

ANDRÉ PASTRELO CAVALLIERI

“Adição de precursores em meio complexo solúvel para a produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*”

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

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

ARARAQUARA

2010

FICHA CATALOGráfICA

C377a	Cavallieri, André Pastrelo Adição de precursores em meio complexo solúvel para a produção de Cefamicina C por <i>Streptomyces clavuligerus</i> / André Pastrelo Cavallieri. – Araraquara : [s.n], 2010 66 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo 1. Biotecnologia. 2. <i>Streptomyces clavuligerus</i>. 3. Cefamicina C. 4. Ácido α-aminoadípico. 5. L-lisina. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

André Pastrelo Cavallieri

Dados Pessoais

Nome André Pastrelo Cavallieri
Nascimento 21/10/1982 - Bariri/SP - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008 - 2010** Mestrado em Pós Graduação em Biotecnologia.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil
Título: Adição de precursores em meio complexo solúvel para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2002 - 2008** Graduação em Farmácia-Bioquímica.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

Formação complementar

- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Engenharia Metabólica.
Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Operação e manutenção básica do Sistema HPLC.
Scientific Instruments CO., SINC, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Importância das Interações Medicamentosas na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Técnicas de Separação Cromatográficas.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Simpósio de Propaganda de Medicamentos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Validade Científica do Modelo Homeopático.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005	Curso de curta duração em Desenvolvimento de Fármacos no Brasil. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Atualização Terapêutica: AINEs Inibidores de COX 2. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Módulo Temático Empresarial. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em II Simpósio de Psicofarmacologia- Transtornos Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Biofarmácia: Importância no Desenvolvimento.... Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em HIV/AIDS: Impacto Social, Estratégias de Combate... Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Farmácia Hospitalar. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em O Papel do Farmacêutico na Área de Marketing e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Simpósio de Alimentos Nutracêuticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Sistema de Liberação de Fármacos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Desenvolvimento de Fármacos no Brasil. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Saneamento Ambiental.

Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil

- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Gestão Ambiental de Resíduos.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Benefícios dos Silicones no Cuidado aos Cabelos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Garantia de Qualidade em Farmácia.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Cachaça- da Produção ao Controle da Qualidade.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. Cavallieri, A. P., CORREA, T., Araujo, M. L. G. C.
Atividade de lisina-6-aminotransferase na produção de cefamicina C em meio complexo adicionado de lisina In: III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4, 2009, São Carlos - SP.
Anais do III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4. , 2009.
2. Cavallieri, A. P., BELLAO, C., Badino, A. C., Araujo, M. L. G. C.
Estratégias de Eliminação de Biocompostos Interferentes na Análise de Cefamicina C por Bioensaio In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal - RN.
Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. , 2009.
3. Cavallieri, A. P., CORREA, T., TEODORO, J. C., Araujo, M. L. G. C.
Influência da Adição de L-Lisina em Meio Complexo na Atividade de Lisina-6-Aminotransferase e na Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal - RN.
Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. , 2009.
4. Cavallieri, A. P., BELLAO, C., Araujo, M. L. G. C., Badino, A. C.
Influência das presenças de ácido clavulânico e de penicilina N na análise de cefamicina C In: III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4, 2009, São Carlos.
Anais do III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4. , 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Cavallieri, A. P., HEGUEDUSCH, D. F., Suarez Jr., J. A. O., MOREIRA, R. R. D.
Farmacovigilância de Fitoterápicos em Araraquara - SP In: 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp, 2008, Araraquara.

Anais da 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp. , 2008.

2. Cavallieri, A. P., Araujo, M. L. G. C.

Uso de Penicilinase na Análise de Cefamicina C Produzida em Meio Fermentativo de *Streptomyces clavuligerus* In: 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp, 2008, Araraquara.

Anais da 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp. , 2008.

3. Cavallieri, A. P., Lisboa H.C.F., Sponchiado S.R.P.

Evaluation of the tyrosinase activity in melanized strain of *Aspergillus nidulans* In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq, 2005, Águas de Lindóia.

XXXIV Reunião da Sociedade da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq.
São Paulo: Adaltech Soluções para Eventos, 2005. v.XXXIV.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Cavallieri, A. P., Araujo, M. L. G. C.

Influência de precursores em meio complexo solúvel na produção de cefamicina C por *streptomyces clavuligerus* In: III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4, 2009, São Carlos.

Anais do III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4. , 2009.

2. Cavallieri, A. P., Garcia Jr., Oswaldo, Sponchiado S.R.P.

Biossorção de Lantânio e Neodímio Pela Biomassa de *Aspergillus nidulans* In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007

Anais do XIX congresso de Iniciação Científica da UNESP. , 2007.

3. Cavallieri, A. P., Garcia Jr., Oswaldo, Sponchiado S.R.P.

Biossorção de Neodímio pela Linhagem Melanizada do fungo *Aspergillus nidulans* In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2006, Botucatu.

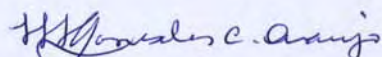
Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. , 2006.

ANDRÉ PASTRELO CAVALLIERI

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

Araraquara, 26 de fevereiro de 2010.

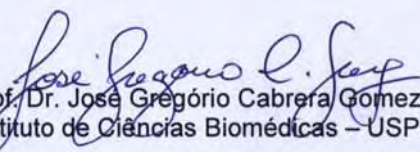
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos



Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez
Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo

"A ignorância afirma ou nega veementemente; a ciência duvida."
(Voltaire)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela existência deste universo maravilhoso que se descortina a frente de nossos olhos.

A meus pais, **Antônio e Rosa**, pelo seu amor, por sempre acreditarem em mim e pelo seu apoio incondicional.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo**, pela orientação e amizade, sempre me apoiando e incentivando.

Ao **Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.** pela elaboração da estratégia de tratamento das amostras do bioensaio.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli** pela concessão do uso do aparelho de análise aminoácidos.

Ao químico **Ademir Geraldo Cavallari Costa Longa** pelo auxílio com as análises de aminoácidos.

À técnica **Maria do Carmo Luiz** por sua prestatividade, sempre auxiliando na realização de meu trabalho.

A **Luísa** por sempre atender aos meus pedidos.

Às companheiras de laboratório, **Tatiana e Telma**, pelo seu companheirismo, amizade e auxílio nas atividades de laboratório.

A todo meus **amigos**.

À **Carla** por sempre estar a meu lado.

À **FAPESP** pelo auxílio financeiro (Projeto temático – Fapesp 05/55079-4).

Ao **CNPq** e a **FAPESP** (2008/52819-5), pelas bolsas concedidas.

RESUMO

β -lactâmicos são compostos de elevada importância clínica. *Streptomyces clavuligerus* produz vários destes compostos, como penicilina N (PenN), deacetilcefalosporina C, deacetoxicefalosporina C, cefamicina C (CefC) e ácido clavulânico (AC). Particularmente, CefC é um antibiótico de grande interesse por suas características de resistência a β -lactamases. A biossíntese deste antibiótico envolve uma série complexa de reações enzimáticas, iniciando-se com a etapa limitante de conversão de L-lisina em ácido L- α -aminoadípico (AAA) que, então, condensa-se com cisteína e valina para formar L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV), o precursor dos antibióticos β -lactâmicos. A formulação de meios utilizando-se estratégias racionais tem sido de fundamental importância para incrementar a produção de antibióticos β -lactâmicos em *S. clavuligerus*. No presente trabalho, visando contornar a etapa de conversão de L-lisina, investigou-se o efeito da adição de AAA e/ou L-lisina no processo de produção de CefC por *S. clavuligerus* ATCC 27064 em meio de produção complexo solúvel contendo amido e farinha de semente de algodão (ProfloTM) como principais fontes de C e energia e de N, respectivamente. Inicialmente, foram realizadas fermentações adicionando-se ao meio um ou outro aminoácido. Os resultados destes experimentos subsidiaram, então, a seleção de faixas de concentração dos aminoácidos, através de métodos de planejamento experimental, para investigar o efeito combinado destes compostos no processo. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio de metodologia de superfície de resposta, relacionando-se concentração inicial e consumo de AAA e L-lisina com a produção de CefC. Nos experimentos com os meios contendo somente L-lisina ou AAA, como também naqueles estabelecidos através de metodologia de planejamento experimental, foram observados os efeitos positivos destes aminoácidos sobre a produção de antibióticos. A análise estatística dos dados experimentais não indicou um efeito combinado dos aminoácidos, conforme evidenciado experimentalmente. Após determinadas as concentrações ideais de ambos os aminoácidos no meio de produção, avaliou-se o efeito da adição de íons fosfato ao meio, uma vez que este pode influenciar os processos enzimáticos da rota biossintética de CefC. Constatou-se que, dentro da faixa estudada (0 a 25 mM de fosfato), houve um máximo de produção com a adição de 15 mM. Para finalizar o trabalho, foi realizado um experimento em escala aumentada sob as condições que conduziram aos maiores acúmulos de produto e de produção específica em frascos agitados (28,8 mM de L-lisina, 4 mM de AAA e 15 mM de K₂HPO₄). Este experimento confirmou o efeito positivo de ambos aminoácidos sobre a produção de antibióticos. Os resultados obtidos neste trabalho, de uma forma geral demonstram que o passo inicial de conversão de L-lisina em AAA é limitante e está diretamente associado à produção. Quanto ao fosfato, os dados obtidos também condizem com relatos da literatura, demonstrando que escolha de uma faixa ideal de concentração pode ser decisiva no aumento da eficiência do processo.

Palavras-chave: *Streptomyces clavuligerus*. Cefamicina C. Ácido α -aminoadípico. L-lisina.

ABSTRACT

β -lactams are compounds of high clinical importance. *Streptomyces clavuligerus* produces various of these compounds, such as penicillin N (PenN), deacetylcephalosporin C, deacetoxycephalosporin C, cephamycin C (CefC), and clavulanic acid (AC). Particularly, CefC is an antibiotic of great interest for its characteristics of β -lactamases resistance. The biosynthesis pathway of CefC involves a complex series of enzymatic reactions, starting with the rate-limiting step of the lysine conversion to α -aminoadipic acid (AAA), followed of this compound condensation with cysteine and valine to form L- α -aminoadipyl-L-cysteiny-D-valine (ACV), the precursor of β -lactam antibiotics. In this work, the effect of the addition of AAA and / or lysine on CefC production by *S. clavuligerus* ATCC 27064 was investigated. It was used a complex medium containing soluble starch and cottonseed flour (ProfloTM) as main sources of C and energy, and N, respectively. Initially, fermentations were carried out by adding to the medium one or other amino acid. The results of these experiments were used to select the concentration ranges of amino acids by using methods of experimental design. A three-level full-factorial design was applied to investigate the combined effects of lysine and AAA concentrations on CefC production. Response surface methodology was used to determine statistically the optimum amino acids concentration values in order to obtain the maximum concentration of antibiotic. Positive effects of these amino acids on the production of antibiotics were observed in the experiments using media containing lysine or AAA, as well in the designed experiments. The effect of adding phosphate ions in the production medium was investigated too. It was found that there was a maximum production with the addition of 15 mM, within the range studied (0 to 25 mM phosphate). To confirm the results, a fermentation run was conducted in 5 L fermentor equipped with agitation and aeration, under the experimental condition that led to higher accumulation of product and specific production in shake-flasks (28.8 mM lysine, AAA 4 mM and 15 mM K₂HPO₄). The results showing that the initial step of lysine conversion to AAA is rate-limiting and is directly associated to production. In relation to phosphate, the data are consistent with reports showing that the choice of an optimal range of concentration can be decisive in increasing the efficiency of the process.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*. Cephamycin C. α -amioadipic acid. L-lysine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 – Estrutura química do anel β -lactâmico: neste caso trata-se da estrutura comum aos antibióticos cefalosporínicos.	21
Figura 3. 2 – Principais subclasses de compostos β -lactâmico	22
Figura 3. 3 – Estrutura química da CefC	24
Figura 3. 4 - Estrutura química do antibiótico semi-sintético Cefotetan	24
Figura 3. 5 - Estrutura química do antibiótico semi-sintético Cefoxitina	24
Figura 3. 6 – Rotas biossintéticas em <i>S. clavuligerus</i> de (A) CefC e (B) AC (LIRAS, 1999) (PenN – penicilina N, DAOC – deacetoxicefalosporina C, DAC – deacetilcefalosporina C, OCDAC – orto-carbamoil-deacetilcefalosporina C, HOCDAC – 7-hidroxi-carbamoil-deacetilcefalosporina C)	26
Figura 4. 1 - Etapas de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados	36
Figura 4. 2 - Cromatograma obtido a partir de análise do <i>pool</i> de aminoácidos-padrão	37
Figura 5. 1 – Planejamento 2 ⁿ (adição de AAA em 0 h): diagrama de Pareto do modelo ajustado para a produção de CepC totais em 72 horas de fermentação.	52
Figura 5. 2 - Planejamento 2 ⁿ (adição de AAA em 48 h): diagrama de Pareto do modelo ajustado para a produção de CepC totais em 72 horas de fermentação.	54
Figura 5. 3– Planejamento 3 ⁿ : diagrama de Pareto, com nível de significância igual a 0,05 (linha vertical contínua) e 0,10 (linha vertical tracejada), para dados de CepC totais obtidos em 72 horas de fermentação.	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5. 1 - Curva de calibração de CepC para bioensaio.	42
Gráfico 5. 2- Halos de inibição em função da concentração de antibióticos.	43
Gráfico 5. 3- Concentração de AC em função do tempo de hidrólise.	44
Gráfico 5. 4 - Concentração de CepC Totais após das amostras: amostras de 72 horas (barras sem preenchimento) e de 120 horas (barras com preenchimento). Letras após o número: tratamento enzimático (P); tratamento ácido (A); tratamento alcalino (B), tratamento ácido e enzimático (AP); tratamento alcalino e enzimático (BP).	45
Gráfico 5. 5 – Biomassa (A), CepC totais (B) e produção específica (C), obtidos em meios contendo L-lisina	47
Gráfico 5. 6 – Biomassa (A) e consumo de AAA (B) em meios contendo várias concentrações iniciais do aminoácido.	48
Gráfico 5. 7 – CepC totais (A) e produção específica (B) nos meios contendo diferentes concentrações iniciais de AAA.	49
Gráfico 5. 8 – Planejamento 2 ⁿ com duplicata do ponto central: CepC totais em meios com adição de AAA no início da fermentação (A) e após 48 horas de processo (B), em 48, 72 e 96 horas de fermentação.	50
Gráfico 5. 9 – Planejamento 2 ⁿ (adição de AAA em 0 h): superfície de resposta ajustada ($r^2=0,79$ a 90% de grau de confiança) e dados experimentais de concentração de CepC totais em 72 horas de fermentação.	51
Gráfico 5. 10 - Planejamento 2 ⁿ (adição de AAA em 48 h): superfície de resposta ajustada ($r^2=0,91$; a 90% de grau de confiança) e dados experimentais de concentração de CepC totais em 72 horas de fermentação.	53
Gráfico 5. 11 - Planejamento experimental 3 ⁿ : consumo de AAA (A) e L-lisina (B)	55
Gráfico 5. 12 – Planejamento 3 ⁿ : CepC totais em 24, 48 e 72 horas de fermentação.	56
Gráfico 5. 13 – Planejamento 3 ⁿ : produção específica em 24, 48 e 72 horas de fermentação.	56
Gráfico 5. 14 – Superfície de reposta para planejamento 3 ⁿ ($r^2=0,92$)	57
Gráfico 5. 15- Biomassa (A), CepC totais (B) e produção específica (C) obtidos em meios contendo diferentes concentrações de fosfato.	60
Gráfico 5. 16 - Biomassa , CepC totais e produção específica (C) obtidos experimento em biorreator.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 4. 1– Composição do meio agar nutriente (Difco 0001).	30
Tabela 4. 2- Meio de esporulação de <i>S. clavuligerus</i> (SÁNCHEZ; BRAÑA, 1996).	30
Tabela 4. 3 – Composição do meio de germinação (MG) ou reativação (MR)	31
Tabela 4. 4 - Composição geral dos meios de preparo do inóculo	31
Tabela 4. 5 - Meio-base de fermentação principal (OMSTEAD et al, 1985; ANTONIO, 2007)	32
Tabela 4. 6- Meios para avaliação da suplementação com L-lisina sobre a produção de CefC	33
Tabela 4. 7 - Meios para avaliação da suplementação com AAA sobre a produção de CefC	33
Tabela 4. 8 - Condições das variáveis independentes do Planejamento Fatorial 2 ⁿ , com duplicata do ponto central: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de AAA (variável x_2), adicionados ao meio base de produção (Tabela 4.5).	34
Tabela 4. 9 - Condições das variáveis independentes do Planejamento Fatorial 3 ⁿ , com quadruplicata do ponto central: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de AAA (variável x_2), adicionados ao meio base de produção (Tabela 4.5).	34
Tabela 4. 10 - Meios para avaliação do efeito de íons fosfato sobre a produção de CefC	35
Tabela 5. 1 – Planejamento fatorial 2 ⁿ com duplicata do ponto central: condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de AAA no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtidas em 72 h de fermentação.	50
Tabela 5. 2 – Planejamento fatorial 3 ⁿ : condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de AAA no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtidas em 72 horas de fermentação.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA – Ácido L- α -aminoadípico

AC – Ácido clavulânico

ACV – L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina

CefC – Cefamicina C

CepC – Cefalosporina

DAC – deacetilcefalosporina C

DAOC – deacetoxicefalosporina C

DO – Densidade óptica

HOCDAC – 7-hidroxi-carbamoil-deacetilcefalosporina C

IPNS – Isopenicilina N sintase

LAT – Lisina- ϵ -aminotransferase

MG – Meio de germinação

MI – Meio de inóculo

MP – Meio de produção

MR – Meio de reativação

OCDAC – orto-carbamoil-deacetilcefalosporina C

OPA – orto-phtalaldeído

OPC – 6-oxo-piperideína-2-ácido carboxílico

PenG – Penicilina G

PenN – Penicilina N

PBPs – Proteínas ligantes de penicilinas

UI – Unidade internacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	21
3.2. <i>STREPTOMYCES CLAVULIGERUS</i>	23
3.3. CEFAMICINA C	23
3.4. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE CefC	25
3.5. ESTUDOS BIOQUÍMICOS DA SÍNTESE DE CefC	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. MATERIAIS	29
4.1.1. Microrganismos	29
4.1.2. Bactéria-teste	29
4.2. MEIOS DE CULTURA	29
4.2.1. Meio sólido de cultivo de bactérias-teste	29
4.2.2. Meio de esporulação de <i>S. clavuligerus</i>	30
4.2.3. Meio de reativação ou germinação de micélios e de esporos	30
4.2.4. Meios para preparo de inóculo (MI)	31
4.3. EQUIPAMENTOS	35
4.4. CONDIÇÕES GERAIS DO PROCESSO FERMENTATIVO	35
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	36
4.5.1. Coleta de amostras, armazenagem do sobrenadante e determinação de biomassa	36
4.5.2. Determinação da concentração de aminoácidos: AAA e L-lisina	37
4.5.3. Determinação de AC	38
4.5.4. Determinação de CefC através de bioensaio de difusão em ágar	38
4.5.4.1. Padrão utilizado	38
4.5.4.2. Preparo da suspensão bacteriana	38
4.5.4.3. Preparo das placas para bioensaio	38
4.5.4.5. Eliminação de biocompostos interferentes na análise de CefC totais	39

4.5.4.4. Aplicação das amostras, incubação e leitura de halos	39
4.5.4.6. Determinação de CepC totais	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1. PADRONIZAÇÃO DO BIOENSAIO	41
5.1.1. Curva de calibração para CepC	41
5.1.2. Eliminação de interferentes no bioensaio	42
5.1.2.1. Eliminação de Penicilina N	42
5.1.2.2. Eliminação conjunta de AC e Penicilina N	43
5.2. CONCENTRAÇÃO DE L-LISINA NO MEIO DE PRODUÇÃO	46
5.3. CONCENTRAÇÃO DE AAA NO MEIO DE PRODUÇÃO	47
5.4. PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS	49
5.4.1. Planejamento 2 ⁿ	49
5.4.2. Planejamento 3 ⁿ	54
5.5. EFEITOS DE ÍONS FOSFATO SOBRE A PRODUÇÃO DE CEP C TOTAIS	59
5.6. EXPERIMENTO EM BIORREATOR	61
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

O primeiro antibiótico foi descoberto em 1928, quando Alexander Fleming notou um halo transparente ao redor de um mofo contaminante em uma placa originalmente inoculada com estafilococos. O fungo havia produzido alguma substância que inibiu o crescimento bacteriano, mais tarde denominada penicilina, nome este associado a *Penicillium*, o gênero do microrganismo produtor. Foi necessário ainda mais de uma década para acumular conhecimento e dar início a produção de antibióticos, inaugurando-se então uma nova era na medicina, na qual as infecções microbianas puderam ser controladas de forma eficaz pelos antibióticos. Passados mais de 80 anos desta descoberta, diversas outras estruturas com ação antimicrobiana sintetizadas por microrganismos foram descobertas, compondo um arsenal terapêutico de elevada importância para a medicina moderna.

A produção de antibióticos é realizada através de processos industriais fermentativos, e têm sua origem na década de 1940, impulsionada naquela época pela Segunda Guerra Mundial. Segundo Rokem (2007), este mercado movimenta hoje mais de 25 bilhões de dólares/ano. Com o passar dos anos, os melhoramentos realizados no processo produtivo aumentaram a produtividade e os rendimentos de maneira surpreendente. Como exemplo da magnitude da produtividade destes bioativos tem-se a produção de penicilina que excede as 60000 toneladas anuais, a um custo médio de US\$5,00 por kg (ROKEM, 2007).

Os antibióticos mais importantes clinicamente pertencem aos grupos dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina. 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 atividade antimicrobiana significativa, 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. Essas descobertas foram de suma importância, pois a evolução natural e o uso indiscriminado de antibióticos têm selecionado espécies de microrganismos resistentes às drogas convencionais tradicionais.

Dentre essas novas estruturas encontradas, estão o AC e a Cefamicina C (CefC), ambos produzidos por *Streptomyces clavuligerus*. A CefC é um antibiótico com estrutura parecida à da Cefalosporina C (CepC), sendo mais resistente às β -lactamases do que este último por apresentar um grupo 7- α -metoxi que lhe confere maior estabilidade ao anel β -lactâmico.

Diante do exposto, justifica-se o interesse em estudar o processo de produção de CefC, buscando informações que possibilitem aumentar os níveis de rendimento e produtividade do mesmo e reduzindo custos. Para contribuir neste sentido, o presente trabalho propôs investigar a adição de precursores da estrutura do antibiótico no meio de cultura sob condições definidas por meio de metodologia de planejamento experimental, de forma a proporcionar melhorias ao processo. Os resultados obtidos neste estudo forneceram informações bioquímicas importantes com respeito ao metabolismo secundário do microrganismo, as quais poderão nortear novas estratégias para o incremento da produção.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi investigar melhorias do processo fermentativo de produção de CefC por *S. clavuligerus* através de adição adequada de ácido L- α -aminoadípico (AAA) e fosfato em meio de produção complexo solúvel para, respectivamente, contornar a etapa limitante de conversão de L-lisina em AAA e induzir a formação do tripeptídeo ACV, também uma etapa limitante da rota biossintética.

Para isso foram realizadas as seguintes etapas:

1. Adaptação de metodologia de análise de CefC.
2. Estudo do efeito da L-lisina sobre a produção de CefC no meio de produção adotado.
3. Investigação do efeito de AAA sobre a produção de CefC, em meio não suplementado com L-lisina.
4. Investigação da adição conjunta de AAA e L-lisina aos meios de produção, em condições delineadas por meio de planejamento fatorial.
5. Avaliação do efeito da concentração de fosfato sobre a produção de CefC, em meio suplementado com AAA e L-lisina.
6. Validação da composição de meio mais adequada, obtida em frascos agitados, em biorreator tipo tanque agitado e aerado em escala de bancada.

Estes antibióticos por vezes são classificados como peptídeos não ribossomais por serem sintetizados a partir de três aminoácidos, o ácido L- α -aminoadípico (AAA), a L-cisteína e a L-valina, e por sua síntese não ocorrer no ribossomo. Uma importante característica que distingue a biossíntese em eucariotos e procariotos é a formação do aminoácido raro AAA: nos primeiros ele é um intermediário da rota biossintética da L-lisina, enquanto no segundo grupo ele é formado pela descarboxilação da L-lisina via enzima lisina- ϵ -aminotransferase (LAT).

Atualmente, grande parte dos antibióticos disponíveis comercialmente pertencentes a este grupo são derivados sintéticos daqueles produzidos naturalmente, através de modificações químicas que têm por objetivo melhorar as características destes bioativos.

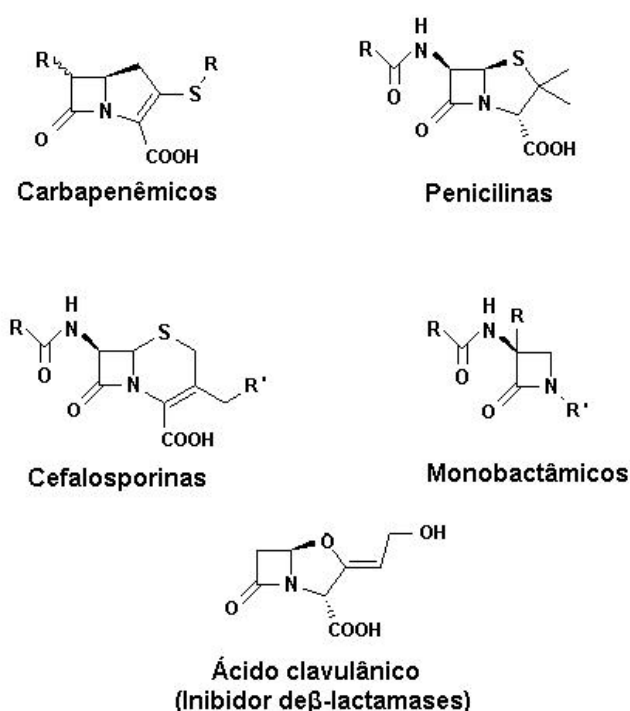


Figura 3. 2 – Principais subclasses de compostos β -lactâmico

3.2. *Streptomyces clavuligerus*

S. clavuligerus é uma bactéria filamentosa gram positiva pertencente ao grupo dos actinomicetos. Foi isolada de uma amostra de solo na América do Sul, sendo descrita pela primeira vez por Higgins e Kastner (1971). É um microrganismo aeróbio, com condições favoráveis ao seu crescimento em temperatura entre 25 e 35 °C, e pH entre 6,5 e 8,0. Está depositada no banco da ATCC sob número 27064, e no banco da NRRL sob numeração 3585. Duas características são marcantes nesta espécie de microrganismo: a incapacidade de metabolizar glicose (GARCIA-DOMINGUEZ et al, 1989), e a incomum presença do ciclo da uréia em um procarioto (BUSHELL et al, 2006).

S. clavuligerus tem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, como os antibióticos β -lactâmicos da rota biossintética da CepC (penicilina N, deacetilcefalosporina C, deacetoxicefalosporina C), CefC e o AC, um potente inibidor de β -lactamases, além de outras vinte clavamas. Produz ainda holomicina, n-propionil-holotina e tunicamicina, (LIRAS; RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000). Dentre estes compostos, destacam-se o AC (PRUES; KELLETT, 1983; BRUNDTLAND, 2000) e a CefC (CefC), mais potente que CepC e resistente a β -lactamases (OMSTEAD et al., 1985; BRAKHAGE et al., 2005).

3.3. Cefamicina C

CefC é um antibiótico β -lactâmico produzido por *Nocardia lactamdurans* e *S. clavuligerus* (NAGARAJAN et al, 1971). Foi o primeiro membro da família das cefamicinas a ser isolado. Pertence à subclasse das cefalosporinas e sua característica marcante é presença de um grupamento metoxila na posição 7- α do sistema bicíclico (Figura 2.3). Este grupamento promove maior estabilização do sistema β -lactâmico, aumentando a resistência deste antibiótico às enzimas do tipo β -lactamases, principais responsáveis pela inativação de antibióticos β -lactâmicos. CefC é particularmente ativa contra bactérias gram negativas. Modificações químicas em sua estrutura através de alterações nas cadeias laterais têm sido realizadas visando aumentar o espectro de atividade contra gram positivas. Cefotetan (Figura 2.4) e Cefoxitina (Figura 2.5) são dois exemplos de antibióticos semi-sintéticos obtidos a partir da CefC.

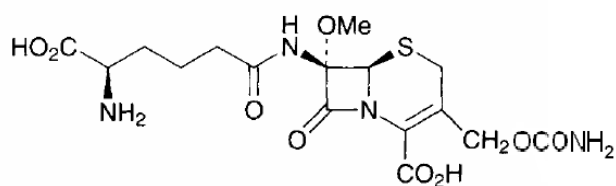


Figura 3. 3 – Estrutura química da CefC

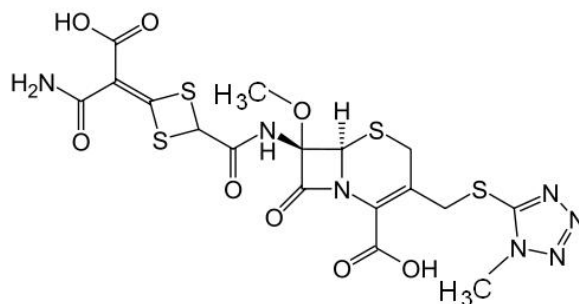


Figura 3. 4 - Estrutura química do antibiótico semi-sintético Cefotetan

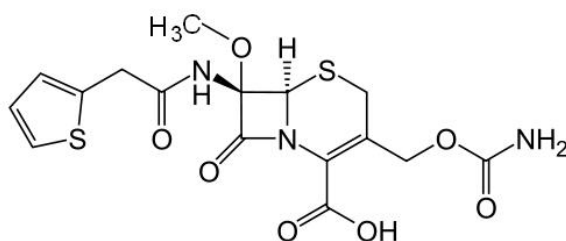


Figura 3. 5 - Estrutura química do antibiótico semi-sintético Cefoxitina

A biossíntese de CefC em *S. clavuligerus* é complexa, envolvendo uma longa sequência de reações enzimáticas. Lisina- ϵ -aminotransferase (LAT), presente exclusivamente em *Streptomyces* spp produtores de antibióticos β -lactâmicos, é a primeira enzima da rota e catalisa a conversão de L-lisina em 1-piperideína-6-carboxilato (Figura 2.6). Este intermediário, por sua vez, é convertido em AAA através de uma reação catalisada pela enzima piperideína-6-carboxilato dehidrogenase. A enzima δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetase (ACVS) catalisa, então, a condensação dos três aminoácidos precursores (AAA, L-cisteína e L-valina) em um tripeptídeo linear δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV). Este é, por sua vez, convertido a isopenicilina N através de uma ciclização oxidativa, catalisada por isopenicilina N sintase (IPNS).

Isopenicilina N epimerase promove então a mudança conformacional da forma L para D na cadeia lateral aminoadipil. O próximo passo consiste na expansão do anel tiazolidínico para o anel de seis membros, característico das cefalosporinas. A partir desta expansão são necessários quatro passos enzimáticos que inserem os grupamentos carbamoil e 7- α -metoxila na estrutura para, enfim, se obter a CefC (MALMBERG et al., 1993; MARTIN, 1998; LIRAS, 1999; ALEXANDER et al, 2000).

3.4. Regulação da síntese de CefC

As rotas biossintéticas de CefC (Figura 2.6A) e de AC (Figura 2.6B) em *S. clavuligerus* são totalmente independentes, porém, tem-se evidenciado que mutantes de *S. clavuligerus* não produtores de CefC também não produzem AC (LIRAS e MARTIN, 2005).

Recentemente, verificou-se que as sínteses de AC e CefC são reguladas pelo mesmo elemento multifuncional, *ccaR* ("cephamycin and clavulanic acid Regulator"), codificado pelo gene *ccaR*, localizado no agrupamento de genes da biossíntese de CefC (BIGNELL et al., 2005). Desta forma, a ativação e a regulação de uma determinada via biossintética em *S. clavuligerus* são mecanismos complexos, influenciados tanto pela natureza e concentração de nutrientes essenciais e outros constituintes do meio de cultivo (fontes de C, N, P e S, sais, etc) como por intermediários do metabolismo primário e/ou componentes que participam, direta ou indiretamente, da rota biossintética (KHETAN et al., 1999). A formação do δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV), por exemplo, um intermediário da rota de biossíntese de β -lactâmicos, pode ser afetada por glicose em *Penicillium chrysogenum* e *Nocardia lactamdurans*, por fosfato em *S. clavuligerus* e ainda, por amônia em *S. clavuligerus* e *Cephalosporium acremonium* (NOVO NORDISK A/S, 1999). Lebrihi et al. (1987) estudou o efeito da concentração de fosfato sobre a produção de CefC e AC, e concluiu que tanto baixas como elevadas concentrações do íon podem afetar a biossíntese destes antibióticos.

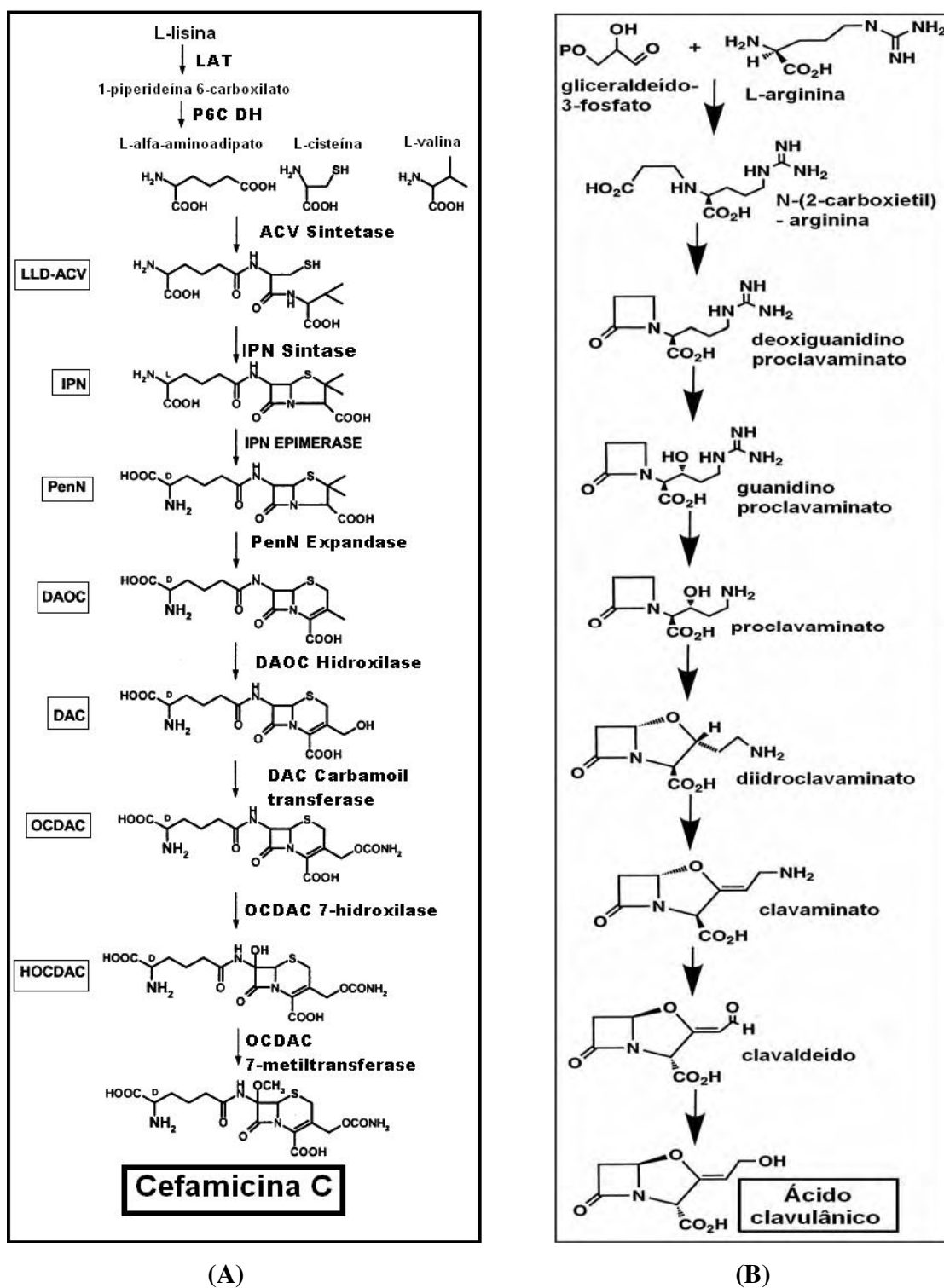


Figura 3. 6 – Rotas biossintéticas em *S. clavuligerus* de (A) CefC e (B) AC (LIRAS, 1999) (PenN – penicilina N, DAOC – deacetoxicefalosporina C, DAC – deacetilcefalosporina C, OCDAC – orto-carbamoil-deacetilcefalosporina C, HOCDAC – 7-hidroxi-carbamoil-deacetilcefalosporina C)

3.5. Estudos bioquímicos da síntese de CefC

Apesar da rota biossintética de antibióticos β -lactâmicos já ter sido elucidada em quase sua totalidade, apenas recentemente os aspectos bioquímicos dos mecanismos regulatórios têm sido investigados mais detalhadamente, utilizando-se linhagens selvagens e/ou linhagens recombinantes de *S. clavuligerus* (MALMBERG et al., 1995). Malmberg et al. (1995), utilizando linhagem recombinante de *S. clavuligerus* contendo cópia adicional do gene para codificação da enzima LAT, obtiveram elevados índices de produção de CefC. Desta forma concluiu-se que a reação de formação do intermediário AAA, catalisada por LAT, constitui um passo limitante da rota biossintética. Estudos como este proporcionam informações de elevado interesse, as quais possibilitam a interferência no bioprocessamento de forma criteriosa, visando o aumento final de produção.

Os estudos bioquímicos, de uma forma geral, são normalmente realizados com microrganismos cultivados em meios de cultura sintéticos simples, não se priorizando o aumento da produção de CefC propriamente dito. Para se avaliar este último aspecto, fundamentalmente tecnológico, deve-se considerar uma característica importante do comportamento de microrganismos filamentosos durante um bioprocessamento de metabólitos secundários, a saber, a relativa dissociação entre as fases de crescimento celular (trofofase) e de produção (idiofase). Normalmente, esta última ocorre sob condições limitantes mais ou menos severas de nutrientes, adversas ao pleno desenvolvimento celular, que podem ser obtidas variando-se os componentes do meio para, simultaneamente, manter as células viáveis e obter rendimentos adequados de produto (DEMAIN, 1984).

Normalmente, a produção industrial de CefC é realizada em meios de cultura complexos contendo fontes de N provenientes de matéria prima vegetal de baixo custo, que resultam em altos rendimentos de produto. Porém, nestes meios pode haver componentes de difícil identificação que afetam negativamente o processo e dificultam a realização de estudos bioquímicos. Por estes motivos, estudos bioquímicos e aspectos do bioprocessamento são estudados distintamente. Todavia a utilização de fontes de N solúveis, como extratos protéicos ou a combinação adequada de aminoácidos, surge como uma alternativa favorável à geração de caldos mais homogêneos e menos viscosos que, por isso, promove melhorias com relação à transferência de massa e calor, condições de monitoramento e controle, bem como a simplificação de processos de separação, recuperação e purificação do produto

(ELANDER, 2003). Desta forma, torna-se possível aliar aspectos bioquímicos e tecnológicos do bioprocesso com vistas a estabelecer condições de meio que conduzam a melhorias na produção de CefC, como a isopenicilina sintase,

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Microrganismos

Para de produção de compostos β -lactâmicos foi utilizada a linhagem ATCC 27064 de *S. clavuligerus* (BUTTERWORTH, 1984), adquirida da própria ATCC na forma de células vegetativas (micélios) liofilizadas. O microrganismo foi estocado em duas formas:

- esporos ou células vegetativas, em solução de glicerol 20% v/v, a temperatura de -80°C
- células vegetativas liofilizadas, armazenadas em ampolas à temperatura ambiente.

Também foi utilizada a linhagem DSMZ 41826 de *S. clavuligerus*, um mutante espontâneo da linhagem selvagem, com maior capacidade produtiva, estocada da mesma forma que a linhagem anterior (VINING et al, 1987).

4.1.2. Bactéria-teste

Para os bioensaios de detecção/quantificação de antibióticos β -lactâmicos foi utilizada *Escherichia coli* ESS 2235 como bactéria teste, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Paloma Liras, da Faculdade de Biologia da Universidade de Leon, Espanha (LIRAS; MARTIN, 2005). Também foram utilizadas duas formas de estoque para bactéria teste:

- em solução de glicerol 20% v/v, à temperatura de -80°C
- em ágar nutriente, à temperatura de 4°C .

4.2. Meios de Cultura

4.2.1. Meio sólido de cultivo de bactérias-teste

O cultivo da bactéria *E. coli* ESS 2235 foi realizado em meio ágar nutriente (Difco 0001), indicado pela ATCC, conforme indicado na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1– Composição do meio agar nutriente (Difco 0001).

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Peptona	5,0
Extrato de Carne	3,0
Agar bacteriológico	15,0
pH	6,8 ± 0,1
Água destilada em q.s.p.	1000 mL

4.2.2. Meio de esporulação de *S. clavuligerus*

O meio proposto por Sánchez e Braña (1996), descrito na Tabela 4.2, foi utilizado para obtenção de esporos do microrganismo.

Tabela 4. 2- Meio de esporulação de *S. clavuligerus* (SÁNCHEZ; BRAÑA, 1996).

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Extrato de levedura	0,5
Extrato de carne	0,5
Caseína hidrolisada ácida	1,0
Glicose	5,0
MOPS	21,0
Ágar	20,0
pH	7,0± 0,1

4.2.3. Meio de reativação ou germinação de micélios e de esporos

A germinação de esporos ou de micélios congelados a -80°C de *S. clavuligerus* foi realizado meio indicado pela ATCC (meio ISP1), adicionado de extrato de malte (Tabela 4) (KIESER et al, 2000).

Tabela 4. 3 – Composição do meio de germinação (MG) ou reativação (MR)

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Tryptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
MOPS	21,0
pH	6,8 ± 0,1

4.2.4. Meios para preparo de inóculo (MI)**Tabela 4. 4** - Composição geral dos meios de preparo do inóculo

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Amido	10,0
Proflo [®] (a)	8,5
Extrato de levedura	1,0
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
MOPS	21,0
Solução de sais ^(b)	10,0 mL

(a) Farinha de semente de algodão, gentilmente cedida pela empresa Traders Protein (Lubbock, Texas, EUA)

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

4.2.5. Meio utilizados para produção de antibióticos (MP)

Tabela 4. 5 - Meio-base de fermentação principal (OMSTEAD et al, 1985; ANTONIO, 2007)

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Amido	10
Proflo [®]	8,5
Extrato de levedura	0,5
Tiosulfato de sódio ^(a)	1,0
K ₂ HPO ₄	1,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
CaCl ₂	0,2
NaCl	2,0
MOPS	21,0
Solução de sais	5,0 mL

(a) adicionados em 30 horas de processo

Utilizou-se farinha de semente de algodão (marca: Proflo[®]) como principal fonte de nitrogênio no meio de produção. A fonte foi submetida a uma filtração prévia à autoclavagem, de forma a aumentar a solubilidade do meio e, assim, melhorar a disponibilidade de oxigênio ao microrganismo e permitir análises mais precisas, pois a biomassa pode ser facilmente separada do meio por centrifugação, ao contrário do que ocorreria com meio insolúvel. O oxigênio é um cofator de importantes enzimas da rota biossintética de CefC, como a isopenicilina N sintase, Penicilina N expandase e deacetoxicefalosporina C hidroxilase (LEITÃO et al, 1997; LIRAS, 1999). Dados da

literatura têm demonstrado que a oxigenação do meio é um fator essencial para o aumento da produção de CefC (OKABE et al, 1992).

Tabela 4. 6- Meios para avaliação da suplementação com L-lisina sobre a produção de CefC

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)			
	M1	M2	M3	M4
L-lisina (cloridrato)	1,8	4,6	9,1	18,3
	(10 mM)	(25 mM)	(50 mM)	(100 mM)
Demais componentes – idem Tabela 4.5				

Tabela 4. 7 - Meios para avaliação da suplementação com AAA sobre a produção de CefC

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)				
	M1	M2	M3	M4	M 5
AAA ^(a)	0	0,67	1,35	2,70	4,05
	(0 mM)	(4,2 mM)	(8,4 mM)	(16,7 mM)	(25,1 mM)
Demais componentes – idem Tabela 4.5					

- (a) - O AAA adicionado ao meio foi previamente solubilizado em HCL 1N.

Tabela 4. 8 - Condições das variáveis independentes do Planejamento Fatorial 2ⁿ, com duplicata do ponto central: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de AAA (variável x_2), adicionados ao meio base de produção (Tabela 4.5).

Variáveis independentes				
Meio	Unidades Codificadas		Unidades Reais	
	L-lisina (x_1)	AAA (x_2)	L-lisina (mM)	AAA (mM)
1	-1	-1	0	0
2	+1	+1	100	10
3	+1	-1	100	0
4	-1	+1	0	10
5	0	0	50	5
6	0	0	50	5

Tabela 4. 9 - Condições das variáveis independentes do Planejamento Fatorial 3ⁿ, com quadruplicata do ponto central: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de AAA (variável x_2), adicionados ao meio base de produção (Tabela 4.5).

Variáveis				
Meio	Unidades Codificadas		Unidades Reais	
	L-lisina (x_1)	AAA (x_2)	L-lisina (mM)	AAA (mM)
1	0	-1	16,8	2,0
2	-1	+1	4,8	6,0
3	+1	+1	28,8	6,0
4	0	0	16,8	4,0
5	0	0	16,8	4,0
6	0	0	16,8	4,0
7	0	0	16,8	4,0
8	+1	0	28,8	4,0
9	0	+1	16,8	6,0
10	-1	-1	4,8	2,0
11	-1	0	4,8	4,0
12	+1	-1	28,8	2,0

Tabela 4. 10 - Meios para avaliação do efeito de íons fosfato sobre a produção de CefC

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)				
	M1	M2	M3	M4	M 5
L-lisina	5,3 (28,8 mM)	5,3 (28,8 mM)	5,3 (28,8 mM)	5,3 (28,8 mM)	5,3 (28,8 mM)
AAA	0,64 (4,0 mM)	0,64 (4,0 mM)	0,64 (4,0 mM)	0,64 (4,0 mM)	0,64 (4,0 mM)
K ₂ HPO ₄	0,0 (0 mM)	0,87 (5,0 mM)	1,75 (10,0 mM)	2,61 (15,0 mM)	3,50 (20,0 mM)
Demais componentes – idem Tabela 4.5					

4.3. Equipamentos

Equipamentos para as fermentações:

- Mesas incubadoras rotatórias (New Brunswick), para os experimentos em frascos agitados, providas de controle de agitação e de temperatura.

Equipamentos e aparelhos para procedimentos gerais e analíticos:

- Espectrofotômetro (UV e luz visível - Pharmacia)
- Câmara de fluxo laminar, balanças, estufas, pHmetros, autoclaves, bombas peristálticas, centrífuga refrigerada, banhos termostatizados.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu)
- Microcomputadores para o tratamento dos dados experimentais
- Biorreator tipo tanque agitado e aerado em escala de bancada.

4.4. Condições gerais do processo fermentativo

Foram realizados processos em batelada com duração variável entre 72 e 120 horas em frascos agitados em mesa incubadora rotatória com temperatura controlada em 28°C e frequência de rotação de 260 rpm. Primeiramente, o microrganismo foi transferido para um

meio de reativação, conforme composição descrita na Tabela 4.3, por um período de 24 horas. Após a etapa de reativação, a bactéria foi transferida para o meio de preparo do inóculo principal (Tabela 4.4) por mais um período de 24 horas. Do caldo resultante, retirou-se uma alíquota correspondente a 10% do volume do meio de fermentação principal (Tabela 3) para inocular o meio de produção. Esta metodologia encontra-se esquematizada na Figura 4.1.

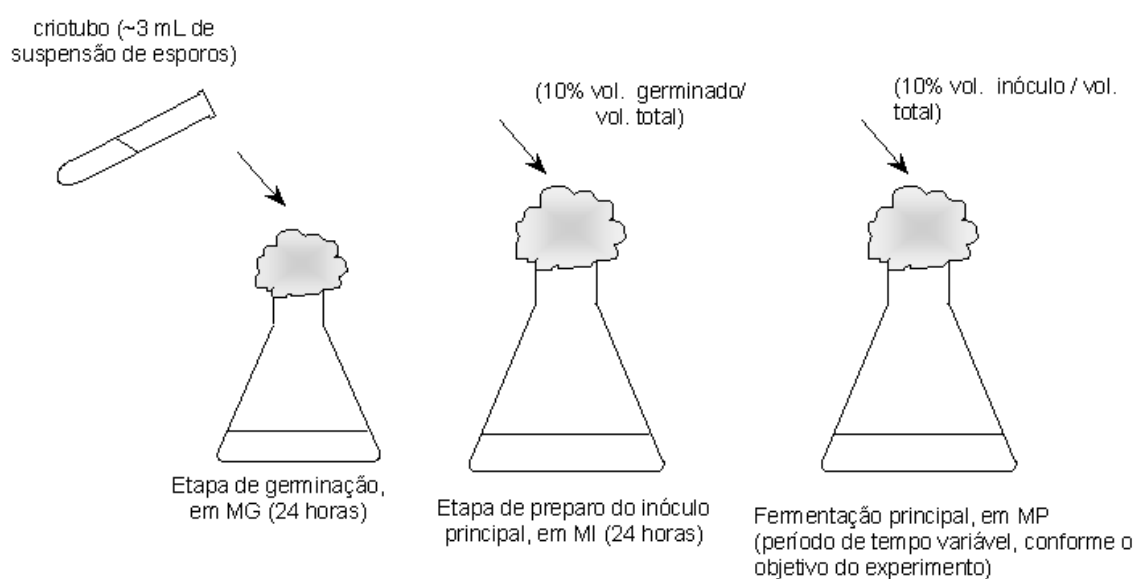


Figura 4. 1 - Etapas de cultivo de *S. clavuligerus* em frascos agitados

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Coleta de amostras, armazenagem do sobrenadante e determinação de biomassa

As amostras foram coletadas a cada 24 horas de fermentação. Após a coleta, o caldo fermentativo foi centrifugado por 10 minutos, 11000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em "freezer" (-20°C) para as análises consumo de substratos e quantificação de antibióticos. O precipitado contendo a massa celular foi novamente centrifugado com água destilada para a remoção de impurezas, sendo o "pellet" resultante seco em estufa a 105°C por 24 horas em recipiente previamente pesado. Após este período, o recipiente contendo a biomassa seca seguiu para um dessecador e, após atingir a

temperatura ambiente, foi pesada, sendo sua concentração expressa em termos de massa seca por volume de meio de cultura ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.5.2. Determinação da concentração de aminoácidos: AAA e L-lisina

Para a análise de aminoácidos, as amostras de caldo fermentativo foram diluídas 10 vezes em tampão citrato pH 2,2 e depois filtradas em membrana com poro de $0,45\mu\text{m}$. As análises foram realizadas através de método de derivatização pós-coluna com *ortho*-phthalaldeído (OPA) utilizando-se uma coluna de troca iônica em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A, acoplado a um detector de fluorescência Shimadzu modelo RF-10a XL ajustado com o comprimento de onda de excitação e emissão de 350 nm e 450 nm respectivamente. A calibração do sistema foi realizada utilizando-se uma mistura padrão de aminoácidos (Sigma), obtendo-se um valor para o tempo de retenção de cada aminoácido. O software do sistema realizou o cálculo da concentração de aminoácidos da amostra através de um fator de conversão obtido da relação entre a área de cada pico do padrão e área do pico da amostra (Figura 4.2) (KUO et al, 2005). Para o AAA, um aminoácido incomum, utilizou-se um padrão (Sigma), estimando-se a concentração presente na amostra como para os demais aminoácidos. Os tempos de retenção para AAA e L-lisina foram de 14,7 e 44,5 minutos, respectivamente.

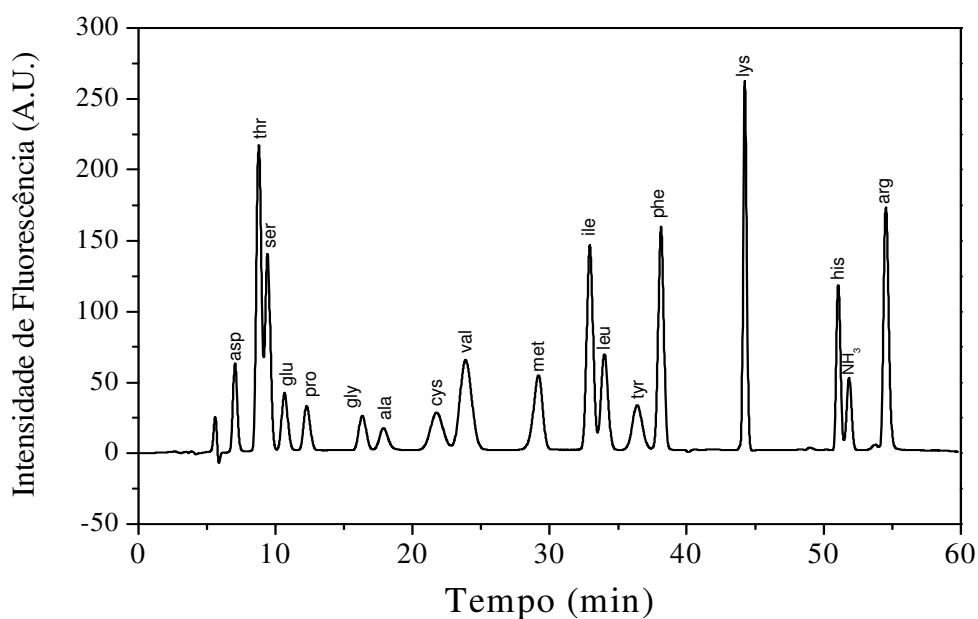


Figura 4. 2 - Cromatograma obtido a partir de análise do *pool* de aminoácidos-padrão

4.5.3. Determinação de AC

AC foi quantificado através de método proposto por Bird et al. (1982), no qual a amostra é derivatizada previamente com imidazol (60 g/L) a 30°C por 12 minutos. Após a reação, a solução é resfriada em banho termostatzado a 20°C, sendo o produto da reação (*1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo) oct-2-en-1-oylimidazol*) determinado através de leitura em espectrofotômetro UV a 312 nm. Uma curva de calibração com um padrão da substância foi previamente construída. Este método é específico para AC, sendo que derivados do AC e outros compostos contendo o núcleo clavam respondem bem às condições de análise, mas penicilinas praticamente não são detectadas pelo método.

4.5.4. Determinação de CefC através de bioensaio de difusão em ágar

4.5.4.1. Padrão utilizado

CefC pode ser quantificada por HPLC com detector Ultravioleta (UV), em comprimento de onda de 254 nm, todavia é necessário um padrão de elevada pureza. 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; MARTIN, 2005). Portanto o antibiótico produzido foi quantificado de forma indireta e expresso em termos de concentração de Cefalosporinas totais (CepC totais, em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.5.4.2. Preparo da suspensão bacteriana

A bactéria teste foi cultivada em tubo contendo ágar nutriente, por 24 horas em estufa a 36- 37°C. A suspensão bacteriana foi preparada adicionando-se aproximadamente 10 mL de solução salina (0,9%) ao tubo com as bactérias crescidas. A densidade óptica (DO) da suspensão resultante foi lida em 600 nm, em espectrofotômetro.

4.5.4.3. Preparo das placas para bioensaio

A cada 100 mL de meio nutriente ágar ainda fluido ($\sim 46^\circ\text{C}$) foram adicionados 0,7 mL de suspensão bacteriana com DO igual a 1. Em cada placa de 150 mm de diâmetro foram vertidos 40 mL de meio ágar nutriente contendo a bactéria teste. Após solidificação

do meio, perfurou-se o número necessário de poços (5 mm de diâmetro) para a aplicação das amostras.

4.5.4.5. Eliminação de biocompostos interferentes na análise de CepC totais

S. clavuligerus é conhecido por sua capacidade em produzir diversos compostos com atividade antimicrobiana. Desta forma, para quantificar com maior exatidão o antibiótico produzido foi necessário realizar alguns tratamentos específicos com as amostras para depois realizar o bioensaio.

(a) Eliminação do AC

As amostras foram tratadas previamente para eliminar o AC presente de duas formas:

- tratamento alcalino, através da adição de NaOH 1M até pH 9,0
- tratamento ácido, através da adição de HCl 1M até pH 3,0

A concentração de AC da amostra foi avaliada em intervalos definidos e, ao se estabilizar em valores em torno de $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, o pH era reajustado para 7,0.

(b) Eliminação da Penicilina N

Para eliminar a PenN utilizou-se a solução enzimática BD Difco TM Penase[®], adicionada a uma proporção de 25 μL de enzima por mL de amostra, reagindo-se por um período de 20 minutos.

- Características da enzima BD Difco TM Penase: potência 1977 UI/ mL/min , a pH 7, 25°C, tomando-se como base 1mg de Penicilina G (PenG) $\equiv$ 1595 UI

4.5.4.4. Aplicação das amostras, incubação e leitura de halos

No interior dos poços perfurados (item 4.5.4.3) foram adicionados 20 μL das soluções preparadas de amostra e de padrão de antibiótico, adequadamente diluídas. As placas foram incubadas a 36-37°C por 18 horas sendo medidos, então, os diâmetros dos halos de inibição.

4.5.4.6. Determinação de CepC totais

(a) Quantificação por interpolação logarítmica

Neste procedimento, foram aplicadas em uma mesma placa duas concentrações do padrão e duas concentrações das amostras do caldo fermentativo. As medidas dos diâmetros dos halos de inibição foram utilizadas para calcular a concentração de antibióticos na amostra através de interpolação logarítmica, conforme é apresentado a seguir.

Sendo

$$\theta = \frac{(\sum A_H + \sum A_L) - (\sum P_H + \sum P_L)}{(\sum A_H + \sum P_H) - (\sum A_L + \sum P_L)} \cdot \log(\text{fator de diluição}) \quad \text{Equação 4.1}$$

onde:

- A e P - valores dos diâmetros dos halos de inibição das amostras e dos padrões do antibiótico, respectivamente
- H e L - subscritos indicando alta e baixa concentração, respectivamente
- fator de diluição - razão entre a concentração mais alta e a mais baixa das soluções, tanto dos padrões como das amostras

pode-se calcular a concentração da amostra através da seguinte equação:

$$C_{\text{amostra}} = 10^{\theta} * \text{conc. mais alta do padrão}$$

(b) Quantificação por meio de curva de calibração

Outra forma de quantificar a produção de CefC foi construir previamente uma curva de calibração com o padrão, plotando-se os valores de logaritmo da concentração *versus* diâmetros dos halos de inibição correspondentes. Através da reta obtida pode-se calcular a concentração de antibióticos na amostra. Construiu-se uma curva de calibração com 13 concentrações de CepC (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 120 mg·L⁻¹). As placas, cada uma contendo oito aplicações de cada concentração do antibiótico, foram realizadas em triplicata, perfazendo um total de vinte e quatro medidas de halos de inibição para cada concentração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Padronização do bioensaio

Embora a quantificação de CefC por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seja relatada na literatura (LIRAS; MARTÍN, 2005), em nosso estudo foi adotada a metodologia de bioensaio devido à indisponibilidade do padrão do antibiótico. Todavia, o procedimento de quantificação por bioensaio é influenciado por uma série de fatores que podem afetar o resultado final. Dentre estes pode-se destacar: concentração da bactéria-teste, composição do meio de cultivo, tempo de incubação da bactéria teste, razão de difusão da amostra, profundidade do ágar, padrão de crescimento do microrganismo, temperatura de incubação, estabilidade da amostra, outras substâncias bioativas normalmente presentes no caldo fermentativo, tempo de aplicação da amostra na placa. A soma de todos esses fatores acarreta em maiores valores de desvio padrão comparativamente a ensaios químicos. Tendo em vista tais complicações, foi necessário padronizar a metodologia para a obtenção de resultados confiáveis.

5.1.1. Curva de calibração para CepC

A quantificação de CepC Totais por interpolação logarítmica (Item 4.5.4.6.a) requer a aplicação de uma diversidade de concentrações (soluções-padrão e amostras) impedindo a aplicação de maior número de replicatas da mesma concentração. O aumento do número de replicatas da amostra confere maior consistência ao resultado da análise, uma vez que minimiza o efeito do desvio padrão com relação à média. Assim, foram construídas curvas de calibração para a quantificação do antibiótico, de forma a eliminar a aplicação de padrões em todas as placas, aumentando-se o número de aplicações de amostras em uma mesma placa.

O Gráfico 5.1 apresenta uma curva de calibração típica para este propósito, construída com 13 concentrações do padrão, sendo realizadas 24 aplicações para cada concentração. O grande número de concentrações testadas aliado ao coeficiente de determinação obtido ($r^2 = 0,98$) proporcionou confiabilidade à curva utilizada, validando seu uso para quantificar os antibióticos produzidos por *S. clavuligerus*. A partir dos dados obtidos ajustou-se a reta representada pela equação 5.1, que relaciona diâmetro de halo (y)

e logaritmo da concentração de CepC (x). Considerando-se que o erro experimental associado a este tipo de análise é relativamente elevado (10 a 20%), pode-se concluir que o modelo representa bem os dados experimentais.

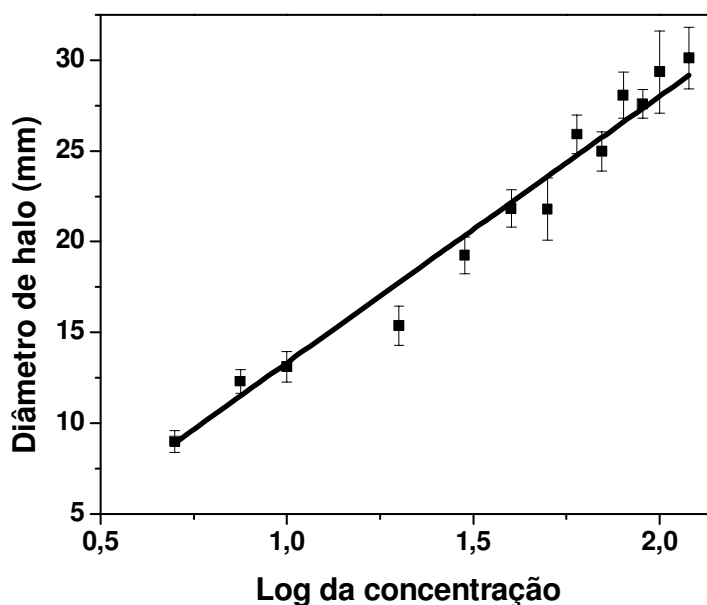


Gráfico 5. 1 - Curva de calibração de CepC para bioensaio.

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

Equação 5.1

$$R^2=0,98$$

5.1.2. Eliminação de interferentes no bioensaio

Como já mencionado, *S. clavuligerus* produz diversos compostos com atividade antimicrobiana como Penicilina N, deacetilcefalosporina C (DAC), deacetoxicefalosporina C (DAOC) e CefC, além do AC. Esta versatilidade acaba por dificultar a quantificação específica da CefC por bioensaio, uma vez que a bactéria teste utilizada é sensível a todos estes antibióticos.

5.1.2.1. Eliminação de Penicilina N

Nesta etapa do trabalho buscou-se uma forma de eliminar a Penicilina N do caldo fermentativo pois, dependendo das condições da fermentação, é excretada no meio de produção em quantidades significativas (ZHANG et al, 1987). Por outro lado,

deacetilcefalosporina C e deacetoxicefalosporina C não são encontradas em concentrações elevadas no meio de cultivo (LIRAS; MARTÍN, 2005), portanto interferem pouco na análise. O tratamento escolhido foi o proposto por Liras e Martín (2005), no qual se utiliza penicilinase para degradar o anel β -lactâmico da penicilina alvo.

Para comprovar a eficiência da enzima utilizada no presente trabalho (penicilinase BD DifcoTM Penase[®]), foram realizados testes de especificidade e potência, cujos resultados estão representados no Gráfico 5.2. A especificidade da enzima foi comprovada pela ausência de halo de inibição na presença de Penicilina G e pela formação do halo na placa contendo CepC. O anel β -lactâmico deste último, assim como em CefC, está acoplado a anel de seis átomos, o que lhe confere maior estabilidade frente à enzima utilizada. Estes dados comprovaram a eficiência da enzima utilizada.

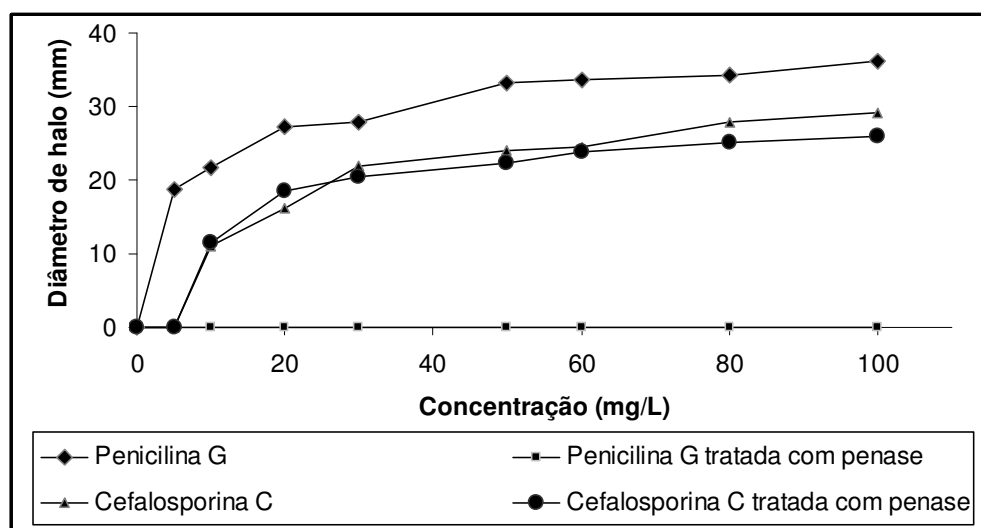


Gráfico 5. 2- Halos de inibição em função da concentração de antibióticos.

5.1.2.2. Eliminação conjunta de AC e Penicilina N

A presença do AC poderia tornar ineficiente o tratamento das amostras com penicilinase procurando-se, por isto, eliminar o composto antes da adição da enzima. Considerou-se então a grande instabilidade de AC em valores ácidos ou básicos de pH como estratégia para tratar as amostras e assim, eliminar este composto do meio. Uma vez eliminado o AC, pôde-se então adicionar penicilinase para hidrolisar a penicilina N. Para

testar esta suposição, adicionou-se NaOH ou HCl em amostras provenientes de cultivos com a linhagem DSMZ 41826, nos tempos de 72 e 120 horas de cultivo. O AC foi quantificado a cada 1,5 h de tratamento até indicar valores baixos de concentração, entre 15 e 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Gráfico 5.3). A amostra foi, então, neutralizada a pH 7,0 para a adição de penicilinase e posterior análise por bioensaio.

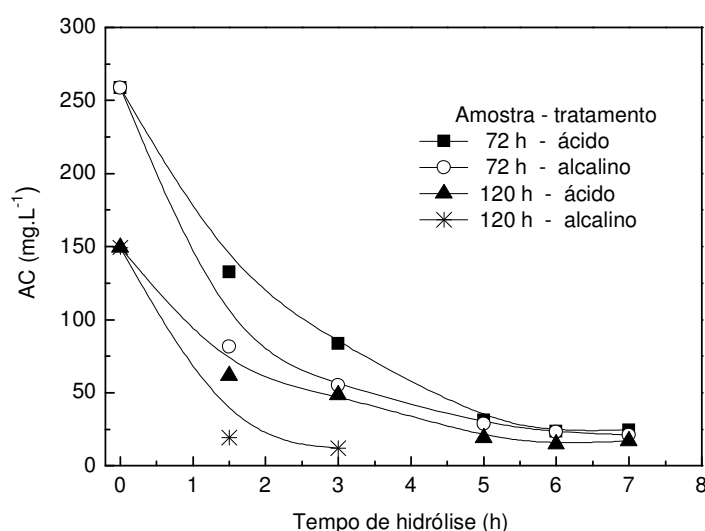


Gráfico 5. 3- Concentração de AC em função do tempo de hidrólise.

A maior concentração de AC, em torno de $260 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, foi obtida em 72 horas de cultivo e, de uma maneira geral, este composto mostrou-se mais instável em pH alcalino em todas as amostras, comparativamente ao pH ácido (Gráfico 5.3).

Os resultados de bioensaio das amostras coletadas em 72 e 120 horas de fermentação, após os vários tratamentos propostos, estão ilustrados no Gráfico 5.4. Analisando-se as amostras de 72 horas que não sofreram tratamento ácido ou alcalino (72 e 72P), observa-se que adição de penicilinase promoveu uma diminuição no nível de antibióticos ao redor de $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta diferença provavelmente ocorreu pela ação da enzima sobre a PenN presente na amostra, o que não se observou no par de amostras submetidas ao tratamento prévio com ácido (72A e 72AP). Este agente possivelmente foi o responsável pela degradação da PenN, em virtude do baixo pH. Nas amostras com tratamento alcalino prévio (72B e 72BP) novamente observou-se uma diferença

significativa (para menos) na amostra tratada com a enzima, indicando a presença de PenN. Todavia, o nível de antibióticos destas amostras mostrou-se significativamente menor que o observado nas amostras sem tratamento prévio (72, 72P) ou com tratamento ácido (72A e 72AP), provavelmente porque o pH alcalino degradou cefalosporinas da alíquota utilizada.

Com relação às amostras de 120 horas sem tratamento prévio (120 e 120P) ou com tratamento ácido (120A e 120AP) não foram observadas diferenças significativas no nível de antibióticos em nenhum caso, indicando que nestas alíquotas não havia presença de PenN. Como no caso das amostras de 72 horas (72B e 72BP) observou-se novamente menor concentração de CepC totais nas amostras tratadas com base (120B e 120BP).

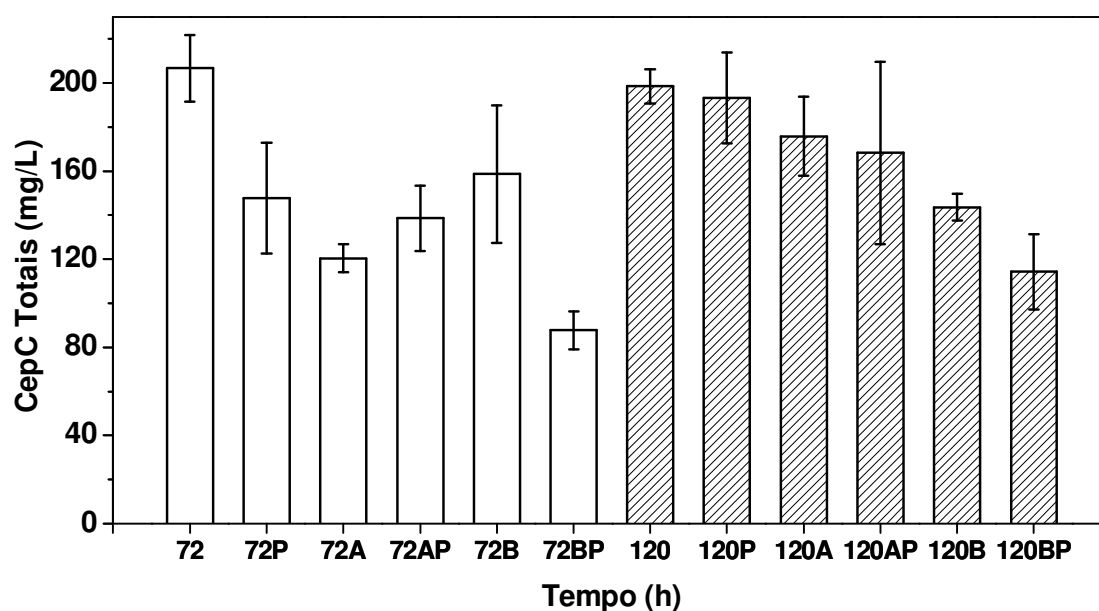


Gráfico 5. 4 - Concentração de CepC Totais após das amostras: amostras de 72 horas (barras sem preenchimento) e de 120 horas (barras com preenchimento). Letras após o número: tratamento enzimático (P); tratamento ácido (A); tratamento alcalino (B), tratamento ácido e enzimático (AP); tratamento alcalino e enzimático (BP).

Os resultados apresentados estão de acordo com informações da literatura de que o AC é mais instável em pH alcalino (BERSANETTI et al, 2005), assim como as cefalosporinas (OMSTEAD et al., 1985). Assim, o tratamento alcalino não foi adequado para a análise de CefC por bioensaio por degradar as cefalosporinas. O tratamento ácido, por sua vez, afetou com menor intensidade a concentração destes antibióticos. Ainda, os

dados de bioensaio comprovaram que a interferência da PenN foi minimizada pelo uso de penicilinase mesmo na presença de AC. Este fato pode ser explicado pela quantidade e pela potência da solução enzimática utilizada, que foi suficiente para inativar altas concentrações de PenN, aliado à diluição das amostras (5 vezes) antes da adição da enzima. Desta forma, adotou-se somente o tratamento enzimático das amostras, sem adição de ácido ou base, para a realização do bioensaio.

5.2. Concentração de L-lisina no meio de produção

Segundo Mendelovitz e Aharonowitz (1982), L-lisina estimula a produção de β -lactâmicos em actinomicetos e elevadas concentrações do aminoácido L-lisina adicionadas ao meio de produção proporcionam aumentos significativos na produção do antibiótico CefC, comparativamente aos meios sem adição do aminoácido (FANG et al, 1996).

Para verificar a influência e a concentração ideal de L-lisina exógena a ser adicionada ao meio, estudos foram desenvolvidos em nosso laboratório. Utilizando como base o meio descrito por Omstead et. al (1985), no presente trabalho foram acrescentadas diferentes concentrações de L-lisina (Tabela 4.6), avaliando-se a concentração de CefC por bioensaio. Conforme mostrado na Gráfico 5.5, dentro da faixa estudada, obtém-se o patamar máximo na concentração de antibióticos com 100 mM. do aminoácido. Com relação à produção específica, o maior valor obtido também ocorreu com adição de 100 mM, embora, neste caso, o efeito da adição do aminoácido não foi tão evidente quando comparado ao aumento proporcionado na produção total, uma vez que L-lisina também promoveu o aumento da biomassa.

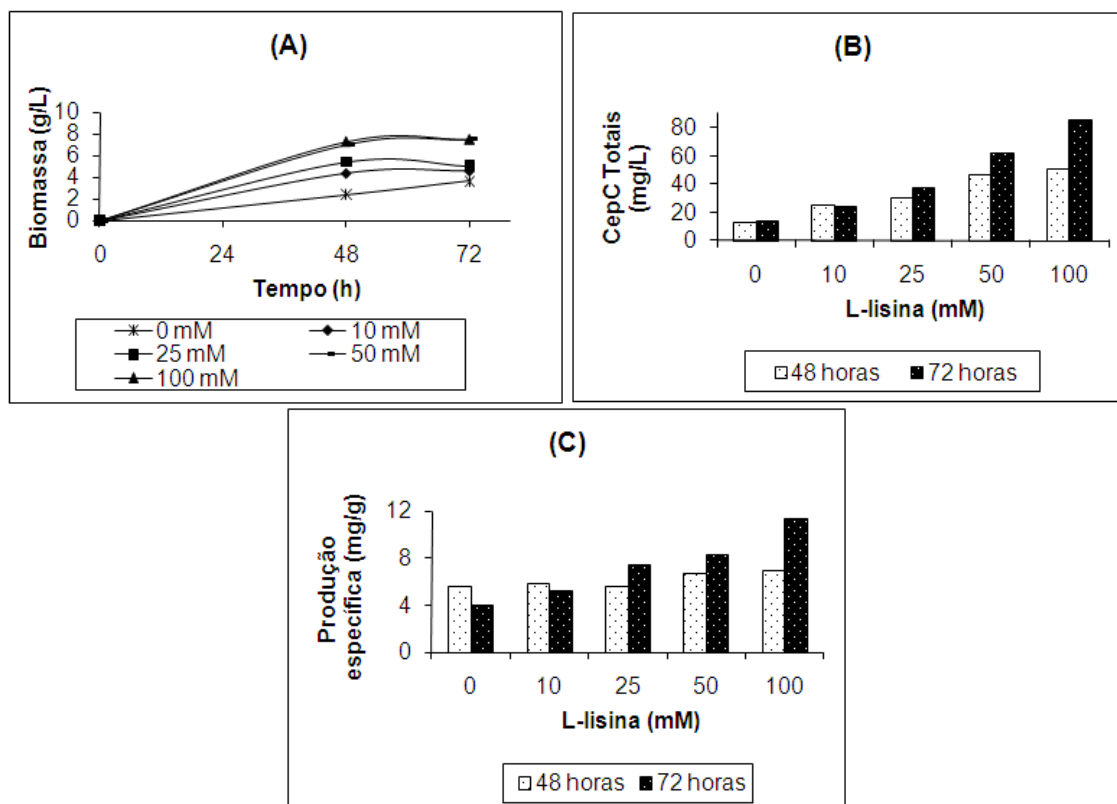


Gráfico 5.5 – Biomassa (A), CepC totais (B) e produção específica (C), obtidos em meios contendo L-lisina

5.3. Concentração de AAA no meio de produção

Malmberg et al (1995) obtiveram aumento na produção de CefC utilizando linhagem mutante que continha cópia adicional para o gene que codifica a enzima LAT, responsável pela conversão de L-lisina em AAA.

Para investigar a influência da adição de AAA na produção de CefC, foram testadas cinco concentrações do aminoácido (0; 4,2; 8,4; 16,7 e 25,1 mM) no meio base descrito na Tabela 4.5, o qual não continha L-lisina. O AAA foi solubilizado previamente com HCl 1N. A grande quantidade deste ácido necessária para preparar a solução contendo 25,1 mM de AAA acarretou uma diminuição acentuada do pH, afetando o processo como um todo. Para os demais meios, a diminuição de pH não foi significativa.

Os dados de biomassa e de consumo do aminoácido encontram-se no Gráfico 5.6 e os dados de produção estão apresentados no Gráfico 5.7.

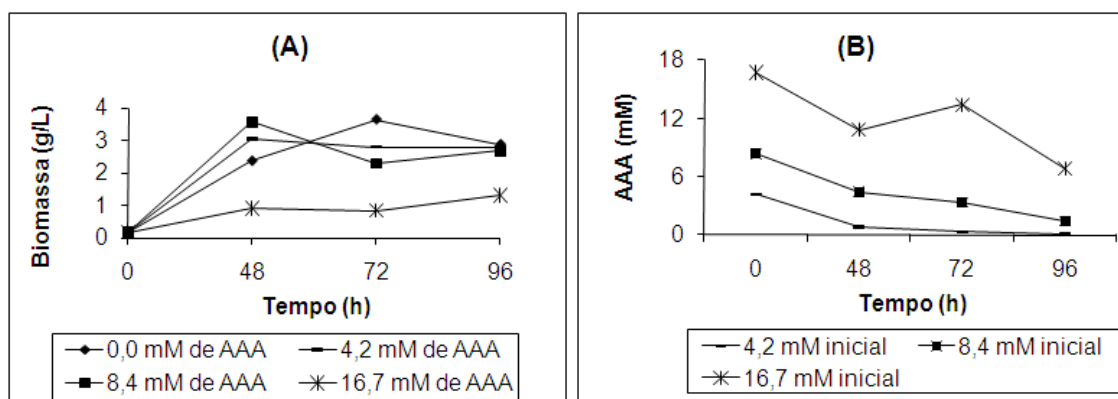


Gráfico 5. 6 – Biomassa (A) e consumo de AAA (B) em meios contendo várias concentrações iniciais do aminoácido.

Os meios com 4,2 e 8,4 mM de AAA proporcionaram maior produção de antibióticos, cerca de $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de CepC totais, respectivamente, em 72 h de cultivo. Por outro lado, no meio sem adição do aminoácido, a produção máxima foi de $14,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ no mesmo período. Além da dificuldade em manter o pH em valores adequados ao processo ($\text{pH } 6,8 \pm 0,2$), o meio contendo 16,7 mM de AAA resultou em baixo crescimento e produção semelhante ao meio sem o aminoácido (Gráficos 5.6 e 5.7). Assim, pode-se concluir que concentrações de AAA acima deste valor inviabilizam o processo em frascos agitados. Nos meios contendo as menores concentrações de AAA foi possível associar o aumento de produção com a presença do aminoácido, comparativamente ao meio sem AAA (Gráfico 5.7), porém, a produção resultante não foi estequiometricamente compatível com a concentração adicionada. Madduri et al (1989) testaram a capacidade de várias espécies de *Streptomyces*, produtores e não-produtores de antibióticos β -lactâmicos, de catabolizar AAA quando este está presente no meio como única fonte de nitrogênio. *S. clavuligerus* foi uma das espécies que não apresentou esta capacidade. Mais um indício de que o AAA não é uma fonte de nitrogênio adequada para a constituição celular foi o baixo crescimento observado em todas as condições (Gráfico 5.6). Todavia Henriksen et al (1998) relataram que AAA pode ser metabolizado em uma δ -lactama, denominada 6-oxo-piperideína-2-ácido carboxílico (OPC), que é excretada no meio de cultura durante a produção de

penicilina por *Penicillium chrysogenum*. A formação de OPC desvia AAA da síntese de antibióticos e leva à diminuição dos níveis de produção de penicilina.

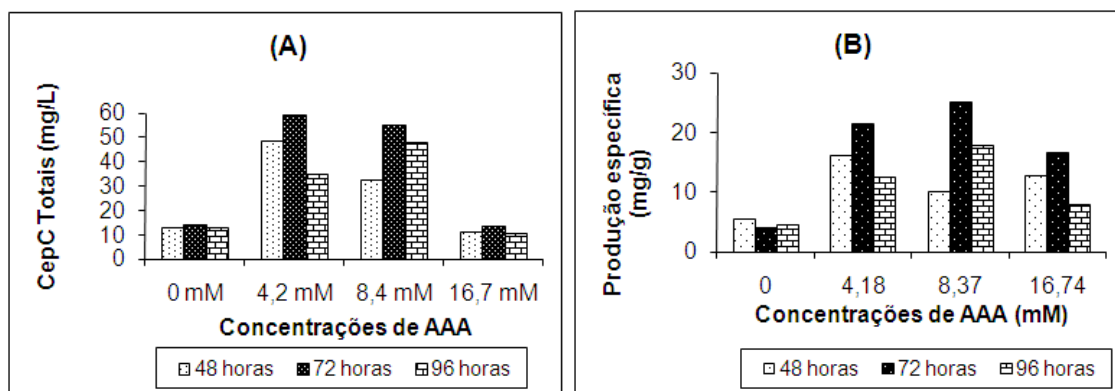


Gráfico 5. 7 – CepC totais (A) e produção específica (B) nos meios contendo diferentes concentrações iniciais de AAA.

5.4. Planejamento Experimentais

Com base na constatação de que as adições de AAA e L-lisina, separadamente, proporcionaram aumentos na concentração final de CepC totais, comparativamente ao meio sem aminoácidos, partiu-se para o estudo do efeito conjunto de ambos. Para isto, utilizou-se metodologia de planejamento experimental (BOX et al., 1978; RODRIGUES; IEMMA, 2005), delineando-se experimentos variando a quantidade dos aminoácidos através de combinações fatoriais em dois e três níveis de concentração.

5.4.1. Planejamento 2ⁿ

Primeiramente foi desenvolvido um estudo em dois níveis de concentração, -1 e +1 (em unidades codificadas), com duplicata de um ponto central e $n = 2$ (variáveis independentes: L-lisina e AAA). Replicatas do ponto central foram realizadas para a estimar o erro experimental. As faixas selecionadas de concentração foram estabelecidas em 0 a 100 mM e 0 a 10mM para L-lisina e AAA, respectivamente. Os valores das variáveis em unidades codificadas e em valores originais encontram-se na Tabela 5.1, bem como as respostas obtidas em termos de produção de CepC totais (mg·L).

Tabela 5. 1 – Planejamento fatorial 2^n com duplicata do ponto central: condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de AAA no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtidas em 72 h de fermentação.

	Variáveis independentes				Variável Resposta	
	Unidades Codificadas		Unidades originais		CepC totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
Meio	L-lisina (x_1)	AAA (x_2)	L-lisina (mM)	AAA (mM)	adição de AAA no início da fermentação	adição de AAA em 48 h
1	-1	-1	0	0	13,5	13,5
2	+1	+1	100	10	61,2	85,2
3	+1	-1	100	0	84,9	84,9
4	-1	+1	0	10	21,8	15,3
5	0	0	50	5	65,5	72,0
6	0	0	50	5	76,3	65,7

O Gráfico 5.8 mostra os dados de produção, com adição de AAA no início da fermentação (Gráfico 5.8 A) e em 48 horas de processo (Gráfico 5.8 B).

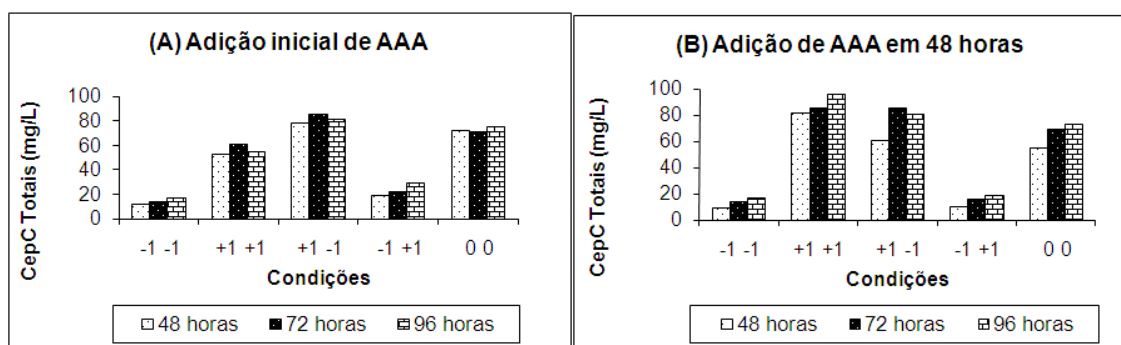


Gráfico 5. 8 – Planejamento 2^n com duplicata do ponto central: CepC totais em meios com adição de AAA no início da fermentação (A) e após 48 horas de processo (B), em 48, 72 e 96 horas de fermentação.

A coleta de amostras em 48, 72 e 96 horas de fermentação possibilitou a geração de 6 superfícies de resposta. Entretanto para os dados de 48 e 96 h não foram obtidos ajustes satisfatórios. As superfícies de resposta geradas com os dados de 72 horas de processo, tanto para adição de AAA no início da fermentação como adição em 48 horas de cultivo (Gráficos 5.9 e 5.10), indicaram algumas tendências do comportamento com relação à produção.

Com relação à adição de AAA no início do processo, o diagrama de Pareto (Figura 5.1) mostra que o efeito linear de L-lisina foi o único significativo. Através da análise estatística, o parâmetro correspondente a este efeito indicou um valor de $p_{\text{calculado}}$ (0,087), menor do que $p_{\text{crítico}}$ (0,10). Caso contrário ($p_{\text{calculado}} \geq p_{\text{crítico}}$) a hipótese nula (H_0) seria aceita, ou seja, o parâmetro em questão não seria significativo. Na prática, isto significa que apenas a adição de L-lisina exerceu efeito sobre a concentração de antibióticos. Isto é claramente observado na superfície de resposta (Gráfico 5.9) ou mesmo nos gráficos com dados experimentais de produção (Gráfico 5.8), que mostram a tendência de concentração de CepC totais ascendente quando se aumenta a concentração de L-lisina. O valor de $p_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste (0,16) foi maior do que o valor de $p_{\text{crítico}}$, de forma que pode-se aceitar o modelo.

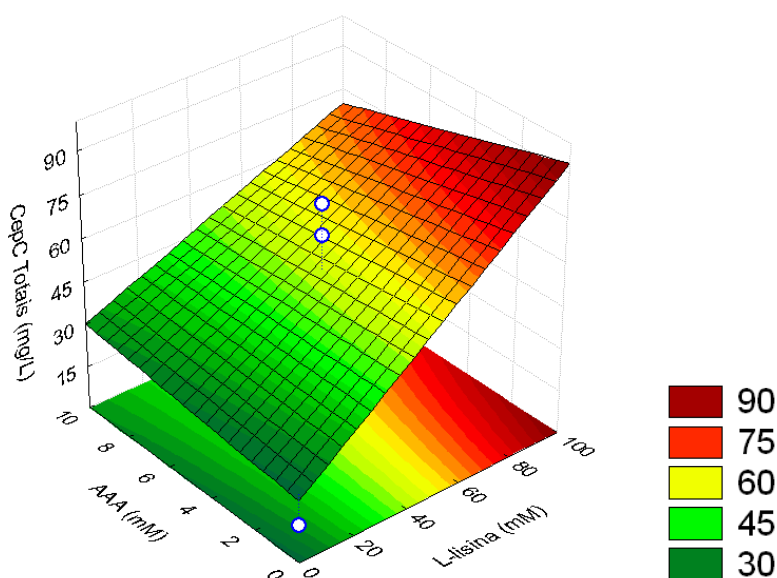


Gráfico 5. 9 – Planejamento 2ⁿ (adição de AAA em 0 h): superfície de resposta ajustada ($r^2=0,79$ a 90% de grau de confiança) e dados experimentais de concentração de CepC totais em 72 horas de fermentação.

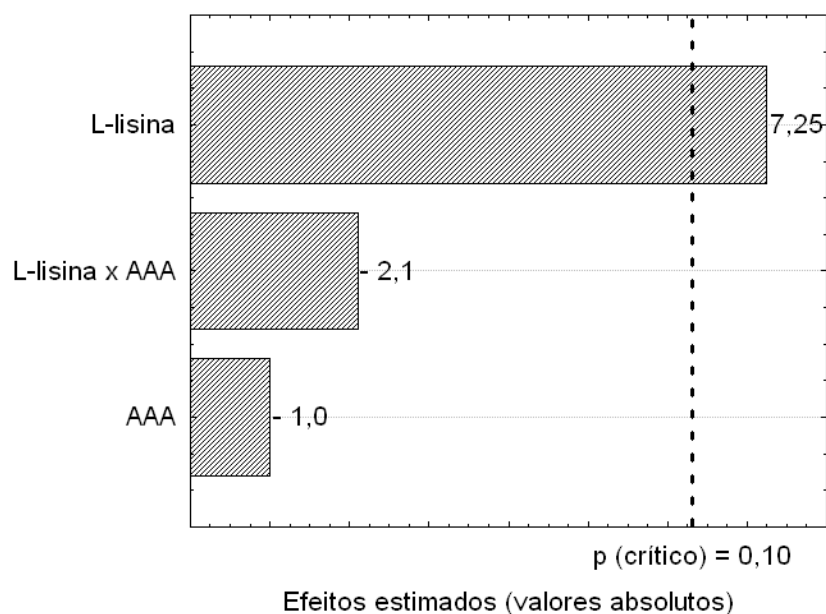


Figura 5. 1 – Planejamento 2ⁿ (adição de AAA em 0 h): diagrama de Pareto do modelo ajustado para a produção de CepC totais em 72 horas de fermentação.

A superfície de resposta (Gráfico 5.10) e o diagrama de Pareto (Figura 5.2) obtidos para a condição de AAA adicionado após 48 horas evidenciaram ainda mais a influência positiva do aumento de concentração de L-lisina na produção. Comparando-se os meios contendo a maior concentração de L-lisina (100 mM) e sem a adição deste aminoácido, observou-se que somente a adição de AAA em 0 horas influenciou o processo. A adição deste aminoácido no meio contendo a maior concentração de L-lisina prejudicou a produção, enquanto observou-se o contrário com o meio sem L-lisina. Por outro lado, a adição tardia de AAA não causou nenhum efeito na produção de cefalosporinas.

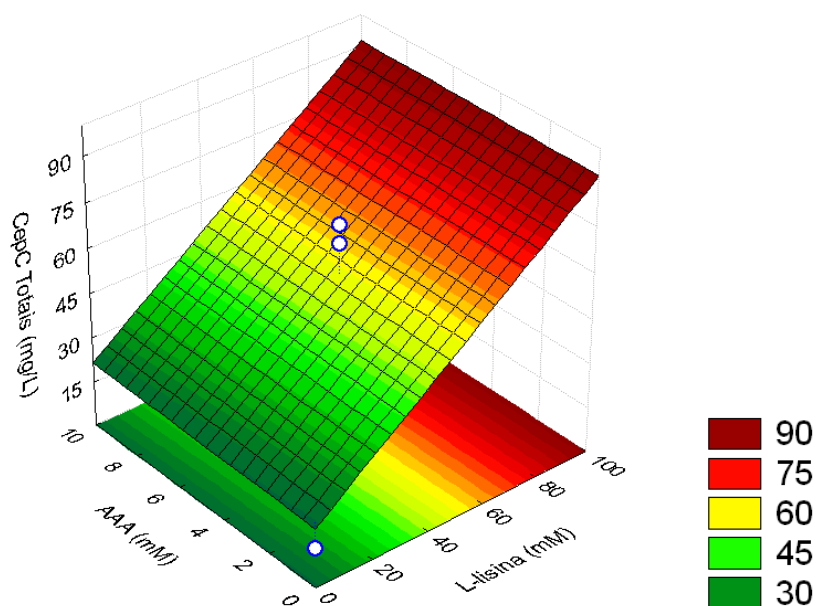


Gráfico 5. 10 - Planejamento 2ⁿ (adição de AAA em 48 h): superfície de resposta ajustada ($r^2=0,91$; a 90% de grau de confiança) e dados experimentais de concentração de CepC totais em 72 horas de fermentação.

Uma avaliação global dos dados experimentais apresentados anteriormente (Gráfico 5.7) mostrou que a presença de AAA influenciou a produção de CepC totais, o que não foi indicado pelo modelo resultante da análise estatística dos dados obtidos no planejamento fatorial 2ⁿ. Provavelmente as altas concentrações de L-lisina adicionadas ao meio mascararam o efeito do AAA (intervalo inadequado de concentrações no planejamento fatorial 2ⁿ), interferindo na análise dos dados utilizando-se a metodologia de superfície de resposta. Para estudar de forma mais efetiva o efeito da adição de AAA sobre a produção, bem como o efeito conjunto dos dois aminoácidos, um novo planejamento fatorial foi desenvolvido.

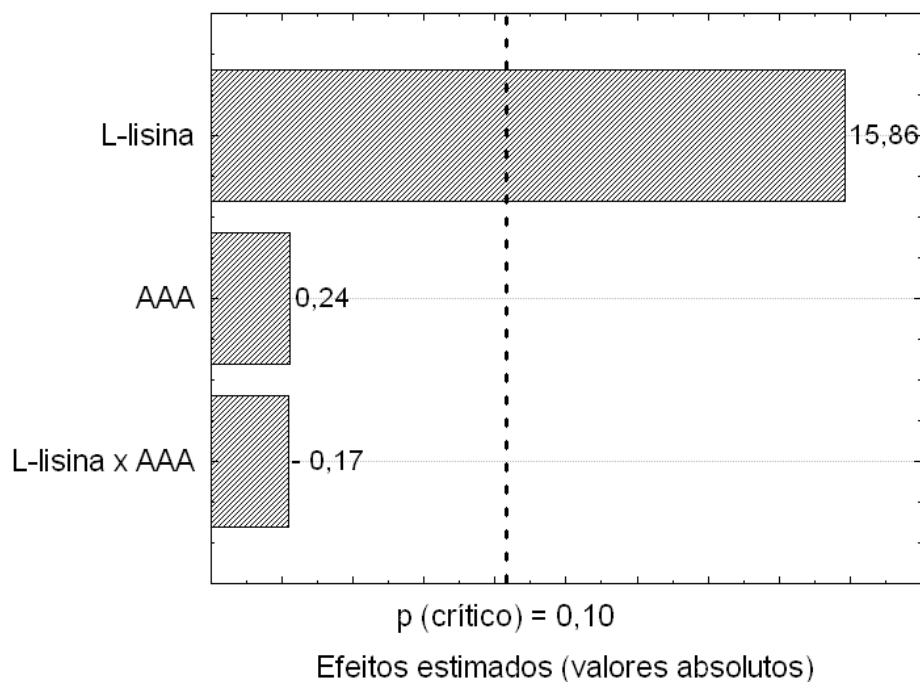


Figura 5. 2 - Planejamento 2ⁿ (adição de AAA em 48 h): diagrama de Pareto do modelo ajustado para a produção de CepC totais em 72 horas de fermentação.

5.4.2. Planejamento 3ⁿ

Neste planejamento, foram estabelecidos intervalos de concentração mais restritos e investigou-se um maior número de condições (Tabela 5.2). Nestes experimentos adicionou-se AAA somente no início da fermentação. Em intervalos de tempo definidos foram retiradas amostras para acompanhar o consumo de aminoácidos com o intuito de relacioná-lo com a produção. O Gráfico 5.11 apresenta os dados de concentração dos aminoácidos ao longo dos cultivos. Observou-se na fermentação em meio +1 0 uma pequena concentração residual de ambos os aminoácidos (Gráficos 5.11 A e B), enquanto nos meios 0+1 e +1+1 sobrou apenas AAA, também em baixas concentrações. Nos demais meios, ambos os aminoácidos foram consumidos completamente.

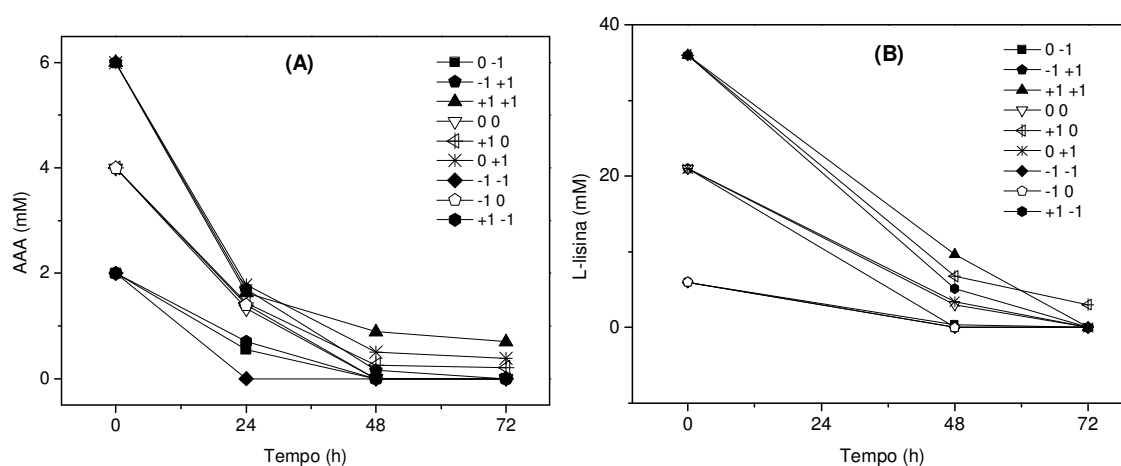


Gráfico 5.11 - Planejamento experimental 3^n : consumo de AAA (A) e L-lisina (B)

Tabela 5.2 – Planejamento fatorial 3^n : condições das variáveis independentes (concentração de L-lisina e concentração de AAA no meio de cultura) e concentração de CepC totais obtidas em 72 horas de fermentação.

	Variáveis				Resposta
	Unidades Codificadas		Unidades Reais		
Meio	L-lisina (x_1)	AAA (x_2)	L-lisina (mM)	AAA (mM)	CepC totais (mg.L^{-1})
1	0	-1	16,8	2	$82,8 \pm (9,6)$
2	-1	+1	4,8	6	$67,1 \pm (17,7)$
3	+1	+1	28,8	6	$111,8 \pm (9,6)$
4	0	0	16,8	4	$112,4 \pm (32,5)$
5	0	0	16,8	4	$102,9 \pm (14,4)$
6	0	0	16,8	4	$117,9 \pm (17,2)$
7	0	0	16,8	4	$112,0 \pm (13,7)$
8	+1	0	28,8	4	$118,9 \pm (16,4)$
9	0	+1	16,8	6	$92,2 \pm (6,6)$
10	-1	-1	4,8	2	$44,1 \pm (8,2)$
11	-1	0	4,8	4	$66,8 \pm (20,9)$
12	+1	-1	28,8	2	$118,5 \pm (36,9)$

Os Gráficos 5.12 e 5.13 mostram os dados de produção em 24, 48 e 72 horas de fermentação, obtidos sob as condições estabelecidas no planejamento fatorial 3ⁿ.

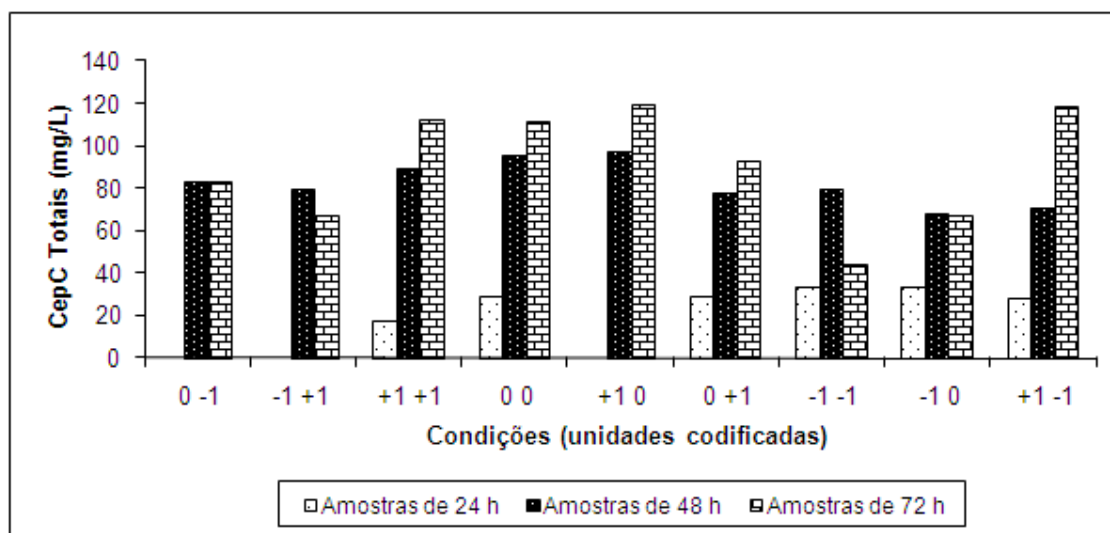


Gráfico 5. 12 – Planejamento 3ⁿ: CepC totais em 24, 48 e 72 horas de fermentação.

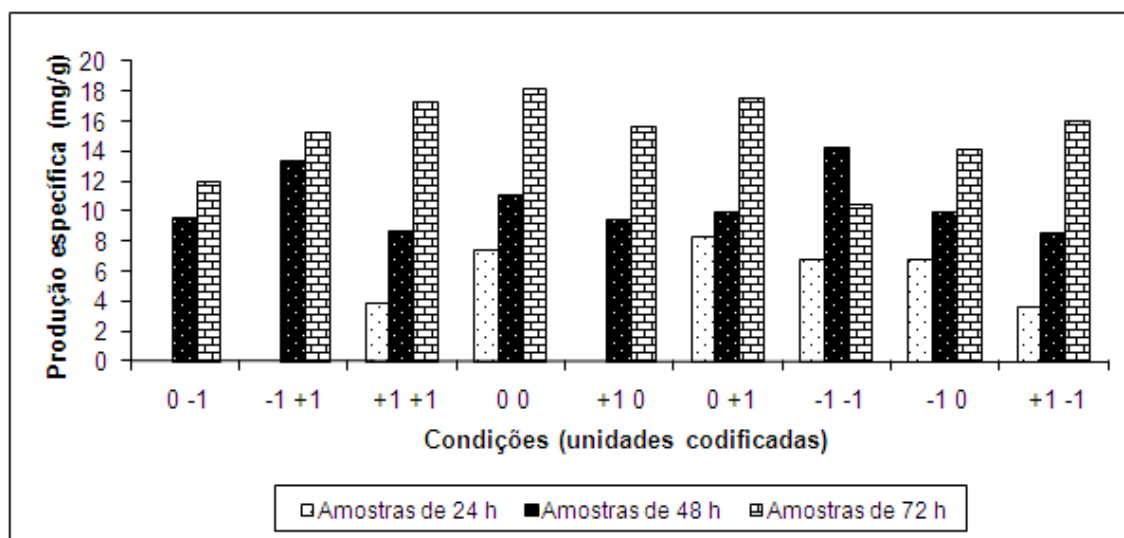


Gráfico 5. 13 – Planejamento 3ⁿ: produção específica em 24, 48 e 72 horas de fermentação.

A superfície de resposta gerada com os dados de 48 h apresentou coeficiente de determinação $r^2 = 0,48$, por isso foi descartada. Com as amostras de 72 horas, a superfície obtida (Gráfico 5.14) apresentou alto coeficiente de determinação ($r^2 = 0,92$) e proporcionou informações importantes a respeito da influência dos aminoácidos sobre a

produção. A qualidade do ajuste está representada através do diagrama de Pareto (Figura 5.3)

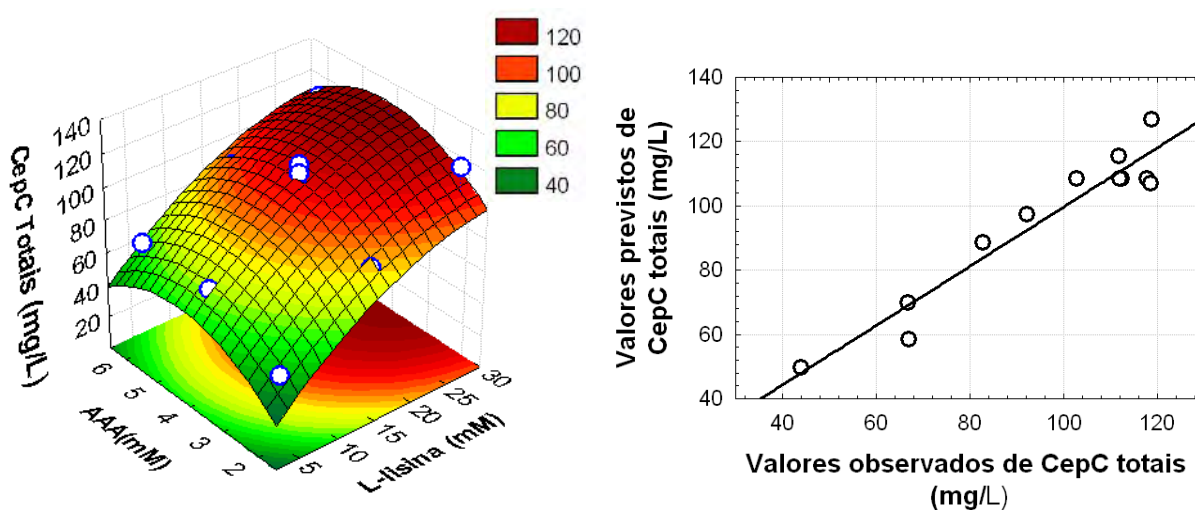


Gráfico 5. 14 – Superfície de resposta para planejamento 3^n ($r^2=0,92$)

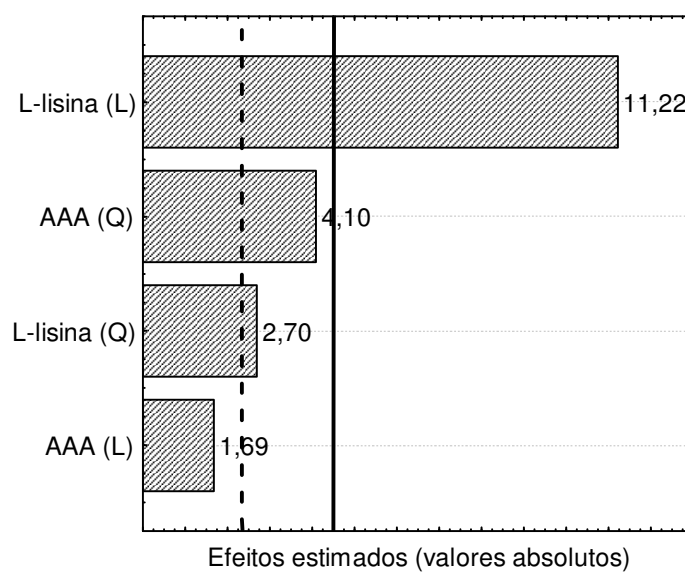


Figura 5. 3– Planejamento 3^n : diagrama de Pareto, com nível de significância igual a 0,05 (linha vertical contínua) e 0,10 (linha vertical tracejada), para dados de CepC totais obtidos em 72 horas de fermentação.

As equações dos modelos quadráticos são expressas a seguir para intervalos de confiança de 95% (Equação 1) e 90 % (Equação 2), com variáveis independentes em valores codificados. Os termos não significativos foram eliminados.

$$\text{CefC (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 91,28 (\pm 1,94) + 28,55 (\pm 2,54) \cdot x_1 + 7,81 (\pm 1,91) \cdot x_2^2$$

Equação 5. 2

$$\text{CefC (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 91,28 (\pm 1,94) + 28,55 (\pm 2,54) \cdot x_1 + 5,15 (\pm 1,91) \cdot x_1^2 + 7,81 (\pm 1,91) \cdot x_2^2$$

Equação 5. 3

Um planejamento fatorial 2^n simples complementado apenas de uma duplicata do ponto central, como aquele anteriormente apresentado (Item 5.4.1), é realizado para checar os principais efeitos, individuais e combinados, das variáveis independentes sobre a variável resposta. Este planejamento não permite ajustar uma superfície quadrática por não fornecer um número suficiente de dados para tal. Já um planejamento do tipo 3^n permite obter um modelo quadrático com o qual se pode prever um ponto de máximo ou mínimo para a variável resposta. Em qualquer tipo de planejamento, porém, as faixas de valores das variáveis independentes devem ser selecionadas criteriosamente, com base no fenômeno em questão.

No planejamento 3^n , a faixa mais restrita de concentrações dos aminoácidos aliada ao maior número de combinações das variáveis independentes resultou em melhor ajuste da superfície de resposta ($r^2 = 0,92$). No modelo ajustado, além do parâmetro associado ao termo linear da lisina, o parâmetro do termo quadrático da concentração de AAA foi significativo quando o intervalo de confiança foi estabelecido em 95% (Figura 5.3) e, alterando-se este intervalo para 90%, o parâmetro associado ao termo quadrático de L-lisina também passa a ser significativo. Neste planejamento, assim como no anterior (2^n), as superfícies de resposta resultantes mostraram que o aumento da concentração de L-lisina proporciona aumento na produção de antibióticos, em concordância com os dados da literatura (FANG et al, 1996). Ainda, a escolha das novas faixas de concentração dos aminoácidos foi fundamental para que o parâmetro do termo quadrático de AAA tenha se mostrado significativo, ou mesmo o termo quadrático de L-lisina, com intervalo de

confiança igual a 90%. Com isso foi possível prever, através dos modelos quadráticos obtidos (Equações 1 e 2), uma concentração máxima ao redor de $130 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de CepC totais, em concentrações de AAA e L-lisina de 4,3 mM e 33,4 mM, respectivamente. Estes resultados mostraram que as presenças destes aminoácidos em concentrações específicas podem ser determinantes para a obtenção de uma concentração máxima de antibiótico.

Apesar do bom ajuste obtido, o efeito combinado dos dois aminoácidos sobre a produção não foi previsto pelo modelo. Porém, se forem tomados os dados de produção de CepC totais do meio suplementado somente com L-lisina (Gráfico 5.5) ou somente com AAA (Gráfico 5.7), nota-se que a máxima produção obtida foi cerca de 60 e 85 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para adição de AAA e de L-lisina, respectivamente, ao passo que no planejamento 3ⁿ foram obtidos máximos em torno de $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Este mesmo resultado foi obtido em meios contendo 28,8 mM de L-lisina, porém adicionado de 2 e 4 mM de AAA (condições +1, -1 e +1, 0). Confrontando os dados obtidos com os meios contendo cada aminoácido adicionado individualmente e com os meios do planejamento 3ⁿ, pode-se concluir que a associação dos aminoácidos exerce efeito positivo no processo, aumentando a produção de CepC.

5.5. Efeitos de íons fosfato sobre a produção de CepC totais

Íons fosfato exercem efeitos importantes na regulação da produção de metabólitos secundários e em *S. clavuligerus* não é diferente. Aharonowitz e Demain (1977) relataram que a máxima produção de antibióticos por este microrganismo ocorre em meios contendo entre 10 e 25 mM de fosfato. Os autores ainda observaram que concentrações superiores inibem a produção. O efeito dos íons fosfato sobre o meio suplementado foi avaliado adicionando-se várias concentrações de K_2HPO_4 ao meio de produção apresentadas na Tabela 4.10. A concentração de AAA foi fixada em 4,0 mM com base na tendência indicada pela superfície de resposta gerada no planejamento 3ⁿ. Quanto à L-lisina, utilizou-se a concentração de 28,8 mM, que resultou no maior valor experimental de produção, porque a melhor concentração teórica de L-lisina (33,4 mM) ficou fora da faixa estudada.

Como pode ser observado no Gráfico 5.15, o pico de produção, tanto total quanto específica, ocorreu em 72 h com adição de 15 mM de fosfato. Excetuando-se a condição com 0 mM, todas as demais condições resultaram em concentração celular da mesma ordem de grandeza, indicando que fosfato realmente exerceu efeito sobre a produção. Os

dados obtidos condizem com os relatos de Aharonowitz e Demain (1977), pois o máximo de produção foi encontrado dentro da faixa estudada. Lebrihi et al. (1987) mostraram que a biossíntese da enzima expandase é inibida em condições de altas concentrações de fosfato no meio.

Ainda é importante ressaltar que o meio sem adição de fosfato não era totalmente carente do íon, uma vez que a fonte de nitrogênio (proflo) contém 0,35% de fósforo disponível (porcentagem em massa). Esses resultados reforçam o fato de que o fosfato exerce alta influência sobre a produção, por atuar como inibidor ou indutor de diversos processos enzimáticos no microrganismo, seja em nível de metabolismo primário ou secundário.

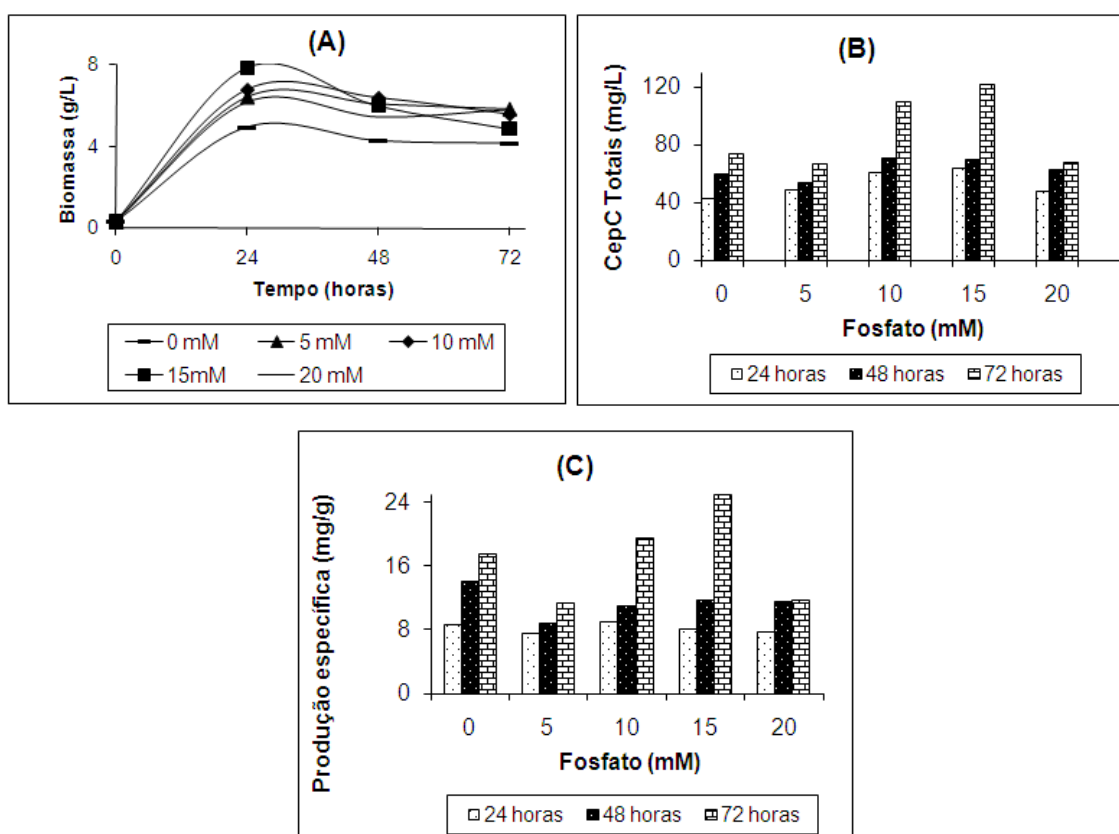


Gráfico 5. 15- Biomassa (A), CepC totais (B) e produção específica (C) obtidos em meios contendo diferentes concentrações de fosfato.

5.6. Experimento em biorreator

As condições que conduziram aos maiores acúmulos de produto e de produção específica em frascos agitados (28,8 mM de L-lisina, 4 mM de AAA e 15 mM de K_2HPO_4) foram investigadas em maior escala (1,5 litros), utilizando-se um biorreator convencional em escala de bancada. Os resultados estão apresentados no Gráfico 5.16.

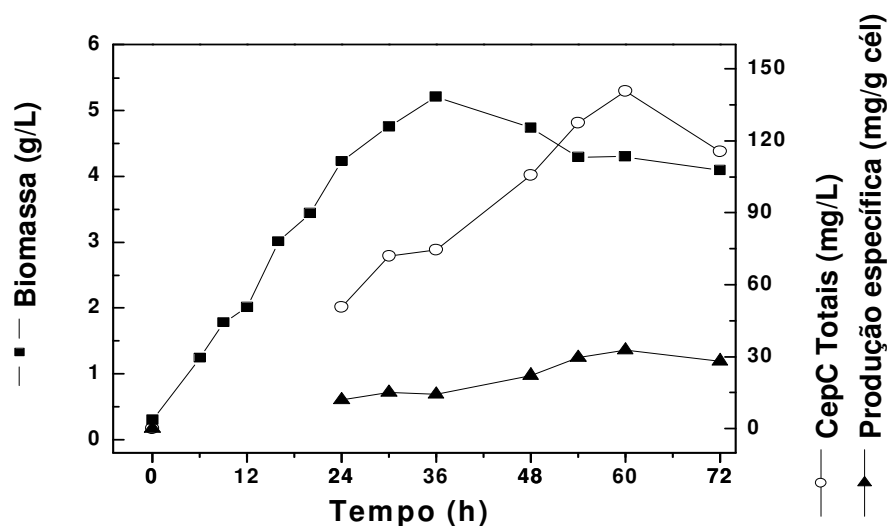


Gráfico 5. 16 - Biomassa , CepC totais e produção específica (C) obtidos experimento em biorreator.

Em comparação ao experimento em frascos agitados (Gráfico 5.15), observou-se menor biomassa (Gráfico 5.16) e um aumento de 16 % em relação ao máximo de produção, atingindo-se o valor de $141,9 \text{ mg.L}^{-1}$ de CepC em 60 horas de cultivo. Em relação à produção específica, este aumento foi ainda maior (33 %) devido ao menor crescimento obtido no biorreator. Comparando-se aos resultados de produção (Gráfico 5.5) obtidos com o meio adotado como controle (meio base + 100 mM de L-lisina), cuja composição está descrita na Tabela 4.5 (meio base), o aumento foi de 61,7% e o de produção específica superou 190 %. Ressalta-se que no experimento em biorreator o meio base foi suplementado com apenas 28,8 mM de L-lisina e 4 mM de AAA.

A adição dos precursores em concentrações adequadas, aliada ao maior controle do processo proporcionado pelo biorreator, conduziu a aumentos significativos na produção e confirmou o efeito positivo exercido pelos aminoácidos AAA e L-lisina sobre a produção do antibiótico CefC por *S. clavuligerus*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- A padronização do bioensaio através do levantamento de uma curva de calibração aliada ao tratamento enzimático das amostras com penicilinase BD DifcoTM Penase[®] permitiu obter resultados mais confiáveis de CepC totais, mesmo na ausência de padrão de CefC.
- Por meio dos experimentos com os meios contendo somente L-lisina ou AAA, como também daqueles estabelecidos através de metodologia de planejamento experimental, foram observados os efeitos positivos desses aminoácidos sobre a produção de antibióticos.
- Os resultados obtidos reforçaram os dados da literatura de que o passo inicial de conversão de L-lisina em AAA é limitante e está diretamente associado à produção.
- A análise estatística dos dados experimentais utilizando metodologia de superfície de resposta não indicou o efeito positivo dos aminoácidos em conjunto, porém este efeito foi evidenciado experimentalmente.
- Fosfato exerce influência sobre a produção de CefC e o estabelecimento de uma concentração ideal a ser adicionada ao meio de produção é de suma importância para que se obtenha o máximo de conversão de substratos a produtos.
- Em vista dos resultados positivos obtidos no presente trabalho, pôde-se concluir que estudos que contribuam no sentido de contornar a etapa limitante de conversão de L-lisina em AAA são de fundamental importância para incrementar a produção de β -lactâmicos em *S. clavuligerus*.

REFERÊNCIAS

AHARONOWITZ, Y.; DEMAINE, A. L. Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. **Archives Microbiology**, v. 155, p. 169-173, 1977.

ALEXANDER, D. C.; BRUMLIK, M. J.; LEE, L.; JENSEN, S. E. Early cephamycin biosynthetic genes are expressed from a polycistronic transcript in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 348-356, 2000.

ANTONIO, T.; CORRÊA, T.; ARAUJO, M. L. G. C. Meios de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de CefC. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s.n.], 2007. PFE0121. 1 CD-ROM.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOSA, M.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinect studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 31-31, 2005.

BIGNELL, D. R. D.; TAHLAN, K.; COLVIN, K. R.; JENSEN, S. E.; LESKIW, B. K. Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1529-1541, 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.

BOX, G. E. P. ; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. New York: John Wiley and Sons, 1978. 655 p.

BRAKHAGE, A. A. Molecular regulation of β -Lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 547- 585, 1998.

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.

BRUNDTLAND, G. H. **Overcoming antimicrobial resistance**. Disponível em: <www.who.int/infectious-disease-report/2000/>. Acesso em: 27 nov. 2009.

BUSHELL, M. E.; KIRK, S.; ZHAO, H.-J.; AVIGNONE-ROSA, C. A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 149-157, 2006.

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.

DEMAIN, A. L. Biology of antibiotic formation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 33-42.

ELANDER, R. P. Industrial production of β -lactam antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 385-392, 2003.

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

GARCIA-DOMINGUEZ, M.; MARTIN, J. F.; LIRAS, P. Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 12, p. 6808-6814, 1989.

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

KHETAN, A.; MALMBERG, L. H.; KYUNG, Y. S.; SHERMAN, D. H.; HU, W. S. Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 1020-1027, 1999.

KIESER, T.; CHATER, K. F.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; HOPWOOD, D. A. **Practical streptomyces genetics**. Norwich: John Innes, 2000. 613 p.

KUO, C-T.; WANG, P-Y.; WU, C-H. Fluorometric determination of ammonium ion by ion chromatography using postcolumn derivatization with *o*-phthaldialdehyde. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 1, p. 91-97, 2005.

LEBRIHI, A.; GERMAIN, P.; LEFEBVRE, G. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 130-135, 1987.

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*: microbial processes and products. In: BARREDO, J. L. (Ed.). **Methods in biotechnology**. New Jersey: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149-163.

LIRAS, P.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A. Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 467-475, 2000.

MALMBERG, L-H.; HU, W-S.; SHERMAN, D. H. Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the Lysine 6-aminotransferase (lat) gene in cephamycin C biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6916-6924, 1993.

MALMBERG, L. H.; HU, W. S.; SHERMAN, D. H. Effects of enhanced lysine ϵ -aminotransferase activity on cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 198-205, 1995.

MARTÍN, J. F. New aspects of genes and enzymes for β -lactam antibiotic biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 1-15, 1998.

MENDELOVITZ, S.; AHARONOWITZ, Y. 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.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L. D.; GORMAN, M.; HAMILL, R. L.; HIGGENS, 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.

NOVO NORDISK A/S (United States). M. Egel-Mitani; S. Kaasgaard; K. N. Kristiansen. **Process for the production of secondary metabolites**. PCT/DK95/00386, 28 Sept. 1995, 04 Apr. 1996.

OKABE, M.; KUWAJIMA, T.; SATOH, M.; KIMURA, K.; OKAMURA, K.; OKAMETO, R. Preferential and high-yield production of a cephamycin c by dissolved oxygen controlled fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, p. 292-296, 1992.

OMSTEAD, D. R.; HUNT, G. H.; BUCKLAND, B. C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive biotechnology**. New Jersey: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 187-210.

PRUES, D. L.; KELLETT, M. A. New clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Antibiotics**, v. 20, p. 208-212, 1983.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 325 p.

ROKEM, J. S.; LANTZ, A. E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1262-1287, 2007.

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

VINING, L. C.; JENSEN, S. E.; WESTLAKE, D. W. S.; AHARONOWITZ, Y.; WOLFE, S. Cephamycin production and isopenicillin N synthetase activity in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 240-246, 1987.

ZHANG, J. Y.; WOLFE, S.; DEMAINE, A. L. Effect of ammonium as nitrogen source on production of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase by *Cephalosporium acremonium*. **Journal of Antibiotics**, v. 40, p. 1746-1750, 1987.