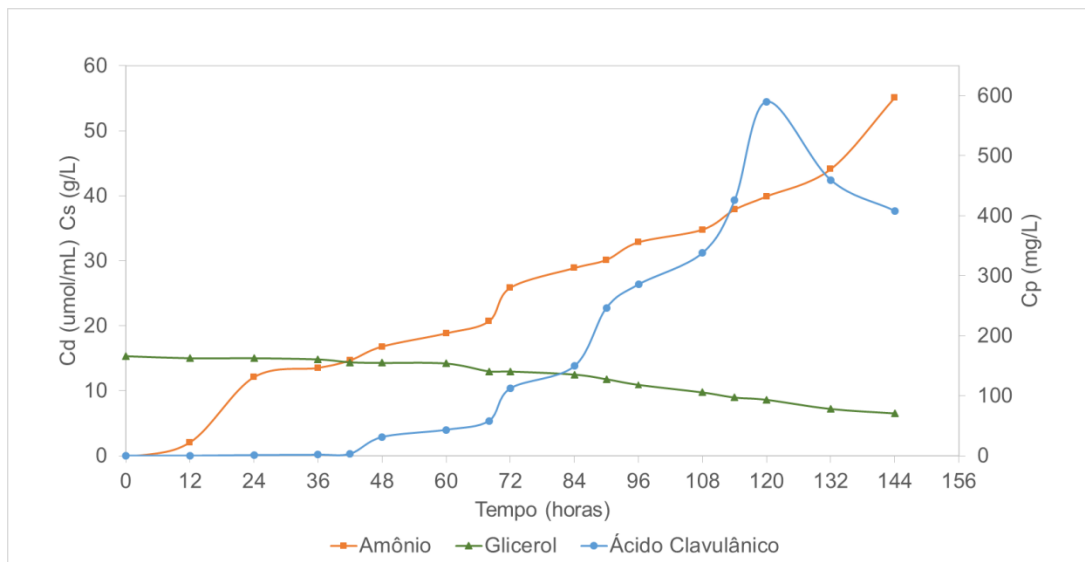


Figura 10. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e amônio (Cd) ao longo do tempo no cultivo em biorreator convencional de tanque agitado.

Após avaliação dos resultados de produção de AC obtidos em mesa incubadora rotativa, observou-se que houve maior produção com a diminuição da temperatura. Por essa razão o experimento realizado em biorreator convencional foi realizado a 20°C, visando validar a produção de AC a temperatura em biorreator.

Em trabalho anterior do grupo de pesquisa, realizado por Ribeiro (2017) verificou-se que o aumento da rotação favorece a produção de AC logo decidiu-se por realizar o cultivo em biorreator a 1000 rpm.

Esta condição de agitação associada à baixa temperatura não reportada na literatura em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, ocasionou uma grande fase lag, por volta de 12 horas, que acarretou um longo tempo de cultivo.

Analisando a Figura 10 é possível observar que a produção de AC aumentou consideravelmente após 66 horas de cultivo, onde se tem um considerável consumo de glicerol, durante todo cultivo manteve-se este padrão inversamente proporcional do consumo de glicerol e produção de AC.

O pico de produção de AC foi de 590 mg/L obtido em 120 horas de cultivo, onde a concentração de glicerol no caldo estava abaixo de 4 g/L e a produção de amônio foi de 39 $\mu\text{mol/mL}$. Após este tempo de cultivo, a velocidade de degradação do AC foi maior do que a de produção com diminuição da concentração de AC de 590 para 408 mg/L. Isto está relacionado a liberação de amônio no meio de cultura, sendo que nas 24 horas finais de experimento esta concentração aumentou em mais de 20 $\mu\text{mol/mL}$, alcançando 60 $\mu\text{mol/mL}$ em 144 horas de cultivo.

Observou-se que a concentração de AC em biorreator não foi a mesma alcançada em mesa incubadora rotativa. Pode-se concluir que a condição muito cisalhante de 1000 rpm juntamente com a baixa temperatura (20°C) não favoreceu a produção de AC. Rosa *et al.* (2005) realizaram cultivo para produção de AC a 1000 rpm atingindo a produção máxima de 614 mg/L, sendo a maior concentração relatada em seu artigo. Porém o cultivo foi realizado a 28°C diferentemente do presente trabalho.

Rodrigues (2007) avaliou diferentes condições de temperaturas e pH, e verificou que houve uma maior produção de AC com a diminuição da temperatura em experimento a pH 6,8, 800 rpm e 2 vvm, obtendo 684 mg/L. Os resultados obtidos mostraram que a utilização de menores temperaturas pode ser uma estratégia promissora para melhorar o desempenho do processo de produção do AC.

Rosa *et al.* (2005) avaliaram a influência da transferência de oxigênio e condições de cisalhamento na produção de AC. Os ensaios foram realizados em biorreator convencional de 4 L, variando a velocidade de agitação e empregando 0,5 vvm, temperatura de 28°C e pH 6,8. Os autores concluíram que altas velocidades de agitação produzem altas taxas de cisalhamento e melhoram a produção de AC.

5.3. Ensaio de degradação

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos no experimento para avaliação da degradação de AC em solução aquosa e em solução com os componentes do meio de cultivo, com exceção do glicerol e proteína isolada de

soja. Os ensaios tiveram duração de 48 horas e a concentração inicial (C_i) de AC utilizada foi de 500 mg/L.

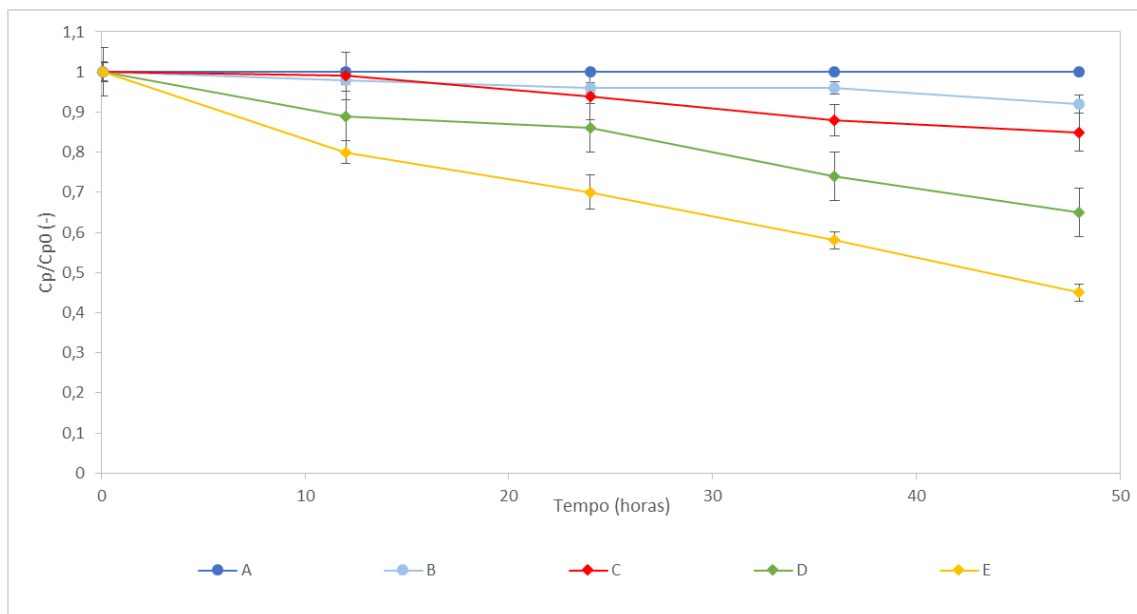


Figura 11. Perfil das concentrações de AC em solução aquosa, solução aquosa com 100 $\mu\text{mol/mL}$ de amônio, componentes do meio de cultura e componentes do meio de cultura com diferentes concentrações de amônio.

No tubo A utilizou-se uma solução aquosa com 500 mg/L de AC. No tubo B foi utilizada solução com 500 mg/L de AC com 100 $\mu\text{mol/ml}$ de amônio, já no tubo C foi utilizada uma solução com os componentes do meio de cultura para produção de AC, com exceção do glicerol e PIS. Nos tubos D e E foi utilizado esta mesma solução que simula o meio de cultura e adicionado 100 e 200 $\mu\text{mol/ml}$ respectivamente.

Observa-se que somente em solução aquosa (A) a molécula de AC se manteve estável durante todo o experimento. Em solução aquosa de AC com 100 $\mu\text{mol/mL}$ de amônio (B) houve uma pequena degradação de AC de cerca de 8,2% em relação a C_i , mostrando que há uma interferência direta do amônio na degradação do AC.

É possível verificar que quando foi utilizada solução aquosa com os componentes do meio de cultura (C) houve também degradação, sendo esta de 15,4% em relação ao valor inicial (C_i) mostrando a influência dos demais componentes do meio de cultura e não apenas dos metabolitos provenientes do metabolismo proteico e sua posterior liberação de amônio. Quando utilizado 100 $\mu\text{mol/mL}$ de amônio juntamente com os componentes do meio de cultura

(D) houve também degradação do AC sendo esta de 32,2% em relação à C_i e quando foi empregada a concentração de 200 $\mu\text{mol/mL}$ de amônio (E) a C_f caiu para 54,8% da C_i , ressaltando a interferência dos íons amônio liberados no meio de cultivo, para estabilidade da molécula de AC.

Roubos (2002) estudou a influência individual dos componentes contidos no meio de cultura para produção de AC, monitorou a degradação durante a fase de crescimento exponencial dos cultivos e avaliou a degradação de AC no sobrenadante de amostras obtidas durante cultivo. A concentração de amônio teve uma grande influência na constante da velocidade de degradação, assim como também foi observado a influência do magnésio. Além disso as alterações na disponibilidade do substrato, como glicerol também provocou um aumento importante da constante da velocidade de degradação.

Bersanetti *et al.* (2005) estudaram a degradação de AC em diferentes valores pH e temperatura, utilizando soluções aquosas. Para pHs 6.2 e 7.0, respectivamente, mostrou que a degradação do ácido clavulânico, em solução aquosa, segue uma cinética de pseudo-primeira ordem e que os valores da constante de degradação aumentaram com a temperatura. Também observa-se que as constantes de taxa correspondentes a pH 7,0 foram consideravelmente superiores aos obtidos a pH 6,2. As constantes da taxa de degradação de AC em solução aquosa são inferiores as obtidas em meio de cultivo, devido à presença de outros componentes do meio, como compostos de amônio, que aumentam a instabilidade da AC.

A Figura 12 apresenta a degradação de AC obtida a partir de caldo de cultivo realizado a 25°C e também a concentração do amônio durante o tempo do experimento.

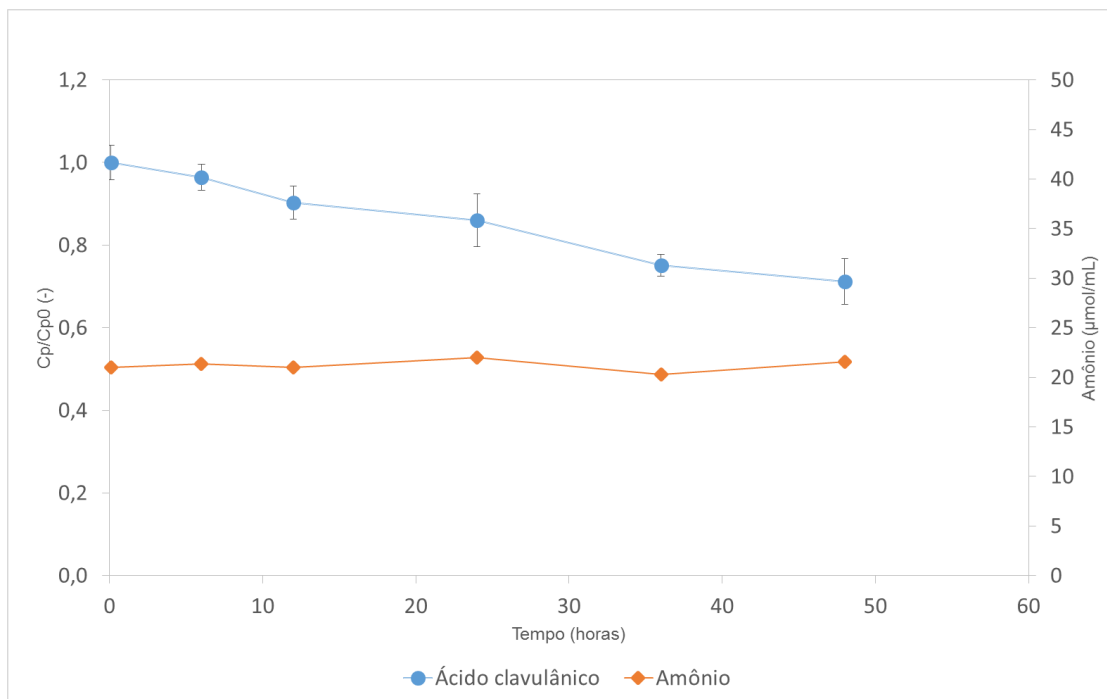


Figura 12. Perfil da degradação de AC a partir de caldo de cultivo a 25°C.

No experimento mostrado na Figura 12 foi utilizado o sobrenadante do caldo de cultivo realizado a 25°C, temperatura mediana dentre as estudadas neste trabalho, e avaliou-se a degradação de AC a cada 6 horas inicialmente e depois a cada 12 horas. Foi realizada também a quantificação de amônio no meio durante o ensaio. Foi possível observar que o AC obteve uma velocidade constante de degradação, enquanto que a concentração de amônio contido no meio não sofreu alteração com o decorrer do experimento, com uma concentração baixa em relação aos cultivos realizados em mesa incubadora rotativa, o que evidencia que sua liberação é decorrida do catabolismo proteico, Cum a vez que este se manteve estável neste experimento.

Equação para cálculo da cinética de degradação de AC.

$$kdAC = \frac{-dCAC}{dA} = -kdAC \cdot CAC \quad \text{Equação 1}$$

$$\ln \frac{CACi}{CACf} = kdAC \cdot t \quad \text{Equação 2}$$

$$kdAc = \frac{\ln \frac{CACi}{CACf}}{t} \quad \text{Equação 3}$$

A Tabela 9 apresenta a cinética de degradação de AC em diferentes soluções e em caldo de cultivo.

Tabela 9. Cinética de degradação de AC em solução aquosa, solução aquosa com 100 $\mu\text{mol/mL}$ de amônio, componentes do meio de cultura, componentes do meio de cultura com diferentes concentrações de amônio e em caldo de cultivo.

Meio	k_{dAc} (h^{-1})
A	0,00005
B	0,00178
C	0,00348
D	0,00810
E	0,01654
Caldo	0,00740

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que a velocidade de degradação aumentou quando utilizado meio B (solução aquosa AC com 100 $\mu\text{mol/mL}$ de íon amônio) em relação ao meio A (solução aquosa de AC) evidenciando a degradação pelo íon amônio. Nos meios C (componentes do meio de cultura), D (componentes do meio de cultura com 100 $\mu\text{mol/mL}$ de íon amônio) e E (componentes do meio de cultura com 200 $\mu\text{mol/mL}$ de íon amônio) a velocidade de degradação aumentou conforme foi aumentada a concentração de íons amônio, mostrando novamente o efeito de degradação do íon amônio sobre o AC e a interação dos componentes do meio de cultura com o AC, já a velocidade de degradação do caldo se assemelhou com a obtida utilizando meio C.

6. CONCLUSÕES

A produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* foi influenciada diretamente pela temperatura utilizada. A produção de AC máxima foi de 1100,6 mg/L, alcançada no cultivo realizado com menor temperatura (20°C), sendo o cultivo foi mais extenso devido ao metabolismo celular atenuado. A produção de AC foi de apenas 241,4 mg/L em cultivo realizado a 30°C. Este teve uma duração inferior aos demais mostrando que a temperatura afeta o metabolismo celular assim como a produção e estabilidade de seus metabolitos secundários, como o produto em questão no presente trabalho, o ácido clavulânico.

Os resultados evidenciam que os íons amônio liberados pelo catabolismo proteico e acumulado no caldo de cultivo tem um importante efeito na degradação da molécula de AC durante sua fase de produção, onde após atingir determinada concentração, suprimiu a produção deste, bem como iniciou elevada degradação da biomolécula de AC.

A realização de cultivos em mesa incubadora rotativa sob temperaturas brandas mostrou-se uma tática com potencial de melhoramento no processo de produção de AC. Além disto, os resultados obtidos em cultivos utilizando biorreator deixa espaço para novos estudos, visando aprimorar a condição de cisalhamento em relação à temperatura.

REFERÊNCIAS

ALI M. S. Optimization of *Streptomyces Clavuligerus* Medium and Conditions for Clavulanic Acid Production. **Journal of Applied Sciences Research**, v.6, n.8, p. 1303-1308, 2010.

BAGGALEY, K.H.; BROW, A.G.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Production Report**, p.309-333, 1997.

BALLOWS, A. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation identification, applications.** 2nd. ed, New York: Springer-Verlag, 1992. v.1.

BAPTISTA-NETO, A. B. *et al.* A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous process. **Braz. J. Chem. Eng.** v.22, n.4, p. 557-563 São Paulo Oct./Dec. 2005.

BELLÃO, C.; ANTONIO T.; ARAÚJO M.L.G.C.; BADINO A.C. **Braz. J. Chem. Eng.** v30, p.257-266, 2013

BELTER, P. A. Biotreatment, Downstream Processing and Modelling: With 32 Tables. *Comprehensive Biotechnology*; Moo-Young, M., 2nd. ed. New York: Pergamon Press, 1985. p. 473-480.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G; Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochem. Eng. J.**, v.23, p. 31-36, 2005.

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

BRANA, A.F.; PAIVA, N.; DEMAIN, A.L. Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. **J. Gen. Microbiol.** v.132, n.5, p.1305-1317, 1986.

BROWN, A.G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANCOMB, G.; HOOD, J.D.; READING, C.; ROLISON, G.N. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **J. Antibiotics**, v.29, p.668-670, 1976.

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

CAVALLIERI, A. P. **Adição de precursores em meio complexo solúvel para a produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara-SP, 2010.

CERRI, M.O.; BABINO, A. C. Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v.35, p. 977-984, 2012.

COSTA, C. L. L. **Estratégia para melhoria de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. Tese (Doutorado) Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, 2014.

COSTA, C.L.L.; BADINO, A.C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochem. Eng. J.**, v.69, p.1-7, 2012.

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

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

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

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

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; BADINO JR, A.C.; HOKKA, C.O. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Letters**, v.23, p. 157–161, 2001.

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

HAMAD, B. The antibiotics market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, p.675-676, 2010.

HU, Z.C.; ZHENG, Y.G.; WANG, Z.; SHEN, Y.C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme Microb Technol.**, v.39, p.586-590, 2006.

ISHIDA, K.; TRINH V. H.; HEI C. L.; KWANGKYOUNG L.; CHANG-HUN S.; YEO J Y.; JAE K. S. Degradation of Clavulanic Acid During the Cultivation of *Streptomyces clavuligerus*; Instability of Clavulanic Acid by Metabolites and Proteins from the Strain. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.16, p.590–596, 2006.

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

KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: The John Innes Foundation, 2000.

KIM, J. H.; HANCKOCK, I.C. Pellet forming and fragmentation in liquid culture of *Streptomyces griseus*. **Biotechnol. Lett.** v.22, n.3, p.189-192, 2000.

KIM, Y.J.; MOON, M.H.; SONG, J.Y.; SMITH, C.P.; HONG, S.K.; CHANG, Y.K. Acidic pH shock induces the expressions of a wide range of stress-response genes, **BMC genomics**, v.9, n.604, p.1-10, 2008.

KIM, Y.J.; MOON, M.H.; SONG, J.Y.; SMITH, C.P.; HONG, S.K.; CHANG, Y.K. pH shock induces overexpression of regulatory and biosynthetic genes for actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.76, p.1119-1130, 2007.

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

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; COLLINS, J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.423-435, 2010.

LEBRIHI, A.; LAMSAIF, D.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.37, n3, p.382-387, 1992.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M.P. Introduction to the order Actinomycetales. In: STAR, M.P.; STALP, H., TRYPER, H.G.; BALAWI, A.; SCHLEGEL, H.G. **The prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.** New York: Springer-Verlag, 1981.

LIRAS, P.; RODRIGUEZ-GARCIA, A. Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor biosynthesis and molecular genetics. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, n.4, p. 467-475, 2000.

LIU, Y.; IMLAY, J.A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. **Science**, v.339, p,1210-1213, 2013.

LOUNES, A.; LEBRIHI, A.; ENSLIMANE C.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P.; Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. **Can. J. Microbiol.** v.41, n.9, p800-808, 1995a.

LYUI, H.; Nefelova, M. V.; Zakharchuk, L. M. Heat shock effect on production and composition of actinomycins. **Antibiotiki i Khimioterapiya**. v. 45, n. 2, p.5-9; 2000.

MANPREET, S.; SAWRAJ, S.; SACHIN, D.; PANKAJ, S.; BANERJEE, U.C. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. **Mal. J. Microbiol.**, v.1, n.2, p.1-9, 2005.

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

MIKULIK, K.; PALECKOVÁ, P. Activity of ribosomes and tmRNA of *Streptomyces aureofaciens* during development and stress conditions induced by changes in temperature and the presence of antibiotics. Communicating

Current Research and Educational Topics and Trends. **Applied Microbiology**, 2007.

OLIVEIRA, L.M. **Estudo cinético da produção de ácido clavulânico e cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***, Tese (Doutorado), Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, 2009.

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

RODRIGUES, K.C.S. **Estudo da influência do pH e de temperatura na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional**, Dissertação (Mestrado) Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável, Universidade Federal de São João Del-Rei, UFSJ, Ouro Branco, MG, 2015.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, **Appl Microb Biotechnol.**, v.20, p.318-325, 1984.

ROSA, J.C. **Influência das condições de transferência de O₂ na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. Dissertação (Mestrado) Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, 2002.

ROUBOS, J.A.; DE-LAAT, W.T.A.M.; BABUSKA, R.; HEIJEN, J.J. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. **Biotechnol Progr.**, v.18, p.451-457, 2002.

SANTOS, A.; PEREIRA, J.F.B.; HAGA, R.B.; RANGEL-YAGUIC, C.O.; TEIXEIRA, J.A.C.; CONVERTI, A.; PESSOA, A.J. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach. **Biochemical Engineering Journal**, v.45, p.89-93, 2009.

SAUDAGAR, P.S.; SURVASE, S.A.; SINGAL, R.S. Clavulanic Acid: A review, **Biotechnology Advances** v.26, p.335–351, 2008.

SER, H-L.; LAW, J. W-F.; CHAIYAKUNAPRUK, N.; JACOB, S. A.; PALANISAMY, U. D.; CHAN, G-K.; GOH, H-B.; LEE, H-L. Fermentation Conditions that Affect Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, Article 522, April 2016.

SILVA, C.S.; BOVAROTI, E; RODRIGUES, M.I.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 32, p. 625-632, 2009.

SONG, J.Y.; JENSEN, S.E.; LEE, K.J. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.88, p.659-669, 2010.

SPELLBERG, B.; BARTLETT, J.G.; GILBERT, N.G. The future of antibiotics and resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 4, p. 299-302, 2013.

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

UNTRAU, S.; LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. **Curr. Microbiol.** v.28, n.2, p.111-118, 1994.

VOELKER, F.; ALTABA, S. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. **Microbiology.** v. 147, n.9, p.2447-2459, 2001.

WALLACE, K.K.; PAYNE, G.F.; SPEEDIE, M.K. Ammonium effects on streptonigrin biosynthesis by *Streptomyces flocculus*. **Journal of Industrial Microbiology.** v.6, n.1, p.43-48, 1990.

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

YAN, Q.H.; CHEN, B.; ZHANG, S.L.; LIU, Z.Z.; GAO, Y.S.; TU, G.Q. A diverse temperature control in meilingmycin fermentation. **Chin. J. Antibiot.** v.27, n.1, p. 18-20, 2002.

YAO, J. H. *et al.* An analytical quality by design (aQbD) approach for a L-asparaginase activity method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, n.5, p.232-239, 2016.

APÊNDICE

Figura 1. Curva de calibração de ácido clavulânico, equação modelo e coeficiente de correlação linear.

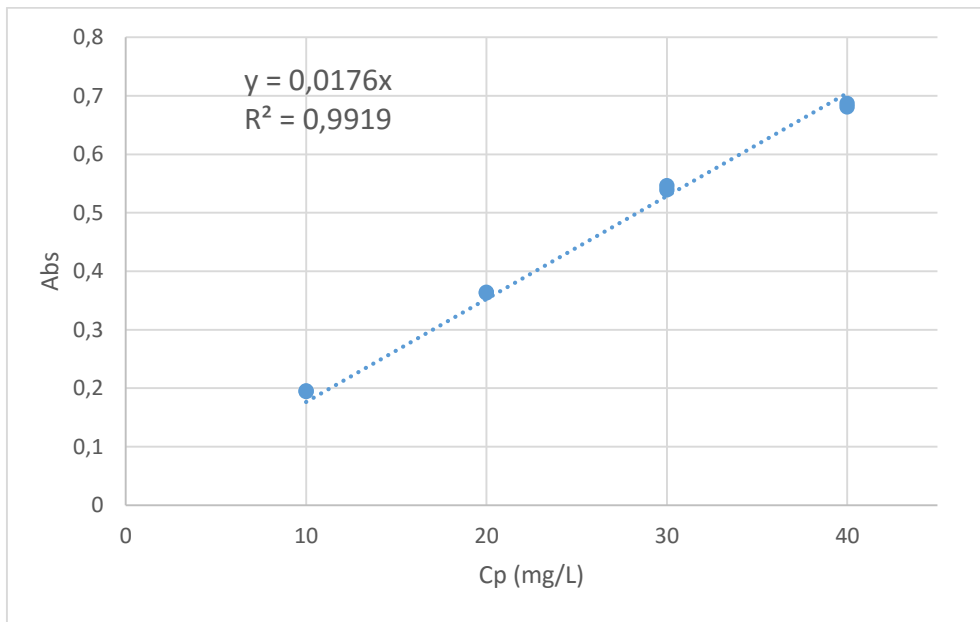
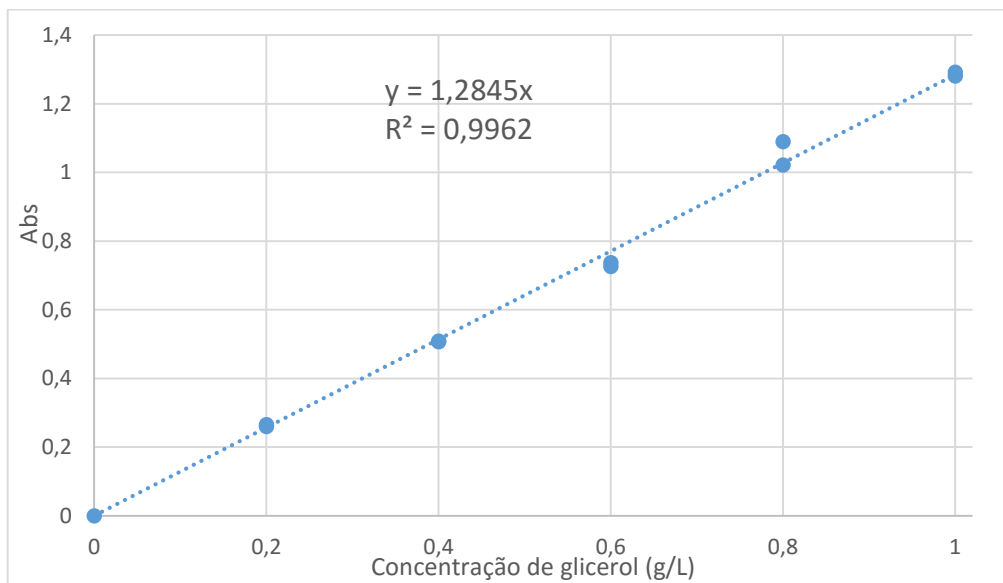


Figura 2. Curva de calibração de glicerol, equação modelo e coeficiente de correlação linear.



ANEXO

Figura 1. Curvas de calibração de amônio em diferentes comprimentos de onda (de 420 a 455 nm), equação modelo e correlação dos coeficientes angulares.

