



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

EFEITOS DA TEMPERATURA E pH NA PRODUÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO PELO
Streptomyces clavuligerus

Juliana Junqueira Pinelli

Orientadora: Prof. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco
Junho/2015

EFEITOS DA TEMPERATURA E pH NA PRODUÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO PELO
Streptomyces clavuligerus

Juliana Junqueira Pinelli

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

Orientador: Profa. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Junho/2015



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

EFEITOS DA TEMPERATURA E pH NA PRODUÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO PELO
Streptomyces clavuligerus

Juliana Junqueira Pinelli

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

Profa. Sandra de Cássia Dias - Orientadora

Profa. Isabel Braga – Examinador 1

Prof. Edson Nucci – Examinador 2

Sumário

Resumo	1
1.Introdução.....	2
2.Justificativa do Projeto	7
3.Objetivos	8
3.1.Objetivos específicos	8
4.Materiais e Métodos	8
4.1.Micro-organismo.....	8
4.2.Meios de Cultura	8
4.3 Manutenção do Micro-organismo	9
4.4.Cultivos em Mesa Incubadora Rotativa	9
4.5.Análise da Concentração de AC	10
5.Resultados e Discussão	10
6.Conclusões.....	15
7.Referências Bibliográficas	15

RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um metabólito secundário produzido por uma bactéria Gram-positiva denominada *Streptomyces clavuligerus*. Bactérias deste gênero são conhecidas por produzirem metabólitos secundários com funções antimicrobianas e antifúngicas. Este metabólito (AC) é um composto de suma importância, principalmente para a indústria farmacêutica, pois possui ação antibacteriana. É utilizado em associação com outros antibióticos, como a amoxicilina. Sua produção ocorre por via fermentativa, sendo necessário controlar o pH e a temperatura, já que qualquer variação nesses parâmetros pode comprometer a sua produção. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura e pH na produção do ácido clavulânico utilizando o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Para isso, foram realizados 4 experimentos, de acordo com o planejamento experimental fatorial 2². Este planejamento utilizou a temperatura e o pH como variáveis independentes e a produção de ácido clavulânico como variável dependente. As amostras foram retiradas de 24 em 24 horas e a produção de ácido clavulânico determinada por método espectrofotométrico. A maior produção do ácido clavulânico (520,24 mg/L) foi observada em pH 6,7 e temperatura de 19°C em 144h e a maior produtividade (11,87mg/L.h) foi observada em pH 6,7 e temperatura de 27°C em 24h. A temperatura foi o parâmetro mais significativo, não havendo interação entre a temperatura e o pH na faixa escolhida.

Palavras-chave: *Streptomyces clavuligerus*; ácido clavulânico; antibióticos β -lactâmicos; temperatura; pH.

1. INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC) é um metabólito secundário produzido por uma bactéria Gram-positiva conhecida como *Streptomyces clavuligerus* (figura 1). Micro-organismos desta espécie se caracterizam por serem aeróbios estritos, filamentosos, primeiramente habitantes do solo e morfologicamente semelhantes aos fungos [1]. O *S. clavuligerus* cresce a temperaturas entre 28 a 45°C, sendo de suma importância do ponto de vista industrial, capazes de produzir cerca de 80% dos metabólitos secundários conhecidos, especialmente antibióticos como os do tipo β -lactâmicos (cefamicina C, penicilina N, deacetil cefalosporina C e o ácido clavulânico) [2,3]. Também são reconhecidos por produzirem alguns compostos com propriedades antibacterianas e antifúngicas, como a alanil clavama e 2-hidroximetil clavama, além de antibióticos não β -lactâmicos, como a holomicina e a tunicamicina [1]. Os diferentes tipos de compostos produzidos por estes micro-organismos são mostrados na Figura 2.

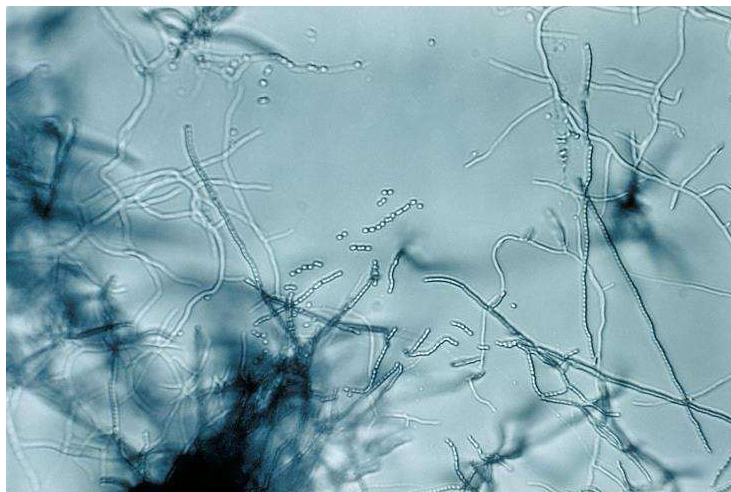


Figura 1: *Streptomyces clavuligerus* visto por um microscópio [4].

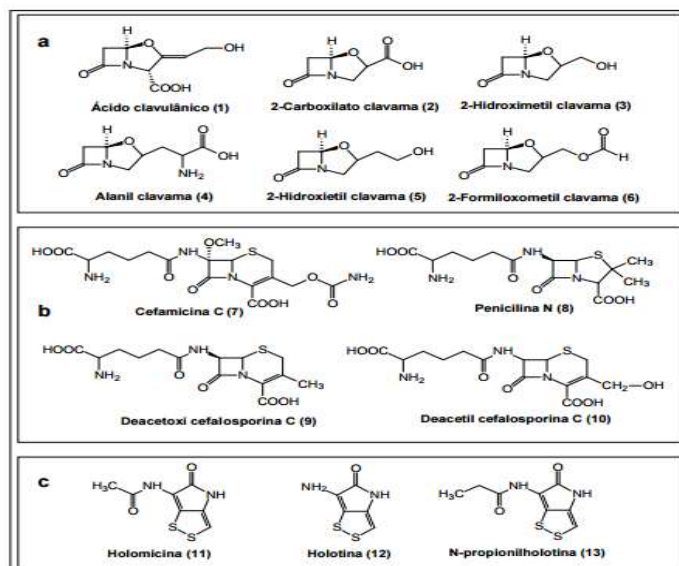


Figura 2: Estrutura química dos diferentes compostos químicos produzidos por *Streptomyces clavuligerus* (a) Antibióticos tipo clavama; (b) Antibióticos β -lactâmicos; (c) Antibióticos não β -lactâmicos [5].

Os antibióticos β -lactâmicos recebem essa denominação por possuírem em sua estrutura um anel conhecido como anel β -lactâmico (figura 3). Eles são divididos em cinco subgrupos de acordo com o radical ligado ao anel. São eles: carbapenemos, clavams, penicilinas, monobactâmicos, e cefamicinas e cefalosporinas (figura 4).

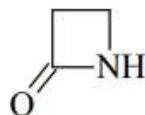


Figura 3: Fórmula estrutural do anel β -lactâmico [6].

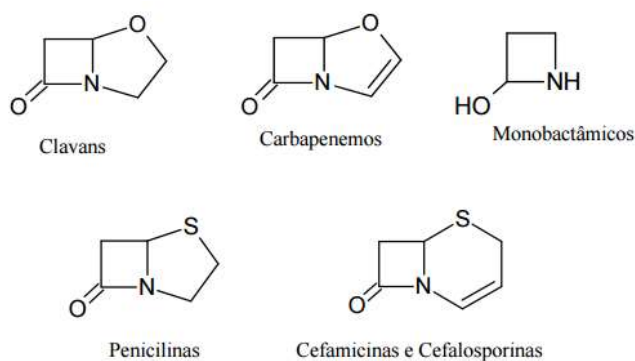


Figura 4: Estrutura dos diferentes subgrupos dos antibióticos β -lactâmicos [6].

Esses antibióticos do tipo β -lactâmico corresponderam a mais de 50% do total de vendas de antibióticos em 2004 [7]. Possuem atividade antibacteriana, inibindo de forma irreversível uma enzima conhecida como transpeptidase, presente apenas em bactérias. Esta enzima é responsável por catalisar a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicana da parede celular bacteriana, fazendo com que ocorra a formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas de tal estrutura, conferindo à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da bactéria. Esses antibióticos constituem a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança. Por possuírem diferentes subgrupos com ações distintas, os antibióticos β -lactâmicos são os agentes mais utilizados para o tratamento das mais diversas infecções [8].

O uso de antibióticos de forma indiscriminada é um dos principais fatores que contribui para o desenvolvimento da resistência a antibióticos por diversos micro-organismos. A principal causa dessa resistência é produção de enzimas conhecidas como β -lactamases por esses micro-organismos. Essas enzimas hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico, destruindo o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), responsáveis pelo passo final da síntese da parede bacteriana, fazendo assim com que o antibiótico perca sua ação [9].

O ácido clavulânico (AC) foi descoberto em 1976, durante um programa de seleção de micro-organismos produtores de compostos β -lactâmicos, e foi descrito por apresentar atividade inibitória de β -lactamases (enzimas produzidas por bactérias resistentes às penicilinas e cefalosporinas). É constituído por um anel β -lactâmico condensado a um anel oxazolidina (figura 5). Apresenta atividade inibitória das β -lactamases intracelulares ou extracelulares, atuando geralmente como inibidor competitivo e irreversível [6, 10, 11]. Embora, o AC seja efetivo contra um grande espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sua atividade antimicrobiana não é muito eficiente quando comparada com outros antibióticos como tienamicina. Por isso, ele é utilizado associado a outros antibióticos β -lactâmicos, que são suscetíveis à ação da enzima β -lactamase [10]. Um dos medicamentos comercializados no Brasil é o Clavulin® (Glaxo SmithKline do Brasil Ltda.), uma associação de 500 mg de amoxicilina e 125 mg de ácido clavulânico.



Figura 5: Estrutura do ácido clavulânico [12].

A produção do AC ocorre por meio de processos fermentativos utilizando *Streptomyces clavuligerus*. Diferentes tipos de biorreatores podem ser utilizados na produção deste metabólito. O método de fermentação em semi-batelada é um dos mais utilizados já que garante uma maior produtividade e apresenta uma operação simples. Esse tipo de processo pode ser utilizado para aumentar a massa total de células (prolongando a fase log) e manter o micro-organismo na fase estacionária, fase que ocorre a maior taxa de produção de metabólitos secundários [13]. Diversos estudos na literatura demonstram os efeitos da agitação, da transferência de oxigênio e da concentração de oxigênio dissolvido na produção do AC para esse tipo de fermentação [14,15].

A fermentação contínua é mais eficiente do que o processo em batelada ou semi-batelada em termos de tempo de processamento. Porém, em termos de produtividade, ela apresenta desvantagens: sua produtividade pode ser reduzida por variações genéticas que podem ocorrer quando a operação contínua acontece por um longo período de tempo e há também uma grande probabilidade de contaminação [13]. O único estudo sobre o cultivo contínuo de *Streptomyces clavuligerus* relatado na literatura é o trabalho de Kirk *et al* (2000) [16] em que os autores estudaram o fluxo metabólico do *Streptomyces clavuligerus* afim de se compreender o processo de produção de ácido clavulânico.

Quanto a rota biossintética de produção do AC, sabe-se muito pouco. Apenas uma parte dela é compreendida. Uma via que compreende algumas sequências de reações bioquímicas que conduzem à produção de AC e clavamas (figura 6) tem sido proposta [17]. Porém, trabalhos adicionais ainda precisam ser realizados para que seja possível determinar a via biossintética completa desse metabólito.

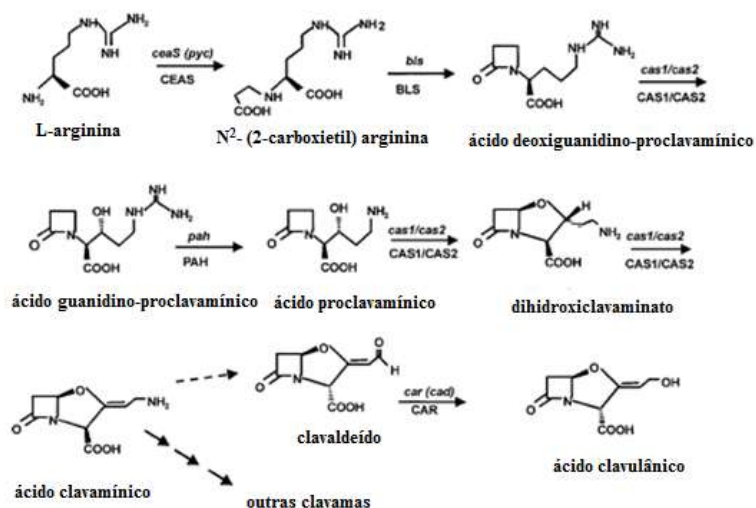


Figura 6: Rota de produção do AC [17].

A reação de condensação de arginina com o D-gliceraldeído-3-fosfato para formar N²-(2-carboxietil) arginina (CEA) foi recentemente elucidada como o passo inicial da via de síntese do AC. Este passo biossintético é catalisado por uma enzima conhecida como sintase carboxietilarginina TPP dependente codificada pelo gene *ceaS*. A síntese do anel β -lactâmico a partir de CEA é catalisada pela enzima β -lactâmico sintetase um novo tipo de enzima dependente de ATP / Mg^{2+} , codificada pelo gene *bis*. Após a formação do anel β -lactâmico, apenas três enzimas foram caracterizadas: clavaminato sintetase (CAS), proclavaminato amidinohidrolase (PAH) e a clavaldeído redutase (CAR). O *S. clavuligerus* tem duas isoenzimas (CAS1 E CAS2), codificadas pelos genes *cas1* e *cas2*. A *cas2* catalisa a hidroxilação do ácido deoxiguanidino-proclavamínico para o ácido guanidino-proclavamínico e a ciclização oxidativa do ácido proclavamínico a ácido clavamínico. A PAH, que hidrolisa o resíduo guanídico do ácido guanidino-proclavamínico para formar o ácido proclavamínico é codificada pelo gene *pah*. A CAR é susceptível de ser envolvida na conversão direta do altamente reativo intermediário clavulanato-9-aldeído em AC e é codificada por um gene *car* [18].

A composição do meio de cultura é um parâmetro de suma importância nos processos celulares, podendo levar a uma maior ou menor produção do composto de interesse. A literatura descreve diferentes meios de culturas para a produção do AC, sendo os meios que contêm glicerol ou lipídeos como fontes de carbono e energia, e farinha ou proteína isolada de soja como fontes de nitrogênio os mais utilizados.

Carboidratos, geralmente, são a fonte de carbono mais utilizada pelos micro-organismos para o crescimento celular nos mais diversos cultivos. Porém, alguns metabólitos secundários têm sua síntese inibida pelos produtos oriundos do catabolismo desses compostos, acarretando assim uma diminuição na biossíntese de antibióticos. O *S. clavuligerus* não é capaz de assimilar glicose uma vez que não consegue transportá-la através da membrana plasmática [6].

Romero *et al* (1984) [19] analisaram a função do glicerol na formação do AC pelo *S. clavuligerus*. Os autores sugeriram que o glicerol é convertido em gliceraldeído-3P e utilizado como precursor de carbono do anel C3 da molécula de AC. Gouveia *et al* (2001) [20] também analisaram cultivos com glicerol como fonte de carbono, concluindo que a melhor concentração de glicerol foi 20g/L.

Um fator de suma importância nos processos fermentativos para a produção do AC é a temperatura, pois exerce influência tanto no crescimento microbiano quanto na produção do composto de interesse. O modelo matemático conhecido como equação de Arrhenius pode ser utilizado para expressar a influência da temperatura na constante de velocidade de uma dada reação:

$$k = k_0 - e^{Ea/RT} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

k: constante da velocidade da reação a temperatura absoluta T (h^{-1})

k_0 : fator pré-exponencial ou fator de frequência (h^{-1})

Ea: energia de ativação (J/mol)

R: constante dos gases ideais (8,314J/mol. K)

T: temperatura absoluta (K)

Trabalhos científicos sugerem que a redução da temperatura de cultivo aumenta a viabilidade celular, reduz a velocidade específica de consumo de substrato, diminui a solubilidade do oxigênio, além de diminuir a atividade de muitas proteases contribuindo para o aumento na produção da biomolécula de interesse [21,22]. A produção do ácido clavulânico utiliza temperaturas de 25 a 30°C [13 e 23]. Porém, temperaturas mais altas como 28 ou 30°C fazem com que o AC seja degradado, uma vez que sua velocidade de degradação aumenta exponencialmente com o aumento da temperatura, como mostra a equação acima (equação 1).

Outro fator determinante na produção do ácido clavulânico é o pH. Devido a sua estrutura molecular ser susceptível a hidrólise ácida e básica, o AC é estável em condições neutras de pH, sendo a produção dele geralmente realizada em pH 6,8 aquele no qual o micro-organismo apresenta seu crescimento ótimo, aliado a uma baixa degradação do AC [24]. Porém, o AC tem se mostrado mais estável em pH igual a 6,2 em solução aquosa [25]. Da mesma forma que a temperatura, o crescimento ótimo do microrganismo ocorre em um pH diferente daquele onde o ácido apresenta maior estabilidade. É válido ressaltar que não há na literatura relatos do pH de estabilidade do AC em meios de cultura, apenas em soluções aquosas como dito anteriormente.

2. JUSTIFICATIVA DO PROJETO

O AC é um metabólito secundário produzido pelo *Streptomyces clavuligerus* de valor comercial por possuir ação antibacteriana, inibindo a atividade das β -lactamases, enzimas produzidas por bactérias resistentes às penicilinas e cefalosporinas. Diversos estudos analisaram a produção do AC em diferentes meios de cultura afim de determinar a melhor composição do meio para produção, porém poucos trabalhos investigaram a influência da temperatura e pH no processo de produção do AC. Esses dois parâmetros podem aumentar de forma significativa a

produção do AC. Portanto, um estudo que avalie a influência da temperatura e pH na produção do AC, encontrando condições ótimas, pode otimizar o processo.

3.OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta como objetivo geral estudar a influência da temperatura e pH na produção de ácido clavulânico (AC), utilizando o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

3.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- ✓ Identificar a melhor temperatura para a produção do ácido clavulânico por meio do planejamento experimental estatístico fatorial
- ✓ Identificar o melhor pH para a produção do ácido clavulânico por meio do planejamento experimental estatístico fatorial

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

O microrganismo utilizado para a realização dos experimentos foi o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 preservado no nitrogênio líquido. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Biotecnológico e no Laboratório de Cultura Celular do Campus Alto Paraopeba na Universidade Federal de São João Del-Rei.

4.2. Meios de cultura

Foram utilizados dois diferentes meios de cultura durante os cultivos: meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al* (2005) [26], e o meio de cultura de crescimento e produção proposto por Teodoro *et al* (2006) [27] (tabelas 1 e 2, respectivamente). O meio de reativação teve seu pH ajustado para o valor 6,8. Já os meios de crescimento e produção tiveram os seus valores de pH ajustados de acordo com o planejamento experimental descrito na Tabela 3.

Tabela 1: Composição do meio de reativação

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	21,0
Peptona bacteriológica	10,0
Extrato de levedura	1,0
Extrato de malte	10,0
Tampão MOPS	15,0
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais* (mL/L)	1,0
Ágar nutricional	20,0

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

Tabela 2: Composição do meio de cultura de crescimento ou produção.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15,0
Extrato de levedura	1,00
Proteína isolada de soja	20,0
Tampão MOPS	21,0
K ₂ HPO ₄	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,4
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,4
Solução de Sais* (mL/L)	1,0

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

Tabela 3: Valores de temperatura e pH utilizados para medidas de concentração de ácido clavulânico.

Ensaio	Variável 1 (T°C)	Variável 2 (pH)	Variável 1 (T°C)	Variável 2 (pH)
1	1	-1	27	6,3
2	1	1	27	6,7
3	-1	-1	19	6,3
4	-1	1	19	6,7

4.3. Manutenção do micro-organismo

Uma quantidade de células de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 armazenadas em nitrogênio líquido foi transferida, com o auxílio de uma alça de platina, para placas de *petri* contendo meio de reativação (tabela 1) acrescido de ágar 20 g/L. As placas foram incubadas, em estufa bacteriológica, a 30°C por aproximadamente 5 dias para crescimento das colônias. A cepa foi mantida através da transferência semanal de colônias para novas placas de Petri contendo o meio de reativação acrescido de 20g/L de ágar.

4.4. Cultivos em mesa incubadora rotativa

A placa contendo colônias de *Streptomyces clavuligerus* incubada durante 5 dias foi lavada com 3 mL de meio de reativação. A suspensão contendo células foi transferida para *erlenmeyer* de 250 mL contendo 22,5 mL do meio de reativação (tabela 1) e incubado por 24h a

250 rpm na temperatura desejada. Após o período de incubação, 2,5 mL de suspensão do meio de reativação foram retirados e transferidos para *erlenmeyers* de 250 mL que continham 22,5 mL de meio de crescimento (tabela 2), e incubado durante 24h a 250 rpm. Passado esse tempo, 5 mL da suspensão do meio de crescimento foram transferidos para *erlenmeyers* de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de produção. Esses *erlenmeyers* foram incubados a 250 rpm, dando início à etapa de produção de AC. O pH do meio e a temperatura utilizada nesta fase seguiram planejamento experimental fatorial apresentado na Tabela 3. Foram retiradas 2 mL de amostra a cada 24 horas. Essas amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 10 min, sendo o pellet descartado e o sobrenadante congelado para determinar a produção do AC.

4.5. Análise da concentração de AC

A concentração de AC foi analisada pelo método espectrofotométrico proposto por Bird *et al* (1982) [28]. Neste método, a concentração de AC é avaliada por análise espectrofotométrica através da formação do produto de derivatização de AC com imidazol. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,0 mL de amostra e 2 mL de imidazol. A solução foi incubada durante 15 min a 30°C, em banho-maria. Passado esse tempo, as amostras tiveram suas absorbâncias medidas no comprimento de onda 311nm. O branco foi constituído de 1,0 mL da amostra mais 2 mL de água, incubado durante 15 minutos a 30°C. As amostras foram diluídas com água afim de se evitar que o valor da absorbância medido ultrapassasse 1. A concentração de AC foi calculada utilizando a equação 2.

$$[AC] = [(Abs1 - Abs2) \times fator\ de\ diluição] \div 0,021 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Abs1- média da absorbância da amostra

Abs2- absorbância do branco.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados 4 cultivos de acordo com as condições de temperatura e pH indicados na Tabela 3. As temperaturas e os valores de pH escolhidos foram baseados em conhecimentos prévios de que o AC apresenta boa produção em temperaturas que variam de 20°C a 30°C e pH entre 6,0 e 7,0. A Tabela 4 e a Figura 7 apresentam, respectivamente, os resultados da produção do ácido clavulânico e as produtividades obtidas nas condições testadas.

As maiores produções do AC foram obtidas nos ensaios 4 (19°C e pH 6,7) e 2 (27°C e pH 6,7): 520,24 mg/L (144 horas) e 413,09 mg/L (48 horas), respectivamente. As maiores produtividades também foram obtidas nestes ensaios: 3,61 mg/L.h (ensaio 4 em 144h) e 11,87 mg/L.h (ensaio 2 em 24h). Para os cultivos realizados com temperatura igual a 27°C (ensaios 1 e 2), a maior produção de AC foi obtida em 48h. Após esse tempo, observou-se o decréscimo na produção do ácido clavulânico, por este motivo a amostra retirada no tempo de 96h não foi analisada (figura 7 e tabela 4).

Nos cultivos 3 e 4 realizados a 19°C, foi possível observar que a produção do ácido clavulânico teve início a partir de 48h, tempo inicial necessário para que a cultura de *S. clavuligerus* se adaptasse e começasse a sintetizar o AC, fazendo então com que sua produção ocorresse após esse tempo. O ensaio 3 (19°C e pH 6,3) obteve uma melhor produção (17,6 mg/L) e produtividade (0,37 mg/L.h) em 48h se comparado ao

ensaio 4 (19°C e pH 6,7), entretanto, este ensaio comparado aos demais, apresentou a pior produção e produtividade do ácido clavulânico (figura 7).

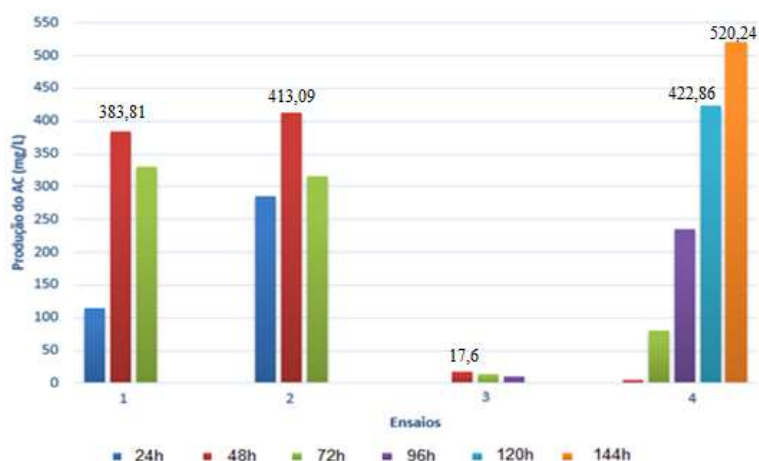


Figura 7: Produção do ácido clavulânico nos quatro ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental (tabela 3).

Tabela 4: Produtividade (mg/L.h) do ácido clavulânico em diferentes tempos para cada ensaio do planejamento experimental.

Ensaio	24h	48h	72h	96h	120h	144h
1	4,77	7,99	4,58	*	*	*
2	11,87	8,61	4,39	*	*	*
3	*	0,37	0,198	0,104	0,019	0
4	*	0,09	1,11	2,45	3,53	3,61

*não foram realizadas análises do AC visto que não ocorre produção deste nestes tempos.

A temperatura de 27°C favoreceu a produção de ácido clavulânico em 24 e 48 horas, já a temperatura de 19°C favoreceu a produção de ácido clavulânico após 48 horas de cultivo (figura 7). Para o tratamento estatístico dos dados foi necessário escolher um tempo para analisar a influência das variáveis independentes na produção do ácido clavulânico. Em 24 horas apenas os ensaios 1 e 2 produziram o ácido clavulânico, a partir de 120 horas a produção do ácido clavulânico foi relevante apenas para a condição 4. Em 48 horas, a melhor produtividade (8,61mg/L.h) do ácido clavulânico foi 2,4 vezes maior que a melhor produtividade obtida em 144 horas 3,61 mg/L.h (ensaio 4). Portanto o tempo de 48 horas foi escolhido para analisar, estatisticamente, a influência da temperatura e pH na produção do ácido clavulânico.

Tabela 5: Respostas do ácido clavulânico (mg/L) e (mg/L.h) de acordo com as variáveis analisadas em 48h.

Ensaio	Variáveis			Resposta 1 Concentração de AC (mg/L)	Resposta 2 Produtividade (mg/L.h)
	pH	T	pH x T		
1	6,3 (-)	27 (+)	-	383,81	7,99
2	6,7 (+)	27 (+)	+	413,09	8,61
3	6,3 (-)	19 (-)	+	17,6	0,37
4	6,7 (+)	19 (-)	-	4,76	0,09

Ao analisarmos os dados da Tabela 5, foi possível observar que a única diferença entre os ensaios 1 e 2 foi a mudança do valor de pH. Assim, a diferença observada na resposta (413,09 – 383,8) indicou que houve um aumento de 29,28 mg/L na produção do AC quando o pH altera do nível inferior (-) para o nível superior (+) mantendo a temperatura fixa. Se fizermos uma análise similar para os ensaios 3 e 4 onde mais uma vez o pH variou e a temperatura manteve constante, observamos que houve um decréscimo de 12,84 mg/L na produção do AC (4,76 – 17,6) quando o pH altera do nível inferior (-) para o superior (+).

Comparando os ensaios 2 e 4 que utilizaram mesmo pH, mas diferentes temperaturas, observamos que houve um decréscimo (4,76 – 413,09) de 408,33 mg/L quando a temperatura alterou do nível superior (+) para o nível inferior (-). A mesma análise pode ser repetida para os ensaios 1 e 3 que utilizaram mesmo pH, mas diferentes temperaturas (17,6 – 383,81) obtendo também uma queda de 366,21 mg/L na produção do ácido quando a temperatura alterou do nível superior (+) para o nível inferior (-). Estes resultados permitiram concluir que ambas as variáveis influenciaram na produção do AC, porém, a temperatura influenciou de forma mais significativa que o pH.

As respostas obtidas durante os experimentos para as alterações das variáveis independentes estão representadas graficamente na Figura 8 e a análise desta figura reforça os resultados descritos acima

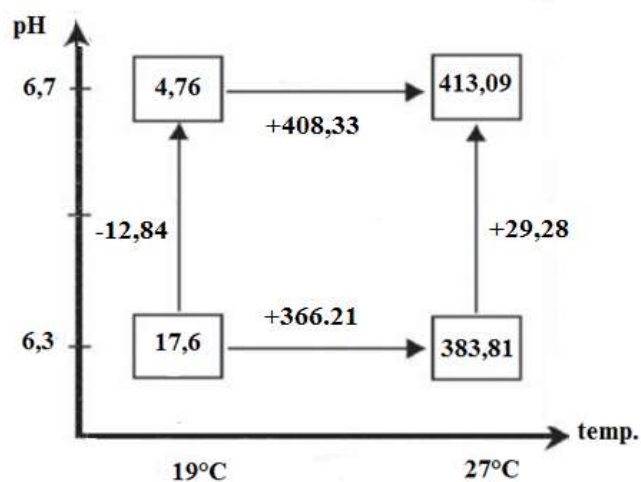


Figura 8: Produção do ácido clavulânico no tempo de 48h nas diferentes condições testadas.

Ao analisarmos os dados presentes na Figura 8, podemos observar que o pH não apresentou o mesmo efeito quando analisado para os níveis inferiores (19°C) e superiores (27°C) da temperatura para o tempo escolhido (48 horas de cultivo). É possível perceber que quando aumentamos a temperatura mantendo-se fixo o pH, a produção do AC também aumenta, fazendo então com que a temperatura possua um efeito positivo marcante. Já quando aumentamos o pH mantendo-se fixo a temperatura, observamos que para a temperatura de 19°C há uma queda na produção do AC ao passarmos do pH 6,3 para o 6,7 e para a temperatura de 27°C há um aumento na produção do AC ao alterar o pH de 6,3 para 6,7. Porém este aumento é menos significativo pois apresenta uma pequena variação. Os resultados desta análise permitiram concluir que a melhor produção do AC deve ser obtida no ensaio com a maior temperatura e maior pH (27°C e pH 6,7). Isto pode ser visualizado na Figura 10, curvas de contorno para a produção do AC. A Figura 9 representa um Gráfico de Pareto onde é possível analisar mais uma vez a influência dos parâmetros temperatura e pH na produção do AC.

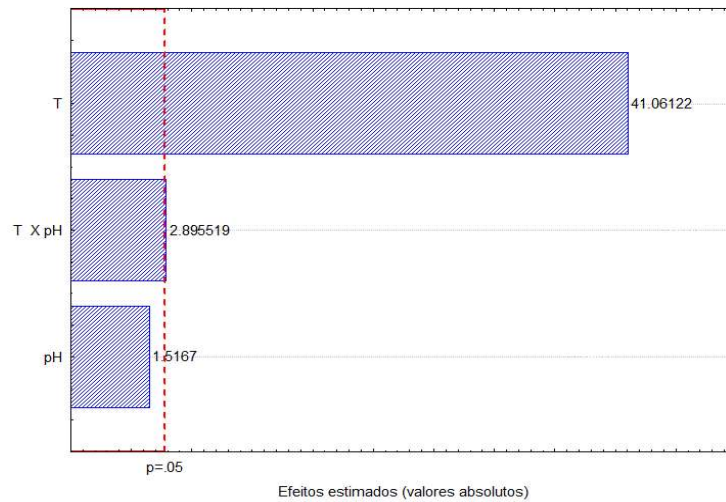


Figura 9: Diagrama de Pareto (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança).

Ao analisarmos o diagrama de Pareto, observamos que no intervalo de confiança escolhido (95%) apenas a temperatura foi significativa estatisticamente. O pH está bem abaixo do limite de confiança estabelecido ($p=0,5$) não sendo significativo estatisticamente. Já o pH e a sua interação com a temperatura aparecem muito próximos ao limite de confiança, podendo ser significativos se a faixa escolhida de pH fosse aumentada.

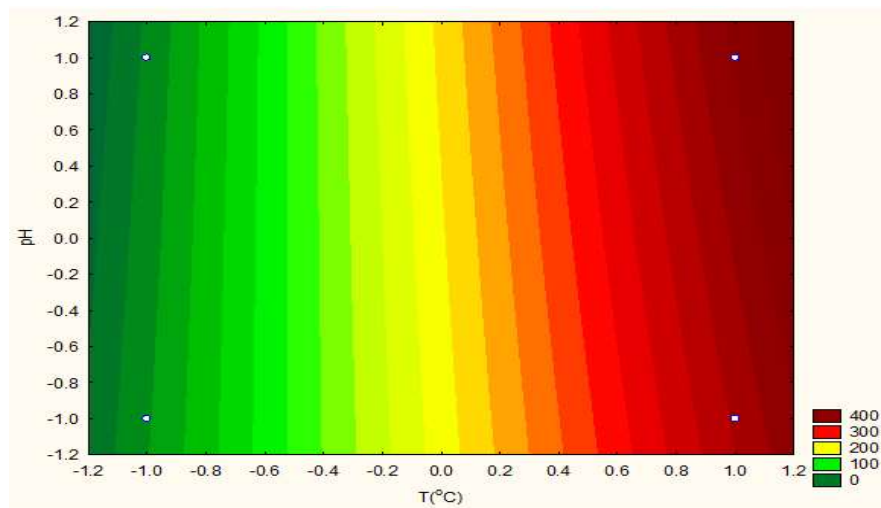


Figura 10: Curva de contorno em função da temperatura e pH para análise da produção do ácido clavulânico no tempo de 48h.

Analisando a Figura 10, observamos que a maior concentração do ácido clavulânico ocorreu na faixa de temperatura de +0,8 a +1,2, independente do pH e que a temperatura de 27°C (+1) está dentro desta faixa.

Costa *et al* (2010) [6] avaliaram a produção do AC em batelada utilizando três diferentes temperaturas 30, 25 e 20°C. A melhor produção de ácido clavulânico foi obtida na temperatura de 20°C, 925,0 mg/L em 156 horas, e a menor produção de AC foi obtida na temperatura de 30°C 168,7 mg/L em 72 horas. Este resultado confirma os dados deste trabalho: a produção do ácido clavulânico é favorecida em temperaturas menores, entretanto o longo tempo de cultivo pode não ser economicamente viável.

De acordo com Santos *et al* (2009) [29] a faixa de estabilidade do ácido clavulânico está entre pH 6,0 e 7,2. Os resultados encontrados neste trabalho foram condizentes com estes dados, visto que em ambos os valores de pH analisados (6,3 e 6,7) houve produção do AC, sendo o pH 6,7 o que apresentou maior produção.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A temperatura de 27°C favoreceu a produção do ácido clavulânico no início do cultivo (48 horas) apresentando alta produção (413,09 mg/L) e produtividade (8,61 mg/L.h) neste tempo.
- ✓ A temperatura de 19°C apresentou maior produção do ácido clavulânico (520,24 mg/L) após um longo período de cultivo, 144 horas, porém apresentou baixa produtividade neste mesmo tempo (3,61 mg/L.h).
- ✓ A temperatura possui maior influência que o pH na produção do ácido clavulânico, sendo então o principal parâmetro que deve ser controlado durante a produção deste.
- ✓ O pH para o tempo de 48 horas não interferiu na produção do ácido clavulânico.
- ✓ Ambos os valores de pH analisados (6,3 e 6,7) houve produção do AC, sendo o pH 6,7 o que apresentou maior produção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BENAVIDES, D. J. L. Metabólitos secundários de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 e fungos endofíticos filamentosos. 2008. 102f. Dissertação (Pós-graduação em química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- 2 - LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Introduction to the order Actinomycetales. In: Star, M.P.; Stalp, H., Tryper, H.G.; Balawi, A.; Schlegel, H.G. The prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacterias, New York, Springer-Verlag, 1981.
- 3- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, Applied Microbiology and Biotechnology, v.20, p.318-325, 1984.
- 4- Site:<http://en.wikipedia.org/wiki/Streptomyces>. Acessado em: 15/06/2015.
- 5- ELSON, S.W. N-Acyl derivatives of clavaminic acid produced by a mutant of *Streptomyces clavuligerus*, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, n. 14, p. 979-980, 1988.

- 6- COSTA, C. L.L. Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em batelada e batelada alimentada com pulsos de glicerol sob diferentes condições de temperatura. 2010. 55f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- 7- VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival? *Angewandte Chemie International Edition*, v.45, p.5072 – 5129, 2006.
- 8- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M.L. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, *Química nova*, v. 33, p.667-679, 2010.
- 9- Site: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm. Acessado em: 15/06/2015.
- 10- 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, *Journal Antibiotics*, v.29, p.668-670, 1976.
- 11-OLIVEIRA, J. H.; H. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação, *Química Nova*, São Paulo, v. 32, 2009.
- 12- Site: http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=47%3Abeta-lactamases-sua-importancia-na-resistencia-bacteriana&catid=13%3Atemas-de-interesse&Itemid=57&lang=br. Acessado em: 16/06/2015.
- 13 - NETO, A.B.; HIRATA, D.B.; CASSIANO FILHO, L.C.M.; BELLÃO, C.; BADINO JÚNIOR, A.C.; HOKKA, C.O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.22, p.557-563, 2005.
- 14 - ROSA, J.C. Influência das condições de transferência de O₂ na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, 2002. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- 15-YEGNESWARAN, P.K., GRAY, M.R.; THOMPSON, B.G. Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: effect on *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnology and Bioengineering*, v..38, p. 1203-1209, 1991.
- 16 - KIRK, S., AVIGNONE-ROSSA, C.A.; BUSHELL, M.E. Growth limiting substrate affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnology Letters*; 22: (22), 1803-1809, 2000.
- 17 - LIRAS, P.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A. Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.54, p.467-475, 2000.
- 18 - MELLADO, E.; LORENZANA, L.M.; RODRÍGUEZ-SÁIZ, M.; DÍEZ, B.; LIRAS, P.; BARREDO, J.L. The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the car gene, *Microbiology*, v. 148, p.1427-1438, 2002.
- 19- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.20, p.318-325, 1984.
- 20 - GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Studies on rheology and oxygen mass transfer in the clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, p. 827-834, 2001.
- 21- FURUKAWA, K. ; OHSUYE, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α -amidating enzyme, *Cytotechnology*, v.26, p.153-164, 1998.

- 22- YOON, S.K.; SONG, J.Y.; LEE, G.M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells, *Biotechnology and Bioengineering*, v.82, pg.289-288, 2003.
- 23 - JIANG, S.J.; YANG, Y.Y.; WANG, H.Q. Optimization of clavulanic acid fermentation, *Chinese Journal of Antibiotics*, v.29, p.335-338, 2004.
- 24 – C, C.L.L. Estratégias para melhoria da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. 2014. 131f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- 25 - BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G. Kinetic studies on clavulanic acid degradation, *Biochemical Engineering Journal*, v.23, p. 31-36, 2004.
- 26 - 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 and Biosystems Engineering*, v.27, p.99-104, 2005.
- 27 - 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, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, p.450-455, 2006.
- 28- BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole, *Journal Analyst*, v.107, p.1241-1245, 1982.
- 29 - SANTOS, C.V.; PEREIRA, J.F.; HAGA, R.B.; RANGEL-YAGUI, C.O.; TEIXEIRA, J.A., CONVERTI, A., JR, A.P. 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.