

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS PARA O
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Kaio César da Silva Rodrigues

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH E DA
TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces*
***clavuligerus* EM BIORREATOR CONVENCIONAL**

OURO BRANCO - MG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS PARA O
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Kaio César da Silva Rodrigues

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH E DA
TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces*
***clavuligerus* EM BIORREATOR CONVENCIONAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal de São João Del-Rei como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

OURO BRANCO - MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca da UFSJ

Rodrigues, Kaio César da Silva
R696e Estudo da influência do pH e da temperatura na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional [manuscrito] / Kaio César da Silva Rodrigues. - 2015
69 f. : il.

Orientador: Marcel Otávio Cerri.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São João del-Rei. Mestrado em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável.

Referências: f. 47-52.

1. Ácido clavulânico - Teses 2. *Streptomyces clavuligerus* – Teses 3. pH- Processos químicos - Teses 4. Temperatura – Processos químicos - Teses 5. Stress - Processos químicos - Teses I. Cerri, Marcel Otavio (Orientador) II. Universidade Federal de São João del-Rei. III. Mestrado em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável IV. Título

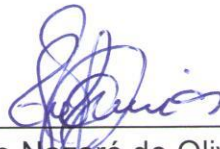
CDU 66.094.6

Kaio César da Silva Rodrigues

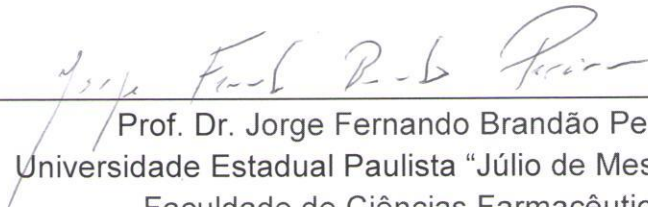
“Estudo da influência do pH e da temperatura na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional”



Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
(UNESP/FCFAR)



Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior
Universidade Federal de São João del-Rei
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias para o
Desenvolvimento Sustentável
(UFSJ/PPGTDS)



Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
(UNESP/FCFAR)

Ouro Branco, 26 de fevereiro de 2015.

À minha Família

AGRADECIMENTOS

À minha família e à Jana pelo apoio e carinho em todos os momentos.

Ao meu orientador Marcel Otavio Cerri pelos ensinamentos e orientação.

Às amigas Cássia e Camila do mestrado pela sincera amizade, companheirismo e parceria durante todo o curso.

Aos amigos do laboratório do DEQ-UFSCar pela amizade e auxílio nos experimentos, em especial, Cecília, Diego, Carlos, Liliane, Jorge, Matheus, Carol, Fernanda e Álvaro.

Aos integrantes da República Furazóio.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À UFSJ pela oportunidade de cursar o mestrado.

À UFSCar pela infraestrutura fornecida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	III
NOMENCLATURA.....	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Antibióticos β -lactâmicos	4
2.2. Ácido clavulânico.....	5
2.3. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	7
2.4. Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i>	8
2.5. Influência da temperatura e do pH na produção de AC.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Microrganismo.....	16
3.2. Meios de cultura utilizados	16
3.2.1. Meio de cultura de reativação	16
3.2.2. Meios de cultura de crescimento e produção	16
3.3. Equipamentos utilizados	17
3.4. Preservação do microrganismo	19
3.5. Procedimento experimental dos cultivos em batelada em biorreator	21

3.5.1. Cultivos em batelada a temperatura e pH constantes.....	22
3.5.2. Cultivos em batelada aplicando rampas de pH e temperatura.....	23
3.6. Metodologias analíticas	24
3.6.1. Análise da concentração de AC.....	24
3.6.2. Determinação da concentração de glicerol.....	24
3.6.3. Análise da concentração celular	25
3.6.4. Análise da reologia do caldo fermentativo.....	25
3.7. Cálculo dos parâmetros de cultivo	26
3.7.1. Velocidade de consumo de glicerol (r_G)	26
3.7.2. Coeficiente de rendimento global de substrato (glicerol) em células (Y_{xs}).....	26
3.7.3. Coeficiente de rendimento de células em produto (AC) (Y_{px}).....	27
3.7.4. Coeficiente de rendimento de substrato (glicerol) em produto (Y_{ps}).....	27
3.7.5. Produtividade máxima em AC (Pr_{max})	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Cultivos em batelada a temperatura e pH constantes.....	30
4.2. Cultivos em batelada aplicando rampas de pH e temperatura	36
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE A	53
APÊNDICE B	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Subgrupos da classe dos antibióticos β -lactâmicos (adaptada de BAPTISTA-NETO, 2004).....	5
Figura 2.2. Estrutura molecular do ácido clavulânico (Fonte: LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2008).....	6
Figura 2.3. Micélio aéreo de <i>Streptomyces clavuligerus</i> . Fonte: (BELMAR-BEINY e THOMAS, 1991).....	8
Figura 3.1. Biorreator Bioflo III da New Brunswick.....	18
Figura 3.2. Procedimento experimental dos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> para produção de AC em biorreator.....	21
Figura 4.1. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e células (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo EF-1 (T = 30°C, pH = 6,8).....	30
Figura 4.2. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e células (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo EF-2 (T = 30°C, pH = 6,3).....	31
Figura 4.3. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo EF-3 (T = 25°C e pH = 6,8).....	32
Figura 4.4. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo EF-4 (T = 20°C e pH = 6,8).....	33
Figura 4.5. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp) e glicerol (Cs) ao longo do tempo nos cultivos EF-1 (T = 30°C, pH = 6,8), EF-3 (T = 25°C, pH = 6,8) e EF-4 (T = 20°C, pH = 6,8).....	34
Figura 4.6. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo RPH-1 (rampa de pH 6,8-6,3 com início em 18 horas, término em 22 horas e decréscimo de 0,1 a cada 1 hora).....	38

- Figura 4.7.** Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo RT-1 (rampa de temperatura 30-20°C com início em 12 horas, término em 21 horas e decréscimo de 1°C a cada 1 hora).38
- Figura 4.8.** Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo RPH-2 (rampa de pH 6,8-6,3 com início em 18 horas, término em 42 horas e decréscimo de 0,1 a cada 6 horas).40
- Figura 4.9.** Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo RT-2 (rampa de temperatura 30-20°C com início em 12 horas, término em 66 horas e decréscimo de 1°C a cada 6 horas).....40
- Figura 4.10.** Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo RTPH com barras de desvio padrão da média da duplicata (rampa de temperatura 30-27°C com início em 12 horas, término em 36 horas e decréscimo de 1°C a cada 12 horas; rampa de pH 6,8-6,6 com início em 36 horas, término em 48 horas e decréscimo de 0,1 a cada 12 horas).42
- Figura 4.11.** Perfis de produção de AC dos cultivos conduzidos em valores de pH constantes (EF-1 e EF-2) e com aplicação de rampas de pH (RPH-1, RPH-2 e RTPH).44
- Figura 4.12.** Perfis de produção de AC dos cultivos conduzidos em temperaturas constantes (EF-1, EF-3 e EF-4) e com aplicação de rampas de temperatura (RT-1, RT-2 e RTPH).....44
- Figura A1.** (Apêndice A) Curva de calibração do ácido clavulânico, equação do modelo e coeficiente de correlação linear.54
- Figura A2.** (Apêndice A) Curva de calibração para determinação da concentração celular em função das medidas de Abs₆₀₀, equação do modelo e coeficiente de correlação linear.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Meio de cultura de Rosa <i>et al.</i> (2005).	16
Tabela 3.2. Composição dos meios de cultura de crescimento e produção, baseados no meio proposto por Teodoro <i>et al.</i> (2006).	17
Tabela 3.3. Meio de cultura de Reading Cole (1977) modificado.	20
Tabela 3.4. Meio de cultura de Sanches e Branã (1996).	20
Tabela 3.5. Condições de pH e temperatura dos ensaios fermentativos.	22
Quadro 4.1. Condições experimentais e principais resultados dos cultivos conduzidos a temperatura e pH constantes (EF-1, EF-2, EF-3 e EF-4) e com a aplicação de rampas de temperatura e/ou pH (RT-1, RPH-1, RT-2, RPH-2 e RTPH).....	29
Quadro B1. Comparação entre os resultados da literatura e do cultivo controle do presente trabalho, em termos de produção máxima de AC ($C_{p_{max}}$).....	56
Quadro B2. Comparação entre os resultados do presente trabalho (biorreator) e do trabalho de Costa e Badino (2012) (mesa incubadora rotativa), em termos de produção máxima de AC ($C_{p_{max}}$) e produtividade máxima em AC (Pr_{max}).	56

NOMENCLATURA

Abs - absorvância (nm)

Abs₆₀₀ - medida de absorvância a 600 nm (nm)

AC - ácido clavulânico

C_x - concentração de células (g.L⁻¹)

C_s - concentração de substrato (glicerol) (g.L⁻¹)

C_p - concentração de AC (mg.L⁻¹)

C_{s_i} - concentração de substrato (glicerol) no início do cultivo (g.L⁻¹)

C_{x_i} - concentração de células no início do cultivo (g.L⁻¹)

C_{p_i} - concentração de AC no início do cultivo (mg.L⁻¹)

C_{p_{max}} - concentração máxima de AC (mg.L⁻¹)

C_{x_{max}} - concentração máxima de células (g.L⁻¹)

C_{s_f} - concentração de glicerol ao final do cultivo (g.L⁻¹)

EF - ensaio fermentativo

K - índice de consistência (dina.cm⁻².s⁻ⁿ)

K_{max} - índice de consistência máximo (dina.cm⁻².s⁻ⁿ)

MOPS - ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico

n - índice de comportamento do escoamento

pH_i - valor de pH inicial do cultivo

pH_f - valor de pH final do cultivo

Pr_{max} - produtividade máxima em AC (mg.L⁻¹.h⁻¹)

r_G - velocidade de consumo de glicerol (g.L⁻¹.h⁻¹)

R² - coeficiente de correlação linear

RPH - rampa de pH

RT - rampa de temperatura

t - tempo de cultivo (h)

T_i - temperatura inicial do cultivo (°C)

T_f - temperatura final do cultivo ($^{\circ}\text{C}$)

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

Y_{xs} - coeficiente de rendimento global de substrato (glicerol) em células ($\text{g}_X \cdot \text{g}_G^{-1}$)

Y_{px} - coeficiente de rendimento de células em produto (AC) ($\text{g}_{AC} \cdot \text{g}_X^{-1}$)

Y_{ps} - coeficiente de rendimento de substrato (glicerol) em produto ($\text{g}_{AC} \cdot \text{g}_G^{-1}$)

τ - tensão de cisalhamento ($\text{dina} \cdot \text{cm}^{-2}$)

γ - gradiente da velocidade de cisalhamento (s^{-1})

RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um composto β -lactâmico com potente atividade inibitória de β -lactamases, o principal mecanismo de resistência de microrganismos patogênicos a antibióticos β -lactâmicos. O AC tem resolvido o problema da resistência microbiana, sendo aplicado no tratamento de infecções em combinação com outros antibióticos sensíveis à ação β -lactamases. Tradicionalmente, o AC é produzido pela bactéria *Streptomyces clavuligerus* por meio de fermentações aeróbias em biorreatores convencionais. Em geral, o processo fermentativo é sujeito a efeitos de parâmetros, tais como pH, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio, condições do inóculo, agitação e fornecimento de oxigênio. Sabe-se que temperatura e pH influenciam no crescimento do microrganismo e na formação e estabilidade da molécula de AC no caldo fermentativo. No entanto, existem poucos estudos com foco nos efeitos desses dois parâmetros no processo fermentativo de produção do AC. No presente trabalho a influência da temperatura e do pH na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* foi investigada em biorreator convencional, visando a implementação novas estratégias de cultivo para melhoramento da produção de AC. Inicialmente, foram realizados quatro cultivos em batelada a 800 rpm e 2 vvm utilizando valores de temperatura e pH constantes, EF-1 (T = 30°C e pH 6,8), EF-2 (T = 30°C e pH 6,3), EF-3 (T = 25°C e pH 6,8) e EF-4 (T = 20°C e pH 6,8). Ademais, foi estudado o efeito da redução da temperatura e do pH durante os cultivos com a aplicação de diferentes condições de rampa. Foram realizados dois cultivos fixando o pH em 6,8 com redução da temperatura de 30°C para 20°C aplicando decréscimos de 1°C a cada hora e 1°C a cada 6 horas, dois ensaios fixando a temperatura em 30°C com redução do pH de 6,8 para 6,3 aplicando decréscimos 0,1 a cada hora e 0,1 a cada 6 horas, além de um ensaio reduzindo o pH (6,8 para 6,6) e a temperatura ao mesmo tempo (30°C para 27°C). Foi observado que utilização de temperaturas menores pode estender a viabilidade celular por mais tempo além de favorecer a estabilidade da molécula de AC, proporcionando maior acúmulo do produto no caldo fermentativo. A produção máxima foi alcançada na condição EF-4 (684,36 mg.L⁻¹), valor 43% maior que no cultivo controle a 30°C e pH 6,8 (EF-1). A aplicação de rampas, possivelmente, favoreceu a estabilidade da molécula de AC no caldo fermentativo e a produção máxima de AC alcançada foi similar a do cultivo controle. No entanto, a estratégia comprometeu a adaptação e o crescimento do microrganismo, resultando em menor acúmulo de AC no caldo fermentativo se comparado aos cultivos EF-3 e EF-4. Os resultados obtidos mostraram que a utilização de menores temperaturas pode ser uma estratégia promissora para melhorar o desempenho do processo de produção do AC.

Palavras-chave: ácido clavulânico, *Streptomyces clavuligerus*, pH, temperatura, stress

ABSTRACT

Clavulanic acid (CA) is a β -lactam compound with potent inhibitory activity against β -lactamases, the main resistance mechanism of pathogenic microorganisms to β -lactam antibiotics. The CA has solved the microbial resistance problem, being applied in infections treatment in combination with other sensitive antibiotics to β -lactamase activity. Traditionally, CA is produced from *Streptomyces clavuligerus* bacterium using aerobic fermentation in conventional bioreactors. In general, the fermentation process is subject to effects of parameters such as pH, temperature, carbon and nitrogen sources, inoculum conditions, stirring and oxygen supply. It is known that temperature and pH influence the microorganism growth and formation and stability of CA molecule in fermentation broth. However, there are few studies focusing on the effects of these two parameters in the fermentative process of CA production. In this work the influence of temperature and pH on CA production by *Streptomyces clavuligerus* was investigated in conventional bioreactor in order to implement new cultivation strategies for improvement the CA production. Initially, four cultivations were performed in batch at 2 vvm and 800 rpm using constant temperature and pH, EF-1 (T = 30°C and pH 6,8), EF-2 (T = 30°C and pH 6,3) EF-3 (T = 25°C and pH 6,8) and EF-4 (T = 20°C and pH 6,8). In addition, the effect of temperature and pH reduction during the cultivation was studied applying different ramp conditions. Two cultivations were conducted at pH 6,8 with temperature ramps of 30°C to 20°C decreasing 1°C every hour and 1°C every 6 hours, two conducted at temperature of 30°C with pH rampas 6,8 to 6,3 decreasing 0,1 every hour and 0,1 every 6 hours, and other one conducted applying temperature and pH ramp simultaneously. It was observed that the using of lower temperatures can extend cell viability longer and profit the CA molecule stability, providing greater product accumulation in fermentation broth. The maximum production was achieved in the EF-4 condition (684,36 mg.L⁻¹), 43% greater than the control cultivation at 30°C and pH 6,8 (EF-1). The application of ramps, possibly, profited the CA molecule stability in fermentation broth and the maximum CA production achieved was similar to control cultivation. However, the strategy interfered the microorganism adaptation and growth, resulting in lower CA accumulation in fermentation broth, compared to EF-4 and EF-3 cultivations. The results showed that using lower temperatures can be a promising strategy for improvement the performance of CA production process.

Keywords: clavulanic acid, *Streptomyces clavuligerus*, pH, temperature, stress

1. INTRODUÇÃO

Com a descoberta da penicilina em 1929 tornou-se possível o tratamento de algumas infecções causadas por bactérias. Desde então uma gama de novos antibióticos e métodos mais eficazes tem sido descoberta para o tratamento de infecções (KOHANSKI *et al.*, 2010; LIU e IMLAY, 2013). Os compostos β -lactâmicos têm sido os mais utilizados devido a sua eficácia e por causarem poucos efeitos colaterais (BAGGALEY *et al.*, 1997). No ano de 2009, o mercado global de antibióticos gerou vendas de 42 bilhões de dólares, que corresponde a 46% da venda de agentes anti-infecciosos (também inclui drogas antivirais e vacinas) e 5% do mercado farmacêutico global (HAMAD, 2010).

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

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

Nas últimas décadas o aumento do número de patógenos resistentes a antibióticos, especialmente a β -lactâmicos, tem impulsionado a busca por novos métodos no combate a infecções. Dentre as estratégias utilizadas se destaca a busca por β -lactâmicos que pudessem ser mais estáveis à ação das β -lactamases bem como de inibidores para essas enzimas. Foi nesse contexto que um grupo de pesquisadores descobriu o ácido clavulânico (AC) (BAGGALEY *et al.*, 1997).

O AC é um composto β -lactâmico com potente atividade inibidora de β -lactamases (CERRI e BADINO, 2012; DEKUN, 2013). No entanto, sua atividade antibacteriana é baixa se comparada a outros antibióticos, tornando impossível ministrá-lo isoladamente no tratamento de infecções bacterianas. O AC é frequentemente encontrado na forma de sal de potássio em conjunto com antibióticos sensíveis a ação de β -lactamases (BAGGALEY *et al.*, 1997). No Brasil é comercializado o Clavulin®, um medicamento que contém amoxicilina e clavulanato de potássio, fornecido pelos laboratórios BRAINFARMA, EMS, MEPHA, NOVARTIS,

RANBAXY E EUROFARMA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). A aplicação de combinações como estas, tem resolvido o problema da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos (BAGGALEY *et al.*, 1997).

O AC é tradicionalmente produzido pela bactéria *Streptomyces clavuligerus* por meio de processo fermentativo em biorreator do tipo tanque agitado e aerado (convencional), utilizando meio complexo contendo glicerol ou lipídeos como fonte de carbono e derivados da soja como fonte de nitrogênio (MAYER e DECKWER, 1996; WANG *et al.*, 2005; BAPTISTA-NETO *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007).

O processo de produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* tem sido extensivamente estudado em diversos aspectos, tais como melhoramento genético de linhagens (SONG *et al.*, 2010), otimização de condições nutricionais e operacionais (ORTIZ *et al.*, 2007; CERRI e BADINO, 2012) e aumento do rendimento de processos de recuperação (SILVA *et al.*, 2009). A maioria dos trabalhos tem como objetivo principal a obtenção de melhores rendimentos na produção do antibiótico. Apesar dos esforços, ainda existem poucas informações em relação ao efeito de alguns parâmetros no processo fermentativo de produção do AC, especialmente temperatura e pH. Os escassos trabalhos existentes foram realizados em mesa incubadora rotativa (COSTA E BADINO, 2012; BERSANETTI *et al.*, 2005), não simulando reais condições industriais como fornecimento de oxigênio, controle de pH e cisalhamento.

De um modo geral, em processos fermentativos o pH e a temperatura afetam diretamente o metabolismo celular, resultando em alterações no crescimento e viabilidade de células e na produção de biomoléculas (FURUKAWA e OHSUYE, 1998; HU *et al.*, 2006). Portanto, se torna evidente que os estudos envolvendo a avaliação de efeitos do pH e da temperatura em processos fermentativos são de extrema importância.

Tomando como base as informações expostas, a presente dissertação de mestrado teve como objetivo geral estudar a influência dos parâmetros pH e temperatura, visando à implementação de novas estratégias de cultivo e condições adequadas para a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator de bancada do tipo convencional. Os objetivos específicos foram:

- Investigar a influência do pH e da temperatura na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*, visando encontrar as melhores condições para o crescimento do microrganismo e produção do AC. Nesta etapa, os cultivos foram conduzidos em valores de temperatura e pH constantes.

- Investigar a influência do pH e da temperatura na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* aplicando rampas de pH e temperatura durante os cultivos visando melhorar a

produção de AC em relação aos cultivos conduzidos em temperatura e pH constantes. Nesta etapa, os cultivos foram iniciados em uma determinada condição de pH e temperatura, mas durante os ensaios os parâmetros foram manipulados para outra condição de interesse.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antibióticos β -lactâmicos

Algumas bactérias pertencentes ao grupo dos actinomicetos são capazes de produzir compostos que não estão envolvidos com o crescimento celular. A maioria desses compostos é produzida após a fase de crescimento, durante a idiofase (fase estacionária) e são denominados metabólitos secundários. Apesar de os metabólitos secundários não serem essenciais para o crescimento celular, acredita-se que eles estejam envolvidos com funções de sobrevivência na natureza (DEMAIN e FANG, 1995).

Os metabólitos secundários frequentemente apresentam estruturas moleculares mais complexas que as dos compostos que os originam, como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos. Suas estruturas podem ser formadas por anéis β -lactâmicos, peptídeos cíclicos contendo aminoácidos não proteicos, açúcares incomuns, nucleosídeos e políenios. Ao contrário dos metabólitos primários, eles são produzidos por apenas algumas espécies de gêneros, ou em casos mais extremos, algumas linhagens de espécies. O gênero *Streptomyces* é responsável por 75% de todos os metabólitos secundários produzidos por actinomicetos (DEMAIN e FANG, 1995).

A maioria dos metabólitos secundários é produzida por meio de processos fermentativos, preferencialmente utilizando biorreatores operados em batelada alimentada. Com este método é possível manter o microrganismo na fase estacionária por mais tempo além de aumentar a massa total de células, aumentando a produção do metabólito secundário de interesse (BAPTISTA-NETO *et al.*, 2005).

Dentre os metabólitos secundários os mais importantes são os antibióticos, definidos como compostos naturais ou semissintéticos que inibem ou suprimem o crescimento de bactérias (atividade antibacteriana), sendo utilizados para o tratamento e prevenção de infecções em seres humanos e animais. (KÜMMERER, 2009; PÉREZ *et al.*, 2007).

Dentre as classes de antibióticos existentes, os β -lactâmicos são os mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas (HAMAD, 2010). Os antibióticos desta classe apresentam uma característica em comum, o anel β -lactâmico, e podem ser divididos em cinco subgrupos de acordo com a estrutura molecular básica, conforme é ilustrado na Figura 2.1. (DEMAIN e ELANDER, 1999, PÉREZ *et al.*, 2007).

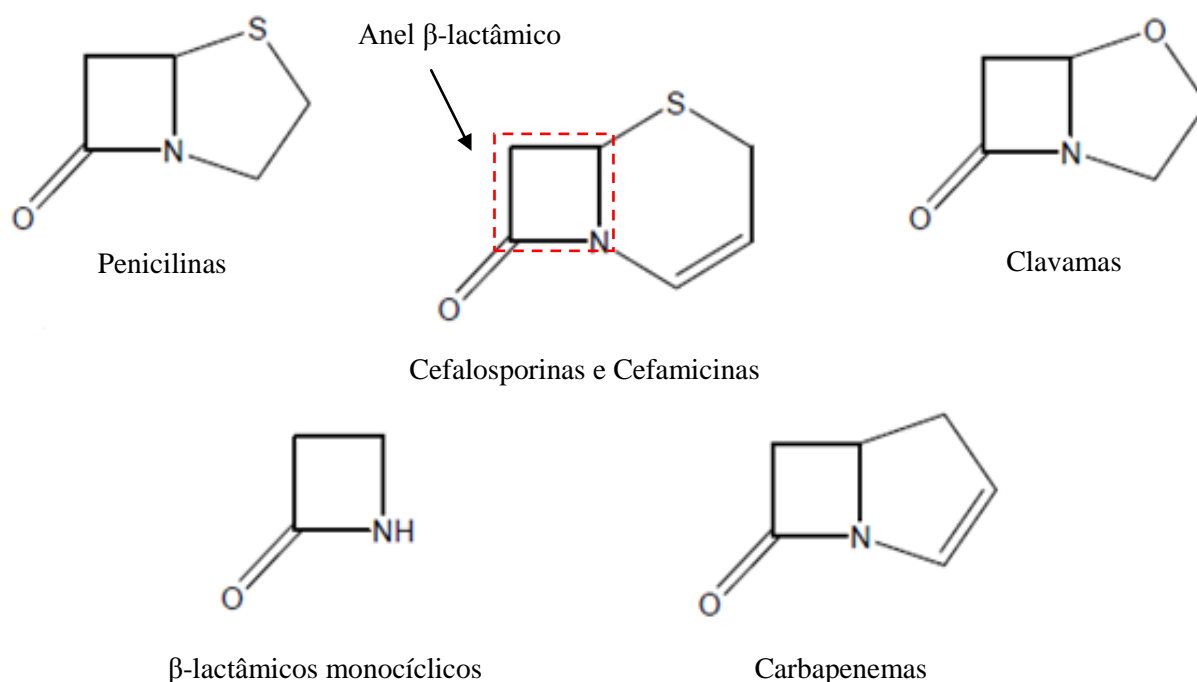


Figura 2.1. Subgrupos da classe dos antibióticos β -lactâmicos (adaptada de BAPTISTA-NETO, 2004).

Ao longo dos anos, as bactérias foram sofrendo mutações e desenvolveram mecanismos que lhes conferiram resistência a vários antibióticos, incluindo os β -lactâmicos. A resistência microbiana a antibióticos β -lactâmicos se deve à capacidade de algumas bactérias patogênicas sintetizarem β -lactamases. Estas enzimas são responsáveis pela clivagem do anel β -lactâmico, inativando os antibióticos.

2.2. Ácido clavulânico

Como consequência do aumento da resistência de algumas bactérias a antibióticos β -lactâmicos devido à ação das β -lactamases, houve a necessidade de encontrar inibidores para estas enzimas. Nesse contexto, na década de 1960 começaram-se vários esforços de microbiologistas e bioquímicos para descoberta de novos β -lactâmicos que pudessem ser mais estáveis à ação das β -lactamases bem como de inibidores para as mesmas (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Em meados da década de 1960 um grupo de pesquisadores implementou um programa de seleção de microrganismos produtores naturais de inibidores de β -lactamases. Foram coletadas amostras de solos de diferentes localidades do mundo. Os testes de inibição foram feitos em placas de Petri utilizando a bactéria *Klebsiella aerogenes*, resistente ao antibiótico β -lactâmico benzilpenicilina. Dentre as culturas microbianas testadas, a de *Streptomyces clavuligerus*

apresentou os melhores resultados por ter produzido um metabólito com pronunciada atividade inibitória de β -lactamases (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Posteriormente, a estrutura química desse composto foi elucidada por Brown *et al.* (1976), e o mesmo foi denominado ácido clavulânico, (Z)-(2R,5R)-3-(2-hidroxietilideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo(3.2.0)-heptano-2-ácido carboxílico. A estrutura molecular do AC (Figura 2.2) é formada por dois anéis, o β -lactâmico e o oxazolidino.

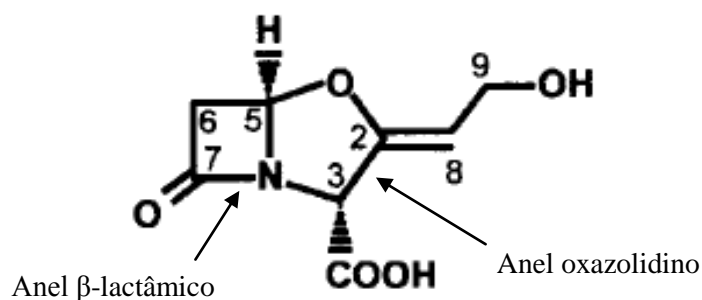


Figura 2.2. Estrutura molecular do ácido clavulânico (Fonte: LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000).

O AC consiste em uma estrutura de massa de 200 Da que não possui grupos hidrofóbicos fortes e apresenta como propriedade característica baixa estabilidade química, o que leva a baixos rendimentos de em processos de recuperação (MAYER *et al.*, 1997). O mecanismo de ação do AC consiste na sua ligação irreversível ao grupo hidroxila de uma serina no centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário estável e inativando a enzima (LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2008).

No trabalho de Brown *et al.* (1976) foi avaliada a concentração inibitória mínima de ampicilina na presença e ausência de AC. O teste foi feito contra uma colônia de bactérias produtoras de β -lactamases. Na presença de AC foi necessário $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina para agir efetivamente e extinguir a colônia. Na ausência do AC, a concentração de antibiótico necessária para obter o mesmo resultado foi de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O AC pode ser utilizado contra uma ampla variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas. No entanto, sua atividade antibacteriana é baixa se comparada a outros antibióticos, como tienamicina, cefalosporina e penicilina, o que torna inviável ministrá-lo isoladamente para o tratamento de infecções bacterianas. Dessa forma, frequentemente, o AC é encontrado em formulações juntamente com outros antibióticos β -lactâmicos sensíveis à ação de β -lactamases, tais como penicilina, cefalosporina e amoxicilina (DEKUN, 2013; CERRI e BADINO, 2012; BAGGALEY *et al.*, 1997).

No mercado farmacêutico o AC é comercializado na forma de sais de metais alcalinos, como sódio e potássio (clavulanato de sódio e clavulanato de potássio), juntamente com outros antibióticos. A empresa Glaxo SmithKline do Brasil Ltda comercializa o AC no Brasil sob a forma comercial Clavulin®, (500 mg de amoxicilina e 125 mg de AC). No exterior podem ser encontradas as formas Augmentin® e o Timentin®, sendo a última uma combinação de AC e ticarciclina (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; BAGGALEY *et al.*, 1997).

A aplicação de combinações como estas, tem resolvido o problema da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos, aumentando a eficácia do tratamento de infecções, o que faz do AC um composto importante clinicamente e economicamente (MARQUES *et al.* 2009; CERRI e BADINO, 2012).

2.3. *Streptomyces clavuligerus*

A bactéria *Streptomyces clavuligerus* foi inicialmente descrita por Higgens e Kastner (1971) como um microrganismo produtor de cefamicina C. Outros antibióticos β -lactâmicos como, penicilina N, desacetoxicefalosporina C e ácido clavulânico, e não β -lactâmicos como, holomicina e tunicamicina também foram reportados em trabalhos que utilizaram isolados de *Streptomyces clavuligerus* (LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000).

Trata-se de uma bactéria filamentosa e estritamente aeróbia, pertencente ao grupo dos actinomicetos. A maioria das espécies do gênero *Streptomyces* são mesofílicas e neutrofílicas, ou seja, crescem bem na faixa de temperatura de 28 a 45°C e em ambientes neutros. O ciclo de vida dos *Streptomyces* é formado por três etapas: germinação dos esporos, crescimento dos micélios e esporulação (BALLOWS *et al.*, 1992). A *Streptomyces clavuligerus* é formada por um micélio aéreo composto por um emaranhado de hifas ramificadas (Figura 2.3).

A característica mais importante da *Streptomyces clavuligerus* é a sua capacidade de produzir antibióticos, o que a coloca em destaque no cenário mundial da indústria farmacêutica (SAUDAGAR *et al.*, 2008; ROMERO *et al.*, 1984). Saudagar *et al.* (2008) ressaltam que a bactéria seja capaz de produzir pelo menos 21 metabólitos secundários, incluindo o AC.

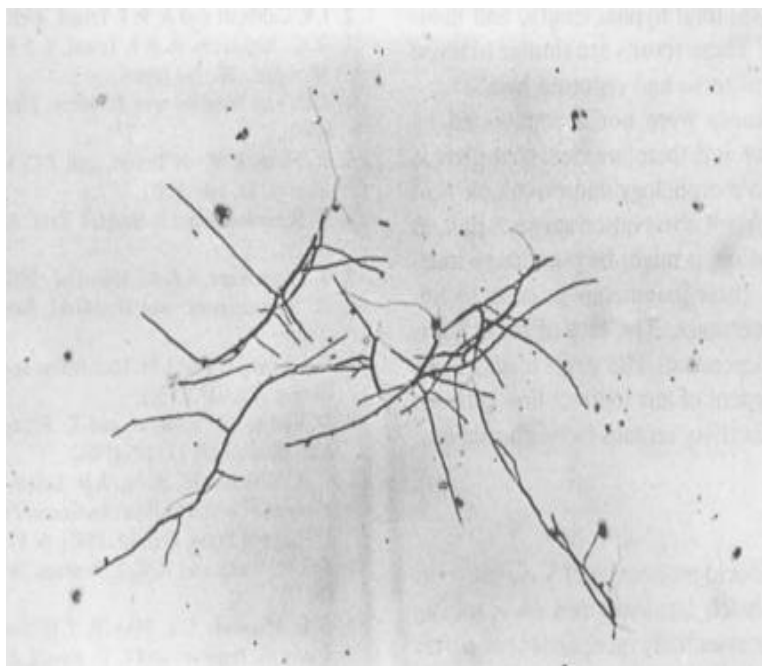


Figura 2.3. Micélio aéreo de *Streptomyces clavuligerus*. Fonte: (BELMAR-BEINY e THOMAS, 1991).

2.4. Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

O AC é tradicionalmente produzido a partir de processos fermentativos utilizando a bactéria *Streptomyces clavuligerus*. A produção de metabólitos por células microbianas ocorre em duas fases distintas. Na fase de crescimento, também conhecida como trofofase ocorre a síntese de produtos do metabolismo primário, compostos essenciais ao crescimento celular, como aminoácidos, proteínas, lipídeos e carboidratos. Quando o crescimento celular chega ao fim, devido ao esgotamento desses compostos, a trofofase dá lugar à idiofase, também conhecida como fase estacionária de crescimento, onde ocorre a síntese de metabólitos secundários, incluindo o AC e outros antibióticos (MAYER e DECKWER, 1996).

Em geral, o processo fermentativo de produção de AC é complexo e sofre a influência de vários parâmetros tais como pH, temperatura, agitação, aeração, além de fontes de carbono, nitrogênio e indutores (SAUDAGAR *et al.*, 2008). Portanto, a produção de AC requer condições de cultivo especiais e é importante considerar que tais condições afetem os parâmetros cinéticos de crescimento celular, consumo de substrato e produção do AC.

A produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* é marcadamente influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio, uma vez que o consumo das mesmas resulta no acúmulo de diferentes metabólitos no caldo fermentativo, ocasionando a degradação do AC (GOUVEIA *et al.*, 1999; KIRK *et al.*, 2000).

A composição do meio fermentativo é de fundamental importância nos bioprocessos, seja para o crescimento de microrganismos ou produção de um produto de interesse. Na literatura existem vários meios fermentativos para a produção de AC. Aqueles mais utilizados recentemente apresentam glicerol ou lipídeo como fonte de carbono e energia e derivados da soja (farinha de soja, isolado proteico de soja, farelo de soja, etc) como fonte de nitrogênio (SAUDAGAR *et al.*, 2008)

Mayer e Deckwer (1996) estudaram a produção e decomposição simultâneas de AC em cultivos com *Streptomyces clavuligerus* em meio complexo contendo farelo de soja ou extrato de farinha soja como fonte nitrogênio. Foi reportado que em cultivos com extrato de farinha de soja a produção de AC se iniciou durante a trofofase. Por outro lado, nos cultivos com farelo de soja a produção ocorreu tardiamente, durante a idiofase. Os montantes finais de AC foram menores nos cultivos com extrato de farinha de soja, possivelmente devido a maior degradação durante a fase estacionária. Os autores também reportaram que a decomposição do AC *in vivo* foi consideravelmente maior do que *in vitro* (na ausência de células). Essa diferença pode ser devido a uma possível reabsorção de AC pelas células para produção de outros metabólitos secundários ou ainda resultado da modificação da estrutura do AC para desintoxicar o meio durante a fase de crescimento.

Teodoro *et al.* (2006) avaliaram os efeitos da concentração inicial da fonte de nitrogênio no meio fermentativo. Eles concluíram que elevada concentração inicial de nitrogênio (próxima a 4,5 g.L⁻¹ de N total) resulta em maior liberação de amônia durante o cultivo devido ao catabolismo de aminoácidos. Segundo os pesquisadores, a produção de AC é inibida na presença de altas concentrações de íons amônio no caldo fermentativo. A concentração inicial de nitrogênio próxima a 3,0 g.L⁻¹ de N total proporcionou bom crescimento celular e a maior produção específica de AC ao longo de todo o cultivo. Portanto, a concentração da fonte de nitrogênio deve assegurar um crescimento celular satisfatório combinado com uma elevada biossíntese do produto de interesse.

As fontes de nitrogênio comumente utilizadas em meios de cultura como os sais de amônio, podem apresentar efeito negativo sobre o metabolismo secundário de alguns microrganismos (DEMAIN e FANG, 1995). A presença de íons amônio em quantidade suficientemente elevada pode levar à repressão de enzimas importantes do metabolismo envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio como aminoácido e ureia (WHITE, 1995).

Visser-Luirink *et al.* (2006) avaliaram o efeito de sais de amônio em processos fermentativos para produção de AC. Foi observado um aumento na produção de AC quando a

concentração de íons amônio foi mantida igual ou superior a 50 mg.L⁻¹. Por outro lado, concentrações muito elevadas inibiram a síntese de AC. Dessa forma, a concentração de íons amônio deve ser mantida em um nível que não cause citotoxicidade e ao mesmo tempo assegure boa produção de AC. Roubos *et al.* (2002) relataram que concentrações elevadas de íons amônio no meio levaram ao aumento considerável na taxa de degradação de AC. Romero *et al.* (1984) também destacaram que o excesso de íons amônio resultante do catabolismo proteico pode inibir a biossíntese de AC além de causar degradação do mesmo (ROMERO *et al.*, 1984).

Ortiz *et al.* (2007) estudaram a influência de tipos específicos de derivados da soja (farinha de soja e isolado proteico de soja) como fontes de nitrogênio para a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. A partir de experimentos em incubadora rotativa, os autores reportaram que a produção de AC foi significativamente maior nos cultivos com farinha de soja.

Hamedi *et al.* (2012) compararam o efeito da utilização da semente de amendoim e suas frações com o efeito de outras importantes fontes de nitrogênio industriais na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. Assim como em outros trabalhos (ORTIZ *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2005; SAUDAGAR *et al.*, 2008), foi demonstrado que a farinha de soja é uma boa fonte de nitrogênio tanto para a produção de AC quanto para o crescimento de *Streptomyces clavuligerus*. Os autores também reportaram que o amendoim não é a principal fonte de nitrogênio para a produção de AC, no entanto a farinha de sua semente, em uma concentração ótima, pode ser utilizada como fonte auxiliar de carbono e nitrogênio, aumentando a produção de AC.

Em geral, os carboidratos são a fonte de energia mais simples para o crescimento celular e produção de metabólitos secundários. No entanto, os produtos do seu rápido catabolismo podem atuar como inibidores na biossíntese de diversos metabólitos secundários, tais como penicilina e cefalosporina. Uma maneira de minimizar a repressão catabólica por carbono é adicionar ao meio fermentativo fontes de carbono com baixa solubilidade como lipídeos (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

Uma peculiaridade da bactéria *Streptomyces clavuligerus* é a sua incapacidade de assimilar glicose como fonte de carbono por não conseguir transportá-la através da membrana celular (ZHANG e DEMAIN, 1992). Diante deste fato e a fim de minimizar a repressão catabólica por carboidratos, diversos estudos têm sido realizados testando outras fontes de carbono e energia para produção de AC em cultivos com *Streptomyces clavuligerus*. Saudagar *et al.* (2008) relataram que a fonte mais utilizada tem sido lipídeos.

Utilizando óleo de palma e óleo de palmiste e suas várias frações como fontes de carbono, Lee e Hoo (1996) avaliaram a produção de AC e cefamicina C a partir de *Streptomyces*

clavuligerus. A oleína da palma, uma fração do óleo de palma, foi a melhor fonte de carbono para a produção de AC.

Chen *et al.* (2002) investigaram o efeito da alimentação de glicerol na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. Alimentando glicerol em reator convencional de 5L, a produção de AC alcançou um máximo de 280 mg.L^{-1} , 22% maior que a produção máxima alcançada na condição de controle em batelada (230 mg.L^{-1} em 72 h). No trabalho destes pesquisadores os experimentos foram conduzidos a temperatura de 28°C , agitação de 500 rpm e o pH controlado em 7,0.

Maranesi *et al.* (2005) estudaram o efeito de diferentes óleos vegetais (óleo de soja, óleo de girassol e óleo de milho) na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. Os resultados mostraram um comportamento similar para os três tipos de óleo utilizados, tanto em termos de produção de AC quanto de crescimento do microrganismo, mostrando que a utilização de óleos comestíveis é uma alternativa promissora a ser utilizada em processos de produção de AC.

Ortiz *et al.* (2007) realizaram experimentos utilizando glicerol e óleo de soja como fontes de carbono. Foi reportada maior produção de AC em cultivos com concentrações iniciais de lipídeos menores. Em todos os ensaios o óleo de soja começou a ser consumido somente após a exaustão de glicerol, mostrando que o glicerol é a fonte de carbono preferida. Os autores sugeriram que cultivo realizado em batelada utilizando óleo de soja como suplemento simula um cultivo em batelada alimentada, no qual o glicerol é disponibilizado no caldo fermentativo a partir da hidrólise do óleo de soja pela ação de lipases.

Romero *et al.* (1984) estudaram a regulação exercida por fontes de carbono, nitrogênio, fosfatos e enxofre na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. Foi reportada inibição na biossíntese de AC a partir de $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol, $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido glutâmico, $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ de amônio e $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato. Rius e Demain (2002) verificaram que altas concentrações de glicerol (2 a 3% m/v) podem inibir a produção de AC. Por outro lado, Romero *et al.* (1984) destacaram a importância do glicerol na biossíntese de AC, uma vez que nenhum AC foi formado na ausência desse substrato.

Chen *et al.* (2003) avaliaram o efeito de arginina, ornitina e glicerol na produção de AC por meio de cultivos em batelada e batelada alimentada em mesa incubadora rotativa. Nos experimentos em batelada foi reportado um aumento significativo na produção de AC com a adição de ornitina (200 mg.L^{-1}) comparada à produção sem a adição do aminoácido (115 mg.L^{-1}). Por outro lado, a arginina apresentou efeito desprezível na produção de AC. No mesmo trabalho, alimentando glicerol e ornitina, foi alcançada uma produção de 311 mg.L^{-1} .

2.5. Influência da temperatura e do pH na produção de AC

Em geral, as células vivas apresentam respostas a diferentes alterações externas (stress) de parâmetros como temperatura, pH, pressão, força iônica e disponibilidade de oxigênio. A resposta mais comum é a alteração na expressão de genes, levando a síntese de conjuntos específicos de proteínas e afetando diretamente o metabolismo celular. Como resultado, podem ocorrer alterações no crescimento e viabilidade de células bem como na produção de metabólitos primários e secundários (FURUKAWA e OHSUYE, 1998; KAUFMANN *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2006; COSTA e BADINO, 2012).

Condições de stress induzem em *Streptomyces* a ativação de respostas especializadas e coordenadas, incluindo síntese de antibióticos, enzimas hidrolíticas e outras proteínas relacionadas ao stress, além da diferenciação morfológica de formas vegetativas a micélios aéreos e esporos (MIKULIK e PALECKOVÁ, 2007). Diferentes fatores sigmas, moléculas que coordenam a expressão gênica, respondem a diferentes tipos de stress ambiental a partir de mecanismos de tradução únicos em linhagens de *Streptomyces*, tornando possível o crescimento de microrganismos em condições adversas (KIM *et al.*, 2008).

Servant and Mazodier (1995) estudaram os efeitos do stress térmico na tradução de proteínas em *Streptomyces albus*. Linhagens selvagens com o gene *hsp18* resistiram por mais tempo em altas temperaturas. Os autores concluíram que a proteína HSP18 desempenha um papel importante na termotolerância do microrganismo.

Vohradsky *et al.* (2000) analisaram as alterações globais na expressão de genes em resposta a condições induzidas de stress ao calor, frio, sal, etanol e presença de antibiótico, em *Streptomyces coelicolor*. Em todas as condições testadas foi observado aumento ou redução na síntese de proteínas. O stress ao frio foi responsável pelo maior aumento (53%) em relação ao controle.

Mikulik e Palecková (2007) avaliaram a produção de tetraciclina por *Streptomyces aureofaciens* na presença do antibiótico e sob stress induzido por mudanças na temperatura. Foi investigada a atividade do tmRNA, molécula responsável pela reciclagem de cromossomos estagnados durante a tradução e pela destruição de peptídeos incompletos e que não possuam função no interior das células. Foi observado aumento nos níveis de tmRNA em condições induzidas de stress ao frio, o que pode ter contribuído para a sobrevivência do microrganismo em baixas temperaturas.

Kim *et al.* (2007) e Kim *et al.* (2008) em seus trabalhos investigaram os efeitos do stress ácido na expressão de fatores sigmas e a síntese de moléculas em nível de transcrição e tradução.

Os autores demonstraram que o stress ácido induzido em culturas de *Streptomyces coelicolor* é capaz de ativar vários fatores sigmas importantes para o metabolismo secundário, além de moléculas relacionadas à biossíntese do antibiótico actinorodina. De um modo geral, a produtividade do antibiótico foi aumentada com a aplicação do stress. Ademais, o stress ácido foi considerado como um dos mais acentuados, podendo inclusive causar a iniciação prematura da fase estacionária, momento em que metabólitos secundários como antibióticos são produzidos.

Em vista dessas informações, se torna evidente que em processos fermentativos a seleção e otimização de parâmetros são aspectos chaves para que o metabolismo do microrganismo seja direcionado para a produção da biomolécula de interesse. Dentre os parâmetros mais estudados, os principais têm sido pH, temperatura de incubação, agitação, aeração, idade e quantidade do inóculo e suplementação de nutrientes tais como fonte adicional de carbono, nitrogênio e indutores, além de parâmetros para recuperação e purificação de biomoléculas (MANPREET *et al.*, 2005).

Alguns bioprocessos requerem condições controladas de pH, enquanto outras operações não controladas a fim de aumentar o rendimento e a seletividade do produto de interesse (ÇALIK *et al.*, 2003). Os efeitos do pH podem variar entre microrganismos selvagens e mutantes e de acordo com a composição do meio fermentativo (HU *et al.*, 2006). Assim como o pH, a temperatura influencia diretamente em vias metabólicas e na produção de biomoléculas em processos fermentativos. O efeito destes dois parâmetros em células de procariotos e eucariotos tem sido extensivamente estudado a fim de melhorar o rendimento e a qualidade das biomoléculas produzidas.

Furukawa e Ohsuye (1998) avaliaram o efeito da temperatura na produção de uma enzima a partir de linhagens de células recombinantes de mamífero. Aplicando baixas temperaturas durante o cultivo, os autores conseguiram aumentar a produtividade da enzima, além de suprimir o consumo de alguns nutrientes e a liberação de impurezas para o caldo fermentativo. Kaufmann *et al.* (1999) conseguiram aumentar o rendimento global de fosfatase alcalina em 3,4 vezes realizando cultivos em temperaturas mais baixas.

Çalik *et al.* (2002) investigaram a influência das condições de pH na produção de protease serina alcalina por *Bacillus licheniformis*. Eles obtiveram os melhores resultados aplicando condições não controladas de pH sob um valor inicial específico de pH. Hu *et al.* (2006) investigaram os efeitos do pH no crescimento celular e produção de astaxantina por *X. dendrorhous*. Os resultados mostraram que o pH exerceu um papel fundamental tanto no

crescimento celular quanto na formação do produto. Além disso, a condição ótima de pH para o crescimento celular foi diferente da condição ótima para a formação de astaxantina.

Conforme foi mencionado, a maioria dos processos fermentativos industriais sofre influência dos parâmetros pH e temperatura, tanto no crescimento microbiano quanto na produção de biomoléculas. No processo de produção do AC o pH e a temperatura também influenciam significativamente na estabilidade da molécula presente no caldo fermentativo, o que faz com que sua produção em larga escala pelas indústrias farmacêuticas seja minuciosa.

Bersanetti *et al.* (2005) avaliaram a estabilidade do AC em várias temperaturas (10 a 40°C) e nos valores de pH 6,2 e 7,0 a fim de determinar a melhor condição para produção de AC. Eles observaram que a estabilidade do AC em pH 6,2 é maior que em pH 7,0. Além disso, a estabilidade diminui com o aumento da temperatura. Os autores também reportaram que as constantes de degradação do AC em soluções aquosas são menores que em meios fermentativos, possivelmente, devido à presença de outros compostos no meio, como compostos de amônia. Roubos *et al.* (2002) avaliaram a degradação de AC em cultivos com *Streptomyces clavuligerus* e também foi relatada uma redução na constante de degradação de AC em baixas temperaturas.

Santos *et al.* (2009) estudaram a estabilidade do AC ao longo do tempo em diferentes condições de pH e temperatura e na presença de vários níveis de diferentes sais. Foi observado que quanto maior o tempo de exposição, maior é a instabilidade da molécula, sobretudo em valores extremos de pH (4,0 e 8,0) e em altas temperaturas (35°C e 45°C). As menores porcentagens de degradação do AC foram observadas na faixa de pH de 6,2 a 7,0. Além disso, eles noticiaram que a degradação do AC parece ser uma função da força iônica, uma vez que ela aumentou na presença de todos os sais testados. Haginaka *et al.* (1981) também realizaram estudos de estabilidade em temperatura de 35°C, força iônica de 0,5 mol.L⁻¹ na faixa de pH de 3,1 a 10,1. Foi reportado que a taxa de degradação do AC é fortemente dependente do pH e alcançou um valor mínimo no pH de 6,39.

Marques *et al.* (2009) avaliaram, por meio de parâmetros cinéticos e termodinâmicos, o efeito da temperatura na formação e degradação do AC durante a fermentação utilizando a linhagem *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060. Eles observaram que ambos os fenômenos podem ocorrer simultaneamente. A formação de AC é favorecida no início da fermentação, tornando-se negligenciada após certo período, a partir do qual a degradação passa a ser o fenômeno predominante. O autores concluíram que o AC é mais estável em pHs em torno de 6,2 e em temperaturas na faixa de 10 a 20°C.

Recentemente, Costa e Badino (2012) investigaram a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em mesa incubadora rotativa empregando diferentes condições de temperatura nos

cultivos. Os resultados mostraram que a produção de AC pode ser aumentada com a redução da temperatura de cultivo. A utilização de menores temperaturas direciona melhor o metabolismo celular para a produção de AC, além de proporcionar menores taxas de absorção de glicerol e degradação de AC, aumentando o acúmulo de AC no caldo fermentativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado em criotubos na forma de células vegetativas a -70°C suspensas em solução crioprotetora contendo 20% v/v de glicerol.

3.2. Meios de cultura utilizados

3.2.1. Meio de cultura de reativação

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al.* (2005), descrito na Tabela 3.1. O pH foi ajustado para 6,8 e o meio de cultura esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

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

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

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

⁽²⁾ Composição (g.L^{-1} em água destilada): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,0); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0).

3.2.2. Meios de cultura de crescimento e produção

O meio de cultura de crescimento teve a mesma composição do meio de cultura de produção (Tabela 3.2). Ambos foram baseados no meio proposto por Teodoro *et al.* (2006).

Tabela 3.2. Composição dos meios de cultura de crescimento e produção, baseados no meio proposto por Teodoro *et al.* (2006).

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

⁽¹⁾ MOPS: não foi necessária a adição do tampão ao meio de produção uma vez que o pH foi controlado no reator de forma automática em 6,8.

O pH dos meios de crescimento e produção foi ajustado para 6,8 com solução de HCl 1 mol.L⁻¹. A esterilização dos frascos contendo meio de crescimento foi feita em autoclave a 121°C por 20 minutos. O reator contendo maior volume de produção foi esterilizado por um tempo maior (50 minutos) para garantir completa esterilização.

O meio de cultura original proposto por Teodoro *et al.* (2006) continha óleo de soja (1 g.L⁻¹) na sua composição. Neste trabalho, o óleo de soja não foi utilizado a fim de garantir que os resultados de produção de AC e concentração de células fossem exclusivamente em função do consumo de glicerol como única fonte de carbono.

3.3. Equipamentos utilizados

A. Câmara de fluxo laminar

Foi utilizada câmara de fluxo laminar asséptica VECO BIO SEG 12 equipada com lâmpada germicida UV para garantir a manipulação asséptica do microrganismo e de todos os materiais envolvidos nos ensaios.

B. Medidor de pH

Medidor de pH de bancada QX 1500 da QUALXTRON foi utilizado para aferir o pH dos meios fermentativos e das soluções em geral.

C. Viscosímetro

As análises reológicas do caldo fermentativo foram feitas no viscosímetro LV-DVIII+ de cilindros concêntricos da BROOKFIELD.

D. Espectrofotômetro

Para a realização das análises espectrofotométricas de AC, glicerol e densidade óptica, foi utilizado o espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 PRO da AMERSHAM BIOSCIENSES.

E. Autoclave

Todos os materiais envolvidos diretamente nos ensaios fermentativos (meios de cultura, pipetas, erlenmeyers, reatores e soluções diversas) foram esterilizados em autoclave FABRE a 121°C.

F. Biorreator convencional

Neste trabalho foi utilizado o biorreator convencional da New Brunswick modelo Bioflo III (Figura 3.1), tipo tanque agitado e aerado, com volume útil de 4L. O mesmo é equipado com controlador de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e rotação, além de rotâmetro utilizado na aeração para medição da vazão de ar, e bombas para alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e soluções de ácido e base. Foram utilizados dois impelidores do tipo turbina com seis pás planas e diâmetro de 0,076 m.



Figura 3.1. Biorreator Bioflo III da New Brunswick.

G. Ultrafreezer

Os tubos contendo as amostras para análise de AC e glicerol e os criotubos contendo as suspensões celulares de *Streptomyces clavuligerus* foram armazenados em ultrafreezer BIO-FREEZER FORMA SCIENTIFIC a temperatura de -70°C .

H. Mesa incubadora rotativa

As etapas de reativação e crescimento do microrganismo e em alguns casos a etapa de produção de AC foram realizadas em mesa incubadora rotativa 430 da NOVA ÉTICA contendo controles de temperatura e rotação.

I. Centrífuga refrigerada

As amostras retiradas durante os ensaios fermentativos para as análises de AC e glicerol foram centrifugadas em centrífuga refrigerada 5403 EPPENDORF para retirada do material em suspensão.

3.4. Preservação do microrganismo

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

1. Rompeu-se de forma asséptica o tubo de liofilizado contendo células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, cedido pelo DEQ/UFSCar. Para a rehidratação do micélio foram transferidos ao tubo 2 mL do meio ISP-1 (triptona, $5,0\text{ g.L}^{-1}$ e extrato de levedura, $3,0\text{ g.L}^{-1}$). A suspensão de micélio foi transferida para um tubo contendo 4 mL do meio ISP-1, do qual 2 mL foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 mL do mesmo meio, que permaneceram estáticos por 10 dias a 30°C .

2. Decorridos os 10 dias, o conteúdo de cada Erlenmeyer foi transferido para Erlenmeyers de 500 mL contendo 40 mL do meio de cultura de Reading e Cole (1977) modificado (Tabela 3.3). Os Erlenmeyers foram incubados em mesa rotativa a 250 rpm e 30°C por 24 horas.

3. Após 24 horas, os conteúdos dos Erlenmeyers foram misturados e alíquotas de 2,5 mL da suspensão serviram de inóculo para 22,5 mL do mesmo meio em Erlenmeyers de 250 mL. Os Erlenmeyers foram incubados em mesa rotativa a 250 rpm e 30°C por 24 horas. Os conteúdos dos Erlenmeyers foram misturados e a solução resultante foi diluída em glicerol, de forma a conter 20% m/v deste na solução final. A nova suspensão foi transferida para criotubos de 3,5 mL e estes estocados em ultrafreezer a -70°C .

Tabela 3.3. Meio de cultura de Reading Cole (1977) modificado.

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

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

No decorrer do projeto o microrganismo do estoque de trabalho perdeu a viabilidade e diminuiu a capacidade de produzir AC. Desta forma, foi necessária a realização de *screenings* para a manutenção das cepas produtoras de AC, a fim de garantir um estoque de trabalho que mantenha válido os resultados obtidos experimentalmente ao longo de toda a pesquisa. Os passos para a realização do *screening* são descritos a seguir:

1. Colônias de *S. clavuligerus* foram retiradas de placas de Petri com o auxílio de uma alça de platina e estriadas em outras placas contendo o meio de Sanches e Branã (1996) (Tabela 3.4). As placas foram incubadas a 27°C por 5 a 10 dias, até atingir um bom crescimento.

Tabela 3.4. Meio de cultura de Sanches e Branã (1996).

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

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

2. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas com 5 mL do meio de reativação (Tabela 3.1) e a suspensão resultante foi transferida para tubos de ensaio contendo 5 mL do mesmo meio, que foram incubados em mesa rotativa a 250 rpm e 27°C por 24 horas.

3. Após 24 horas, 5 mL desta suspensão serviram de inóculo para 45 mL do meio de reativação em Erlenmeyers de 500 mL, e então realizou-se o cultivo completo em mesa incubadora rotativa (crescimento e produção) seguindo os mesmos passos do item 3.4.

4. Após 72 horas da etapa de produção foram retiradas amostras para análise imediata da concentração de AC. Posteriormente, 5 mL da suspensão contendo a cepa com máxima produção de AC foram transferidos para outro Erlenmeyer contendo 45 mL do meio de Reading e Cole (1977) (Tabela 3.3). Incubou-se a 250 rpm e 27°C por 24 horas e diluiu-se a solução em glicerol de forma a conter 20% m/v deste na solução final. Finalmente, a solução foi transferida para criotubos de 3,5 mL, que foram armazenados em ultrafreezer a -70°C.

3.5. Procedimento experimental dos cultivos em batelada em biorreator

O procedimento utilizado para a realização dos ensaios fermentativos foi o mesmo descrito por Rosa *et al.* (2002) e consiste em três etapas: reativação do microrganismo, crescimento e produção. Na Figura 3.2 é apresentado um esquema do procedimento experimental.

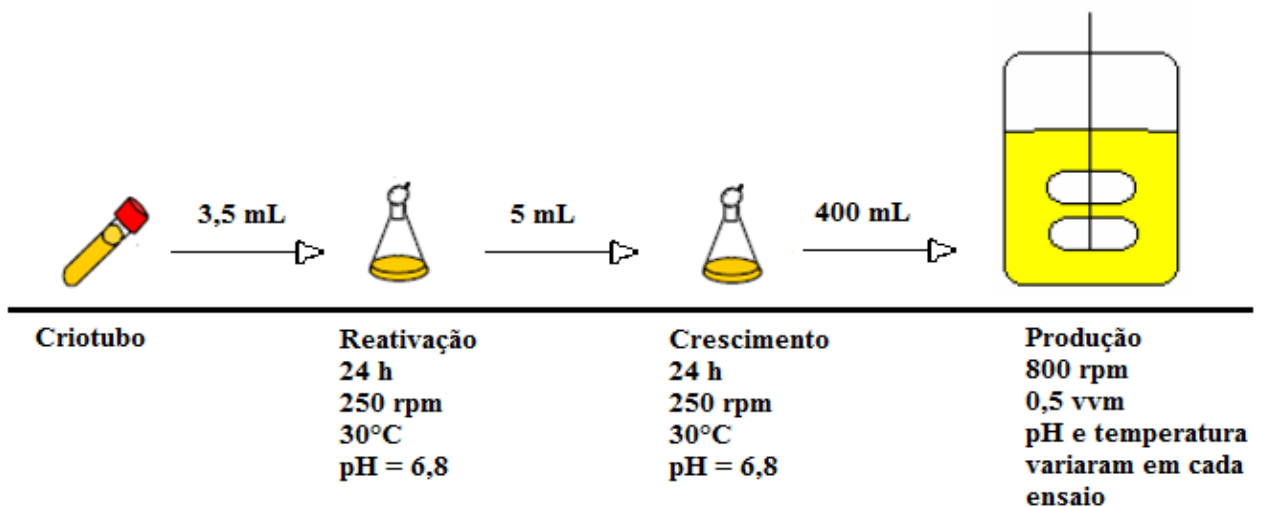


Figura 3.2. Procedimento experimental dos cultivos de *Streptomyces clavuligerus* para produção de AC em biorreator.

Na etapa de reativação, 3,5 mL da suspensão de células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus*, armazenados em criotubos, foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 47 mL de meio de reativação, e estes incubados por 24 horas a 30°C e 250 rpm.

Em seguida, na etapa de crescimento, 5 mL da suspensão resultante da reativação foram utilizados para inocular frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de crescimento. Estes foram incubados por 24 horas a 30°C e 250 rpm.

Na etapa de produção, 400 mL da suspensão de crescimento foram transferidos como inóculo para o biorreator contendo 3,6 L de meio de produção. Dessa forma o volume de trabalho foi de 4 L e o volume de inóculo correspondente a 10% do volume total de caldo. As condições de operação foram: velocidade de agitação de 800 rpm, vazão específica de 0,5 vvm e temperatura e pH variaram de acordo com a condição experimental de cada ensaio.

A etapa de produção foi realizada em um biorreator convencional do tipo tanque agitado e aerado (Figura 3.1). Ao longo da fermentação amostras foram retiradas a cada seis horas para determinação dos parâmetros reológicos (índice de consistência, K e índice de comportamento de escoamento, n), concentração celular, concentração de glicerol e concentração de AC. O pH no biorreator foi controlado através da adição de ácido ($\text{HCl } 1 \text{ mol.L}^{-1}$) e base ($\text{NaOH } 1 \text{ mol.L}^{-1}$) em todos os ensaios.

3.5.1. Cultivos em batelada a temperatura e pH constantes

Inicialmente, para a avaliação dos efeitos da temperatura e do pH na produção de AC foram realizados quatro ensaios fermentativos, cujas condições são apresentadas na Tabela 3.5. As condições escolhidas foram baseadas em algumas informações encontradas na literatura (BAPTISTA-NETO *et al.*, 2005; CERRI e BADINO, 2012, ORTIZ *et al.*, 2007; BERSANETTI *et al.*, 2005).

Tabela 3.5. Condições de pH e temperatura dos ensaios fermentativos.

Cultivo	pH	Temperatura
EF-1	6,8	30°C
EF-2	6,3	30°C
EF-3	6,8	25°C
EF-4	6,8	20°C

A grande maioria dos trabalhos existentes envolvendo produção de AC tem utilizado temperaturas em torno de 30°C e pH de 6,8 (BAPTISTA-NETO *et al.*, 2005; CERRI e BADINO, 2012, ORTIZ *et al.*, 2007). Esta condição foi utilizada no cultivo EF-1, escolhido como controle para comparação aos demais ensaios. Os cultivos EF-3 e EF-4 foram realizados na mesma condição de pH que o cultivo controle (6,8) e em temperaturas menores (25°C e 20°C, respectivamente). No cultivo EF-2 a temperatura foi mantida a mesma do controle (30°C) e o pH controlado em 6,3. A estratégia adotada para a realização dos cultivos EF-2, EF-3 e EF-4 foi

baseada na literatura, que reporta que a taxa de degradação do AC diminui com a redução da temperatura e em valores de pH levemente ácido (6,2 a 6,4) (BERSANETTI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.* 2009; HAGINAKA *et al.*, 1981; ROUBOS *et al.*, 2002; COSTA E BADINO, 2012).

3.5.2. Cultivos em batelada aplicando rampas de pH e temperatura

A aplicação de rampas permite que o processo fermentativo seja iniciado em uma determinada condição de pH e temperatura, mas no decorrer do cultivo os parâmetros são manipulados gradualmente até que seja alcançada outra condição de interesse, mantida até o final da fermentação.

Cultivos com a aplicação de rampa de temperatura: foram realizados dois cultivos aplicando rampa de temperatura (RT-1 e RT-2) No cultivo RT-1 a temperatura foi controlada em 30°C nas primeiras 12 horas e reduzida em 1°C a cada hora, alcançando 20°C após 21 horas. No cultivo RT-2 a temperatura foi controlada em 30°C por doze horas e reduzida em 1°C a cada seis horas, alcançando 20°C após 66 horas. O pH foi controlado em 6,8 durante a condução dos dois experimentos. As condições experimentais foram selecionadas tomando como base os resultados dos cultivos EF-1 (T = 30°C, pH = 6,8), EF-3 (T = 25°C, pH = 6,8) e EF-4 (T = 20°C, pH = 6,8).

Cultivos com a aplicação de rampa de pH: dois cultivos foram conduzidos aplicando rampa de pH (RPH-1 e RPH-2). No cultivo RPH-1 o pH do meio fermentativo foi controlado por 18 horas em 6,8 com posterior redução de 0,1 a cada hora, atingindo o valor de 6,3 após 22 horas. No cultivo RPH-2 o pH foi controlado em 6,8 por 18 horas com posterior redução de 0,1 a cada seis horas, atingindo o valor de 6,3 após 42 horas. A temperatura foi controlada em 30° durante condução dos dois experimentos. As condições experimentais foram selecionadas tomando como base os resultados dos cultivos EF-1 (T = 30°C, pH = 6,8) e EF-2 (T = 30°C, pH = 6,3).

Cultivo com a aplicação de rampa de pH e temperatura: foi realizado um cultivo no qual foi aplicada rampa de pH e de temperatura ao mesmo tempo (RTPH). A temperatura foi controlada por 12 horas em 30°C e reduzida em 1°C a cada 12 horas até alcançar 27°C após 36 horas, valor mantido até o final do cultivo. O pH foi controlado por 36 horas em 6,8 com posterior redução de 0,1 a cada doze horas até atingir o valor de 6,6 após 48 horas, mantido até o final. O cultivo RTPH teve suas condições definidas com bases nos resultados dos outros cultivos realizados com a aplicação de rampas (RT-1, RT-2, RPH-3 e RPH-4).

Ao todo foram realizados quatro cultivos a temperatura e pH constantes e cinco cultivos aplicando rampas, totalizando nove condições experimentais. Diante da grande demanda de tempo e da dificuldade para a realização dos ensaios, a utilização de repetições de todas as condições tornou-se inviável. Dessa forma, foi escolhida apenas uma condição experimental (RTPH) para ser realizada em duplicata e representar a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Os cultivos foram finalizados no instante em que foi detectada queda ou estabilização da concentração de AC no caldo fermentativo.

3.6. Metodologias analíticas

3.6.1. Análise da concentração de AC

Para a determinação da concentração de ácido clavulânico foi utilizado o método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982), que consiste na leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 311 nm do produto da derivatização do ácido clavulânico com o reagente imidazol. A curva de calibração (Figura 1A do Apêndice A) foi construída utilizando como padrão o AC do produto farmacêutico Clavulin®, composto por 500 mg de amoxicilina e 125 g de clavulanato de potássio (Glaxo SmithKline - Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil).

As amostras retiradas durante os ensaios fermentativos foram centrifugadas a 4°C e 3.720 x g por 15 minutos e o sobrenadante congelado em ultrafreezer a -70°C. Para posterior análise de AC as amostras foram transferidas para freezer a -20°C e, em seguida, descongeladas á temperatura ambiente. Foram preparadas duas soluções: solução A contendo 0,4 mL de amostra e 2,0 mL de solução de imidazol (60 g.L⁻¹ e pH = 6,8) e; solução B contendo 0,4 mL de amostra e 2,0 mL de água destilada. As soluções foram agitadas e incubadas a 30°C por 15 minutos. Decorrido o tempo, as absorbâncias foram lidas a 311 nm e as diferenças entre as leituras das soluções A e B utilizadas para determinar a concentração de AC a partir da curva de calibração. As medidas foram feitas em duplicatas.

3.6.2. Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por método enzimático utilizando um kit para triacilglicerídeos (Triglycerides GPO-PAP, Liquid Stable Mono-reagent, Laborlab, Brasil). Consiste em uma técnica espectrofotométrica na qual é feita a leitura a 505 nm do produto colorimétrico resultante da reação enzimática. As amostras retiradas durante os cultivos foram

centrifugadas a 4°C e 3.720 x g por 15 minutos e o sobrenadante congelado em ultrafreezer a -70°C. Para posterior análise de glicerol as amostras foram descongeladas. As medidas foram feitas em duplicatas.

3.6.3. Análise da concentração celular

Diante da dificuldade em estimar a concentração celular em cultivos envolvendo microrganismos filamentosos (*Streptomyces clavuligerus*) e meios fermentativos contendo partículas insolúveis (proteína isolada de soja), foi adaptada uma metodologia proposta por Mayer e Deckwer (1996), no qual foi utilizado meio líquido solúvel contendo Soytone® para o crescimento de *Streptomyces clavuligerus*. Durante o cultivo amostras foram retiradas e as medidas de absorvância a 600 nm (Abs_{600}) das suspensões celulares foram correlacionadas com a concentração celular (C_X) obtida por massa seca ($g.L^{-1}$) através de um modelo linear.

Para a obtenção dos dados de massa seca, a suspensão celular foi centrifugada a 3250 x g e 4°C por 15 minutos e a massa celular lavada duas vezes com solução salina (NaCl 0,9% m/v). A amostra foi colocada em estufa a 75°C para secagem e a massa de células resultante foi aferida em balança analítica até a estabilização da massa. Os ensaios foram realizados em triplicata. A curva de calibração obtida é mostrada na Figura 2A do Apêndice A.

Para a determinação da concentração celular ao longo dos cultivos, as amostras foram deixadas em repouso por 45 segundos para decantação das partículas insolúveis. A fase de topo contendo as células foi retirada e agitada em Vortex durante 30 segundos para desagregação das células e posterior leitura da absorvância a 600 nm em espectrofotômetro. As medidas Abs_{600} foram então utilizadas para estimação da concentração celular (C_X) a partir da curva de calibração. As medidas foram feitas em duplicata.

3.6.4. Análise da reologia do caldo fermentativo

Como o caldo fermentativo se comporta como um fluido pseudoplástico (Baptista-Neto, 2000), o modelo da Lei de Potência (Equação 3-1) que descreve o comportamento da tensão de cisalhamento (τ) em função do gradiente da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) foi utilizado para a estimação dos parâmetros reológicos do caldo: índice de consistência (K) e índice de comportamento do escoamento (n). As medidas foram feitas em duplicatas. Cabe ressaltar que o índice de consistência (K) está relacionado com a concentração celular (C_X), mostrando que é importante o seu monitoramento durante a fermentação.

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (\text{dina.cm}^{-2}) \quad (\text{Equação 3.1})$$

Onde:

τ : tensão de cisalhamento (dina.cm^{-2});

γ : gradiente de velocidade de cisalhamento (s^{-1});

K : índice de consistência ($\text{dina.cm}^{-2} \cdot \text{s}^n$);

n : índice de comportamento do escoamento (-).

3.7. Cálculo dos parâmetros de cultivo

3.7.1. Velocidade de consumo de glicerol (r_G)

As velocidades médias de consumo de substrato foram calculadas com base nos valores de concentração de substrato (C_s) no caldo fermentativo em função do tempo (t) (Equação 3.2):

$$r_G = \frac{C_{s_i} - C_{s(t)}}{t} \quad (\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde:

C_{s_i} : concentração de glicerol no início do cultivo (g.L^{-1});

$C_{s(t)}$: concentração de glicerol no tempo “ t ” de exaustão no caldo fermentativo ou concentração de glicerol ao final do cultivo (nos casos em que não ocorreu exaustão de glicerol) (g.L^{-1});

t : tempo de cultivo em que ocorreu exaustão de glicerol ou tempo em que o cultivo foi finalizado (nos casos em que não ocorreu exaustão de glicerol) (h).

3.7.2. Coeficiente de rendimento global de substrato (glicerol) em células (Y_{xs})

O coeficiente de rendimento global de glicerol em células foi obtido utilizando a Equação 3.3. Foram considerados os valores máximos de concentração celular no tempo “ t ” dos cultivos.

$$Y_{xs} = \frac{C_{x_{\max}} - C_{x_i}}{C_{s_i} - C_{s(t)}} \quad (\text{g}_x \cdot \text{g}_G^{-1}) \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde:

$C_{x_{\max}}$: concentração máxima de células alcançada no tempo “ t ” de cultivo (g.L^{-1});

C_{x_i} : concentração celular no início do cultivo (g.L^{-1});

Cs(t): concentração de glicerol no tempo “t” de cultivo (g.L⁻¹);

Cs_i : concentração de glicerol no início do cultivo (g.L⁻¹).

3.7.3. Coeficiente de rendimento de células em produto (AC) (Y_{px})

O coeficiente de rendimento de células em produto foi estimado através da equação 3.4. Foram considerados os valores máximos de concentração de AC no tempo “t” dos cultivos.

$$Y_{px} = \frac{C_{p_{max}} - C_{p_i}}{C_{x(t)} - C_{x_i}} \quad (g_{AC} \cdot g_X^{-1}) \quad (\text{Equação 3.4})$$

Onde:

C_{p_{max}} : concentração máxima de AC no tempo “t” de cultivo (mg.L⁻¹);

C_{p_i}: concentração de AC no início do cultivo (mg.L⁻¹);

C_{x(t)}: concentração de células no tempo “t” de cultivo (g.L⁻¹);

C_{x_i} : concentração de células no início do cultivo (g.L⁻¹).

3.7.4. Coeficiente de rendimento de substrato (glicerol) em produto (Y_{ps})

O coeficiente de rendimento de substrato (glicerol) em produto (AC) foi estimado através da Equação 3.5. Foram considerados os valores máximos de concentração de AC no tempo “t” dos cultivos.

$$Y_{ps} = \frac{C_{p_{max}} - C_{p_i}}{C_{s_i} - C_{s(t)}} \quad (g_{AC} \cdot g_G^{-1}) \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde:

C_{p_{max}} : concentração máxima de AC no tempo “t” de cultivo (mg.L⁻¹);

C_{p_i}: concentração de AC no início do cultivo (mg.L⁻¹);

Cs(t): concentração de glicerol no tempo “t” de cultivo (g.L⁻¹);

Cs_i : concentração de glicerol no início do cultivo (g.L⁻¹).

3.7.5. Produtividade máxima em AC (Pr_{max})

A produtividade máxima em AC foi calculada de acordo com a Equação 3.6.

$$Pr_{\max} = \frac{Cp_{\max}}{t} \quad (\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) \quad (\text{Equação 3.6})$$

Onde:

Cp_{max}: concentração máxima de AC no tempo “t” de cultivo (mg.L⁻¹);

t: tempo de cultivo onde Cp = Cp_{max} (h).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 4.1 são apresentados as condições experimentais e os principais resultados dos cultivos conduzidos a temperatura e pH constantes e aplicando de rampas de temperatura e pH.

Quadro 4.1. Condições experimentais e principais resultados dos cultivos conduzidos a temperatura e pH constantes (EF-1, EF-2, EF-3 e EF-4) e com a aplicação de rampas de temperatura e/ou pH (RT-1, RPH-1, RT-2, RPH-2 e RTPH).

Cultivo	EF-1	EF-2	EF-3	EF-4	RT-1	RPH-1	RT-2	RPH-2	RTPH
pH_i	6,80	6,30	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80 ± 0,01
pH_f	6,80	6,30	6,80	6,80	6,80	6,30	6,80	6,30	6,60 ± 0,01
T_i (°C)	30,0	30,0	25,0	20,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0 ± 0,1
T_f (°C)	30,0	30,0	25,0	20,0	20,0	30,0	20,0	30,0	27,0 ± 0,1
C_PMax (mg.L ⁻¹)	478,8	226,8	619,4	684,4	169,0	163,5	432,9	356,2	480,6 ± 4,0
C_xmax (g.L ⁻¹)	12,17	2,33	12,01	14,42	6,20	6,31	9,53	9,72	9,77 ± 0,26
K_{max} (dina. cm ⁻² .s ⁻ⁿ)	24,02	0,25	24,15	37,20	3,60	3,78	12,07	12,80	12,98 ± 0,96
C_sf (g.L ⁻¹)	0,00	5,10	0,00	0,00	7,15	5,21	2,06	0,03	0,82 ± 0,06
Pr_{max} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	11,62	3,13	7,96	4,96	5,69	5,52	8,34	8,71	9,49 ± 0,73
r_G (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,467	0,117	0,251	0,118	0,087	0,112	0,156	0,281	0,218 ± 0,0003
Y_{ps} (mg.g ⁻¹)	29,13	19,93	38,04	41,79	21,34	16,62	35,22	23,23	38,81 ± 0,78
Y_{xs} (g.g ⁻¹)	0,649	0,315	0,650	0,784	1,023	1,067	1,833	1,637	1,608 ± 0,041
Y_{px} (mg.g ⁻¹)	50,37	231,19	69,06	53,28	58,68	169,88	114,32	851,10	287,11 ± 11,34

(**pH_i**) pH inicial do cultivo; (**pH_f**) pH final do cultivo; (**T_i**) temperatura inicial do cultivo; (**T_f**) temperatura final do cultivo; (**C_Pmax**) concentração máxima de AC; (**C_xmax**) concentração máxima de células; (**K_{max}**) índice de consistência máximo; (**C_sf**) concentração de glicerol ao final do cultivo; (**Pr_{max}**) produtividade máxima de AC; (**r_G**) velocidade de consumo de glicerol; (**Y_{ps}**) coeficiente de rendimento de AC em relação ao glicerol; (**Y_{xs}**) coeficiente de rendimento celular em relação ao glicerol; (**Y_{px}**) coeficiente de rendimento de AC em relação às células.

4.1. Cultivos em batelada a temperatura e pH constantes

Os efeitos da temperatura e do pH na produção de AC e no crescimento do microrganismo *Streptomyces clavuligerus* foram inicialmente avaliados a partir de quatro ensaios fermentativos. O ensaio fermentativo EF-1 (temperatura de 30°C e pH de 6,8) foi utilizado como controle. Os perfis de concentração de ácido clavulânico (C_p), glicerol (C_s) e células (C_x) e a variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo são apresentados na Figura 4.1.

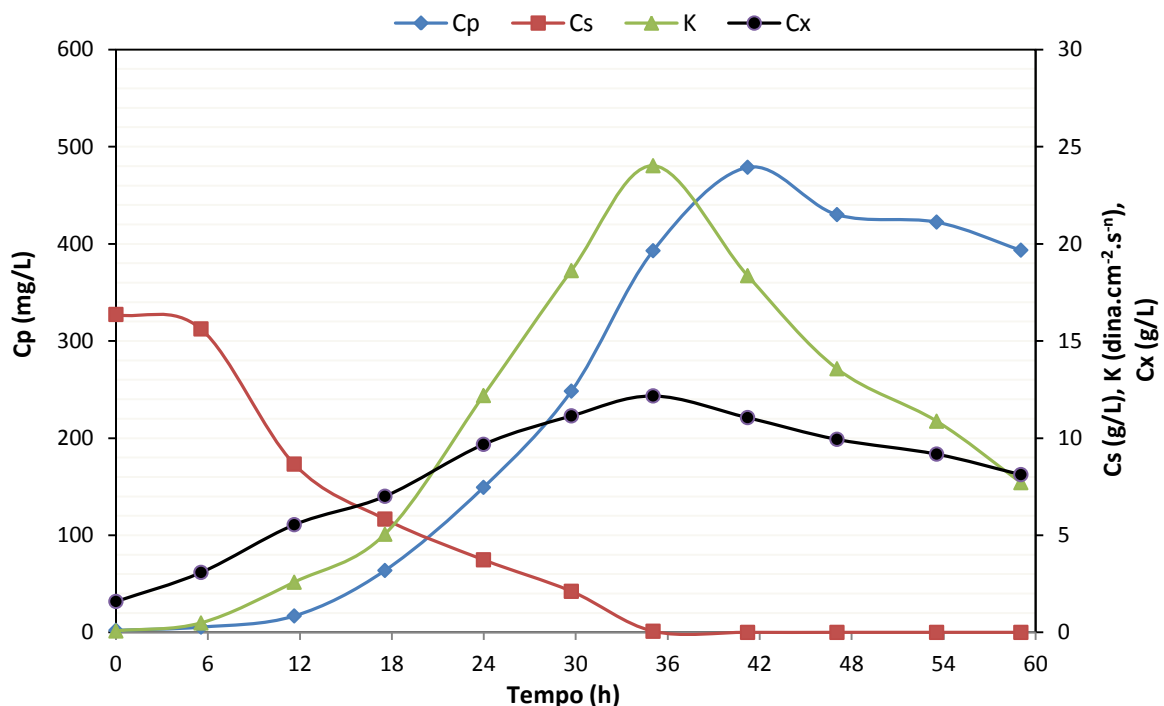


Figura 4.1. Perfis de concentração de ácido clavulânico (C_p), glicerol (C_s) e células (C_x) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo **EF-1** ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,8$).

Os resultados da Figura 4.1 mostram um decréscimo na concentração de glicerol (C_s) ao longo do tempo, alcançando zero em 36 horas. A produção máxima de AC (C_p) foi de 478,8 mg.L^{-1} em 42 horas. Após este tempo a produção decresceu. A concentração celular (C_x) e o índice de consistência (K) aumentaram ao longo do tempo até a exaustão de glicerol, mostrando que este substrato tem um importante papel no crescimento do microrganismo e na saúde estrutural das hifas. O índice de consistência está diretamente relacionado com a concentração celular e sua diminuição está relacionada com a desestruturação das hifas e lise celular (CERRI e BADINO, 2012).

A Figura 4.2 ilustra os perfis de concentração de ácido clavulânico (C_p), glicerol (C_s) e células (C_x) e a variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo do ensaio fermentativo EF-2 (temperatura de 30°C e pH de 6,3). Como se pode observar o glicerol foi consumido a uma taxa mais lenta que o controle EF-1 e não chegou a zero mesmo após 96 horas, quando a fermentação foi finalizada. A produção de AC (C_p) aumentou de forma mais lenta que no cultivo controle e permaneceu praticamente estável após 78 horas. A produção máxima ($C_{p_{max}}$) foi de apenas 226,8 mg.L⁻¹, menos da metade (47%) da produção do cultivo controle. O índice de consistência (K) permaneceu próximo de zero ao longo de todo o cultivo e a concentração de células máxima alcançada foi de apenas 2,33 g.L⁻¹, indicando comprometimento da saúde estrutural das hifas e pobre crescimento celular no valor de pH 6,3. Este resultado condiz com o que é encontrado na literatura a respeito dos actinomicetos, que são microrganismos que crescem bem em ambientes neutros a alcalinos, não crescendo bem em ambientes levemente ácidos (BALLOWS *et al.*, 1992).

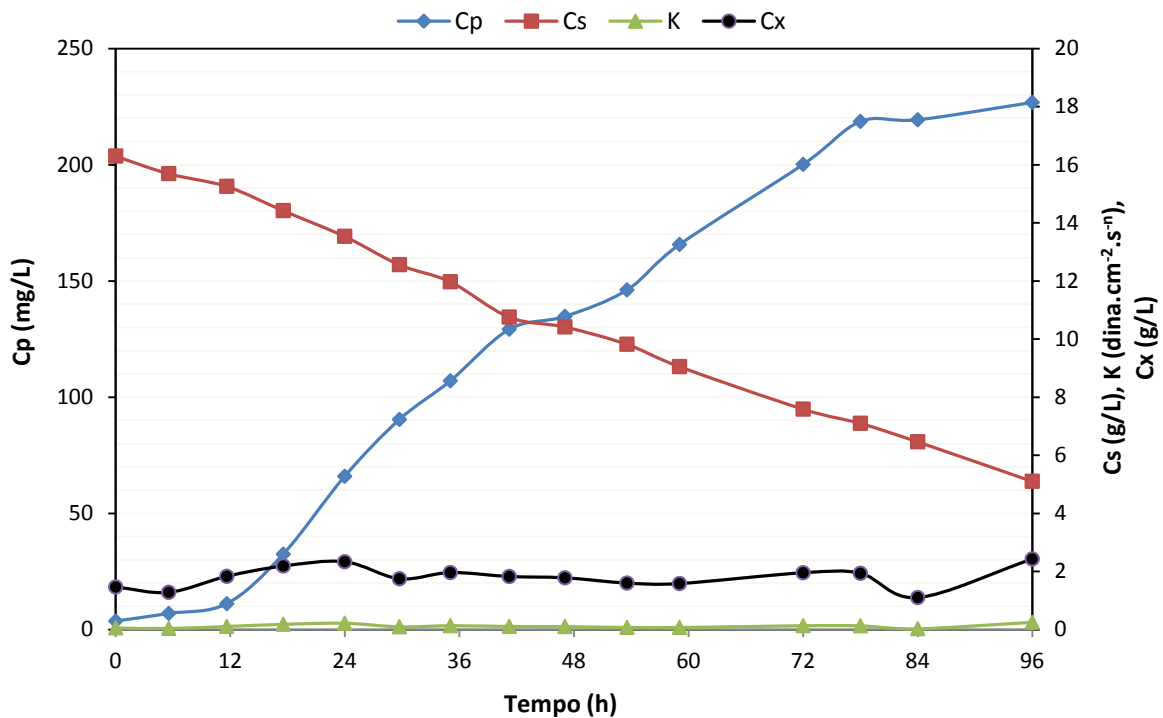


Figura 4.2. Perfis de concentração de ácido clavulânico (C_p), glicerol (C_s) e células (C_x) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo EF-2 ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,3$).

O coeficiente de rendimento de células em produto (Y_{px}) de 231,19 mg_{AC}.g_X⁻¹ foi muito maior que o do controle (50,37 mg_{AC}.g_X⁻¹). A utilização de pH mais baixo (6,3), possivelmente, favoreceu a estabilidade do AC, diminuindo a sua taxa de degradação no caldo fermentativo (BERSANETTI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.* 2009; HAGINAKA *et al.*, 1981). Portanto, mesmo

diante de baixas concentrações celulares, o controle do pH em 6,3 favoreceu o acúmulo de AC no caldo fermentativo, garantindo que não ocorresse queda nos níveis de produto no cultivo EF-2.

Os perfis de concentração de ácido clavulânico (C_P), glicerol (C_S) e células (C_X) e a variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo do cultivo EF-3 (temperatura de 25°C e pH de 6,8) são apresentados na Figura 4.3. O índice de consistência (K) e a concentração celular (C_x) atingiram valores similares aos do cultivo controle, mostrando que o microrganismo cresceu bem apesar de ter sido de forma mais lenta. A velocidade de consumo de glicerol (r_G) foi menor que cultivo controle, ocorrendo exaustão em 68 horas. A produção máxima de AC ($C_{P_{max}}$) foi de 619,43 mg.L⁻¹, 29% maior que a do cultivo controle.

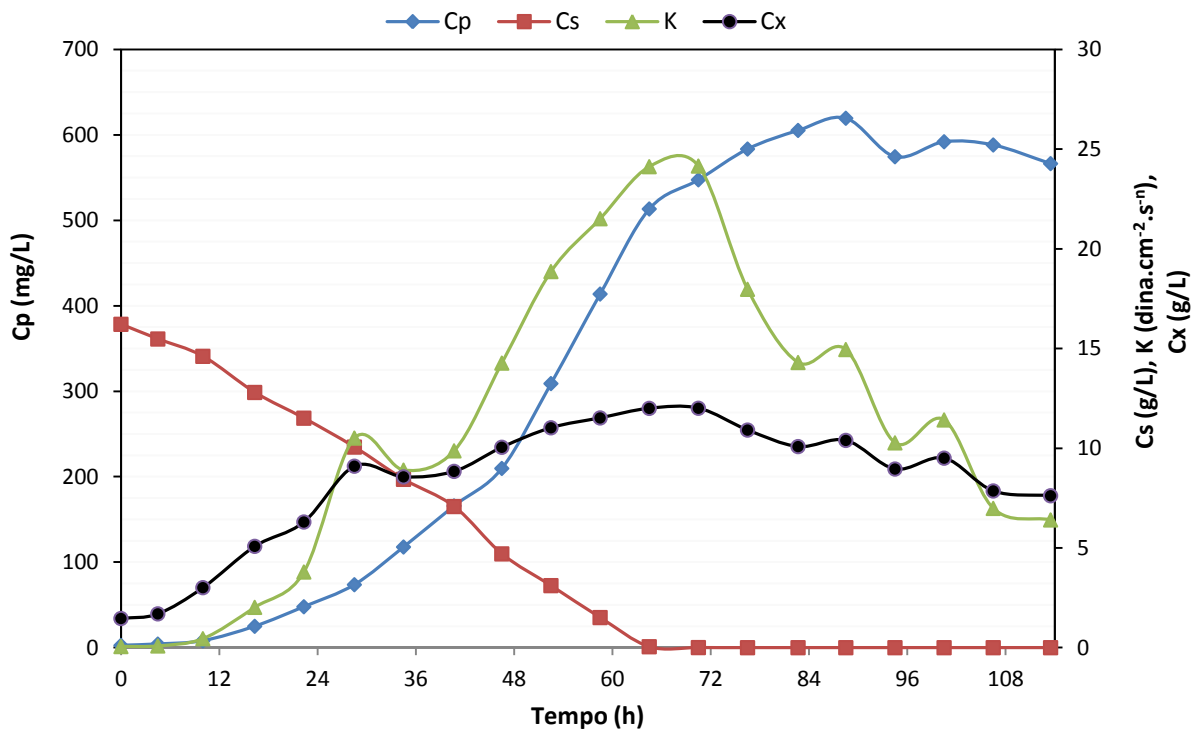


Figura 4.3. Perfis de concentração de ácido clavulânico (C_P), glicerol (C_S) e concentração celular (C_X) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo **EF-3** ($T = 25^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 6,8$).

Na Figura 4.4 são apresentados os perfis de concentração de ácido clavulânico (C_P), glicerol (C_S) e células (C_X) e a variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo do ensaio fermentativo EF-4 (temperatura de 20°C e pH de 6,8). O consumo de glicerol (C_S) foi ainda mais lento que o cultivo EF-3 em relação ao controle. O índice de consistência (K) e a concentração celular (C_X) alcançaram valores similares aos cultivos controle e EF-3. A produção de AC ocorreu em velocidade menor que no cultivo controle, mas foi alcançada a concentração máxima ($C_{P_{max}}$) de 684,36 mg.L⁻¹ em 138 horas, a maior entre todos os cultivos.

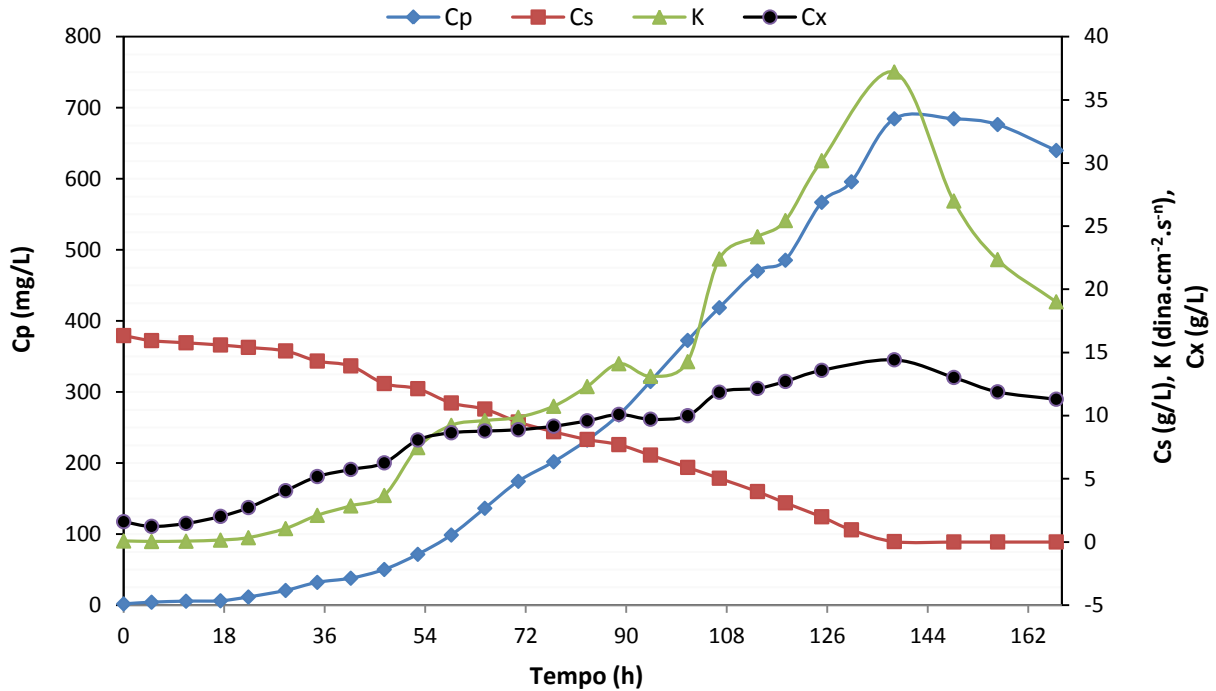


Figura 4.4. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo **EF-4** ($T = 20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 6,8$).

Os resultados dos cultivos EF-1, EF-3 e EF-4 mostram que houve efeito da temperatura sobre o crescimento celular. Embora os valores de concentração máxima de células ($C_{X_{\max}}$) tenham sido próximos nos cultivos a 30°C , 25°C e 20°C ($12,17 \text{ g.L}^{-1}$, $12,01 \text{ g.L}^{-1}$ e $14,42 \text{ g.L}^{-1}$), é importante ressaltar que a viabilidade celular se estendeu por mais tempo com a redução da temperatura, com menor decaimento da concentração celular devido à morte de células, resultando em maiores valores de coeficiente de rendimento de substrato em células (Y_{xs}) e de $C_{X_{\max}}$, alcançados no cultivo EF-4 em relação aos demais. A manutenção da viabilidade celular por mais tempo também pode ter culminado em maior acúmulo de AC no caldo fermentativo. Ademais, as produções de AC alcançadas nos cultivos EF-3 e EF-4 podem estar relacionadas com o aumento da estabilidade do AC em temperaturas menores como foi relatado por Bersanetti *et al.* (2005) e Roubos *et al.* (2002).

O coeficiente de rendimento de substrato em produto (Y_{ps}) foi aumentado com a redução da temperatura em relação ao controle ($29,13 \text{ mg}_{\text{AC}}.\text{g}_{\text{G}}^{-1}$) em consequência dos maiores níveis de produto (AC) acumulados no caldo fermentativo. Ademais, isto sugere que em maiores temperaturas o glicerol foi consumido mais rapidamente e direcionado ao metabolismo primário celular em detrimento da biossíntese de AC.

Para melhor visualização e entendimento dos resultados, na Figura 4.5 é apresentada a comparação entre os perfis de produção de AC e consumo de glicerol ao longo do tempo nos cultivos EF-1 (controle), EF-3 (25°C) e EF-4 (20°C).

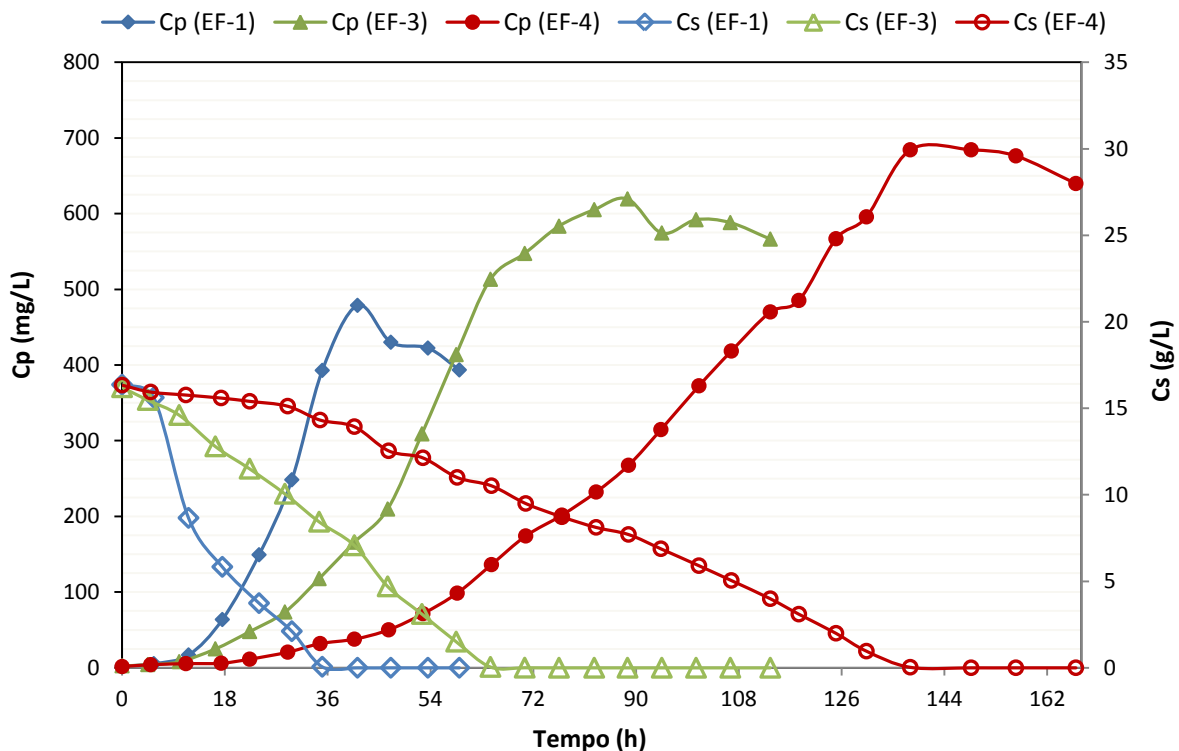


Figura 4.5. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp) e glicerol (Cs) ao longo do tempo nos cultivos EF-1 (T = 30°C, pH = 6,8), EF-3 (T = 25°C, pH = 6,8) e EF-4 (T = 20°C, pH = 6,8).

Comparando os resultados dos cultivos EF-3, EF-4 e EF-1 na Figura 4.5, pode ser notado claramente que a produção máxima de AC aumentou com a redução da temperatura, enquanto a velocidade de consumo de glicerol diminuiu com a redução da mesma ($0,467 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ a 30°C, $0,251 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ a 25°C e $0,118 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ a 20°C), condizendo com os resultados do trabalho de Costa e Badino (2012), realizado em mesa incubadora rotativa. É interessante ressaltar que nos cultivos EF-1 (controle) e EF-3 (25°C) a produção de AC continuou aumentando com a exaustão de glicerol, o que não ocorreu no cultivo EF-4 (20°C). Tal fato pode estar relacionado à absorção de glicerol para o interior das células, gerando um acúmulo que permite a continuidade da produção de AC mesmo após a exaustão do glicerol no caldo fermentativo. Possivelmente, a 20°C a absorção de glicerol pelas células de *S. clavuligerus* foi baixa a ponto de não gerar acúmulo, provocando a queda instantânea na produção de AC logo após a exaustão de glicerol.

Embora as concentrações máximas de AC tenham aumentado com a redução da temperatura, as produtividades máximas (Pr_{\max}) a 25°C ($7,96 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e a 20°C ($4,96 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram inferiores à observada no cultivo controle ($11,62 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Costa e Badino (2012) estudaram o efeito da temperatura na produção de AC em mesa incubadora rotativa. No trabalho dos autores foram realizados cultivos a 30°C, 25°C e 20°C, sendo alcançadas produções máximas de AC ($C_{p\max}$) de $168,7 \text{ mg.L}^{-1}$, $631,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1266,2 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Nas mesmas condições foram alcançados valores de $C_{p\max}$ de $478,8 \text{ mg.L}^{-1}$

(30°C), 619,4 mg.L⁻¹ (25°C) e 684,4 mg.L⁻¹ a (20°C) no presente trabalho. A produção a 30°C foi 2,8 vezes maior que no trabalho de Costa e Badino (2012), possivelmente, em consequência do melhoramento na transferência de oxigênio em biorreator combinado às altas velocidades de crescimento celular e produção de AC. No entanto, a 25°C e 20°C os valores de C_pmax foram menores que no trabalho de Costa e Badino (2012). Neste caso, apesar da transferência de oxigênio ter sido melhorada, os efeitos do cisalhamento podem ter suprimido o crescimento do microrganismo e a produção de AC. A comparação entre os resultados de Costa e Badino (2012) e os do presente trabalho também pode ser visualizada no Quadro B2 do Apêndice B.

A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada em todos os ensaios fermentativos. Em nenhum dos casos a concentração foi inferior a 60% da saturação do oxigênio (dados não mostrados), garantindo que não houvesse limitação do crescimento por falta de oxigênio.

Os resultados em todos os cultivos mostraram que o início da produção de AC coincidiu com o início do consumo de glicerol. Esta é uma característica comum em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* relatada na literatura (BATISTA-NETO *et al.*, 2005; MAYER e DECKWER, 1996).

Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos de produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em biorreatores que podem ser utilizados para comparação com os resultados do presente trabalho.

Baptista-Neto *et al.* (2005) estudaram a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* a partir de cultivos em reator convencional de 4L operado de forma contínua, em batelada e batelada alimentada utilizando meio complexo. As condições de operação foram: velocidade de agitação de 800 rpm, temperatura de 28°C, fluxo de ar de 0,5 vvm e pH 6,8. A produção máxima de AC foi alcançada no cultivo em batelada alimentada (404 mg.L⁻¹), cerca de duas vezes maior que a condição em batelada (194 mg.L⁻¹).

Recentemente, Cerri & Badino (2012) estudaram o efeito da taxa de cisalhamento na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. Os cultivos foram realizados em batelada nos biorreatores convencional de 4L (800 rpm e 0,5 vvm) e pneumático do tipo airlift de 6L, a 30°C e pH de 6,8. Os resultados em termos de produção máxima de AC mostraram que o desempenho do reator pneumático (454 mg.L⁻¹) foi melhor que o do reator convencional (402 mg.L⁻¹).

Rosa *et al.* (2005) avaliaram o efeito do suprimento de oxigênio e das condições de cisalhamento na produção de AC. Os ensaios foram realizados em biorreator convencional de 4L nas velocidades de agitação de 600, 800 e 1000 rpm, com fluxo de ar fixado em 0,5 vvm, temperatura de 28°C e pH controlado em 6,8. Nestas três condições foram alcançadas concentrações de AC de 254 mg.L⁻¹, 475 mg.L⁻¹ e 614 mg.L⁻¹, respectivamente. Os autores

concluíram que altas velocidades de agitação produzem altas taxas de cisalhamento e melhoram a produção e a produtividade de AC, provavelmente devido ao aumento da taxa de transferência de glicerol para dentro das células e de AC para fora das células.

Chen *et al.* (2002) realizaram experimentos em mesa incubadora rotativa e em reator e compararam os resultados. Em batelada e em *shaker* alcançaram a produção de 115 mg.L⁻¹ (28°C, 200 rpm e pH 7,0). Em reator conseguiram aumentar para 230 mg.L⁻¹ (28°C, 500 rpm e pH 7,0). Esse aumento possivelmente foi devido a melhores condições de aeração e o controle do pH em 7,0.

Nos trabalhos de Baptista-Neto *et al.* (2005), Cerri & Badino (2012) e Rosa *et al.* (2005) as condições de cultivo utilizadas foram similares às utilizadas neste trabalho (30°C, pH de 6,8, 800 rpm e 0,5 vvm). Em todos os trabalhos, as produções máximas de AC foram menores que a produção máxima de 478,49 mg.L⁻¹ alcançada neste trabalho nas mesmas condições, mostrando que os resultados foram satisfatórios. A comparação entre os resultados da literatura e os do presente trabalho também pode ser visualizada no Quadro B1 do Apêndice B.

4.2. Cultivos em batelada aplicando rampas de pH e temperatura

Os resultados anteriores sugerem que há uma tendência de que o microrganismo cresça mais rápido em temperaturas maiores, enquanto a formação e o acúmulo de AC são favorecidos em temperaturas menores. Ademais, o microrganismo apresentou melhor crescimento em pH 6,8, valor no qual a formação e estabilidade da molécula de AC não são favorecidas (BERSANETTI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.* 2009; HAGINAKA *et al.*, 1981). Diante dessas informações, foi proposta a estratégia de aplicação de rampas de pH e temperatura durante os cultivos, visando melhorar a produção de AC.

Quando se utiliza rampas, o processo fermentativo é iniciado em uma determinada condição experimental e, ao longo do cultivo os parâmetros são manipulados gradualmente até que seja alcançada outra condição de interesse, mantida até o final da fermentação. Esta estratégia foi aplicada no presente trabalho esperando beneficiar o crescimento celular no início do processo utilizando valores de pH e/ou temperatura maiores e a produção líquida de AC no final do processo, com a posterior redução da temperatura e/ou pH.

A influência da redução da temperatura e/ou pH na produção de AC aplicando diferentes condições de rampas foi então estudada. Inicialmente, foram realizados dois ensaios fermentativos, RPH-1 (rampa de pH 6,8-6,3 com decréscimo de 0,1 a cada 1 hora) e RT-1 (rampa de temperatura 30-20° com decréscimo de 1°C a cada 1 hora).

Os dados dos cultivos EF-1 (30°C e pH 6,8), EF-3 (25°C e pH 6,8) e EF-4 (20°C e pH 6,8) serviram como base para a definição das condições do cultivo RT-1. Analisando os resultados do ensaio fermentativo EF-1 (Figura 4.1 - controle) nota-se que a fase exponencial de crescimento do microrganismo se iniciou após 6 horas de fermentação e que após 12 horas de cultivo, a quantidade de glicerol no meio fermentativo ainda está acima da metade da concentração inicial (8,66 g.L⁻¹). Nos ensaios fermentativos EF-3 e EF-4 (Figuras 4.3 e 4.4) a fase exponencial se iniciou somente após 12 horas e 24 horas, respectivamente. Além disso, após 12 horas o glicerol presente no meio praticamente não começou a ser consumido.

Diante dessa análise, foi sugerido iniciar a rampa de temperatura a 30°C em 12 horas de fermentação e com uma taxa de declínio de 1°C por horas até 20°C. Assim espera-se que o microrganismo tenha um bom crescimento celular nas primeiras horas de cultivo, e que após 22 horas ele já esteja bem adaptado e com elevada concentração celular para produzir AC a 20°C, que supostamente é a temperatura onde o antibiótico é mais estável e sua produção é favorecida.

Para a definição das condições do cultivo RPH-1 foram utilizados como base os resultados dos cultivos EF-1 (30°C e pH 6,8) e EF-2 (30°C e pH 6,3). Foi sugerido iniciar a rampa de pH após 18 horas de fermentação, em pH de 6,8 e com uma taxa de declínio de 0,1 por hora até alcançar o pH de 6,3. A opção por iniciar a rampa de pH após 18 horas de cultivo (6 horas após o início da rampa de temperatura) é para garantir uma boa densidade celular para a produção de AC, uma vez que o microrganismo apresentou pobre crescimento celular em pH 6,3, valor no qual a molécula de AC é mais estável.

Os resultados dos cultivos RPH-1 e RT-1 em termos de perfis de concentração de ácido clavulânico (C_P), glicerol (C_S) e células (C_X) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo são apresentados nas Figuras 4.6 e 4.7, respectivamente. No cultivo RPH-1 o valor de $C_{P_{max}}$ foi de 163,5 mg.L⁻¹, similar ao $C_{P_{max}}$ do experimento RT-1 (168,7 mg.L⁻¹). No entanto, em ambos os casos a produção AC foi significativamente menor que a do cultivo controle (EF-1 - 30°C e pH 6,8). O crescimento celular entre os cultivos foi muito semelhante, atingindo valores máximos ($C_{X_{max}}$) de 6,31 em RPH-1 e 6,2 g.L⁻¹ em RT-1 após 18 horas de cultivo, aproximadamente metade do cultivo controle (12,17 g.L⁻¹). É importante salientar que os valores de concentração de células (C_X) reduziram após o início das rampas, indicando dificuldade de crescimento do microrganismo diante das condições impostas de redução da temperatura e do pH. Os valores finais de C_X no cultivo RT-1 foram ligeiramente mais elevados que os valores finais do cultivo RPH-1, assinalando que a manutenção da viabilidade celular foi mais favorecida em menores temperaturas do que em valores menores de pH.

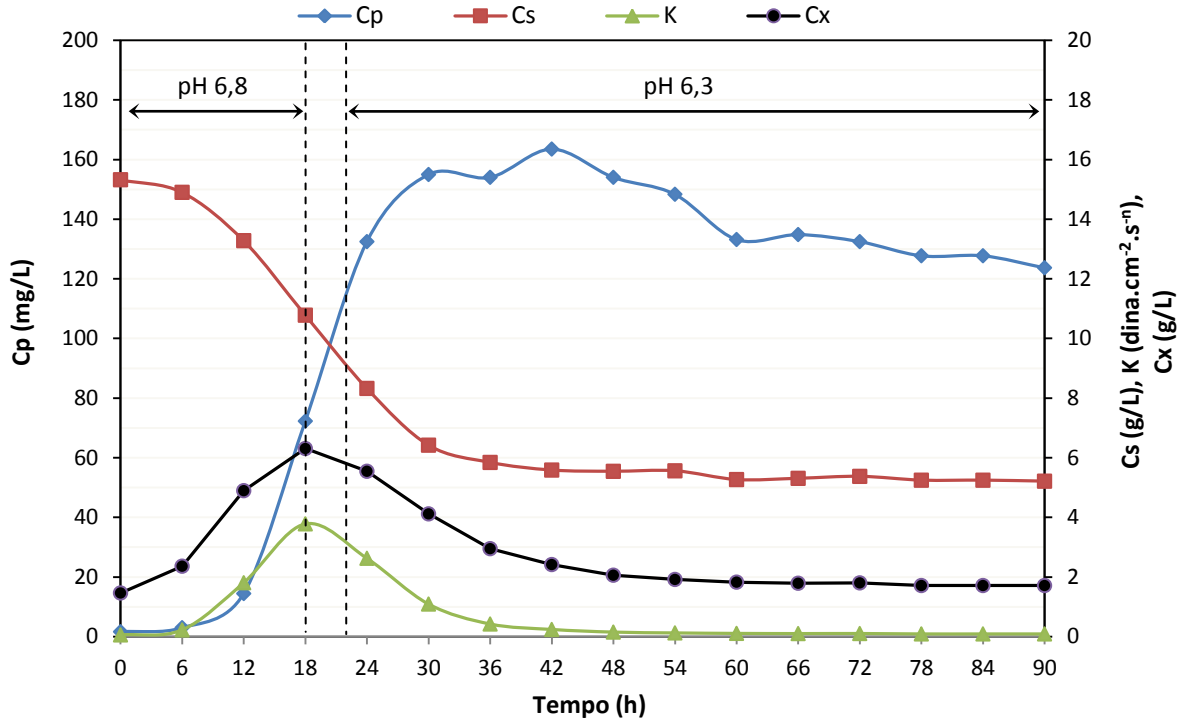


Figura 4.6. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo **RPH-1** (rampa de pH 6,8-6,3 com início em 18 horas, término em 22 horas e decréscimo de 0,1 a cada 1 hora).

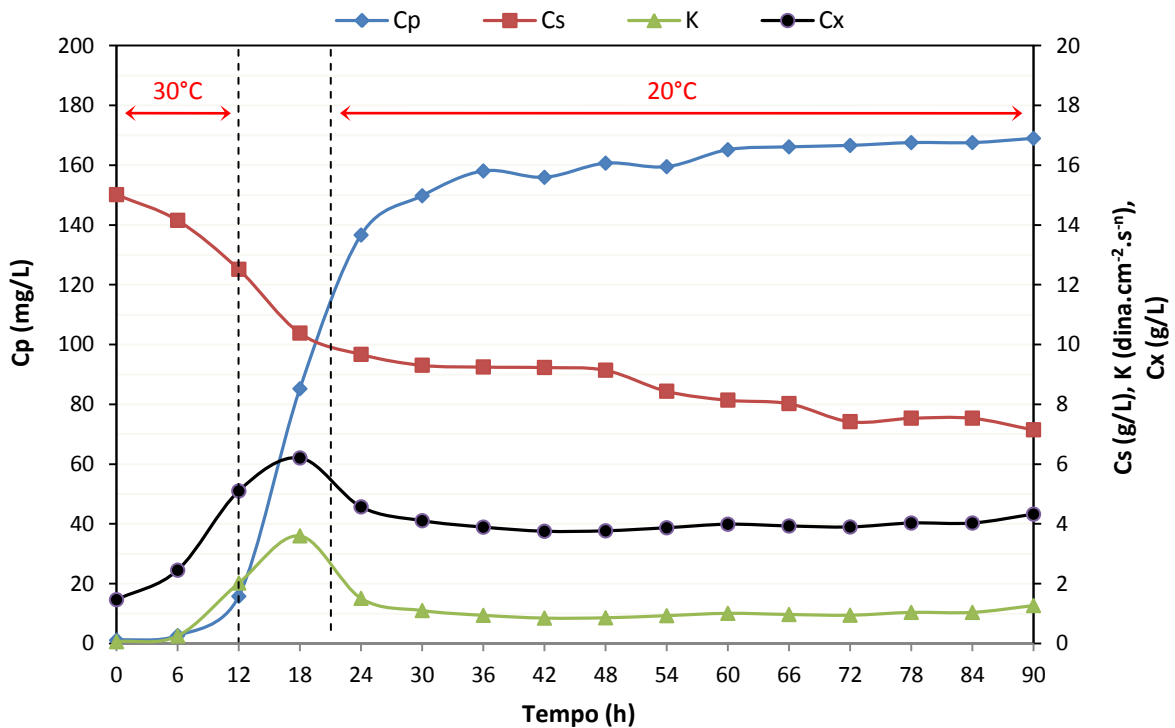


Figura 4.7. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo **RT-1** (rampa de temperatura 30-20°C com início em 12 horas, término em 21 horas e decréscimo de 1°C a cada 1 hora).

As velocidades de consumo de glicerol (r_G) nos dois cultivos (Figuras 4.6 e 4.7) foram similares ($0,087 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em RT-1 e $0,112 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em RPH-1), mas menores que no controle. Ademais, não houve exaustão de glicerol no caldo fermentativo devido ao pobre crescimento celular. Os parâmetros produtividade máxima em AC (Pr_{\max}) e coeficiente de rendimento de substrato em produto (Y_{ps}) também foram inferiores ao do cultivo controle. Os coeficientes de rendimento do produto com relação a células (Y_{px}) foram elevados ($58,68 \text{ g}_{AC}.\text{g}_X^{-1}$ em RT-1 e $169,88 \text{ g}_{AC}.\text{g}_X^{-1}$ em RPH-1) se comparados ao cultivo controle ($50,37 \text{ g}_{AC}.\text{g}_X^{-1}$), o que pode estar relacionado com o aumento da estabilidade da molécula de AC em temperatura e pH menores, favorecendo o seu acúmulo no caldo mesmo com baixa concentração celular.

Costa e Badino (2012) estudaram a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em mesa incubadora rotativa manipulando a temperatura durante o cultivo. No trabalho dos autores a produção de AC foi aumentada em relação ao controle com a redução da temperatura durante o experimento aplicando a estratégia de degrau, na qual a temperatura é reduzida de forma instantânea. Nos ensaios RPH-1 e RT-1 não foram constatadas melhorias na produção de AC, possivelmente, em consequência das condições de cisalhamento rigorosas impostas pelo sistema de agitação mecânica do biorreator, que podem ter comprometido o crescimento do microrganismo e a produção de AC. Frequentemente, em experimentos realizados em frascos são as condições de cisalhamento são mais brandas, uma vez que não se utiliza pás para agitação do caldo fermentativo. Tal fato pode ter favorecido a produção de AC no trabalho de Costa e Badino (2012) em detrimento do resultado do presente trabalho (Quadro B2 do Apêndice B).

Diante dos resultados dos cultivos RPH-1 e RT-1 foram propostos outros dois ensaios, aplicando condições de rampas diferentes. A estratégia adotada foi a redução da taxa de decréscimo nas rampas de pH e temperatura com o objetivo de melhorar a adaptação do microrganismo e a produção de AC. Foram realizados dois cultivos RPH-2 (rampa de pH 6,8-6,3 com decréscimo de 0,1 a cada 6 horas) e RT-2 (rampa de temperatura 30-20° com decréscimo de 1°C a cada 6 horas), cujos resultados são apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9, respectivamente.

Como se pode observar no Quadro 4.1 e na Figura 4.8 todos os parâmetros do cultivo RPH-2 relacionados com a produção de AC ($C_{p_{\max}} = 356,2 \text{ mg.L}^{-1}$; $Pr_{\max} = 8,71 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $Y_{ps} = 23,23 \text{ g}_{AC}.\text{g}_G^{-1}$ e $Y_{px} = 851,1 \text{ g}_{AC}.\text{g}_X^{-1}$) e com o crescimento celular ($C_{x_{\max}} = 9,72 \text{ g.L}^{-1}$; $K_{\max} = 12,8 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^{-n}$ e $Y_{xs} = 1,637 \text{ g}_X.\text{g}_{AC}^{-1}$) foram melhorados se comparados ao cultivo RPH-1. Ademais, a exaustão de glicerol no caldo fermentativo aconteceu em 54 horas de cultivo, o que não ocorreu no cultivo RPH-1, cuja taxa de consumo de glicerol foi significativamente menor. Diante desses resultados, se torna evidente que a redução na taxa de decréscimo da rampa de pH favorece a adaptação do microrganismo e, portanto, a produção de AC.

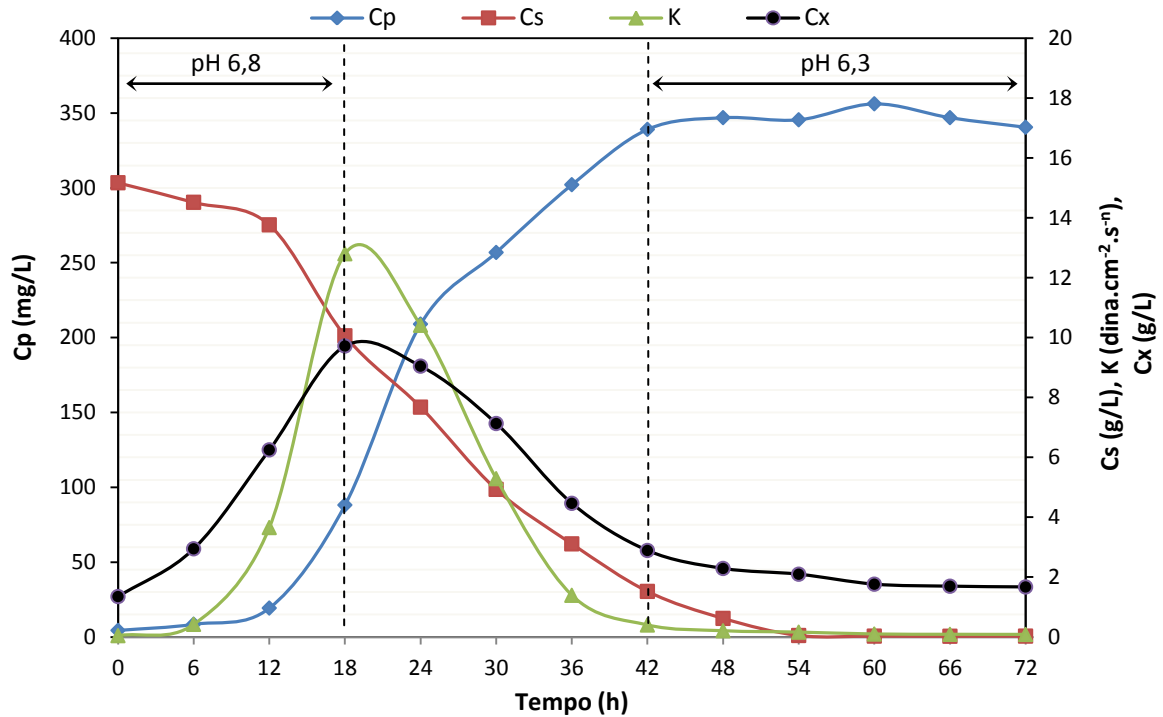


Figura 4.8. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo **RPH-2** (rampa de pH 6,8-6,3 com início em 18 horas, término em 42 horas e decréscimo de 0,1 a cada 6 horas).

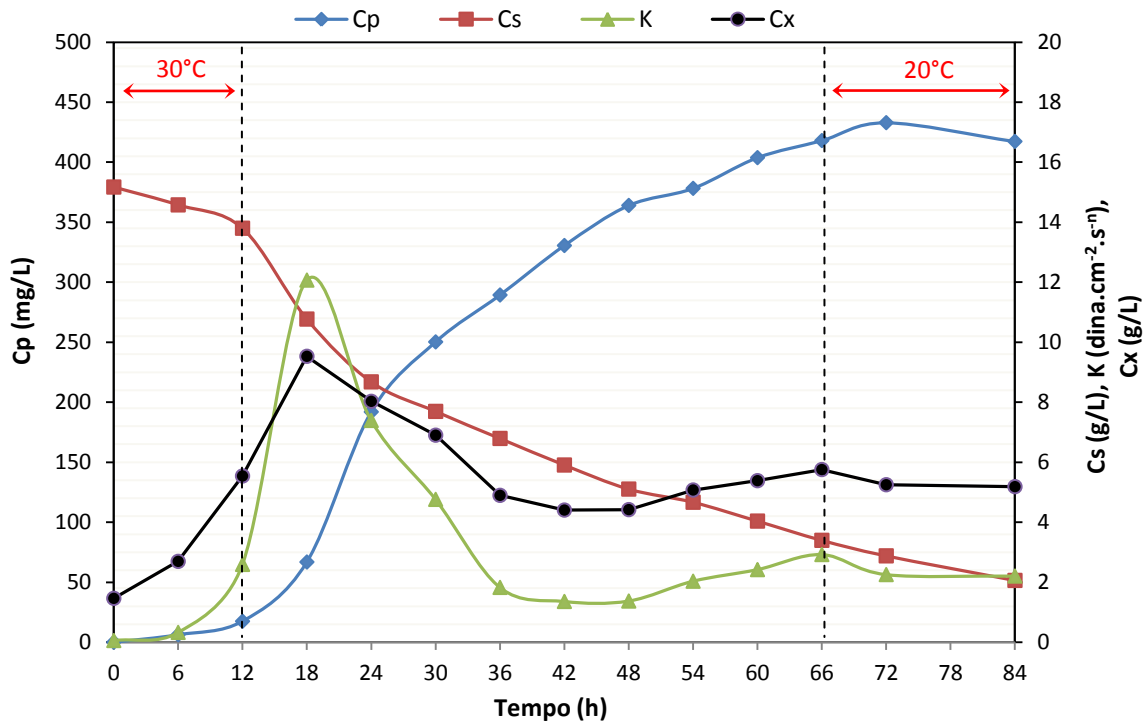


Figura 4.9. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo **RT-2** (rampa de temperatura 30-20°C com início em 12 horas, término em 66 horas e decréscimo de 1°C a cada 6 horas).

Comparados ao cultivo EF-2 ($T = 30^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 6,3$), os resultados do cultivo RPH-2 foram melhorados em termos de produção de AC ($C_{p_{\max}} = 226,8 \text{ mg.L}^{-1}$) e crescimento celular ($C_{x_{\max}} = 2,33 \text{ g.L}^{-1}$). No entanto, não houve melhoramento se comparados ao cultivo controle (EF-1) no qual a concentração celular atingiu $12,17 \text{ g.L}^{-1}$ e a produção máxima de AC $478,8 \text{ mg.L}^{-1}$.

Os resultados do cultivo RT-2 apresentados no Quadro 4.1 e na Figura 4.9 ($C_{p_{\max}} = 432,9 \text{ mg.L}^{-1}$; $C_{x_{\max}} = 9,53 \text{ g.L}^{-1}$; $K_{\max} = 12,07 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^{-n}$; $Pr_{\max} = 8,34 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $Y_{ps} = 35,22 \text{ g}_{\text{AC}}.\text{g}_{\text{G}}^{-1}$; $Y_{px} = 114,32 \text{ g}_{\text{AC}}.\text{g}_{\text{X}}^{-1}$; $Y_{xs} = 1,833 \text{ g}_{\text{X}}.\text{g}_{\text{AC}}^{-1}$ e $r_{\text{G}} = 0,156 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram melhorados em relação ao cultivo RT-1, indicando melhor adaptação do microrganismo, mas não se comparados ao controle EF-1. De um modo geral, nas rampas de temperatura foram observados desempenhos ligeiramente superiores às rampas de pH. RT-1 e RT-2 apresentaram melhor crescimento celular com manutenção da viabilidade celular por mais tempo, culminando em maiores acúmulos de antibiótico.

Em vista desses resultados, ficou claro que a estratégia de redução do pH de 6,8 para 6,3 e da temperatura de 30 para 20°C de forma mais lenta continuou comprometendo o crescimento do microrganismo e a produção líquida de AC. Visando contornar este problema, foi proposto outro experimento (RTPH) com aplicação de rampa de temperatura e pH ao mesmo tempo. As taxas redução das rampas de temperatura e pH foram reduzidas ainda mais em relação aos cultivos anteriores. A rampa de temperatura foi de 30°C para 27°C , com início em 12 horas e término 36 horas de fermentação, aplicando decréscimo de 1°C a cada 12 horas. A rampa de pH foi de 6,8 para 6,6, com início em 36 horas e término após 48 horas de fermentação, aplicando decréscimo de 0,1 a cada 12 horas. Os perfis de concentração de ácido clavulânico (C_{P}), glicerol (C_{S}) e células (C_{X}) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo do cultivo RTPH são apresentados na Figura 4.10. Como esta condição experimental foi realizada em duplicata, os dados foram tratados em relação às médias dos pontos amostrais e os desvios padrões em relação à média foram colocados na Figura 4.10. Os dados mostram que os resultados foram reprodutíveis e confiáveis.

Dentre os cultivos conduzidos com a aplicação de rampa, o RTPH foi o que proporcionou o melhor desempenho em termos de produção de AC e crescimento celular. A produção máxima de AC ($C_{p_{\max}}$) foi de $480,6 \text{ mg.L}^{-1}$, similar à produção máxima do cultivo controle ($478,8 \text{ mg.L}^{-1}$). No entanto, a produtividade máxima (Pr_{\max}) foi de $9,49 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, aproximadamente 20% menor que no cultivo controle, mas maior que a produtividade máxima dos outros cultivos conduzidos em temperatura constante (EF-3 e EF-4). A concentração máxima de células ($C_{x_{\max}}$) atingida foi de $9,77 \text{ g.L}^{-1}$, inferior ao controle e similar aos valores alcançados nos cultivos RT-2

e RPH-2. No entanto, vale ressaltar que a concentração de células se manteve viável por mais tempo durante o cultivo, o que possivelmente favoreceu a produção e o acúmulo de AC no caldo fermentativo em comparação aos outros ensaios com rampa. A taxa de consumo de glicerol (r_G) foi de $0,218 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e não ocorreu a exaustão completa no caldo fermentativo.

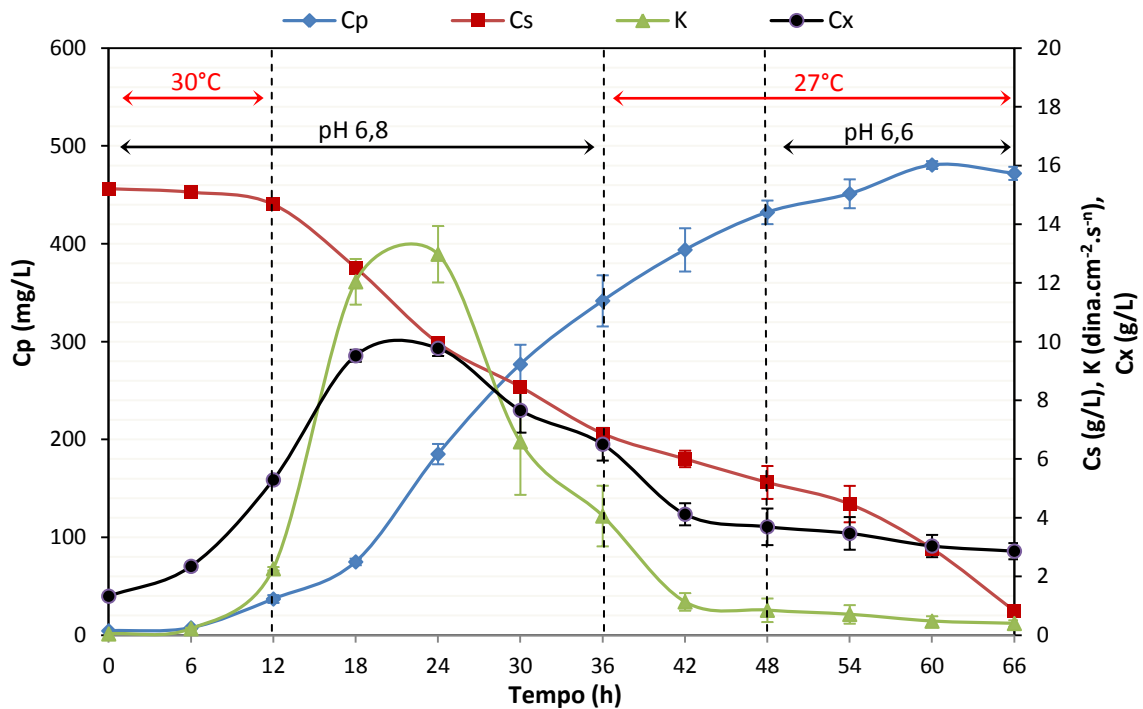


Figura 4.10. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs) e concentração celular (Cx) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no ensaio fermentativo **RTPH** com barras de desvio padrão da média da duplicata (rampa de temperatura 30-27°C com início em 12 horas, término em 36 horas e decréscimo de 1°C a cada 12 horas; rampa de pH 6,8-6,6 com início em 36 horas, término em 48 horas e decréscimo de 0,1 a cada 12 horas).

Apesar dos resultados melhorados em relação às outras rampas, ainda pode ser notada uma influência negativa na adaptação do microrganismo e produção de AC quando as condições de pH e temperatura são reduzidas durante a condução dos ensaios. Possivelmente, as taxas de crescimento do microrganismo não foram elevadas o suficiente para contornar o problema do rigoroso cisalhamento imposto pelas condições de agitação, impedindo que resultados melhores fossem alcançados.

Os rendimentos de células em produto (Y_{px}) dos cultivos com rampa foram todos superiores ao do controle (50,37 mg/g), sugerindo que para uma mesma massa de células maiores quantidades de AC foram produzidas. Esse efeito pode estar associado com a questão do aumento da estabilidade da molécula de AC com a redução do pH e da temperatura, favorecendo o acúmulo de produto no caldo, em detrimento do baixo crescimento celular.

Ademais, é importante ressaltar que os valores de Y_{px} dos cultivos com rampa de pH foram os mais expressivos se comparados ao controle e às rampas de temperatura, alcançando $169,88 \text{ g}_{AC} \cdot \text{g}_X^{-1}$ em RPH-1 e $851,10 \text{ g}_{AC} \cdot \text{g}_X^{-1}$ em RPH-2. Uma possível explicação para este fato está ligada à capacidade dos *Streptomyces* em responder de forma especializada e coordenada a alterações externas adversas. Alguns trabalhos têm demonstrado que dentre os tipos de perturbações induzidas, o stress ácido é o mais acentuado, influenciando uma ampla variedade de fatores sigmas e até mesmo proteínas relacionadas a outros tipos de stress. Kim *et al.* (2007) aplicaram stress ácido em culturas de *Streptomyces coelicolor*, visando aumentar a produção de actinorodina e investigar mudanças na síntese de proteínas em nível de transcrição e tradução. Após a redução do pH foi observado aumento na expressão de quatro genes regulatórios conhecidos, associados com a biossíntese de actinorodina, o que resultou no aumento da produção do antibiótico. A expressão de genes de moléculas e enzimas diretamente associadas com a produção e secreção da actinorodina também foi aumentada. Ademais, vias metabólicas maiores, como glicólise, ciclo de Krebs e pentose fosfato foram ativadas. De um modo geral, o stress ácido contribuiu positivamente para o estímulo da biossíntese do antibiótico, aumentando seus níveis intracelulares e extracelulares, mas não o crescimento celular. Os autores ainda deduziram que a fase estacionária foi ativada de forma antecipada, resultando na iniciação precoce da produção de actinorodina e em ganhos de produtividade. Em outro trabalho, Kim *et al.* (2008) investigaram os efeitos do stress por pH ácido na expressão de fatores sigma e proteínas relacionadas ao stress em *Streptomyces coelicolor* A3(2). O stress ácido influenciou vários fatores sigmas e proteínas. Alguns genes ligados à regulação e outros à ativação da via de biossíntese do antibiótico actinorodina tiveram a expressão aumentada em 5 vezes em relação ao controle (sem stress ácido), resultando no aumento da produtividade do antibiótico. Apesar de ainda não existirem estudos envolvendo *Streptomyces clavuligerus*, a hipótese do aumento da expressão de genes importantes para o metabolismo secundário a partir do stress ácido pode ser utilizada para explicar os altos valores de Y_{px} alcançados nos cultivos com rampa de pH do presente trabalho. Assim, pode ser inferido que mesmo não favorecendo o aumento do crescimento celular, o stress ácido contribuiu para o aumento da expressão de genes regulatórios, enzimas diretamente ligadas à biossíntese de AC e outras enzimas de vias maiores importantes, resultando numa maior proporção produto/células no caldo fermentativo.

Para melhor visualização e comparação dos resultados, foram traçados na Figura 4.11 os perfis de produção de AC dos cultivos conduzidos em valores de pH constantes (EF-1 e EF-2) e com rampas de pH (RPH-1, RPH-2 e RTPH), e na Figura 4.12 os perfis de produção de AC dos

cultivos em temperatura constante (EF-1, EF-3 e EF-4) e com rampas de temperatura (RT-1, RT-2 e RTPH).

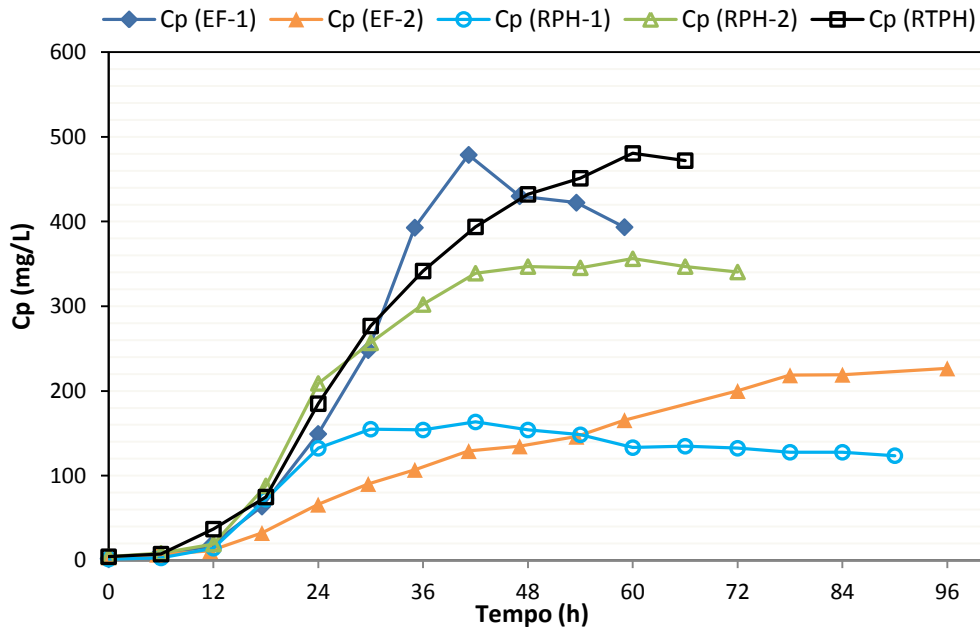


Figura 4.11. Perfis de produção de AC dos cultivos conduzidos em valores de pH constantes (EF-1 e EF-2) e com aplicação de rampas de pH (RPH-1, RPH-2 e RTPH).

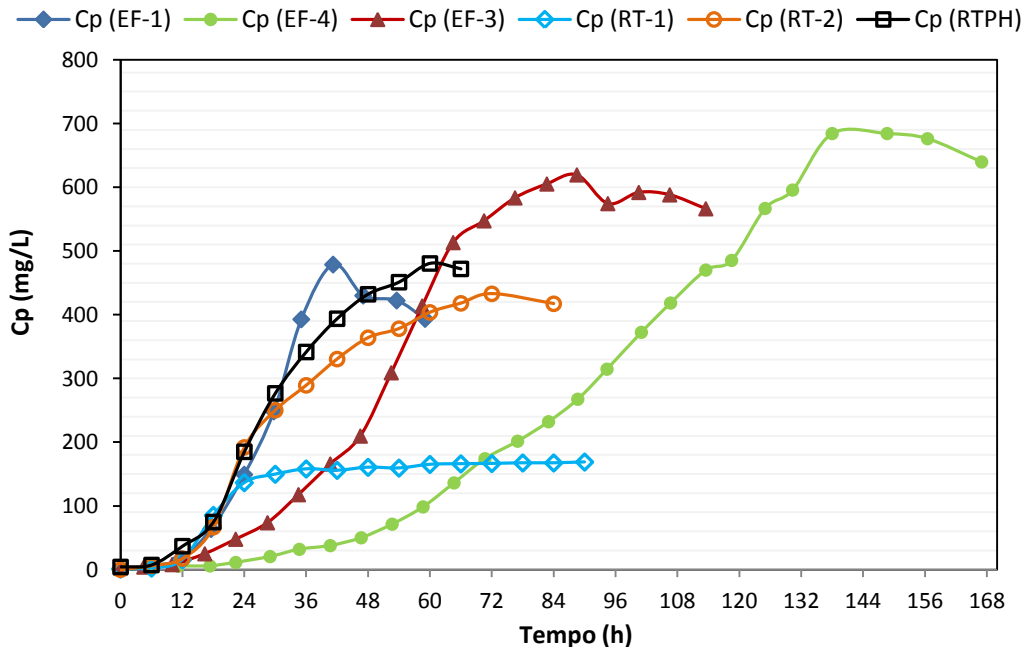


Figura 4.12. Perfis de produção de AC dos cultivos conduzidos em temperaturas constantes (EF-1, EF-3 e EF-4) e com aplicação de rampas de temperatura (RT-1, RT-2 e RTPH).

Analisando as Figuras 4.11 e 4.12 é notória a diferença entre os perfis de produção de AC das rampas de pH e temperatura e dos cultivos conduzidos em temperatura e pH constantes. A

produção de AC foi melhorada nos cultivos RPH-2 e RT-2 em relação aos cultivos RPH-1 e RT-1 com a redução da taxa de decréscimo nas rampas. No cultivo RTPH a produção de AC foi melhorada ainda mais quando comparado a RPH-2 e RT-2, se igualando ao cultivo controle (EF-1). Embora a aplicação de diferentes condições de rampa tenha favorecido a adaptação do microrganismo e conseqüentemente a produção de AC, em nenhum dos casos a concentração de AC superou a dos cultivos EF-3 ($T = 25^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 6,8$) e EF-4 ($T = 20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 6,8$).

5. CONCLUSÕES

A produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* foi influenciada pela temperatura e pH. Nos cultivos realizados a temperatura e pH constantes, a produção de AC foi melhorada com a utilização de temperaturas menores durante os ensaios fermentativos. A produção máxima de AC foi alcançada no cultivo EF-4 (684,36 mg.L⁻¹) na condição de 20°C e pH 6,8. Este resultado pode ser atribuído ao aumento da estabilidade da molécula de AC em baixas temperaturas, reduzindo a sua degradação no caldo fermentativo, e ao bom crescimento do microrganismo mesmo em baixas temperaturas combinado com o prolongamento da viabilidade celular, resultando em maior acúmulo de AC no meio. Por outro lado, a utilização de um valor de pH mais baixo no cultivo EF-2 (pH de 6,3) não contribuiu para o aumento da produção de AC, possivelmente, devido ao pobre crescimento do microrganismo e ao comprometimento da saúde estrutural das hifas.

Dentre os cultivos com redução de temperatura e pH, o experimento RTPH, no qual foi aplicada rampa de pH e temperatura ao mesmo tempo, foi o que proporcionou o melhor desempenho em termos de produção de AC e crescimento celular. No entanto, o desempenho não foi melhorado em relação ao cultivo controle (478,8 mg.L⁻¹). Os menores níveis de AC alcançados nos cultivos com rampas em comparação aos cultivos com temperatura e pH constantes foram atribuídos à dificuldade de adaptação e crescimento do microrganismo sob condições de stress ácido, stress com a redução de temperatura e stress ao rigoroso cisalhamento imposto pelas condições de agitação. Embora a produção de AC não tenha sido melhorada, é importante enfatizar os altos valores dos coeficientes de rendimento de células em produto (Y_{px}) dos cultivos com rampas, especialmente nos ensaios RPH-1 e RPH-2. Este resultado, além de ser atribuído ao aumento da estabilidade da molécula de AC em valores de temperatura e pH menores, pode eventualmente, estar relacionado com o aumento da síntese de moléculas importantes para a biossíntese do AC sob condições de stress ácido. Ambos os fatores podem ter favorecido o acúmulo de AC no caldo fermentativo mesmo com baixo crescimento celular, fazendo aumentar a relação produto/massa de células.

A utilização de cultivos conduzidos em baixa temperatura representa uma estratégia com potencial de melhorar o desempenho do processo de produção do AC, principalmente em aplicações industriais. Ademais, os resultados das rampas indicam que a manipulação da temperatura e do pH pode ser uma estratégia promissora e deixa espaço para novos estudos devido aos altos valores de Y_{px} alcançados, visando, sobretudo, melhoramento de processos de purificação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Lista de genéricos registrados. 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/registrados.htm>> Acessado em 28 de jul. de 2014.

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

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

BAPTISTA-NETO, A.; HIRATA, D.B.; CASSIANO FILHO, L.C.M.; BELLÃO, C.; BADINO, A.C.; HOKKA, C.O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.22, p.557-564, 2005.

BAPTISTA-NETO, A. Estudos cinéticos e reológicos do processo descontínuo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Dissertação de Mestrado, Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, 2000.

BAPTISTA-NETO, A. Estudo do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular. Tese de Doutorado, Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, 2004.

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

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

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

BELMAR-BEINY, M.T.; THOMAS, C.R. Morphology and clavulanic acid production of *streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p.456-462, 1991.

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

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

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

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

ÇALIK, P.; BILIR, E.; ÇALIK, G.; TUNÇER H.; ÖZDAMAR, T.D. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme Microb Technol**, v.31, p.685-697, 2002.

ÇALIK, P.; BILIR, E.; ÇALIK, G.; TUNÇER H.; ÖZDAMAR, T.D. Bioreactor operation parameters as tools for metabolic regulations in fermentation processes: influence of pH conditions. **Chem. Eng. Sci.**, v.58, p.759-766, 2003.

DEKUN, G.; YOUBAO, Z.; KEQIAN, Y. Coordination of glycerol utilization and clavulanic acid biosynthesis to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Sci. China Life Sci.**, v. 56, p.591-600, 2013.

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

DEMAIN, A.L.; ELANDER, R.P. The β -lactam antibiotic: past, present and future, **Antonie van Leeuwenhoek**, v.75, p.5-19, 1999.

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

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

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

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

HAMEDI, J.; IMANPARAST, F.; TIRANDAZ, H.; LAAMERAD, B.; SADRAI, S. Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with peanut derivatives. **Ann Microbiol**, v.62, p.1227-1234, 2012.

HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a P-Lactam Antibiotic Producer. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v.21, p.326-331, 1971.

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

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

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

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

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

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

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I, **Chemosphere**, v.75, p.417-434, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

MAYER, A.F.; HARTMANN, F.; DECKWER, W.D. Diffusivities of clavulanic acid in porous sorption systems with ion pairing. **Chemical Engineering Science**, v.52, p.4561-4568, 1997.

MIKULIK, K.; PALECKOVÁ, P. Activity of ribosomes and tmRNA of *Streptomyces aureofaciens* during development and stress conditions induced by changes in temperature and the presence of antibiotics. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends, **Applied Microbiology**, 2007.

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

PÉREZ, M.I.B.; RODRÍGUEZ L.C.; CRUCES-BLANCO, C. Analysis of different β -lactams antibiotics in pharmaceutical preparations using micellar electrokinetic capillary chromatography, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.746-752, 2007.

READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid: a b-lactam from *Streptomyces clavuligerus*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.11, p.852 -857, 1977.

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

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

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

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

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

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

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

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

SERVANT, P.; MAZODIER, P. Characterization of *Streptomyces albus* 18-Kilodalton Heat Shock-Responsive Protein. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.11, p.2998-3003, 1995.

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

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

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

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

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

VOHRADSKY, J.; LI, X.M.; DALE, G. FOLCHER, M.; NGUYEN, L.; VIOLLIER, P.H.; THOMPSON, C.J. Developmental Control of Stress Stimulons in *Streptomyces coelicolor* Revealed by Statistical Analyses of Global Gene Expression Patterns. *Journal of Bacteriology*, v.182, n.17, p.4979-4986, 2000.

WANG, Y.; REN, J.I.E.; DONG, M.; LIANG, D.; XU. A Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, **Proc. Biochemistry**, v.40, p. 1161-1166, 2005.

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

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

APÊNDICE A

Curvas de calibração

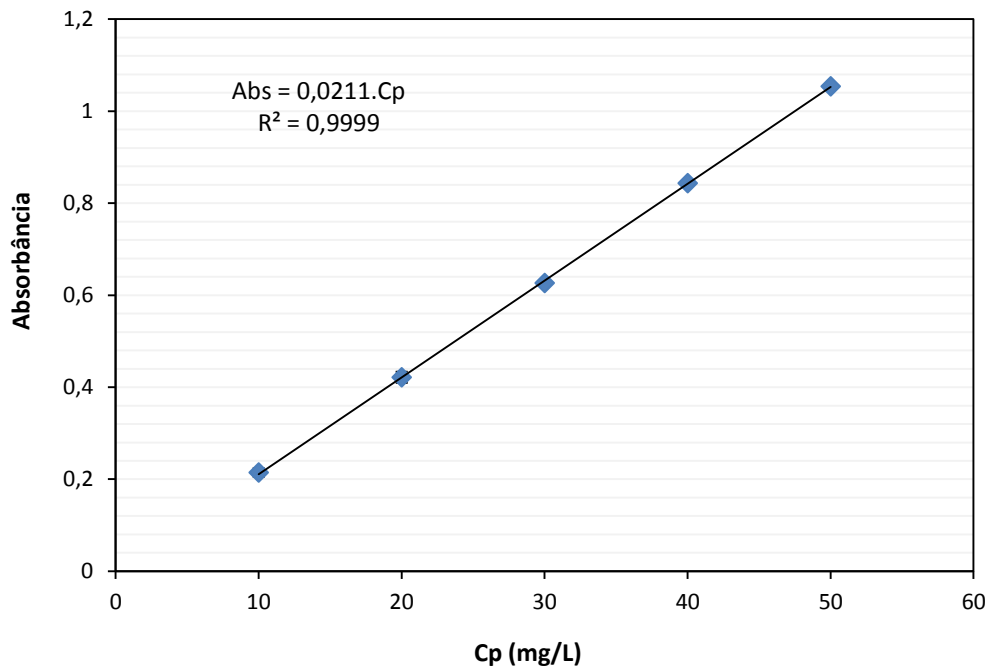


Figura A1. Curva de calibração do ácido clavulânico, equação do modelo e coeficiente de correlação linear.

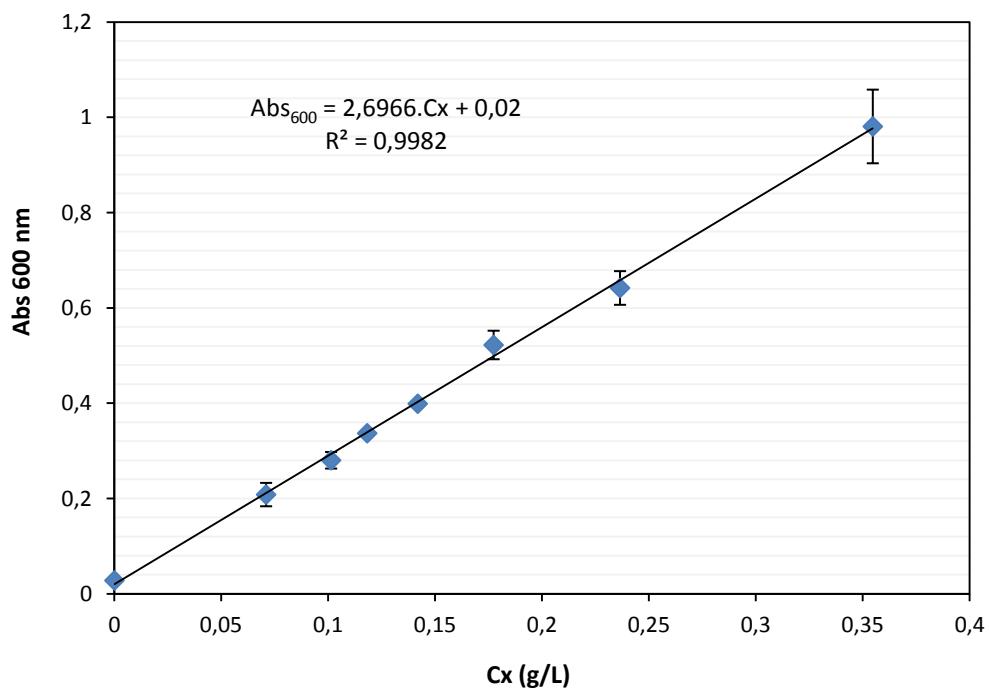


Figura A2. Curva de calibração para determinação da concentração celular em função das medidas de Abs_{600} , equação do modelo e coeficiente de correlação linear.

APÊNDICE B

Quadros de comparação entre os resultados da literatura e do presente trabalho

Quadro B1. Comparação entre os resultados da literatura e do cultivo controle do presente trabalho, em termos de produção máxima de AC (Cp_{max}).

Trabalho	Reator e volume útil	Agitação e vazão de ar	pH e temperatura	Cp_{max} (mg.L ⁻¹)
Baptista-Neto et al. (2005)	Convencional de 4 L	800 rpm e 0,5 vvm	T = 28°C pH = 6,8	194
Chen et al. (2002)	Convencional de 4 L	500 rpm	T = 28°C pH = 7,0	230
Cerri & Badino (2012)	Convencional de 4 L	800 rpm e 0,5 vvm	T = 30°C pH = 6,8	402
Cerri & Badino (2012)	Airlift de 6 L	3,0 vvm	T = 30°C pH = 6,8	454
Rosa et al. (2005)	Convencional de 6 L	800 rpm e 0,5 vvm	T = 28°C pH = 6,8	475
Presente trabalho	Convencional de 4 L	800 rpm e 0,5 vvm	T = 30°C pH = 6,8	478,49

Quadro B2. Comparação entre os resultados do presente trabalho (biorreator) e do trabalho de Costa e Badino (2012) (mesa incubadora rotativa), em termos de produção máxima de AC (Cp_{max}) e produtividade máxima em AC (Pr_{max}).

Condição	Presente Trabalho		Costa e Badino (2012)	
	Cp_{max} (mg.L ⁻¹)	Pr_{max} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Cp_{max} (mg.L ⁻¹)	Pr_{max} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
EF-1 (30°C)	478,8	11,62	168,7	2,7
EF-3 (25°C)	619,4	7,96	631,6	6,4
EF-4 (20°C)	684,4	4,96	1266,2	7,5
RT-1 (30-20°C)	169,0	5,69	382,7	3,1
RT-2 (30-20°C)	432,9	8,34	382,7	3,1