



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ASPARAGINA E L-TREONINA SOBRE A
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces clavuligerus*

Amanda Cristina Castro Silva

Orientadora: Profa. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Junho/2015

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ASPARAGINA E L-TREONINA SOBRE A
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces clavuligerus*

Amanda Cristina Castro Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em
cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del-Rei.

Orientadora: Profa. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Junho/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ASPARAGINA E L-TREONINA SOBRE A
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces clavuligerus***

Amanda Cristina Castro Silva

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Orientadora: Profa. Sandra de Cássia Dias

Examinador 1: Prof. Edson Romano Nucci

Examinador 2: Profa. Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco, __/__/____

RESUMO

Em virtude do uso indiscriminado de antibióticos, com o passar do tempo, as bactérias foram se tornando resistentes aos mesmos. No caso dos antibióticos β -lactâmicos, essa resistência se deve à produção de enzimas capazes de clivar o anel β -lactâmico, inativando o antibiótico. A partir deste contexto, houve a descoberta do ácido clavulânico, um composto capaz de inibir a atividade destas enzimas e, portanto, passou a ser parte das formulações de diversos antibióticos β -lactâmicos. Este composto é produzido pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*, a partir de meios fermentativos específicos. A composição destes meios é de fundamental importância para o crescimento do micro-organismo e produção do produto de interesse. Os meios mais recentemente utilizados na produção de ácido clavulânico apresentam glicerol como fonte de carbono e energia e derivados da soja como fonte de nitrogênio. Neste trabalho a produção de ácido clavulânico foi avaliada em meios fermentativos suplementados com os aminoácidos L-Asparagina e L-Treonina, em diferentes concentrações, de acordo com o Planejamento Experimental Fatorial 2². Ambos os aminoácidos apresentaram influência na produção de ácido clavulânico. A L-Asparagina teve um efeito significativo, porém negativo, enquanto a L-Treonina apresentou efeito positivo. A interação entre os dois aminoácidos foi negativa para a produção de ácido clavulânico.

Palavras-chave: Ácido clavulânico, *Streptomyces clavuligerus*, L-Asparagina, L-Treonina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVO.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Antibióticos β -lactâmicos.....	7
3.2. Ácido clavulânico.....	7
3.3. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	9
3.4. Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i>	9
3.5. Biossíntese do ácido clavulânico.....	10
3.6. Planejamento Experimental Fatorial 2 ²	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Micro-organismo.....	14
4.2. Meios de cultura.....	14
4.2.1. Meio de cultura de reativação.....	14
4.2.2. Meios de cultura de crescimento e produção.....	14
4.3. Preservação do micro-organismo.....	15
4.4. Cultivos em mesa incubadora rotativa.....	15
4.5. Planejamento Experimental Fatorial 2 ²	16
4.6. Preparo das soluções de aminoácidos.....	17
4.7. Metodologia analítica para determinação da concentração de AC.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1. Curva de calibração do ácido clavulânico.....	19
5.2. Produção de ácido clavulânico.....	19
5.3. Análise do Planejamento Experimental Fatorial 2 ²	21
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina em 1929 abriu a possibilidade do tratamento de algumas infecções causadas por bactérias, que antes não podiam ser tratadas. A partir de então, tem sido descoberta uma gama de novos antibióticos cada vez mais eficazes para o tratamento de infecções (KOHANSKI *et al.*, 2010; LIU e IMLAY, 2013). Os antibióticos β -lactâmicos são os mais utilizados devido à sua eficácia e sua capacidade de causar poucos efeitos colaterais, além do amplo espectro de ação (BAGGALEY *et al.*, 1997).

A aplicação de antibióticos se mostrou muito eficiente no tratamento de várias infecções causadas por bactérias ao longo dos anos, entretanto, seu uso indiscriminado resultou no surgimento de micro-organismos patogênicos cada vez mais resistentes. Esta resistência é uma consequência inevitável de processos seletivos sofridos por estes micro-organismos, e que acabam por culminar na adaptação bacteriana à exposição a esses antibióticos (ESSACK, 2001; SPELLBERG *et al.*, 2013).

Os antibióticos β -lactâmicos são uns dos que mais sofrem essa resistência por parte das bactérias. Essa resistência, em especial, se deve à capacidade de algumas bactérias sintetizarem enzimas denominadas β -lactamases, as quais são capazes de clivar o anel β -lactâmico presente nesses antibióticos, causando a inativação desses compostos. Essa resistência bacteriana tem consequências importantes, uma vez que os antibióticos β -lactâmicos, principalmente os dos grupos das penicilinas e cefalosporinas, representam aproximadamente 45% dos antibióticos usados sistematicamente, em virtude de sua disponibilidade e eficácia (HAMAD, 2010; SAUDAGAR *et al.*, 2008).

O surgimento constante de patógenos resistentes aos antibióticos β -lactâmicos tem impulsionado a busca por novos métodos no combate a infecções. Para tanto, as estratégias a serem utilizadas passam pela busca por β -lactâmicos mais estáveis à ação das β -lactamases bem como de inibidores para essas enzimas. Foi nesse contexto, então, que em 1976, Brown *et al.* descobriram um metabólito secundário sintetizado pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*, o qual mostrou uma potente ação inibitória de β -lactamases, sendo denominado ácido clavulânico (AC). A atividade antibacteriana do AC não é suficiente para que este seja administrado isoladamente no tratamento de infecções bacterianas e, portanto, o mesmo é frequentemente encontrado na forma de sal de potássio, associado a antibióticos sensíveis a ação de β -lactamases (BAGGALEY *et al.*, 1997).

O ácido clavulânico é um fármaco de alto valor agregado, que apresenta baixa produtividade, sendo este o principal desafio para sua obtenção em larga escala. Além disso,

até o presente momento, o Brasil não dispõe de tecnologias viáveis para a produção de AC em escala industrial. Assim, as associações farmacêuticas comercializadas no país, que contêm o AC, são provenientes de multinacionais (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Tradicionalmente, o AC é produzido pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*, através de processo fermentativo em biorreator do tipo tanque agitado e aerado (convencional), utilizando um meio complexo contendo glicerol como fonte de carbono e derivados da soja como fonte de nitrogênio (ROSA *et al.*, 2005). A maioria dos trabalhos envolvendo a produção do AC tem como principal objetivo a obtenção de melhores rendimentos, através da otimização em várias vertentes. Ainda assim, existem poucas informações a respeito da influência de alguns parâmetros no processo de produção do AC, por exemplo, não é claro o modo como a suplementação com aminoácidos afeta a produção de AC (COSTA E BADINO, 2012).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em meio fermentativo suplementado com aminoácidos, através de um planejamento experimental estatístico, denominado Planejamento Experimental Fatorial 2², onde as variáveis independentes foram as concentrações dos aminoácidos L-Asparagina (Asn) e L-Treonina (Tre) e a resposta foi a produção de AC.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Antibióticos β -lactâmicos

Certas bactérias, pertencentes ao grupo dos actinomicetos, são capazes de sintetizar compostos que não estão envolvidos com o crescimento celular. Grande parte desses compostos é produzida após a fase de crescimento, durante a fase estacionária, e são denominados metabólitos secundários (DEMAIN e FANG, 1995).

Em geral, os metabólitos secundários apresentam estruturas moleculares mais complexas que as dos compostos originários, como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos. Ao contrário dos metabólitos primários, os secundários são produzidos por apenas algumas espécies, ou até mesmo por apenas algumas linhagens. De todos os metabólitos secundários produzidos por actinomicetos, 75% são produzidos pelo gênero *Streptomyces* (DEMAIN e FANG, 1995).

Dentre os metabólitos secundários mais conhecidos, os principais são os antibióticos, definidos como compostos naturais ou semissintéticos, capazes de inibir ou suprimir o crescimento bacteriano, sendo utilizados para o tratamento e prevenção de infecções em seres humanos ou animais. Os antibióticos β -lactâmicos são os mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Sua principal característica é a presença do anel β -lactâmico (PÉREZ *et al.*, 2007).

Com o passar dos anos as bactérias foram sofrendo mutações desenvolvendo, assim, mecanismos de resistência a vários antibióticos, incluindo os β -lactâmicos. A estes, especialmente, a resistência bacteriana se deve à capacidade de algumas bactérias patogênicas sintetizarem enzimas denominadas β -lactamases, as quais são responsáveis pela clivagem do anel β -lactâmico, causando a inativação dos antibióticos (DEMAIN e FANG, 1995).

3.2. Ácido Clavulânico

O aumento da resistência de certas bactérias aos antibióticos β -lactâmicos, através da ação das β -lactamases, fez necessária a busca por inibidores de tais enzimas. Foi neste contexto que, na década de 1960, diversos pesquisadores se mobilizaram a fim de descobrir novos β -lactâmicos mais estáveis à ação das β -lactamases, bem como inibidores para as mesmas (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Brown *et al.* (1976) elucidaram a estrutura química de um composto que havia sido descoberto em 1960, denominando-o ácido clavulânico. Este composto é um metabólito secundário β -lactâmico, produzido por *Streptomyces clavuligerus*, dotado de potente atividade inibitória de β -lactamases (SAUDAGAR *et al.*, 2008). Seu mecanismo de ação consiste na ligação irreversível do mesmo ao grupo hidroxila de uma serina do centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário estável e, assim, inativando a enzima (LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000). A Figura 3.1 apresenta a estrutura do AC, dando destaque ao anel β -lactâmico, característico dos antibióticos β -lactâmicos.

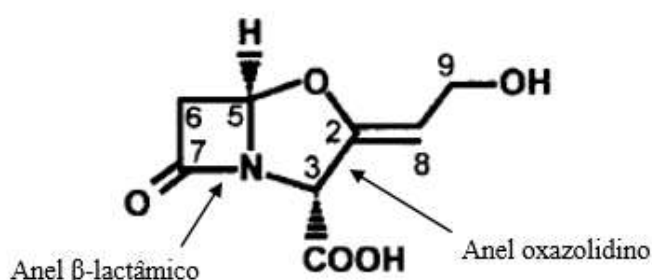


Figura 3.1 - Estrutura molecular do ácido clavulânico (LIRAS E RODRÍGUEZ-GARCIA, 2000).

A ação eficaz do AC fez com que este fosse, cada vez mais, administrado clinicamente em conjunto com antibióticos β -lactâmicos sensíveis às β -lactamases para o tratamento de doenças causadas por muitas bactérias patogênicas (SAUDAGAR *et al.*, 2008). O AC pode ser utilizado contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e negativas, entretanto, se comparado a outros antibióticos β -lactâmicos, o mesmo possui baixa atividade antibacteriana, tornando inviável sua administração isolada para o tratamento de infecções bacterianas. Tendo em vista este fato, o AC é frequentemente encontrado em formulações associado a outros antibióticos β -lactâmicos que, sozinhos, são sensíveis às β -lactamases (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Na indústria farmacêutica o AC é encontrado na forma de sais de metais alcalinos, juntamente com outros antibióticos. A aplicação de combinações como estas é eficiente contra o problema da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos, aumentando a eficácia do tratamento de infecções, o que faz do AC um composto importante clínica e economicamente (MARQUES *et al.*, 2009).

3.3. *Streptomyces clavuligerus*

A bactéria *Streptomyces clavuligerus* foi, inicialmente, descrita por Higgins e Kastner (1971) como um micro-organismo produtor de cefamicina C. Mais tarde, outros antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos também foram reportados em trabalhos utilizando 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* é mesófila ou neutrófila, isto é, crescem bem na faixa de temperatura de 28 a 45 °C (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

A principal característica da *Streptomyces clavuligerus* é sua capacidade de produzir antibióticos, colocando-a em destaque no cenário mundial da indústria farmacêutica. Há relatos de que essa bactéria seja capaz de produzir pelo menos 21 metabólitos secundários, onde se inclui o AC (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

3.4. Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

Tradicionalmente o AC é 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 ocorre a síntese de produtos do metabolismo primário, como aminoácidos, proteínas, lipídeos e carboidratos. Com o fim do crescimento celular, devido ao esgotamento desses compostos, se inicia a fase estacionária, onde ocorre a síntese de metabólitos secundários, incluindo o AC e outros antibióticos (MAYER e DECKWER, 1996).

O processo fermentativo de produção do AC é complexo e sofre influência de diversos parâmetros, como pH, temperatura, agitação, aeração, além de fontes de carbono, nitrogênio e indutores (SAUDAGAR *et al.*, 2008). As fontes de carbono e nitrogênio têm grande influência na produção do AC, uma vez que o consumo destas resulta no acúmulo de diversos metabólitos no caldo fermentativo, podendo ocasionar a degradação do AC (GOUVEIA *et al.*, 1999).

A composição do meio fermentativo é de fundamental importância em bioprocessos, tanto para o crescimento de micro-organismos, bem como para a produção de um metabólito de interesse. Vários meios fermentativos são descritos na literatura para a produção de AC. Os mais utilizados recentemente apresentam o glicerol como fonte de carbono e energia e derivados da soja como fonte de nitrogênio (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

Uma peculiaridade da bactéria *Streptomyces clavuligerus* é a sua incapacidade de assimilar glicose como fonte de carbono, uma vez que a bactéria não consegue transportá-la através da membrana celular (ZHANG e DEMAINE, 1992). Sendo assim, houve a necessidade da descoberta de outras fontes de carbono e energia para a produção de AC. Muitos estudos foram feitos e, em grande parte deles, constata-se que o glicerol é quem obtém os melhores resultados, em concentrações entre 15 e 20 g.L⁻¹, sendo que maiores concentrações podem inibir a produção de ácido clavulânico (SAUDAGAR *et al.*, 2008; ZHANG e DEMAINE, 1992; ROMERO *et al.*, 1984).

3.5. Biossíntese do ácido clavulânico

Diversos estudos da literatura já foram realizados em relação à biossíntese do ácido clavulânico, entretanto, até hoje não se obteve clareza a respeito de quais aminoácidos são mais importantes na biossíntese do AC, ou qual concentração de cada um deles é capaz de aumentar a produção do mesmo. Vários pesquisadores mostraram diferentes conclusões. Na maioria dos trabalhos descritos na literatura, os aminoácidos L-treonina, L-Ornitina e L-Arginina foram os mais utilizados (ROMERO *et al.*, 1984; SAUDAGAR *et al.*, 2008).

Grande parte dos trabalhos aponta a L-Ornitina como um importante precursor C5 do AC (anel oxazolidino), sendo que praticamente todos eles apontam o glicerol como precursor C3, isto é, precursor do anel β -lactâmico do AC, como pode ser observado na Figura 3.2, que apresenta a provável rota metabólica da produção do ácido clavulânico (ROMERO *et al.*, 1984; SAUDAGAR *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2003; LI e TOWNSEND, 2006).

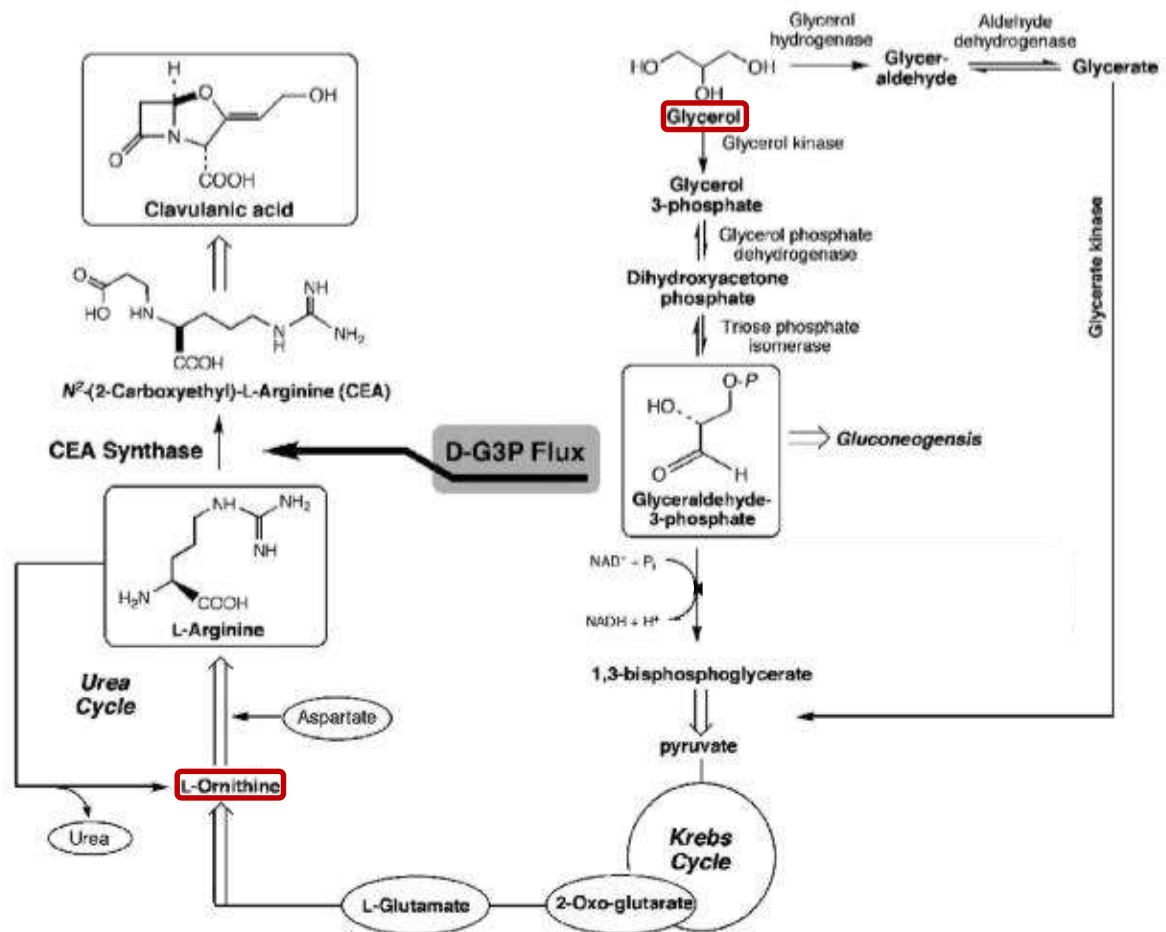


Figura 3.2 - Provável rota metabólica da biossíntese do ácido clavulânico (Modificada de LI e TOWNSEND, 2006).

Saudagar *et al.* (2008) demonstraram, através de estudos utilizando a L-Treonina e a L-Arginina, que ambas se mostraram importantes na produção do AC. Eles apontam como principal motivo do aumento da produção, causado pela adição de L-Treonina e L-Arginina, o fato de que a suplementação de ambos os aminoácidos, direcionou a rota metabólica para a produção de AC, uma vez que as reações anapleróticas de biossíntese desses aminoácidos na célula, ocorridas normalmente durante o ciclo de Krebs, como mostrado na Figura 3.3, não têm a necessidade de acontecer já que estes já estão presentes no meio em quantidades adequadas. Em relação à L-Treonina, Saudagar *et al.* (2008) ainda mostraram que as concentrações que levaram aos melhores resultados foram as de 1 mM e 100 mM (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

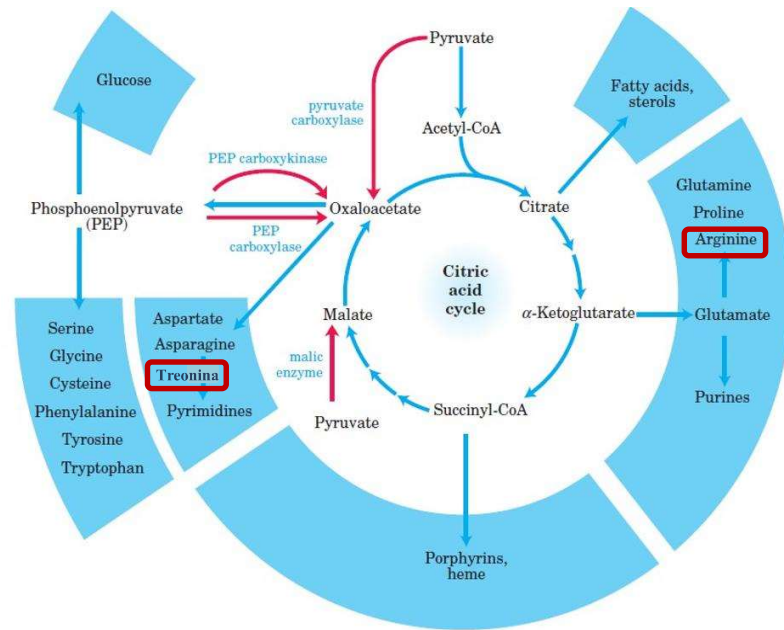


Figura 3.3 - Ciclo de Krebs e biossíntese de aminoácidos (Modificada de VOET *et al.*, 2008).

A L-Asparagina também foi utilizada em alguns estudos como possível precursora do AC. Este aminoácido pode dar origem ao aspartato, sendo hidrolisado por ação da enzima asparaginase. O aspartato, por sua vez, pode sofrer transaminação, gerando oxaloacetato, tal qual apresentado na Figura 3.4. O oxaloacetato é um importante intermediário do ciclo de Krebs, como pode ser observado na Figura 3.3 e, na falta deste, o ciclo não se completa, não ocorrendo a formação do L-Glutamato e, conseqüentemente, da L-Ornitina, o precursor C5 do AC, como mostrado na Figura 3.2. A literatura sugere concentrações de 2 a 4 g.L⁻¹ para suplementação de L-Asparagina (OLIVEIRA *et al.*, 2009; STIPANUK e WATFORD, 2000).

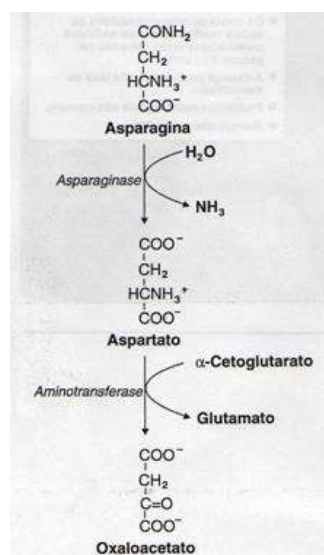


Figura 3.4 - Reação de formação do oxaloacetato a partir de asparagina (VOET *et al.*, 2008).

Diversos resultados são encontrados na literatura, ainda que para os mesmos aminoácidos. Isto se deve, provavelmente, às diferentes condições utilizadas durante o cultivo, tais como temperatura, pH, agitação e fonte de nitrogênio (ROMERO *et al.*, 1984).

3.6. Planejamento Experimental Fatorial 2^2

A crescente necessidade da otimização de processos, visando minimização de tempo e custos, maximização de rendimento, qualidade e produtividade de produtos, leva os pesquisadores a utilizarem metodologias de planejamentos experimentais nas mais diversas áreas (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Em geral, a otimização de variáveis experimentais é feita através de procedimentos que apenas avaliam o efeito de uma variável de cada vez. Tais procedimentos apresentam desvantagens como tempo gasto e falta de avaliação a respeito de interações entre as variáveis que afetam o processo estudado (CUNICO *et al.*, 2008).

São diversos os tipos de planejamento experimental e, dentre estes, destacam-se os planejamentos fatoriais, os quais apresentam vantagens significativas, como a possibilidade de avaliação simultânea do efeito de um grande número de variáveis, com um número reduzido de ensaios experimentais, com posterior seleção das variáveis que mais influenciam no processo estudado (CUNICO *et al.*, 2008).

NEVES *et al.* (2002) definiram que este tipo de planejamento é normalmente representado por b^k , onde k representa o número de fatores, isto é, o número de variáveis independentes do sistema em estudo, e b representa o número de níveis escolhidos, ou seja, o número de condições de operação dos fatores de controle investigados nos experimentos. Este último, em geral é identificado por nível baixo (-) e nível alto (+). O caso mais simples de planejamento fatorial é o representado por 2^2 , onde as variáveis estudadas são duas e cada uma delas está presente em apenas dois níveis (CUNICO *et al.*, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

Para o desenvolvimento do presente trabalho foi utilizada a bactéria *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservada em criotubos na forma de células vegetativas a -196°C, em tanque de nitrogênio líquido, suspensa em solução crioprotetora contendo 20% v/v de glicerol.

4.2. Meios de cultura

4.2.1. Meio de cultura de reativação

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al.* (2005), tal como descrito na Tabela 4.1. Após pesados, os reagentes foram solubilizados em água destilada, o pH foi ajustado para 6,8 utilizando NaOH 4 mol.L⁻¹ e o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Tabela 4.1 - Meio de cultura proposto por 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 (g.L ⁻¹)	21,0
KH ₂ PO 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).

4.2.2. Meios de cultura de crescimento e produção

Os meios de cultura de crescimento e de produção utilizados foram os propostos por Teodoro *et al.* (2006), modificado. Ambos apresentaram a mesma composição (Tabela 4.2). Após pesados, os reagentes foram solubilizados em água destilada, o pH foi ajustado para 6,8 utilizando NaOH 4 mol.L⁻¹. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

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.

Tabela 4.2 - Composição dos meios de cultura de crescimento e produção adaptados de Teodoro *et al.* (2006).

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L^{-1})	15,0
Extrato de levedura (g.L^{-1})	1,0
Isolado proteico de soja (g.L^{-1})	20,0
Tampão MOPS (g.L^{-1})	21,0
KH_2PO_4 (g.L^{-1})	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	0,4
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	0,4
Solução de sais ⁽¹⁾ (mL.L^{-1})	1,0

⁽¹⁾ 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).

4.3. Preservação do micro-organismo

A preservação do micro-organismo foi realizada conservando-se os mesmos em criotubos na forma de células vegetativas a -196°C , em tanque de nitrogênio líquido, e suspensão em solução crioprotetora contendo 20% v/v de glicerol.

A fim de garantir um estoque de trabalho capaz de manter válidos os resultados obtidos experimentalmente ao longo de toda a pesquisa, foi necessária a conservação do micro-organismo em placas para a manutenção das cepas produtoras de AC.

Com essa finalidade, foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de reativação, tal como descrito na Tabela 1, com o acréscimo de 20 g.L^{-1} de ágar bacteriológico. A suspensão armazenada no criotubo, contendo o micro-organismo, foi vertida nas placas de Petri e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30°C por 5 a 10 dias, até atingir um bom crescimento. Para preservação dos micro-organismos, repiques foram feitos de 15 em 15 dias.

4.4. Cultivos em mesa incubadora rotativa

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Rosa *et al.* (2005) e consiste em três etapas: reativação do micro-organismo, crescimento e produção.

Na etapa de reativação, 5 mL do meio de reativação foram utilizados para lavar a placa contendo a cultura de *Streptomyces clavuligerus*. Posteriormente, foram retirados 3,0 mL da suspensão, e inoculados em um *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 22 mL de meio de reativação, e este incubado por 24 horas a 27°C e 250 rpm.

Em seguida, na etapa de crescimento, 2,5 mL da suspensão resultante da reativação foram transferidos para um *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 22,5 mL de meio de crescimento. Este foi incubado por 24 horas a 27°C e 250 rpm.

Na etapa de produção, 5 mL da suspensão anterior (crescimento) foram transferidos como inóculo para *Erlenmeyers* de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de produção. Estes foram incubados a 27°C e 250 rpm, durante 96 horas, dando início à etapa principal do processo de produção do AC. Amostras foram retiradas a cada 24 horas.

4.5. Planejamento Experimental Fatorial 2²

Para realização do planejamento fatorial os dois fatores escolhidos foram os aminoácidos L-Asparagina e L-Treonina, adicionados ao meio de cultivo no tempo de 48 horas de produção.

Como a influência de cada variável foi estudada em dois limites, sendo eles uma concentração máxima e uma concentração mínima de cada aminoácido, o desenho corresponde a um planejamento fatorial 2², no qual apenas quatro ensaios foram necessários para avaliar todas as combinações. Um controle também foi ensaiado, em duplicata. A resposta avaliada foi a produção de ácido clavulânico.

As Tabelas 4.3 e 4.4 apresentam, respectivamente, as concentrações das variáveis avaliadas e seus níveis utilizados no planejamento.

Tabela 4.3 - Concentrações dos aminoácidos utilizados no Planejamento Experimental Fatorial 2² para avaliação da produção de ácido clavulânico.

Variáveis	Concentração	Nível (-)	Nível 0	Nível (+)
L-Asparagina	g.L ⁻¹	2,000	0,000	4,000
	mM	0,015	-	0,030
L-Treonina	g.L ⁻¹	0,119	0,000	11,910
	mM	1,000	-	100,000

Tabela 4.4 - Matriz de delineamento do Planejamento Experimental Fatorial 2².

Ensaio	Concentração L-Asparagina	Concentração L-Treonina
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5 ⁽¹⁾	0	0

⁽¹⁾ Controle, realizado em duplicata.

4.6. Preparo das soluções de aminoácidos

As soluções de aminoácidos para a suplementação foram preparadas de acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 4.3, utilizando-se água destilada como solvente para a diluição. Todas as soluções foram armazenadas em tubos *falcon* devidamente identificados e, após ajuste do pH para 6,8, as soluções foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos.

No período de 48 horas de produção, após a retirada das amostras relativas a este tempo de produção, as soluções foram adicionadas ao meio de produção. Em cada um dos *Erlenmeyers* foi adicionado um volume de 3 mL de cada uma das soluções, de acordo com a matriz de delineamento apresentada na Tabela 4.4.

4.7. Metodologia analítica para determinação 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 do AC já havia sido construída em trabalhos anteriores, no decorrer de projetos de iniciação científica desenvolvidos na instituição de ensino. A mesma está apresentada na Figura 5.1.

Para a quantificação do AC presente no meio de cultura, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas durante os cultivos, nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de produção. As amostras foram colocadas em *ependorfs* e centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi vertido para outros *ependorfs* e imediatamente congelado em freezer a -20°C.

Para a análise, primeiramente as amostras foram descongeladas e as soluções A, B e C foram preparadas para cada amostra, conforme descrito na Tabela 4.5. As soluções A e B se

referem à duplicata de cada amostra. As soluções foram preparadas utilizando uma diluição de 20 vezes. Estas soluções foram agitadas e incubadas a 30°C por 15 minutos. Decorrido este tempo, as absorbâncias foram lidas a 311 nm e as diferenças entre as médias das leituras das soluções A e B com a solução C foram utilizadas para determinar a concentração de AC a partir da curva de calibração.

Tabela 4.5 - Composição das soluções A, B e C para análise da produção de ácido clavulânico.

Solução	Amostra (mL)	Solução de Imidazol⁽¹⁾ (mL)	Água (mL)
A	0,040	2,000	0,760
B	0,040	2,000	0,760
C	0,040	-	2,760

⁽¹⁾ Composição (em água destilada): Imidazol 60 g.L⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de calibração do ácido clavulânico

A curva de calibração para quantificação de ácido clavulânico é apresentada na Figura 5.1. O valor do coeficiente de correlação linear, R^2 , é aproximadamente 1,0, indicando um bom ajuste dos dados, além de indicar que o modelo é preditivo.

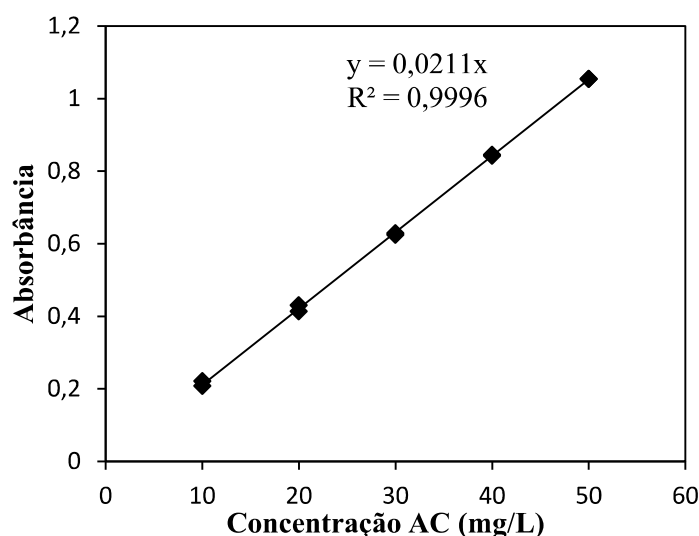


Figura 5.1 - Curva de calibração do ácido clavulânico.

5.2. Produção de ácido clavulânico nos ensaios

O método analítico descrito no item 4.7 foi utilizado para a determinação da concentração de AC produzido nos tempos de produção de 24, 48, 72, e 96 horas.

Para o cálculo da concentração, em miligramas de AC por litro, subtraiu-se a absorbância média das soluções A e B da absorbância obtida para a solução C, soluções estas cujas composições estão descritas na Tabela 4.5. O valor encontrado foi então multiplicado pela diluição utilizada e dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração do AC, obtendo-se então o valor da produção de AC, em mg.L^{-1} .

A Figura 5.2 apresenta os perfis de produção de AC para cada um dos ensaios. Os valores apresentados se referem à média das duplicatas executadas. O ensaio 5 se refere ao controle, o qual não recebeu nenhuma adição de aminoácidos. A produção máxima de AC obtida em cada ensaio é mostrada na Tabela 5.1.

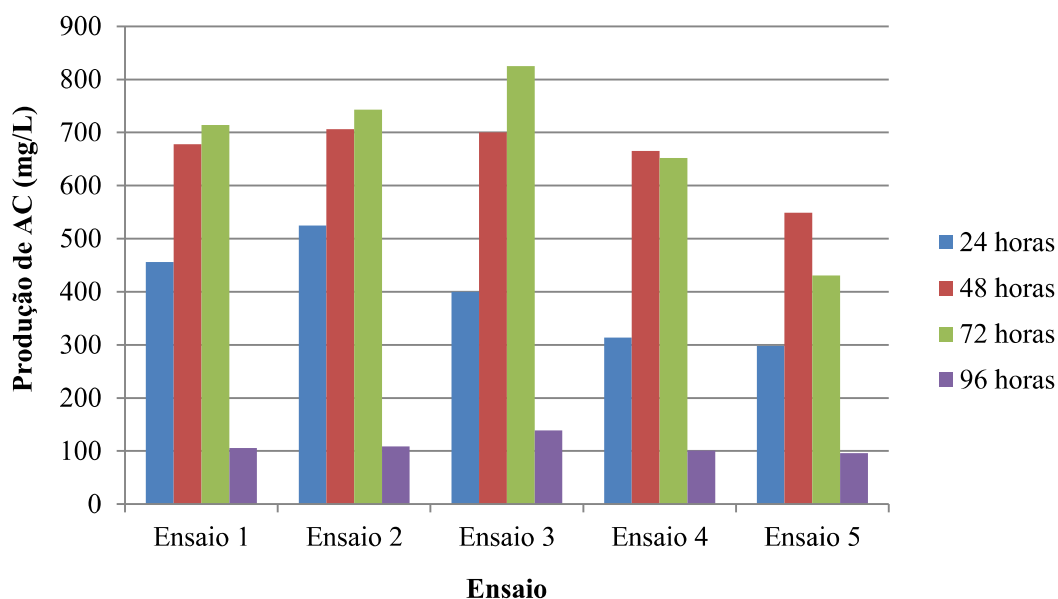


Figura 5.2 - Perfis de concentração de AC nos ensaios 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 5.1 - Produção máxima de AC obtida nos ensaios 1, 2, 3, 4 e 5.

Ensaio	Produção de AC (mg.L ⁻¹)	Tempo (h)
1	714	72
2	743	72
3	825	72
4	677	48
5	549	48

A análise concomitante da Figura 5.2 e da Tabela 5.1 mostra que o ensaio 3 apresentou a maior produção em 72 horas (825 mg/L). Os ensaios 1 e 2 também tiveram sua maior produção em 72 horas (714 e 743 mg/L, respectivamente). Apenas o quarto e o quinto ensaio (controle) alcançaram a maior produção no tempo de 48 horas (665 e 549 mg/L, respectivamente). Em todos os casos houve aumento da produção de 24 horas para 48 horas e queda na produção de 72 horas para 96 horas. Este resultado já era esperado, uma vez que, em diversos trabalhos de produção de AC, este obteve sua melhor produção entre 48 e 72 horas, e queda na produção de 96 horas em diante (SAUDAGAR *et al.*, 2008; ROMERO *et al.*, 1984).

Um fato importante a ser observado através da Figura 5.2, é que o controle, feito sem qualquer adição de aminoácidos, apresentou queda significativa na produção de AC de 48 para 72 horas, enquanto os ensaios com adição de aminoácidos obtiveram aumento na produção ou, no caso do ensaio 4, mantiveram a produção. Isso indicou que a adição de aminoácidos nos cultivos em 48 horas de produção contribuiu para a manutenção da produção de AC, mesmo após o período de maior produção, o de 48 horas. Em geral, após o consumo da fonte de carbono, o glicerol, a produção de AC tende a diminuir e as células começam a

morror. A adição de aminoácidos foi importante na manutenção da produção, uma vez que, mesmo com diminuição da concentração de glicerol e com poucas células ainda viáveis, a produção de AC foi mantida (SAUDAGAR *et al.*, 2008; ROMERO *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 2003).

5.3. Análise do Planejamento Experimental Fatorial 2²

Como já explicitado anteriormente, após 48 horas de produção e, retiradas as amostras relativas a esse tempo, foram adicionadas soluções de aminoácidos ao meio de produção, de acordo com o Planejamento Experimental Fatorial 2², como apresentado na tabela 4.4. Um ponto central feito em duplicata também foi analisado, sem qualquer suplementação de aminoácidos. A Tabela 5.2 apresenta a matriz do Planejamento Experimental Fatorial 2², com todos os parâmetros necessários para os cálculos do planejamento, bem como para a construção dos gráficos demonstrativos. Os valores R1 e R2 correspondem à produção de AC na duplicata, no tempo de 72 horas, onde as soluções de aminoácidos já haviam sido adicionadas. R é o valor médio das duplicatas.

Tabela 5.2 - Matriz de delineamento do Planejamento Experimental Fatorial 2².

Ensaio	Variáveis			Resposta		
	Asn	Tre	Asn x Tre	R ₁	R ₂	R
1	-	-	+	716,2	712,4	714,3
2	+	-	-	746,7	739,0	742,9
3	-	+	-	826,7	822,9	824,8
4	+	+	+	649,5	654,3	651,9
5	0	0	0	431,4	430,5	431,0

Os efeitos principais foram calculados através da soma de cada valor de R multiplicado pelo seu respectivo sinal, para Asn e para Tre. O efeito de segunda ordem foi calculado da mesma maneira, no entanto, cada valor de R foi multiplicado pelo respectivo sinal da interação entre os aminoácidos. Os valores obtidos para os efeitos principais e para o efeito de segunda ordem foram, respectivamente, - 72,15 para a L-Asparagina e + 9,75 para a L-Treonina e - 100,75 para a interação Asn x Tre. Analisando esses valores, pode-se inferir que a L-Asparagina teve um efeito negativo muito marcante e a L-Treonina teve um efeito positivo, não tão significativo.

De acordo com as informações contidas na Tabela 5.2, a única diferença entre os ensaios 1 e 2 está representada pela modificação da concentração de L-Asparagina. Sendo assim, a diferença observada na resposta ($742,9 - 714,3 = + 28,6$) indicou que a produção de

AC aumentou 28,6 mg/L quando a concentração de L-Asparagina (Asn) mudou do nível inferior (-) para o superior (+), mantendo-se fixa, no nível inferior, a concentração de L-Treonina (Tre). Uma análise similar permitiu calcular o efeito da concentração de L-Asparagina quando a concentração de L-Treonina foi mantida fixa no nível superior (ensaios 3 e 4). Nesta análise, o efeito ($651,9 - 824,8 = -172,9$) indicou uma diminuição de 172,9 mg/L na quantidade de AC produzido, quando a concentração de L-Asparagina foi alterada do nível inferior (-) para o superior (+). O efeito global apresentado pela variável Asn foi obtido por meio da média aritmética dos efeitos supracitados $\{[(28,6 - 172,9)/2] = -72,15\}$.

Com cálculos similares aos descritos para Asn, foi possível verificar o efeito global para a L-Treonina (+ 9,75), o qual indicou que quando Tre passa do nível inferior (-) para o superior (+) a resposta monitorada sofre um aumento de 9,75 mg/L.

A interpretação destes resultados pode ser facilitada quando se observa a Figura 5.3, onde as respostas obtidas para os experimentos realizados estão representadas graficamente, como função das variáveis estudadas. A representação geométrica é frequentemente utilizada e objetiva fornecer uma visão global da atuação das variáveis sobre a resposta avaliada.

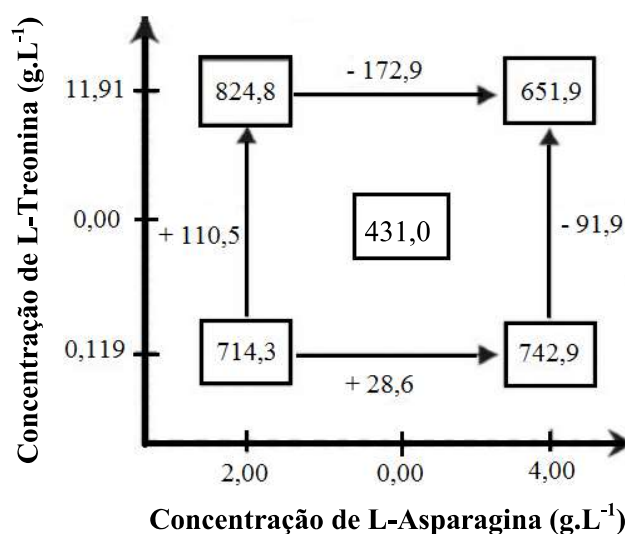


Figura 5.3 - Representação geométrica do Planejamento Experimental Fatorial 2^2 , para o sistema Asn x Tre, na produção de ácido clavulânico.

Analisando o gráfico geométrico e os cálculos citados anteriormente, pode-se concluir que a produção de AC foi maior no experimento em que a L-Asparagina foi adicionada em sua menor concentração e a L-Treonina em sua maior concentração.

O diagrama de Pareto mostrou a significância das variáveis e suas interações, utilizando um nível de confiança de 95%. Analisando este gráfico, apresentado na Figura 5.4

foi possível confirmar o predito pelos cálculos dos efeitos principais e do efeito de segunda ordem, uma vez que o diagrama mostra que as duas variáveis, bem como a interação entre elas, ultrapassaram o eixo de confiança, indicando que todos tiveram efeito significativo sobre a produção de AC. A L-Asparagina teve um efeito significativo, porém negativo, enquanto a L-Treonina obteve um efeito positivo para a produção de AC. A interação entre os dois aminoácidos mostrou um efeito significativo, entretanto, este efeito foi negativo para a produção de AC.

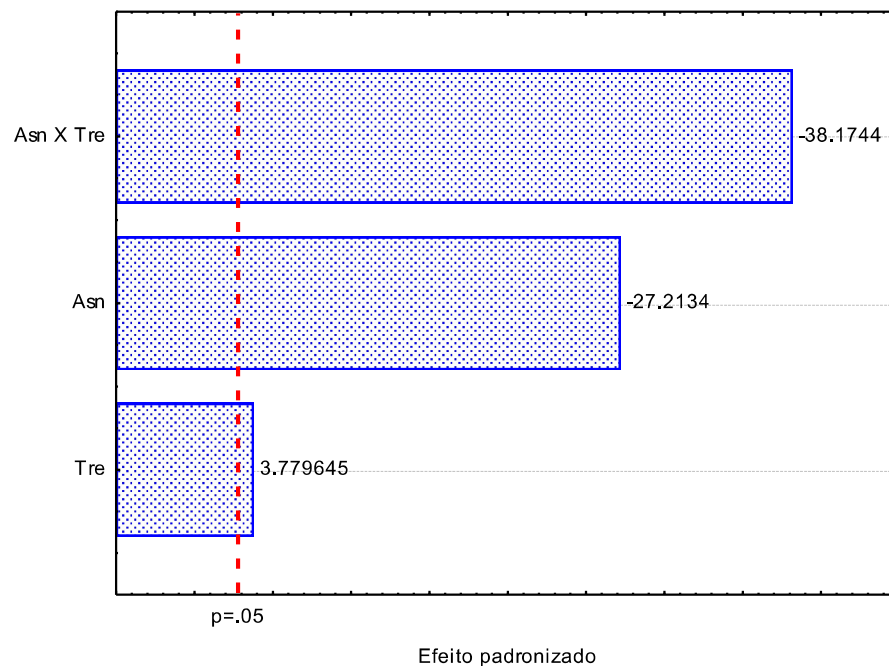


Figura 5.4 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis sob a produção de ácido clavulânico, considerando um nível de confiança de 95%.

Os resultados foram confirmados pela curva de contorno mostrada na Figura 5.5.

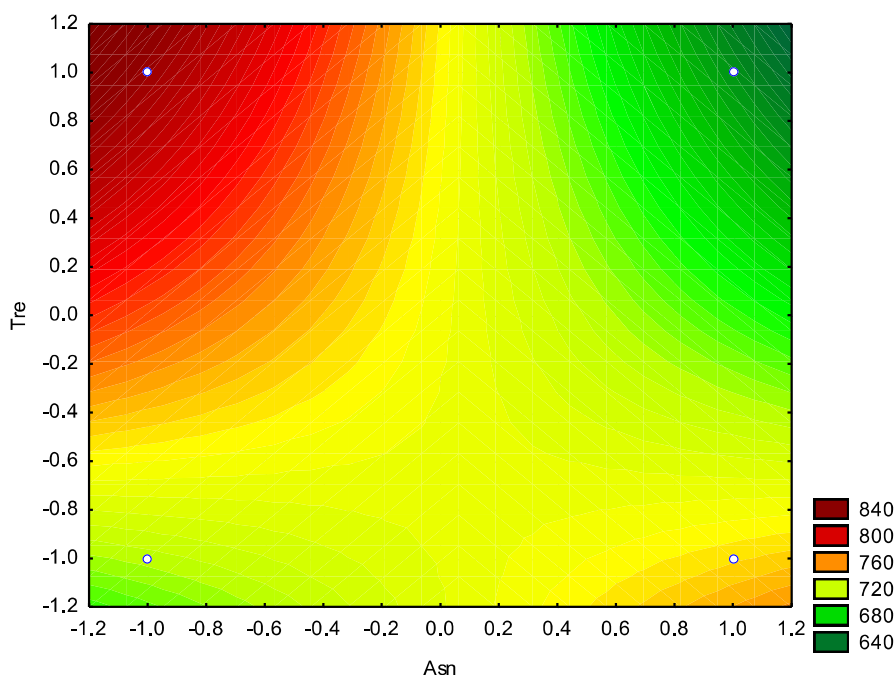


Figura 5.5 - Diagrama de contorno do sistema Asn x Tre na produção de AC.

A curva de contorno evidenciou que a maior produção de ácido clavulânico foi obtida utilizando-se a maior concentração de L-Treonina combinada à menor concentração de L-Asparagina. Não houve interação positiva entre os dois aminoácidos.

É importante ressaltar que, embora o sistema permita evidenciar interações entre as variáveis estudadas, a explicação deve ser fundamentada em argumentos teóricos relacionados ao processo de produção do AC. Assim, no presente trabalho, o aumento da produção de AC evidenciado pela suplementação de L-Treonina, pode ser explicado pela inibição das reações anapleróticas que normalmente abastecem este aminoácido na célula, a partir dos intermediários do ciclo de Krebs e, portanto, a rota metabólica é direcionada para a produção de AC. No caso da L-Asparagina, também era esperado que esta aumentasse a produção de AC, uma vez que o oxaloacetato, um importante intermediário do Ciclo de Krebs, é um produto do metabolismo deste aminoácido. Uma provável explicação para o resultado negativo deste aminoácido pode ser a concentração utilizada. Provavelmente as concentrações máxima e mínima utilizadas para a L-Asparagina não foram adequadas.

Outro fator importante é o tempo de adição dos aminoácidos. O tempo escolhido neste trabalho pode não ter sido o mais adequado, uma vez que a partir de 24 horas de produção já havia concentração significativa de AC, indicando que a produção efetiva iniciou-se nesse período e, portanto, a adição dos aminoácidos em 0 ou 24 horas proporcionaria uma maior produção, visto que no ponto central, de 48 para 72 horas houve declínio na produção de AC,

indicando que a fonte carbono foi exaurida e as células começaram a entrar na fase de morte celular.

6. CONCLUSÃO

Com base na análise da produção de ácido clavulânico para cada um dos ensaios realizados, foi possível concluir que ambos os aminoácidos, L-Asparagina e L-Treonina, apresentaram influência na produção do antibiótico, uma vez que, a avaliação do ponto central mostrou que de 48 para 72 horas de produção ocorreu queda na concentração de AC produzida, enquanto que, nos ensaios onde os aminoácidos foram suplementados, essa concentração foi mantida ou aumentou, indicando a importância dos dois aminoácidos para otimização da produção.

A análise do planejamento experimental evidenciou que a influência apresentada pela L-Asparagina e pela interação dos dois aminoácidos foi negativa para a produção do AC, já a L-Treonina influenciou positivamente.

A fim de atingir uma maior produção de ácido clavulânico, futuros trabalhos podem ser desenvolvidos utilizando diferentes concentrações de L-Asparagina, combinado à adição dos aminoácidos no tempo de 0 ou 24 horas de produção, onde o glicerol ainda está presente em concentrações adequadas e as células ainda estão viáveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGGALEY, K. H.; BROW, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Natural Production Report*, Oxford, v. 1, n.14, p. 309-333, 1997.
- 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.
- CHEN, K. C.; LIN, Y. H.; WU, J. Y.; HWANG, S. C. J. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 152-156, 2013.
- 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. *Biochemical Engineering Journal*, v. 69, p. 1-7, 2012.
- CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.
- DEMAIN, A. L.; FANG, A. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetologia*, v. 9, p. 98-117, 1995.
- ESSACK, S. Y. The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, p. 1391-1399, 2001.
- GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A. G.; BADINO A. C.; HOKKA, C.O. Improvement fo clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivative. *World J Microbial Biotechnology*, v. 15, n. 5, p. 623-627, 1999.
- HAMAD, B. The antibiotics market. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, p. 675-676, 2010.
- HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp.: a P-Lactam Antibiotic Producer. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 21, p. 326-331, 1971.
- 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.
- LI, R.; TOWNSEND, C. A. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic Engineering*, v. 8, p. 240-252, 2006.

LIRAS, P.; RODRIGUEZ-GARCIA, A. Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor biosynthesis and molecular genetics. *App. Microbial Biotechnology*, 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.

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 Microbial Technology*, v. 45, p. 169-173, 2009.

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

NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; JACKSON, E. Variables search technique applied to gas separation. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 327-329, 2002.

OLIVEIRA, L. M.; CRUZ, A. J. G.; HOKKA, C. O. Effect of different carbon and nitrogen sources on *Streptomyces clavuligerus* metabolism for clavulanic acid and cephamycin C production. *New Biotechnology*, v. 255, p. 217-218, 2009.

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.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimento e Otimização de Processos*. 2. ed. Campinas: Cárita, 2009.

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

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*. *Bioprocess Biosystem Engineering*, v. 27, p. 99-104, 2005.

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

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.

STIPANUK, M. H.; WATFORD, M. Amino acid metabolism in biochemical and physiological aspects of human nutrition. *Saunders Company*, v. 14, n. 2, p. 1-6, 2000.

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.

VOET, D.; VOET J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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