

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Produção e extração de Ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA
1542 isolado de líquens da Região Amazônica em fermentação
extrativa por sistema de duas fases aquosas**

Discente: Vanessa Régia Francisco Couto
Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Tatiana Souza Porto

Recife, fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Produção e extração de Ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA
1542 isolado de líquens da Região Amazônica em fermentação
extrativa por sistema de duas fases aquosas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração Biotecnologia, linhas de pesquisa: Pesquisa de Biomateriais e Microbiologia Básica e Aplicada

Discente: Vanessa Régia Francisco Couto
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Tatiana Souza Porto

Recife, fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Parecer da comissão avaliadora referente à dissertação de mestrado acadêmico da discente
Vanessa Régia Francisco Couto

**“Produção e extração de Ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 isolado de
liquens da Região Amazônica em fermentação extrativa por sistema de duas fases aquosas”**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOTECNOLOGIA

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro,
considera a discente Vanessa Régia Francisco Couto aprovada.

Recife, 29 de fevereiro de 2012

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal –
UFRPE – Presidente

Prof^a Dr^a Janete Magali Araújo – Departamento de Antibióticos – UFPE – Membro

Prof^a Dr^a Camila Souza Porto – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE –
Membro

Prof^a Dr^a Daniella Araújo Viana Marques – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal –
UFRPE – Suplente

Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki – Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais –
UNICAP – Suplente

DEDICO

À minha família: minha mãe Nadir, meu pai Ageu (in memoriam) e meu irmão Arlan. Dedico também esta conquista a meu noivo Tiago. Obrigada por todo incentivo e compreensão. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Porto, uma mulher de “tirar o chapéu”, pela oportunidade de orientação, pelos valiosos ensinamentos e por toda a compreensão, paciência e serenidade transmitida nos momentos em que mais precisei durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À minha querida co-orientadora Prof^a Dr^a Tatiana Porto por toda colaboração e incentivo desde o primeiro momento em que cheguei ao laboratório, pela ajuda com as análises estatísticas e por toda energia positivíssima transmitida até nos momentos mais difíceis da pesquisa.

Às Prof^{as} Dr^{as} Camila Porto (minha 2^a co-orientadora), Daniella Viana, Pollyanna Nunes, Cynthia Oliveira e Raquel Pedroza por todo estímulo e dedicação aos alunos do grupo.

A todos os amigos do LABTECBIO pelo companheirismo, por todos os momentos de descontração, pelas discussões científicas e pelo convívio agradável de todos os dias...

Agradecimentos especiais para Márcia Nieves, fiel companheira e admirável ser humano, que desde o princípio até as vésperas da defesa desta dissertação esteve ao meu lado.

À Késsia, Thiago, Amanda, Fabiana, Milena, Sheylla, Patyanne, Juanize, Gabriela, Laura, Tatiana Liu, Meire, Luiza, Priscilla, Paulo, Diego, Kátia por serem antes de companheiros de bancada, verdadeiros amigos e incentivadores e por todos os bons e maus momentos da pesquisa e de nossas vidas pessoais em que permanecemos unidos.

Também às adoráveis estagiárias Anielly e Débora. É sempre muito bom pesquisar com vocês, meninas!

Agradeço também a Eduardo Santos, um pesquisador super criativo e empolgado, que sempre incentiva a todos e nos dá super dicas científicas, além daqueles que junto com ele compõem o grupo de produção de biossurfactantes: Ana Paula, Welton e Almir.

À técnica do LABTECBIO Iêda Cabral, por apoiar a todos no andamento de seus trabalhos.

À Germana, Marcella, Anderson e Carolina do Setor de Biotecnologia do LIKA.

À Prof^a Dr^a Janete Magali pela atenção e por toda disposição em ajudar com as dúvidas e dificuldades com as actinobactérias. Também à Prof^a Dr^a Taciana Cavalcanti por compartilhar os equipamentos que ajudaram no andamento do meu trabalho e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e à secretária Adenilda pelo apoio e, também à FACEPE pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho através da concessão da bolsa de estudo.

A todos os professores e professoras que contribuíram para minha formação, mas que a memória não me permite lembrar, meus sinceros agradecimentos.

E, sobretudo a Deus por me dar serenidade nos momentos de maior dificuldade e cansaço, por me segurar pelas mãos e me reerguer para que eu pudesse continuar seguindo em frente. Por me proporcionar conhecer todas estas pessoas acima citadas. Obrigada meu Deus!

A todos, meus mais sinceros agradecimentos...

RESUMO

O gênero *Streptomyces* produz cerca de 70% dos antibióticos de origem natural utilizados na prática médica. Com o advento e ampla utilização dos antibióticos β -lactâmicos no tratamento de infecções bacterianas, logo surgiram cepas resistentes a estes fármacos, sendo um dos principais mecanismos de resistência microbiana a produção de enzimas β -lactamases, capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico do antibiótico tornando a droga inativa. Ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de β -lactamases produzido por espécies de actinobactérias do gênero *Streptomyces* em processos fermentativos. O sucesso de tais processos depende, sobretudo, dos substratos e dos nutrientes fornecidos ao micro-organismo no meio de cultivo. Em fermentações extrativas, são adicionados ao meio de cultivo os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) compostos por polímero/sal que propiciam uma simultânea produção e recuperação da biomolécula de interesse. Neste contexto, torna-se fundamental a investigação de compostos com atividade antimicrobiana de fontes diversas e, o presente trabalho teve como objetivo produzir e recuperar AC por processo de fermentação em frascos agitados através de fermentação extrativa por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 isolado de líquens da Região Amazônica. A linhagem de *Streptomyces* sp. foi inicialmente cultivada com farinha de soja (20 g/L), extrato de soja (20 g/L) e milhocina (20 g/L) como fontes de nitrogênio (FN) e glicerol (10 g/L) como fonte de carbono (FC) em agitação orbital de 250 rpm em cultivo submerso por 144 horas a 28°C. Sendo a melhor produção de AC verificada com o uso de farinha de soja, foi realizada uma segunda fermentação utilizando um planejamento fatorial 2^3 com quatro pontos centrais a fim de avaliar a influência das variáveis independentes concentração de farinha de soja - FN (10, 20, 30 g/L), concentração de glicerol - FC (5, 10 e 15 g/L) e pH (6,3, 6,8 e 7,4) na produção da biomolécula. A mais alta produção de AC (63,93 mg/L) ocorreu em 96 horas de cultivo no ensaio do planejamento fatorial que utilizou pH 6,3 e as maiores concentrações de farinha de soja e glicerol, 30 e 15 g/L, respectivamente. Em adição, foi realizado um ensaio para atividade antimicrobiana da linhagem de *Streptomyces* frente *Staphylococcus aureus* multirresistente, sendo evidenciado halo de inibição de 33 mm de diâmetro. As melhores condições definidas no primeiro planejamento fatorial foram empregadas em um planejamento fatorial subsequente 2^3 com quatro pontos centrais que avaliou a simultânea produção e extração da molécula de AC em fermentação extrativa com SDFA – Polietilenoglicol (PEG)/sais fosfatos – integrado ao meio de cultura. As variáveis independentes testadas foram massa molar do PEG (M_{PEG} 400, 1.000 e 8.000 g/mol), concentração de PEG (C_{PEG} 15, 20 e 25 m/m%) e concentração dos sais fosfatos (C_{SAL} 15, 20 e 25 m/m%). As maiores concentrações de AC foram obtidas nos ensaios 3 e 5, respectivamente, na fase rica em sal (69,56 mg/L) com as condições (M_{PEG} 400 g/mol; C_{PEG} 25 m/m% e C_{SAL} 15 m/m%) e na fase PEG (54,88 mg/L) nas condições (M_{PEG} 400 g/mol; C_{PEG} 15 m/m% e C_{SAL} 25 m/m%) em 120 horas de cultivo. Os maiores valores do coeficiente de partição ($K=3,27$) e rendimento ($Y=63,2\%$), foram obtidos no ensaio 5, indicando que o AC particionou, sobretudo, para a fase superior rica em PEG, e ficou concentrada em maior quantidade em percentual. Pelos resultados demonstrados, *Streptomyces* sp. DPUA 1542 apresentou efetiva produção de AC utilizando como FN e FC, farinha de soja e glicerol, respectivamente, além de ter apresentado atividade biológica contra bactéria patogênica. A produção e simultânea purificação de AC por fermentação extrativa nas condições testadas pode representar uma alternativa promissora para o emprego em processos de produção do inibidor de β -lactamases a nível comercial.

Palavras-chave: *Streptomyces* sp.; Ácido clavulânico; Fermentação extrativa; Sistema de duas fases aquosas; Planejamento fatorial.

ABSTRACT

The genus *Streptomyces* produces about 70% of the natural antibiotics used in medical practice. With the advent and widespread use of β -lactam antibiotics to treat bacterial infections, soon emerged strains to these drugs, and one of the main resistance mechanisms the production of microbial β -lactamases enzymes, capable of hydrolyzing β -lactam ring of antibiotics making the drug inactive. Clavulanic acid (CA) is a potent β -lactamases inhibitor produced by actinobacteria of the genus *Streptomyces* in fermentation processes. The success of such processes depends mainly on the substrates and nutrients supplied to the microorganism in the culture medium. In extractive fermentations, can be added to the culture medium the aqueous two-phase system (ATPS) composed of polymer/salt to provide a simultaneous production and recovery of the biomolecule of interest. In this context, it becomes essential to the investigation of compounds with antimicrobial activity from various sources, and this study aimed to produce and recover CA via fermentation in shake flasks using extractive fermentation by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 isolated of Amazon lichens. *Streptomyces* sp. strain was initially grown with soybean flour (20 g/L), soy extract (20 g/L) and corn steep liquor (20 g/L) as nitrogen sources (NS) and glycerol (10 g/L) as carbon source (CS) at orbital shaking of 250 rpm in submerged cultivation for 144 hours at 28 °C. As best seen CA production with the use of soybean flour, a second fermentation was performed using a 2³ factorial design with four central points in order to evaluate the effect of independent variables soybean flour concentration - NS (10, 20, 30 g/L) glycerol concentration - CS (5, 10 and 15 g/L) and pH (6,3, 6,8 and 7,4) in the production of the biomolecule. The highest CA production (63,93 mg/L) occurred in 96 hours of culture in the run of the factorial design that used pH 6,3 and higher soybean flour and glycerol concentrations, 30 and 15 g/L, respectively. In addition, was performed a test for antimicrobial activity of *Streptomyces* strain against the multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, and showed inhibition zone of 33mm diameter. The best conditions defined in the first factorial design were used in a subsequent 2³ factorial design with four central points that evaluated the simultaneous production and extraction of the CA molecule in extractive fermentation in ATPS – Polyethyleneglycol (PEG)/phosphate salts – integrated into the culture medium. The independent variables tested were PEG molar mass (M_{PEG}) (400, 1.000 and 8.000 g/mol), PEG concentration (C_{PEG} 15, 20 and 25 m/m%) and phosphates salts concentration (C_{SAL} 15, 20 and 25 m/m%). At higher concentrations of CA was obtained in the runs 3 and 5, respectively, in the phase salt rich (69,56 mg/L) with the conditions (M_{PEG} 400 g/mol, C_{PEG} 25 m/m% and C_{SAL} 15 m/m%) and PEG phase (54,88 mg/L) with the condition (M_{PEG} 400 g/mol, C_{PEG} 15% and C_{SAL} 25%) in 120 hours of cultivation. The highest values of the partition coefficient ($K=3,27$) and activity yield ($Y=63,2\%$) was obtained in the run five, indicated that CA partitioned mainly to the top phase (PEG) and concentrated in greater amount in percentage. The results shown, *Streptomyces* sp. DPUA 1542 showed effective CA production using as NS and CS, soybean flour and glycerol, respectively, also presented biological activity against pathogenic bacteria. The simultaneous production and purification of CA by extractive fermentation under the conditions tested may represent a promising alternative for use in production processes of the β -lactamase inhibitor commercially.

Key-words: *Streptomyces* sp.; Clavulanic acid; Extractive fermentation; Aqueous two-phase system; Factorial design

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Imagem ilustrativa de <i>Streptomyces</i> sp.	18
Figura 2. Ciclo de vida dos <i>Streptomyces</i> . (A) Esporo; (B) Micélio vegetativo; (C) Micélio aéreo; (D) Esporulação	19
Figura 3. Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos	21
Figura 4. Hidrólise do anel β -lactâmico por enzima β -lactamase	22
Figura 5. Inibidores de β -lactamases utilizados na clínica médica. (1) Ácido clavulânico; (2) Sulbactam; (3) Tazobactam.....	24

CAPÍTULO II

Figura 1. Seleção da melhor fonte de nitrogênio para produção de AC por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1542 durante 144 horas de cultivo em 250 rpm a 28°C.....	49
Figura 2. Variáveis controladas durante 144 horas de cultivo na produção de AC por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1542 com farinha de soja em 250 rpm a 28°C	49

CAPÍTULO III

Figura 1. CA production, glycerol consumption, pH range and dry weight of <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1542 strain cultivation in orbital shaker for 24–168 hours.....	61
Figura 2. Diagram for geometric interpretation of the effects of interaction between the independent variables soybean flour and glycerol concentrations in the response variable CA production	61
Figura 3. Tridimensional graphic of CA production (mg/L) in optimum time of 96 hours in all runs of the factorial design	62

CAPÍTULO IV

Figura 1. Fermentação extrativa em SDFA (ensaio 5): formação de fases no branco (A) e após 120 horas de cultivo (B) com a partição das células para a interfase	79
Figura 2. Gráfico de Pareto mostrando a interação entre as variáveis (1) massa molar do PEG (M_{PEG}), (2) concentração do PEG (C_{PEG}) e (3) concentração do SAL (C_{SAL}) e suas interações na produção e extração simultânea da molécula de AC na fase superior após 120 horas de cultivo.....	79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Alguns agentes antimicrobianos produzidos atualmente pelo gênero *Streptomyces*. 20
- Tabela 2.** Combinações de β -lactâmicos e Inibidores de β -lactamases em uso clínico 24

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** CA production by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 in shake flasks under different conditions 63
- Tabela 2.** Statistical matriz of factorial design 2^3 with four replications at the central point and influence of the independent variables on CA production after 96 hours..... 63
- Tabela 3.** Effect of variables in the CA production according to the 2^3 factorial design by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 strain 64

CAPÍTULO IV

- Tabela 1.** Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^3 80
- Tabela 2.** Influência de variáveis independentes nas respostas *K* e *Y* de acordo com o planejamento fatorial 2^3 após 120 horas de cultivo em frascos agitados 80

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

(C)	Ponto central
6-APA	Ácido 6- β -aminopenicilânico
AC	Ácido clavulânico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
CA	Clavulanic acid
C_{PEG}	Concentração do polietileno glicol (m/m%)
CS	Carbon source
C_{SAL}	Concentração dos sais fosfatos (m/m%)
DPUA	Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas
FC	Fonte de carbono
FN	Fonte de nitrogênio
FS	Farinha de soja
K	Coeficiente de partição
MH	Meio de cultivo Müller Hinton
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanesulfônico
M_{PEG}	Massa molar do polietilenoglicol (g/mol)
NS	Nitrogen source
P_{AC}	Produtividade em ácido clavulânico
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PEG	Polietilenoglicol
S DFA	Sistema de duas fases aquosas
SNGPC	Sistema Nacional de Gerenciamento de produtos Controlados
V_r	Razão dos volumes da fase superior e inferior
Y	Rendimento

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	14
2. CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Actinobactérias	17
2.2. Gênero <i>Streptomyces</i>	18
2.3. Antibióticos β -lactâmicos e a Resistência Bacteriana	20
2.4. β -lactamases e Inibidores de β -lactamases	23
2.5. Produção de ácido clavulânico	25
2.6. Sistemas de duas fases aquosas	25
3. OBJETIVOS	28
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	28
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	28
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5. CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR <i>Streptomyces</i> sp. ISOLADO DE LIQUENS DA REGIÃO AMAZÔNICA	37
5.1. ABSTRACT	39
5.2. INTRODUÇÃO	40
5.3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.3.1. Micro-organismo e manutenção.....	41
5.3.2. Meios de cultivo para produção de ácido clavulânico	41
5.3.2.1. Seleção da melhor fonte de nitrogênio	41
5.3.2.2. Produção com a melhor fonte de nitrogênio	42
5.3.3. Determinação da concentração celular e curva de pH	42
5.3.4. Avaliação da produção de ácido clavulânico	42
5.3.5. Produtividade em ácido clavulânico (P_{AC})	43
5.3.6. Ensaio para atividade antimicrobiana	43
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

5.5. CONCLUSÃO	45
5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
5.7. FIGURAS	48
6. CAPÍTULO III – PRODUCTION OF CLAVULANIC ACID BY <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1542 STRAIN USING FACTORIAL DESIGN	50
6.1. ABSTRACT	51
6.2. INTRODUCTION	52
6.3. MATERIALS AND METHODS	53
6.3.1. Microorganism	53
6.3.2. Culture media	53
6.3.3. Fermentation conditions	54
6.3.4. Factorial design	54
6.4. ANALYTICAL METHODS	54
6.4.1. Evaluation of the clavulanic acid production	54
6.4.2. Assay for determining the glycerol concentration	55
6.4.3. Determination of the dry weight and pH curve	55
6.5. RESULTS AND DISCUSSION	55
6.6. CONCLUSIONS	58
6.7. ACKNOWLEDGMENTS	58
6.8. REFERENCES	59
6.9. FIGURE CAPTIONS AND TABLES	61
7. CAPÍTULO IV – PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1542 UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	65
7.1. ABSTRACT	67
7.2. INTRODUÇÃO	68
7.3. MATERIAIS E MÉTODOS	69
7.3.1. Micro-organismo e manutenção	69
7.3.2. Meios de cultura	69
7.3.3. Condições de cultivo	70
7.3.4. Planejamento Fatorial	70
7.3.5. Determinação da concentração de ácido clavulânico	70
7.3.6. Metodologia para análise dos resultados	71
7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71

7.5. CONCLUSÕES	74
7.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7.7. FIGURAS E TABELAS	78
8. CONCLUSÕES	81
9. ANEXOS	82
9.1. ANEXO I – Influência de Diferentes Meios de Cultura na Produção de Pigmentos por Actinomicetos Isolados de Líquens da Região Amazônica	83
9.2. ANEXO II – Normas para publicação (Capítulo III)	89
9.3. ANEXO III – Normas para publicação (Capítulos II e IV)	93

1 INTRODUÇÃO

A utilização disseminada de antibióticos, nas últimas décadas, fez com que as bactérias desenvolvessem defesa relativa aos antimicrobianos, com conseqüente surgimento de resistência (SILVEIRA et al., 2006), inclusive aos antibióticos β -lactâmicos considerados padrão-ouro para o tratamento de infecções bacterianas (VELLA et al., 2011). O uso indiscriminado dos antibióticos acoplado com a mudança dos elementos genéticos que codificam todas as classes de enzimas β -lactamases dificulta as terapias de combate às infecções bacterianas e promove a resistência bacteriana aos compostos β -lactâmicos (BEHARRY et al., 2004).

O principal mecanismo de resistência exibido por uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é a sua habilidade de produzir β -lactamases, enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico dos antibióticos tornando-os inativos (CANTON et al., 2008). As enzimas β -lactamases são divididas em quatro classes, A, B, C e D com base em suas estruturas primárias (AMBLER, 1980) e, em dois grupos, as serino- β -lactamases (classes A, C e B) e as metalo- β -lactamases (classe D) de acordo com seus mecanismos catalíticos (AMBLER, 1980; BUSH 1995; ROSSOLINI, 2005).

São utilizados clinicamente três inibidores de β -lactamases, o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam, e sendo os inibidores de β -lactamases antibióticos β -lactâmicos geralmente com nenhuma ou com a mínima atividade antimicrobiana, quando administrados em combinação com antibióticos β -lactâmicos potencializam sua ação por protegerem estes antibióticos da inativação enzimática pelas β -lactamases produzidas por bactérias resistentes (AKOVA, 2008).

Na clínica médica, os inibidores de β -lactamases são utilizados em associação com antibióticos β -lactâmicos, cujas combinações são de três tipos: o ácido clavulânico administrado em combinação com amoxicilina ou ticarcilina; o sulbactam administrado em combinação com ampicilina e tazobactam administrado em combinação com piperacilina (OLIVEIRA et al., 2009).

Ácido clavulânico foi o primeiro inibidor de β -lactamases produzido e, obtido de forma natural por processo fermentativo a partir de *Streptomyces clavuligerus*, sendo os outros dois inibidores (sulbactam e tazobactam) de origem sintética (OLIVEIRA et al., 2009). Atividade inibidora de enzimas β -lactamases do ácido clavulânico é quase cinco vezes maior que o tazobactam e cerca de 600 vezes maior que o sulbactam (PAYNE et al., 1994). Além de ser um potente inibidor de β -lactamases classe A, o ácido clavulânico também inibe algumas enzimas classe D, porém possui pequena ou nenhuma atividade frente β -lactamases classes B e C (PAGE et al., 2011).

As actinobactérias do gênero *Streptomyces* são reconhecidas como micro-organismos de elevada importância industrial pela habilidade de produzir novos metabólitos secundários incluindo

mais de dois terços dos antibióticos de origem natural utilizados na clínica médica (ARASU et al., 2009; KIESER et al., 2000). As actinobactérias respondem pela produção de 75% de todos os produtos naturais descritos, e de um total de 23.000 metabólitos secundários conhecidos, cerca de 80% deles são produzidos pelo gênero *Streptomyces* (VIJAYAKUMAR et al., 2011).

A produtividade de metabólitos microbianos, em geral, está intimamente relacionada com os processos fermentativos, desta forma, as condições de fermentação, os tipos e as concentrações de nutrientes possuem diferentes efeitos sobre o acúmulo de metabólitos controlados por efetores intracelulares (GOUVEIA et al., 2001).

A contribuição das variáveis em um processo de produção de um biocomposto pode ser investigada através de um planejamento fatorial ou *design* de experimentos, que faz uma relação matemática entre a entrada e saída de variáveis de um sistema, largamente empregada desde o início da década de noventa em processos biotecnológicos. Tais processos podem ser considerados como a transformação dos nutrientes disponíveis no meio de cultivo em componentes para a produção de biomassa e produtos (MANDENIUS & BRUNDIN, 2008).

Após produção em meio de cultivo fermentado, a purificação de compostos de origem biológica pode ser realizada por sistemas de duas fases aquosas (SDFA), sendo os sistemas mais utilizados os constituídos por dois polímeros (polietilenoglicol (PEG) e dextrana) ou por um polímero e um sal (PEG–citrato, PEG–fosfato, PEG–sulfato) que são solúveis em água, mas incompatíveis entre si e se separam em duas fases (RIBEIRO et al., 2007; PADILHA et al., 2011). Estes sistemas podem ser integrados ao meio de cultivo, sendo a biomolécula removida simultaneamente a sua síntese em fermentações extrativas (VIANA MARQUES et al., 2011).

Diante da resistência microbiana aos antibióticos β -lactâmicos torna-se fundamental a busca por novas fontes de antibióticos e, neste sentido, este trabalho teve como objetivo produzir ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA 1542. Dois planejamentos fatoriais sucessivos foram realizados para avaliar a influência das variáveis independentes pH, concentração das fontes de carbono (FC) e nitrogênio (FN), além de verificar a influência das variáveis massa molar do PEG, concentração do PEG e concentração do sal em sistemas de duas fases aquosas na produção e simultânea recuperação da biomolécula de ácido clavulânico por fermentação extrativa (PEG/sal fosfato).

2 CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Actinobactérias

Actinobactérias incluem a ordem Actinomycetales (RUIZ et al., 2010) à qual pertencem as famílias *Corinebacteriaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Streptomicetae*, *Nocardiaceae*, entre outras (GARRITY et al., 2004). Consistem em bactérias Gram-positivas caracterizadas pela formação de micélio aéreo em meio sólido, presença de esporos e alto conteúdo de citosina e guanina (G+C) em seu genoma (SCHIRIJVER et al., 1999).

Na natureza, as actinobactérias são distribuídas em uma multiplicidade de ambientes naturais e antrópicos. A maioria são saprófitas estritos, ocorrendo também algumas espécies parasitárias ou que estabelecem associações mutualistas com plantas e animais. As actinobactérias constituem uma parcela significativa da população microbiana na maioria dos solos, sendo o solo a fonte mais prolífica dos isolados (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983). Cada grama de solo fresco contém cerca de 10^9 unidades formadoras de colônias de bactérias, sendo aproximadamente 10^7 desta população representada por actinobactérias (BALTZ, 2007).

Tal como muitos micro-organismos do solo, a maioria das actinobactérias se comporta como mesófilos em laboratório, com crescimento ótimo em temperaturas de 25° a 30°C e em faixas de pH entre 5.0-9.0, sobretudo em valores próximos da neutralidade (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983).

A morfologia das actinobactérias varia de simples à complexa de acordo com o gênero, abrangendo desde bactérias que se multiplicam por divisão binária, a exemplo do *Corynebacterium* ssp, e outras que apresentam células envelopadas e algumas ramificações como *Mycobacterium* e *Nocardia* sp., respectivamente, até espécies que apresentam amplos filamentos e ramificações, como o gênero *Streptomyces* (CONNELL, 2001). Assemelham-se morfologicamente aos fungos filamentosos, no entanto seus filamentos são constituídos de células muito menores quando comparadas às dos fungos filamentosos (TORTORA et al., 2000).

Metabolicamente, estas bactérias têm a capacidade de utilizar diversas fontes de carbono; podendo ser autotróficas, heterotróficas, quimiotróficas ou fototróficas. No meio ambiente desempenham papel na degradação de matéria orgânica, devido à produção de enzimas extracelulares que vão atuar na decomposição de queratinas, quitinas, celulose, amido, entre outras. Participam também do ciclo dos aminoácidos e do nitrogênio (KENNEDY, 1999; CHATER, 2006).

Algumas espécies de actinobactérias têm a capacidade de causar doenças veterinárias e em humanos incluindo *Nocardia*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* e *Corynebacteria*. É evidente o papel destes micro-organismos na etiologia de doenças como difteria, hanseníase, cáries e doenças periodontais, síndromes clínicas envolvendo o pulmão, ossos e juntas,

tecidos moles e sistema nervoso central (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983; SULLIVAN & CHAPMAN, 2010).

As actinobactérias são reconhecidas pela habilidade de produzir uma diversidade de metabólitos secundários, sintetizados durante o fim da fase estacionária do ciclo de crescimento, e um exemplo destes são os antibióticos. Sendo estes micro-organismos notáveis por sua produção de antibióticos (AL-ZAHRANI, 2007). De um total de aproximadamente 23.000 metabólitos secundários de origem microbiana descritos, cerca de 10.000 compostos bioativos são produzidos por espécies de actinobactérias, sendo 7.600 derivados do gênero *Streptomyces* e 2.500 de espécies de actinobactérias raras, representando um total de 45% dos metabólitos microbianos com atividade biológica (BERDY, 2005; RAJA & PRABAKARANA, 2011). Destacando-se as famílias *Streptomicetaceae*, *Nocardiaceae* e *Corynebacteriaceae* devido à importância dos metabólitos secundários produzidos (RUIZ et al., 2010).

2.2 Gênero *Streptomyces*

Streptomyces é o maior gênero de actinobactérias com mais de 500 espécies descritas (RAJA & PRABAKARANA, 2011). Encontrados em uma variedade de ambientes, mas predominantemente como saprófitas no solo e em vegetais em decomposição, muitos *Streptomyces* produzem esporos e uma substância volátil, a geosmina, que lhes confere um odor característico de “terra molhada” (KIESER et al., 2000).

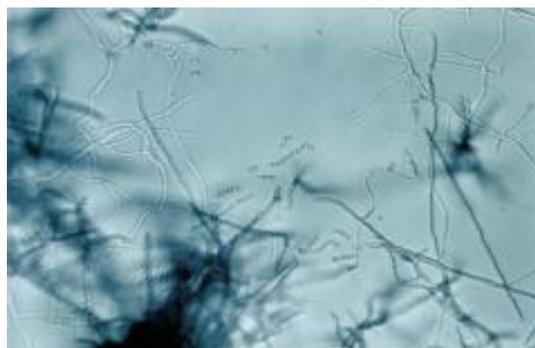


Figura 1. Imagem ilustrativa de *Streptomyces* sp.

Fonte: <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Streptomyces>

As actinobactérias do gênero *Streptomyces* possuem um ciclo de vida bastante interessante, semelhante em muitos aspectos ao ciclo de vida de eucariotos inferiores como os fungos filamentosos (figura 2). A forma reprodutiva consiste de esporos que vão dar início ao desenvolvimento de um micélio vegetativo pela produção de dois tubos germinativos. Este micélio

se ramifica em uma rede de hifas que emerge da superfície da colônia para o ar projetando um micélio aéreo, que irá constituir uma hifa aérea e esta por sua vez originar os esporos. Com a maturação dos esporos o ciclo de vida é completado. Uma vez liberado da cadeia de esporos e dispersados no ambiente, a germinação de cada esporo dará origem a um novo micélio. Em resposta à depleção de nutrientes ou a outros sinais, o desenvolvimento metabólico tem início com a produção de metabólitos secundários ao mesmo tempo em que ocorre a mudança morfológica do micélio vegetativo a micélio aéreo (WORRALL & VIJGENBOOM, 2010).

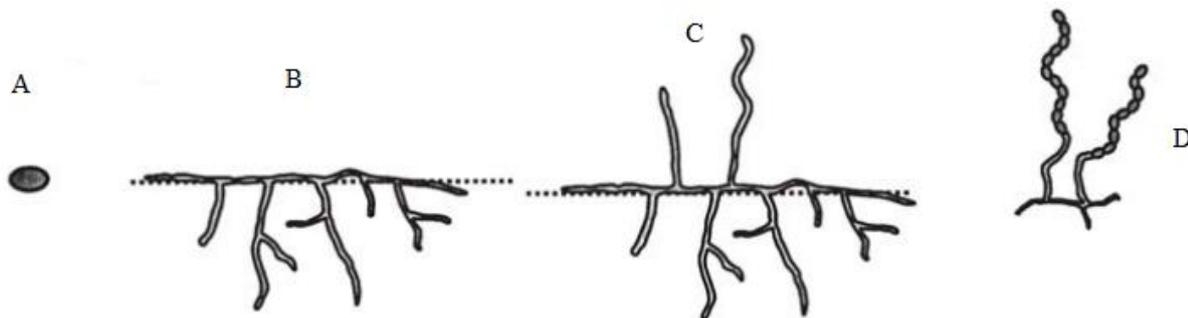


Figura 2. Ciclo de vida dos *Streptomyces*. (A) Esporo; (B) Micélio vegetativo; (C) Micélio aéreo; (D) Esporulação (Reproduzido de WORRALL & VIJGENBOOM, 2010).

Uma das propriedades mais relevantes dos *Streptomyces* é a capacidade de produzir metabólitos secundários como antibióticos, herbicidas, antiparasitários, entre outras substâncias farmacologicamente ativas como imunossupressores e agentes antitumorais (OHNISHI et al., 2008).

Os antibióticos obtidos a partir do gênero *Streptomyces* são classificados como tetraciclina aminoglicosídeos (streptomicina e seus derivados), macrolídeos (eritromicina e seus derivados), cloranfenicol e muitos outros não β -lactâmicos (RAJA & PRABAKARANA, 2011). Aproximadamente 60% dos antibióticos desenvolvidos para a agricultura e horticultura têm sido isolados de espécies deste gênero (HWANG et al., 2001). Na tabela 1 estão descritos alguns agentes antimicrobianos produzidos nos últimos anos por actinobactérias do gênero *Streptomyces*.

Tabela 1. Alguns agentes antimicrobianos produzidos atualmente pelo gênero *Streptomyces*.

Antibiótico	Agente produtor	Referência
Ácido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	Teodoro et al., 2006
Ácido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i> DAUFPE 3060	Marques et al., 2011
Ácido griseoluteico	<i>Streptomyces griseoluteus</i> P510	Wang et al., 2011
Cefamicina C	<i>Streptomyces clavuligerus</i> NT4	Bussari et al., 2008
Antifúngico	<i>Streptomyces rimosus</i> MY02	Yu et al., 2008
Oxitetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i> M4018	Tang et al., 2011
Vernamicina-A	<i>Streptomyces ramulosus</i> AZ-SH-29	Atta et al., 2011
Laidlomocina	<i>Streptomyces</i> sp. CS684	Yoo et al., 2007
Caboxamicina	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	Hohmann et al., 2009

2.3 Antibióticos β -lactâmicos e a Resistência Bacteriana

A história dos antibióticos β -lactâmicos teve início em 1928 quando o escocês Alexander Fleming observou a inibição do crescimento de culturas de *Staphylococcus aureus* em placas que haviam sido contaminadas por fungo presente no ar. O micro-organismo contaminante foi identificado como *Penicillium notatum*, sendo denominada penicilina a substância antimicrobiana por ele produzida (FLEMING, 1944a).

As penicilinas naturais são obtidas por meio de fermentação por fungos do gênero *Penicillium*, não existindo métodos alternativos viáveis. A partir da penicilina isolada de caldos fermentativos, podem ser sintetizados antibióticos com valor terapêutico e comercial superiores (MENEZES et al., 2000; MURO et al., 2009).

O uso intensivo de antibióticos tem aumentado dramaticamente a frequência de patógenos resistentes e ameaçado reduzir as opções terapêuticas (ANDERSSON & HUGUES, 2010), sobretudo à classe de antibióticos mais comumente utilizados, os pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos, composta por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MURRAY et al., 2004). Desde a introdução desta classe de antibióticos, muitos outros derivados β -lactâmicos com atividade antibiótica superior foram colocados no mercado, no entanto o crescente número de bactérias capazes de inativá-los tem ameaçado a eficiência destes fármacos (OLIVEIRA et al., 2009).

Como forma de conter o uso indiscriminado de antibióticos e o conseqüente aumento da resistência bacteriana na comunidade, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu novas regras para a compra de antibióticos que entraram em vigor a partir de novembro de 2011. A venda de antibióticos pode apenas ser realizada mediante receituário médico com prazo de validade de dez dias devido às especificidades dos mecanismos de ação dos antimicrobianos. Além disso, todas as movimentações das prescrições médicas devem ser registradas no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). Estas medidas valem para mais de noventa substâncias antimicrobianas, que abrangem todos os antibióticos com registro no país, exceto para os que são usados exclusivamente no ambiente hospitalar (AMARAL, 2012).

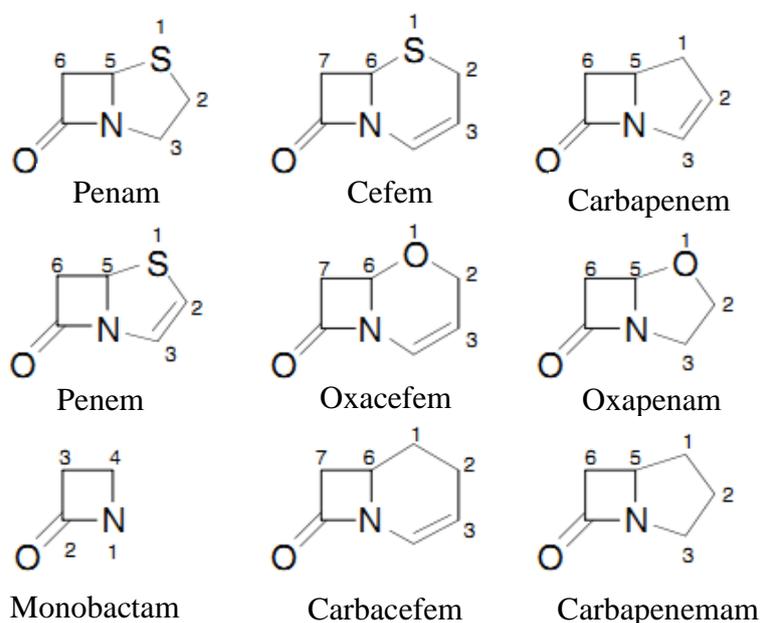


Figura 3. Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos. Reproduzido de TESTERO et al., 2010.

Um dos mecanismos de resistência mais comuns se dá por meio da modificação enzimática dos antibióticos através da produção de enzimas capazes de promover alterações estruturais, resultando na perda de sua funcionalidade. As mais prevalentes são as β -lactamases, enzimas catalíticas de natureza protéica que atuam rompendo a ligação amídica do anel β -lactâmico presente na estrutura química dos antibióticos desta família (WASHINGTON, 1991). A hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comum para esta classe de agentes antimicrobianos, encontrado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas clinicamente importantes (figura 4). As bactérias Gram-negativas apresentam um número respeitável de enzimas β -lactamases, sobretudo cromossômicas e plasmidiais (SOUZA JÚNIOR et al., 2004; BUSH & JACOBY, 2010).

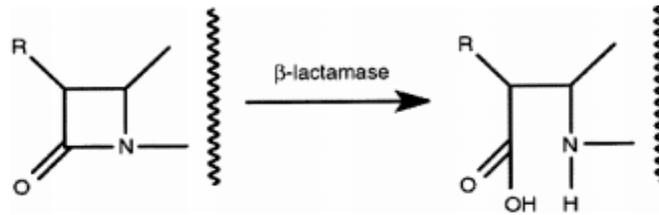


Figura 4. Hidrólise do anel β -lactâmico por enzima β -lactamase. Reproduzido de WILLIAMS (1999).

Outro mecanismo responsável pela resistência a antimicrobianos consistem nas bombas de efluxo presentes na membrana externa da célula que fazem a expulsão de grande quantidade de moléculas, tais como metabólitos, detergentes, solventes orgânicos e antibióticos para o meio extracelular, desta forma as concentrações de substâncias tóxicas são mantidas em níveis baixos no interior celular. Para isto, estas bombas de efluxo utilizam a hidrólise de ATP ou um mecanismo de contra-transporte iônico como substrato energético (TAFUR et al., 2008).

A resistência também pode ocorrer por alterações na permeabilidade da membrana externa, principalmente por mudanças nas proteínas denominadas porinas, as quais formam canais que regulam a entrada e saída de substâncias na célula, inclusive antibióticos. As propriedades de permeabilidade desta barreira têm um maior impacto na susceptibilidade do micro-organismo a antibióticos. Pequenas drogas hidrofílicas, como os antibióticos β -lactâmicos, têm acesso ao interior da célula bacteriana por poros formados pelas porinas, enquanto macrolídeos e outras drogas hidrofóbicas difundem-se através da bicamada lipídica (TAFUR et al., 2008; DELCOUR, 2009).

Os antibióticos β -lactâmicos imipenem e merepenem possuem alta resistência a ação das β -lactamases. Estes fármacos têm sido efetivos particularmente frente *Pseudomonas aeruginosa*, um micro-organismo que parece ser menos susceptível a ação da maioria dos antibióticos que as enterobactérias, devido à diminuição da permeabilidade da membrana e um eficiente sistema de efluxo de drogas (DELCOUR, 2009).

Alteração da estrutura terciária dos sítios de ação dos antibióticos é outro mecanismo de resistência relevante, sendo estes sítios de ação componentes estruturais de importância vital para a célula bacteriana. As proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) são componentes celulares responsáveis pelo processo transpeptidação, fundamental na síntese e estabilidade da parede celular. Estas PBPs constituem o sítio de ação de todos os antibióticos β -lactâmicos promovendo a lise da parede celular bacteriana. A resistência a esta classe de antibióticos pode ocorrer por meio de alterações estruturais secundárias ou mutações que levam à diminuição da afinidade dos β -

lactâmicos pelas proteínas ligadoras de penicilinas e, conseqüentemente, evitam que o antibiótico comprometa a integridade da parede celular (TAFUR et al., 2008).

2.4 β -lactamases e Inibidores de β -lactamases

As enzimas β -lactamases têm evoluído ao longo do tempo, sendo descritas atualmente uma grande quantidade de enzimas diferentes distribuídas em uma variedade de micro-organismos de diversos gêneros e espécies (MENA & GONZÁLEZ, 2009). Os genes que codificam estas enzimas podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em elementos genéticos móveis (plasmídeos), o que facilita sua transferência entre diferentes bactérias (TAFUR et al., 2008), representando um desafio significativo no tratamento de infecções bacterianas.

As β -lactamases, segundo a classificação inicial de Bush, Jacoby e Medeiros foram divididas em serino- β -lactamases classes A, C e D, assim denominadas por possuírem resíduo de serina em seu sítio ativo, enquanto que as metalo- β -lactamases, enzimas que requerem um íon Zn^{2+} em seu sítio ativo foram classificadas na classe B. Esta classificação teve como base a habilidade destas enzimas de hidrolizar classes específicas de β -lactâmicos (BUSH & JACOBY, 2010).

Recentemente, novos subgrupos funcionais têm sido adicionados a este esquema como resultado da identificação de variantes e da expansão das famílias de β -lactamases, sendo então divididas em cefalosporinases ou serino- β -lactamases grupo 1, serino- β -lactamases grupo 2 e metalo- β -lactamases grupo 3 (BUSH & JACOBY, 2010).

Uma estratégia para contornar a resistência à penicilina mediada pela síntese de β -lactamases tem sido a administração do antibiótico β -lactâmico juntamente com um inibidor de enzimas β -lactamases (BUYNAK, 2006). Estes inibidores de β -lactamases não são capazes de hidrolisar as metalo- β -lactamases, no entanto exercem seu mecanismo de ação frente enzimas serino- β -lactamases (BERTONCHELI & HÖRNER, 2008; LLARRULL et al., 2010).

Atualmente, três inibidores de β -lactamase são comercialmente disponíveis, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (figura 5). O mecanismo de ação dos três inibidores de β -lactamase é similar, estes se unem irreversivelmente a enzima β -lactamase formando um complexo acil-enzima, e no processo de ligação à enzima sofrem autodestruição sendo, desta forma, denominados inibidores “suicidas”. Deste modo, protegem o antibiótico β -lactâmico da inativação enzimática, permitindo que o mesmo exerça sua atividade antimicrobiana (BARCELONA et al., 2008).

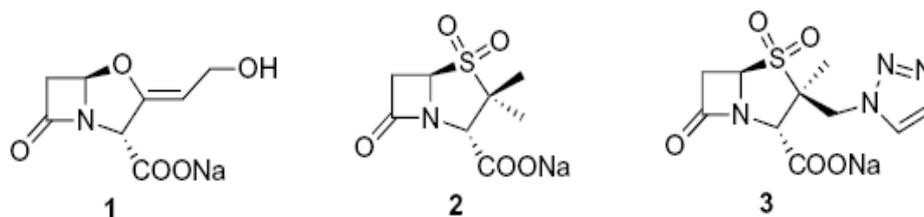


Figura 5. Inibidores de β -lactamases utilizados na clínica médica. (1) Ácido clavulânico; (2) Sulbactam; (3) Tazobactam. Reproduzido de VENKATESAN et al., (2004).

Ácido clavulânico foi isolado de processos fermentativos de *Streptomyces clavuligerus* em 1976 e, desde então tem demonstrado possuir potente atividade como inibidor irreversível de β -lactamases (PEREZ-LLARENA & BOU, 2009), sendo até os dias atuais produzido comercialmente por este micro-organismo em meio complexo (SILVA et al., 2011). Este inibidor de β -lactamases possui uma estrutura química com dois anéis, β -lactâmico e oxazolidina, condensados. Não possui a cadeia lateral ligada ao átomo de carbono C6 que é característica de antibióticos β -lactâmicos, e também tem um substituinte exocíclico ligado ao carbono C2 (grupo hidroxietilidina) em vez do grupo gem-dimetil presente em todas as penicilinas (PEREZ-LLARENA & BOU, 2009).

O sulbactam e o tazobactam são produzidos sinteticamente a partir de ácido 6- β -aminopenicilânico (6-APA), e são estruturalmente semelhantes diferenciando-se quanto à adição de um grupo triazol no grupo β -metil do carbono C2 na estrutura química do tazobactam (PEREZ-LLARENA & BOU, 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

As formulações comerciais contendo as cinco combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases são utilizadas para o tratamento de infecções comuns, embora alguns estejam disponíveis apenas como preparações parenterais e outros usados para infecções adquiridas na comunidade devido à sua biodisponibilidade oral (Tabela 2). Estas combinações são mais freqüentemente utilizadas devido à eficácia e baixa toxicidade (AKALIN, 2002).

Tabela 2. Combinações de β -lactâmicos e Inibidores de β -lactamases em uso clínico (OLIVEIRA et al., 2009; DRAWS & BONOMO, 2010)

β -lactâmico	Inibidor de β -lactamase	Administração
Ampicilina	Sulbactam	Parenteral e oral
Cefoperazona	Sulbactam	Parenteral
Piperacilina	Tazobactam	Parenteral
Ticarcilina	Ácido Clavulânico	Parenteral
Amoxicilina	Ácido Clavulânico	Parenteral e oral

2.5 Produção de ácido clavulânico

O processo fermentativo, em síntese, consiste em submeter um micro-organismo selecionado a um substrato específico por um determinado tempo, com temperatura e pH adequados para que ocorra a degradação do substrato e reprodução do micro-organismo às custas do uso dos nutrientes disponíveis (MORAES, 2001).

A definição da composição do meio de cultura é um estágio primário de fundamental importância no desenvolvimento de bioprocessos fermentativos. Os componentes básicos do meio de cultivo requeridos são as fontes de carbono e nitrogênio, sais minerais e, em alguns casos, fatores de crescimento (MORAES, 2001; ORTIZ et al., 2007). Atualmente, vem sendo reportada na literatura a utilização de derivados da soja, tais como farinha de soja e proteína isolada de soja como excelentes fontes de nitrogênio, e glicerol e óleos vegetais como fontes de carbono para produção de ácido clavulânico por fermentação em meio de cultivo (DOMINGUES et al., 2010; ALI, 2010; HAMED I et al., 2011).

Os componentes do meio de cultivo podem ser combinados com parâmetros operacionais do processo tais como temperatura, agitação e aeração (MANDENIUS & BRUNDIN, 2008), sendo a influência de tais fatores na biossíntese do ácido clavulânico investigada (ROSA et al., 2005).

O primeiro estágio na produção de metabólitos secundários, a exemplo dos antibióticos, é caracterizado pelo desenvolvimento do inóculo o qual deve estar em um estado ativo para minimizar a fase de adaptação ou fase *lag*, livre de contaminação, a biomassa inoculada precisa estar conservada e com capacidade para formar produtos e, seu volume deve corresponder de 3 a 10% do volume total do meio de cultivo (SAUDAGAR et al., 2008).

A segunda fase consiste no estágio onde os antibióticos são microbiologicamente sintetizados e, por fim, a última etapa consiste na recuperação do produto. O ácido clavulânico produzido comercialmente por *Streptomyces clavuligerus* pode ser recuperado a partir do meio de cultivo fermentado de várias formas, sendo normalmente as células removidas por filtração ou centrifugação antes que sejam realizados os processos de extração. A extração do ácido clavulânico do meio fermentado pode ser feita por uma série de fases que são baseadas em operações de separação como extração líquido-líquido, adsorção e troca iônica (SAUDAGAR et al., 2008; SILVA et al., 2011).

2.6 Sistemas de duas fases aquosas

Sistemas de duas fases aquosas (SDFAs) são formados espontaneamente quando soluções aquosas estruturalmente diferentes como dois polímeros ou um polímero com um sal são misturadas

acima de concentrações críticas (AZEVEDO et al., 2009). Os sistemas de duas fases aquosas possuem em sua composição cerca de 80-90% de água constituindo, portanto, ambientes adequados para células, organelas celulares e substâncias bioativas (BANIK et al., 2003).

Para formar as duas fases, soluções aquosas e dois polímeros geralmente polietilenoglicol (PEG) e dextran são requeridos (GÜNDÜZ & KORKMAZ, 2000). Vários sais como fosfato de potássio, citrato de sódio, NaCl, KCl, NH₄Cl entre outros podem formar fases em sistemas de duas fases poliméricos, contendo especialmente o PEG (BANIK et al., 2003).

Partição em sistemas de duas fases aquosas consiste em uma técnica emergente que tem aplicação em processos de purificação de várias proteínas e enzimas (NAGANAGOUDA & MULIMANI, 2008). Além disso, esta técnica é relativamente simples e pouco onerosa, de fácil operação e desenvolvimento consistindo em um processo de purificação e concentração integrado em uma única etapa (AZEVEDO et al., 2009) que possui algumas vantagens em comparação com outras técnicas de separação e purificação comumente usadas, tais como alto conteúdo de água em ambas as fases, alta biocompatibilidade, baixa degradação de biomoléculas, alta separação de produtos, entre outras, além da possibilidade de reciclar polímeros e sais (MOKHTARANI et al., 2008).

O sucesso com sistemas duas fases aquosas depende, sobretudo da capacidade de manipular a composição das fases com intuito de obter fases com diferentes propriedades físicas, coeficientes de partição (K) apropriados e seletividade para o material de interesse. Sendo fundamental a escolha de determinados parâmetros como seleção de polímero sua concentração e peso molecular, a escolha do sal e sua concentração no sistema (XU et al., 2003).

Recentemente, sistemas de duas fases aquosas tem se tornado uma atrativa tecnologia de separação e purificação para numerosas biomoléculas como enzimas extracelulares (ASHIPALA & HE, 2008; PORTO et al., 2008), α -toxinas (CAVALCANTI et al., 2008), anticorpos humanos (AZEVEDO et al., 2009), antibiótico penicilina (JIANG et al., 2009), β -caroteno (CHAVEZ-SANTOSCOY et al., 2010), inibidor de β -lactamase (SILVA et al., 2011), entre outras.

Em fermentação extrativa usando sistemas de duas fases aquosas, o processo de produção e recuperação de produtos de interesse ocorre simultaneamente (BANIK et al., 2003). No que diz respeito a produção de antibióticos por fermentação extrativa com SDFA, ainda há um número relativamente pequeno de trabalhos descritos na literatura. Viana Marques et al. (2011) otimizaram as condições de produção de ácido clavulânico por fermentação extrativa usando sistemas de duas fases aquosas PEG/sais fosfato onde foi avaliada a influência das variáveis massa molar e concentração do PEG, intensidade de agitação e concentrações dos sais fosfato por planejamento fatorial.

No ano de 2008, Mokhtarani e colaboradores investigaram a partição do antibiótico ciprofloxacina em sistemas de duas fases aquosas PEG/sulfato usando planejamento fatorial. Em outro trabalho realizado por Jiang e colaboradores (2009) foi feita a extração de penicilina em SDFA aplicando líquidos iônicos para recuperação do polímero, sendo naquela ocasião o primeiro relato da aplicação de líquidos iônicos para recuperação de materiais formadores de fase. Silva et al. (2011) utilizaram sistema de duas fases aquosas e cromatografia de troca iônica para purificação de ácido clavulânico em relação aos aminoácidos presentes no líquido fermentado. No entanto, nestes trabalhos não foram aplicados sistemas de duas fases aquosas integrados ao meio de produção por fermentação extrativa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Produzir e purificar ácido clavulânico por *Streptomyces sp.* DPUA 1542 por cultivo submerso em frascos agitados em fermentação extrativa utilizando planejamentos fatoriais.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido clavulânico;
- Avaliar a produção de ácido clavulânico fazendo uma correlação com o crescimento celular e consumo de substrato;
- Avaliar o efeito das condições de cultivo em frascos agitados (pH, concentrações das fontes de nitrogênio e carbono) na produção de ácido clavulânico utilizando planejamento fatorial;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do *Streptomyces sp.* DPUA 1542 frente microorganismos multirresistentes a antibióticos;
- Realizar uma fermentação extrativa em Sistema de duas fases aquosas (SDFA) e avaliar a produção e recuperação do ácido clavulânico usando planejamento fatorial.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, J. F., GOLDESTINE, F. W. Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, Suppl 1: S125-S130, 1998.

AGUIAR, E. Agentes antimicrobianos com inibidores de betalactamases: associações, mecanismos de resistência, uso adequado. **Brasília Médica**, v. 40, n. 1/4, p. 27-32, 2003.

AKALIN, H. E. Use of β -lactam/ β -lactamase Inhibitor Combinations to Treat Community-Acquired Respiratory Tract Infections. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 11, Suppl.1, 2002.

AL-ZAHRANI, S. H. M. Studies on antimicrobial activity of *Streptomyces sp.* isolated from Jazan. **JKAU: Sci.**, n. 19, p. 127-138, 2007.

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

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 36, p. 321-331, 1980.

AKOVA, M. Sulbactam-containing β -lactamase inhibitor combinations. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 185-188, 2008.

AMARAL, Vanessa. Venda de antibióticos só poderá ocorrer com retenção da receita na farmácia. 27 de outubro de 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 23 de dezembro de 2011.

ARASU, M. V. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, v.19, p. 22-28, 2009.

ASHIPALA, O. K.; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4112-4119, 2008.

ATTA, H. M.; HAROUN, B. M.; KHALIFA, M. A. Physico-chemical characteristics of vernamycin-A antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* SP-AZ-SH-29. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 247-255, 2011.

- AZEVEDO, A. M. et al. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 14-21, 2009.
- BALTZ, R. H. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. **Microbe**, v. 2, n. 3, 2007.
- BANIK, R. M. et al. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 337-348, 2003.
- BARCELONA, L.; MARIN, M.; STAMBOULIAN, D. Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas: Amoxicilina-sulbactam. **Medicina** (Buenos Aires), v. 68, p. 65-74, 2008.
- BEHARRY, Z. et al. Evaluation of penicillin-based inhibitors of the class A and B β -lactamases from *Bacillus anthracis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 541-545, 2004.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1-26, 2005.
- BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1085-1089, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- BUSSARI, B. et al. Production of Cephameycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 49-58, 2008.
- BUYNAK, J. D. Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 930-940, 2006.
- CANTÓN, R. et al. IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 53-62, 2008.
- CAVALCANTI, M. T. H. et al. Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* Type A in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase PEG–phosphate system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1771-1776, 2008.

- CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical transactions of the Royal Society B**, [London], United Kingdom, v. 361, p.761-798, 2006.
- CONNELL, T. A. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 446-449, 2001.
- DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 808-816, 2009.
- DOMINGUES, L. C. G. et al. Optimisation of the glycerol-to-ornithine molar ratio in the feed medium for the continuous production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 7-11, 2010.
- MURO, L. F. F. et al. Farmacocinética e dinâmica da penicilina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 12, 2009.
- FLEMING, A. A descoberta da penicilina. **Boletim Médico Britânico**, v. 2, p. 5, 1944a.
- GARRITY, G.M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 ed. Release 50, p.1-399, New York: Springer-Verlag, 2004.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 37, p. 189-216, 1983.
- GONZÁLEZ, I. et al. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, England, v. 54, p. 401-415, 2005.
- GOUVEIA, E. R. et al. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 157-161, 2001.
- GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in an aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 255-258, 2000.
- HAMED, J. et al. Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with peanut derivatives. **Annals of Microbiology**, 2011.

- HART, C. A. Antibiotic resistance: an increasing problem? **BJM** 25; 316 (7140), p.1255-1256, 1998.
- HOHMANN, C. et al. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-6, 2009.
- JIANG, Y. et al. Hydrophobic ionic liquids-assisted polymer recovery during penicillin extraction in aqueous two-phase system. **Chemical Engineering Journal**, v. 147, p. 22-26, 2009.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76, 1999.
- KIESER, T. et al. Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich, England, 2000.
- LEE, N. et al. Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. **Drugs**, v. 63, p. 1511-1524, 2003.
- LEVY, B.S., MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine supplement**, New York, United States, v. 10, p. 122-129, 2004.
- LIVERMORE, D. M. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.
- MACEDO, M. L. A. P. et al. Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, p. 59-63, 2005.
- MANDENIUS, C. F.; BRUNDIN, A. Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1191-1203, 2008.
- MARANESI, G. L. et al. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 509-514, 2005.
- MARQUES, D. A. V. et al. Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 658-667, 2011.
- McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in environment – a review. **Gene**, Amsterdam, v. 115, p. 189-192, 1990.

- MENA, A. J. P; GONZÁLEZ, M. J. C. G. Detecção de Betalactamasas de Espectro Estendido em cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. **Kasmera**, v. 37, n. 1, p. 25-37, 2009.
- MENEZES, J. C.; ALVES, T. P.; CARDOSO, J. P. “Biotecnologia Microbiana: A Produção de Penicilina”, cap. 12, 15 pp. in “Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações”, N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL, 2000. MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 776p, 2004.
- MOKHTARANI, B. et al. Partitioning of Ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 241-247, 2008.
- MORAES, I. O. Produção de Microorganismos. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial – Processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 199-217, 2001.
- NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1293-1299, 2008.
- NETO, A. B. Estudo do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Carlos, São Carlos-SP, pp.206, 2004.
- OHNISHI, Y. et al. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal of Bacteriology**, p. 4050-4060, 2008.
- OLIVEIRA, J. H. H. L. et al. Ácido clavulânico e Cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.
- ORTIZ, S. C. A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1071-1077, 2007.
- PADILHA, G. S. et al. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 1, p. 1-4, 2011.
- PAGE, M. G. P. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Properties of BAL30376, a β -Lactam and Dual β -Lactamase Inhibitor Combination with Enhanced Activity against Gram-Negative Bacilli That

- Express Multiple β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1510-1519, 2011.
- PORTO, T. S. et al. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 716-721, 2008.
- RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and Drug - An Overview. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 2, p. 75-84, 2011.
- RIBEIRO, M. Z. et al. Partial purification of Glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase Poly(ethyleneglycol)/phosphate systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 78-83, 2007.
- ROSA, J. C. et al. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, p. 99-104, 2005.
- ROSSOLINI, G. M. Acquired metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, n. p.1557-1558, 2005.
- RUIZ, B. et al. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.
- SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R.S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 335-351, 2008.
- SILVA, C. S. et al. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. **New Biotechnology**, v. 0, n. 0, 2011.
- SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.
- SOUSA JÚNIOR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, v. 63, 2004.
- SULLIVAN, D. C.; CHAPMAN, S. W. Bacteria That Masquerade as Fungi Actinomycosis/Nocardia. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, p. 216-221, 2010.
- TAFUR, J. D.; TORRES, J. A.; VILLEGAS, M. V. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. **Asociación Colombiana de Infectología**, v. 12, n. 3, 2008.

TANG, Z. et al. Improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 17-24, 2011.

TEODORO, J. C. et al. 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.

TESTERO, S. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. β -lactam antibiotics. **Burger's Medical Chemistry, Drug Discovery and Development**, 7^a edição, 2010.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**, 6^a edição, Porto Alegre, Artmed, 2000.

TRESOLDI, A. T. et al. Risk factors associated with the acquisition of multiresistant bacteria in a pediatric nursery. **The Journal of Pediatrics**, v. 4, p. 275-286, 2000.

VELLA, P. et al. The identification of new metallo- β -lactamase inhibitor leads from fragment-based screening, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 3282-3285, 2011.

VENKATESAN, A. M. et al. Novel imidazole substituted 6-methylidene-penems as broad-spectrum β -lactamase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5807-5817, 2004.

VIANA MARQUES, D. A. et al. Extractive Fermentation of Clavulanic Acid by *Streptomyces DAUFPE 3060* Using Aqueous Two-Phase System. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, 2011.

VIJAYAKUMAR, R. et al. Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. **Indian Journal of Microbiology**, p. 1-10, 2011.

WANG, Y. et al. Isolation and purification of a modified phenazine, griseoluteic acid, produced by *Streptomyces griseoluteus* P510. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 311-319, 2011.

WASHINGTON, J. A. Functions and activities of the Area Committee on Microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 2, p. 150-155, 1991.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamases inhibitor. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 12, p S3-S7, 1999.

WORRALL, J. A. R.; VIJGENBOOM, E. Copper mining in *Streptomyces*: enzymes, natural products and development. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 742-756, 2010.

XU, Y. Liquid-Liquid Extraction of Enzymes by Affinity Aqueous Two-Phase Systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 741-750, 2003.

YOO, J. C. et al. Production and Biological Activity of Laidlomycin, Anti-MRSA/VRE Antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. **The Journal of Microbiology**, p. 6-10, 2007.

YU, J. et al. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2087-2091, 2008.

5 CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *STREPTOMYCES* sp. ISOLADO DE LIQUENS DA REGIÃO AMAZÔNICA

Este capítulo refere-se à produção de ácido clavulânico pela linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA 1542 pertencente à Coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (Manaus, AM, Brasil). Este manuscrito será submetido para publicação na revista Química Nova.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *STREPTOMYCES* sp. ISOLADO DE LIQUENS DA REGIÃO AMAZÔNICA

Vanessa Régia Francisco Couto¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) – Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária – CEP: 50670-420 – Recife – PE

Márcia Nieves Carneiro da Cunha²

Camila Souza Porto²

Tatiana Souza Porto²

*Ana Lúcia Figueiredo Porto²

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) – Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900, Recife – PE

Francisca Simas Teixeira³

³ Universidade Federal do Amazonas – Departamento de Parasitologia – Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Coroado I – CEP: 69077-000, Manaus – AM.

*analuporto@yahoo.com.br

PRODUCTION OF CLAVULANIC ACID BY *STREPTOMYCES* sp. ISOLATED OF AMAZON LICHENS

5.1 ABSTRACT

One of the main resistance mechanisms to β -lactam antibiotics developed by a variety of bacteria is the production of β -lactamase enzymes capable of inactivating drugs. Clavulanic acid (CA) is a potent β -lactamase inhibitor produced by actinobacteria of the genus *Streptomyces* in fermentation processes. This work aimed to produce CA by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 strain in submerged cultures, using shake flasks. The production was assessed using soybean flour (20,0 g/L), soybean extract (20,0 g/L), corn steep liquor (20,0 g/L) as nitrogen sources and glycerol (10,0 g/L) as carbon source for 144 hours at 250 rpm at 28°C. The highest CA concentration (23,10 mg/L) was obtained in the time of 120 hours of submerged cultivation, using soybean flour as nitrogen source. We also observed antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. DPUA 1542 strain against *Staphylococcus aureus* multidrug resistant. These results demonstrated that *Streptomyces* sp. strain can be a viable alternative for the synthesis of CA in biotechnological processes.

Keywords: Clavulanic acid (CA); *Streptomyces* sp. DPUA 1542; Submerged fermentation

5.2 INTRODUÇÃO

Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência microbiana aos antibióticos β -lactâmicos consiste na produção de enzimas β -lactamases, que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, tornando a droga inativa.¹ Estes antibióticos atuam ligando-se às proteínas carreadoras de penicilina na parede celular bacteriana, sendo os mecanismos de resistência em geral envolvidos com processos que interferem na atuação destas proteínas.²

Esta situação pode ser contornada através da utilização de três inibidores de β -lactamases administrados clinicamente associados a antibióticos β -lactâmicos: ácido clavulânico/amoxicilina; ácido clavulânico/ticarcilina; sulbactam/ampicilina e tazobactam/piperacilina, desta maneira estas penicilinas passaram a exercer atividade contra bactérias produtoras da enzima.^{3,4}

Ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de β -lactamases com atividade inibidora destas enzimas cerca de 600 vezes maior que o sulbactam e cinco vezes maior que o tazobactam (ácido clavulânico= 0,03 μ M; tazobactam= 0,14 μ M; sulbactam= 17 μ M).⁵

AC pode ser produzido através de processos fermentativos por várias espécies de *Streptomyces*, sobretudo pelo *Streptomyces clavuligerus*. Atualmente, a produção industrial de AC vem sendo realizada apenas pelas companhias Glaxo SmithKline (EUA); Lek D.D. (Eslovênia); e CIPAN (Portugal).⁶ No entanto o processo de obtenção industrial do AC é pouco documentado na literatura, sendo fundamental o conhecimento e a otimização do seu processo de produção.⁷

Neste contexto, torna-se fundamental a investigação de micro-organismos produtores de compostos com atividade antimicrobiana, sendo aproximadamente 20% da biodiversidade mundial concentrada no Brasil, sobretudo na Floresta Amazônica, considerada fonte inestimável de matérias-primas.⁸ Sendo o gênero *Streptomyces* constituído por bactérias filamentosas Gram-positivas amplamente distribuídas em uma variedade de ambientes naturais, sobretudo como componente significativa da população microbiana encontrada no solo.⁹ Caracterizadas por apresentarem um complexo metabolismo secundário, estas actinobactérias respondem pela

produção de cerca de dois terços dos antibióticos de origem natural produzidos por micro-organismos.¹⁰

Devido ao grande potencial microbiológico da Amazônia e à ampla utilização de metabólitos secundários no âmbito biotecnológico, a exemplo dos antibióticos, o presente trabalho teve como objetivo produzir AC por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 isolado da região Amazônica utilizando diferentes fontes de nitrogênio em cultivo submerso em frascos agitados, além de verificar a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* multirresistente a antibióticos β -lactâmicos.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Micro-organismo e manutenção

Streptomyces sp. DPUA 1542 isolado de líquens de Região Amazônica é produtor de inibidores de β -lactamases segundo Cunha e colaboradores¹¹ e pertencente à coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas. As culturas foram repicadas em tubos de ensaio inclinados contendo o meio ISP-2,¹² modificado pela retirada de glicose, e incubadas a 30°C por oito dias, após este procedimento foram mantidas sob refrigeração e repicadas a cada 30 dias.

5.3.2 Meios de cultivo para produção de ácido clavulânico

5.3.2.1 Seleção da melhor fonte de nitrogênio

Os meios de produção utilizados variaram quanto à composição da fonte de nitrogênio para produção de ácido clavulânico, sendo farinha de soja (20,0 g/L); extrato de soja (20,0 g/L) e milhocina (20,0 g/L). Exceto pela composição das fontes de nitrogênio, a composição total do meio de cultivo e as condições de cultivo foram conforme descritos no item a seguir.

5.3.2.2 Produção com a melhor fonte de nitrogênio

Para o pré-inóculo, a linhagem de *Streptomyces* crescida em meio ISP-2 por oito dias foi transferida para frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultivo descrito por Maranesi et al.¹³ composto por glicerol (10,0 g/L), farinha de soja (20,0 g/L), K₂HPO₄ (1,2 g/L), 1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO₄.7H₂O; 100 mg de MnCl₂.4H₂O; 100 mg de ZnSO₄.H₂O; água destilada q.s.p. 100 mL), modificado pela retirada do óleo de soja. Ao meio de cultivo foi adicionado o tampão 3-(N-morfolino) propanesulfônico – MOPS (21,0 g/L) e, o pH inicial foi ajustado em 6,8.

O meio utilizado para o preparo do pré-inóculo foi o mesmo para o cultivo submerso onde foram utilizados frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultura, nos quais foram adicionados os inóculos correspondendo a 10% do volume total. Os frascos foram incubados em agitação orbital de 250 rpm por 144 horas a 28°C, e a cada 24 horas foram retiradas alíquotas para determinação da concentração celular, curva de pH e produção de AC.

5.3.3 Determinação da concentração celular e curva de pH

A concentração celular foi determinada por intermédio do peso da massa celular seca após secagem em estufa a 60°C durante 24 horas. A curva do pH foi obtida por acompanhamento ao decorrer da fermentação por potenciometria a cada 24 horas.

5.3.4 Avaliação da produção de ácido clavulânico

O líquido fermentado foi centrifugado a 5.500×g por 20 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a dosagem de AC. A dosagem de AC foi de acordo com a metodologia descrita por Bird et al.¹⁴ através da dosagem espectrofotométrica do AC que é quantificada pela medição do aumento da densidade ótica a 311nm através da formação do produto 8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-enol decorrente de sua reação com imidazol.

5.3.5 Produtividade em ácido clavulânico (P_{AC})

O cálculo da produtividade do ácido clavulânico no decorrer do cultivo foi realizado com base na equação abaixo, sendo a produtividade do ácido clavulânico expressa em (mg/L. h) conforme Marques et al.¹⁵

$$P_{AC} = C_P / t_h$$

Sendo, C_P : Concentração de ácido clavulânico produzido (mg/L); t_h : tempo (h) de fermentação.

5.3.6 Ensaio para atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. DPUA 1542 foi determinada frente *Staphylococcus aureus* multirresistente a antibióticos β -lactâmicos.¹⁶ Uma suspensão do micro-organismo teste a uma concentração de 10^8 UFC/mL foi semeada em Placas de Petri contendo meio agar Müller Hinton acrescido de uma solução de penicilina G (0,01 mg/mL). Fragmentos de 6 mm de diâmetro foram retirados da área central de cultivo de *Streptomyces* sp. DPUA 1542 crescido em placa de Petri em meio ISP-2¹² por 168 horas a 30°C e depositados na superfície do meio de cultivo. O diâmetro das zonas de inibição do crescimento foram mensuradas após 24 horas de incubação das placas a 37°C.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de AC foi avaliada a cada 24 horas durante 144 horas de cultivo, sendo observada a influência das fontes de nitrogênio conforme a figura 1. A mais alta produtividade de AC ocorreu com 120 horas de cultivo sendo a farinha de soja e a milhocina, respectivamente, as melhores fontes de nitrogênio. O extrato de soja não demonstrou significância, neste ensaio, na produção de AC.

A influência da concentração das fontes de carbono e nitrogênio bem como da rotação em cultivos submersos em frascos agitados envolvendo o gênero *Streptomyces* vem sendo descrito na literatura. A regulação da fonte de carbono é um dos parâmetros que mais exerce influência no controle do metabolismo secundário.¹⁷ A literatura aponta o glicerol como fonte de carbono

essencial para a síntese de AC,⁶ apesar de ainda existirem controvérsias a respeito dos substratos que favorecem ou não sua síntese.⁷ Razão pela qual neste estudo foi utilizado glicerol (15 g/L) como fonte de carbono para a síntese do antibiótico.

Como fontes de nitrogênio para a síntese deste inibidor de β -lactamases são descritos os derivados da soja pelo fato destes fornecerem subsídios para o crescimento celular e possuírem arginina, o precursor da molécula de AC.¹⁸ Os resultados encontrados neste trabalho condizem com a literatura, visto que a mais alta produção foi observada com farinha de soja como substrato, no entanto o mesmo não foi observado em relação ao extrato de soja.

A retirada do óleo de soja do meio de cultivo para produção teve o intuito de reduzir a viscosidade do meio, já que o aumento da viscosidade afeta diretamente a produção de metabólitos secundários como os antibióticos pelo fato de dificultar a transferência de oxigênio,¹⁹ além de gerar altos níveis do óleo residual no meio de cultivo e de requerer alta oxigenação para o metabolismo do óleo quando comparado aos carboidratos.⁶

Pelo fato da melhor produção ter sido observada com o uso da farinha de soja como substrato na produção de AC, visando uma otimização dos resultados obtidos, foi feita uma segunda produção apenas usando farinha de soja como fonte de nitrogênio, sendo a cinética de produção relacionada com o pH e com a curva de crescimento celular, descrita na figura 2.

De acordo com a figura 2, a maior produção de AC ocorreu no final da fase estacionária do crescimento celular (144 horas), sendo 23,44 mg/L ou 0,1627 mg/L.h em produtividade. Resultados superiores foram obtidos por Marques et al.¹⁵ em cultivo submerso com *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 usando o mesmo meio de cultivo usado neste trabalho, diferenciado em relação à concentração de glicerol (5 g/L), com produção máxima de 629 mg/L. No entanto este resultado foi decorrente de estudos de otimização por metodologia de superfície de resposta.

A análise potenciométrica mostrou que o pH não sofreu alterações significativas, mantendo-se entre 5,85 e 6,0, valores próximos ao pH inicial (6,8) devido à adição do tampão biológico MOPS (21,0 g/L), o que é ideal no processo de produção deste inibidor de β -lactamases visto que o

AC apresenta velocidade de degradação elevada em temperaturas acima de 30°C e em regiões alcalinas e ácidas com $\text{pH} > 7,5$ e $\text{pH} < 4,5$, respectivamente.²⁰

Em relação ao ensaio para atividade antimicrobiana foi possível evidenciar atividade antimicrobiana da linhagem de *Streptomyces* utilizada neste trabalho frente *Staphylococcus aureus* em meio agar Müller Hinton adicionado de penicilina G através da formação de um halo de 33 mm de diâmetro. O micro-organismo teste cresceu normalmente em toda extensão da placa, no entanto na região em torno do fragmento de *Streptomyces* sp. foi encontrada uma zona de inibição, indicando que o AC produzido potencializou a ação do antibiótico β -lactâmico difuso no meio de cultivo.

5.5 CONCLUSÃO

A linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA 1542 apresentou produção de AC nas condições testadas, sobretudo na fase de declínio do crescimento celular em 144 horas de fermentação submersa em meio de cultura com farinha de soja, sendo esta fonte de nitrogênio a mais eficiente para produção de AC dentre as fontes testadas. Em adição, *Streptomyces* sp. também demonstrou eficiente atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* com perfil de resistência a antibióticos β -lactâmicos, demonstrando ser uma alternativa promissora para uso na indústria farmacêutica na produção de compostos com atividade antibiótica. No entanto, faz-se necessário aprimorar o processo de produção de AC através de um planejamento de experimentos a fim de aumentar a produtividade em ácido clavulânico.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bertoncheli, C. M.; Hörner, R. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2008**, 4, 44.
2. Sousa Junior, M. A.; Ferreira, E. S.; Conceição, G. C. *Newslab.* **2004**, 63.
3. Venkatesan, A. M.; Agarwal, A.; Abe, T.; Ushiroguchi, H.; Yamamura, I.; Kumagai, T.; Petersen, P. J.; Weiss, W. J.; Lenoy, E.; Yang, Y.; Shlaes, D. M.; Ryan, J. L.; Mansour, T. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12.
4. Aguiar, E. *Brasília Med.* **2003**, 1/4, 40.
5. Payne, D. J.; Cramp, R.; Winstanley, D. J.; Knowles, D. J. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 767.
6. Saudagar, P. S.; Survase, S. A.; Singhal, R.S. *Biotech. Adv.* **2008**, 26.
7. Oliveira, J. H. H. L.; Granato, A. C.; Hirata, D. B.; Hokka, C. O.; Barboza, M. *Quim. Nova* **2009**, 8, 32.
8. Souza, A. Q. L.; Souza, A. D. L.; Spartaco, A. F.; Pinheiro, M. L. B.; Sarquis, M. I. M.; Pereira, J. O. *Acta Amaz.* **2004**, 34.
9. Ilic, S. B.; Konstantinovic, S. S.; Todorovic, Z. B.; Lazic, M. L.; Veljkovic, V. B.; Jokovic, N.; Radovanovic, B. C. *Microbiology* **2007**, 4, 76.
10. Kieser, T.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J.; Chater, K. F.; Hopwood, D. A. *John Innes Foundation, Norwich*, **2000**.
11. Cunha, M. N. C.; Silva, N. M. V.; Teixeira, M. F. S.; Mota, R. A.; Lima-Filho, J. L.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2010**, 6, 62.
12. Pridham, T. G.; Anderson, P.; Foley, C.; Lindenfelser, L. A.; Hesseltine, C. W.; Benedict, R. G. *Antibiot. Ann.* **1957**.
13. Maranesi, G. L.; Baptista-Neto, A.; Hokka, C. O.; Badino, A. C. *W. J. Microb. Biotechnol.* **2005**, 21.

14. Bird, A. E.; Bellis, J. M.; Gasson, B. C. *Analyst*, **1982**, 107.
15. Marques, D. A. V.; Cunha, M. N. C.; Araújo, J. M.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Pessoa-Jr, A.; Porto, A. L. F. *Braz. J. Microbiol.* **2011**, 42.
16. Medeiros, E. S.; Mota, R. A.; Santos, M. V.; Freitas, M. F. L.; Pinheiro Júnior, J. W.; Teles, J. A. A. *Pesq. Vet. Bras.* 2009, 29.
17. Ruiz, B.; Chávez, A.; Forero, A.; García-Huante, Y.; Romero, A.; Sánchez, M.; Rocha, D.; Sánchez, B.; Rodríguez-Sanoja, R.; Sánchez, S.; Langley, E. *Crit. Ver. Microbiol.* **2010**, 2, 36.
18. Chen, K.; Lin, Y.; Tsai, C.; Hsieh, C.; Houn, J. *Biotech. Lett.* **2002**, 24.
19. Sato, S. Em *Biotecnologia industrial – Processos fermentativos e enzimáticos*; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W., eds.; Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.
20. Bersanetti, P. A.; Almeida, R. M. R. G.; Barboza, M.; Lucia, M.; Araujo, G. C.; Hokka, C. O. *Biochem. Eng. J.* **2005**, 23.

5.7 FIGURAS

Figura 1. Seleção da melhor fonte de nitrogênio para produção de AC por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 durante 144 horas de cultivo em 250 rpm a 28°C.

Figura 2. Variáveis controladas durante 144 horas de cultivo na produção de AC por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 com farinha de soja em 250 rpm a 28°C.

Figura 1.

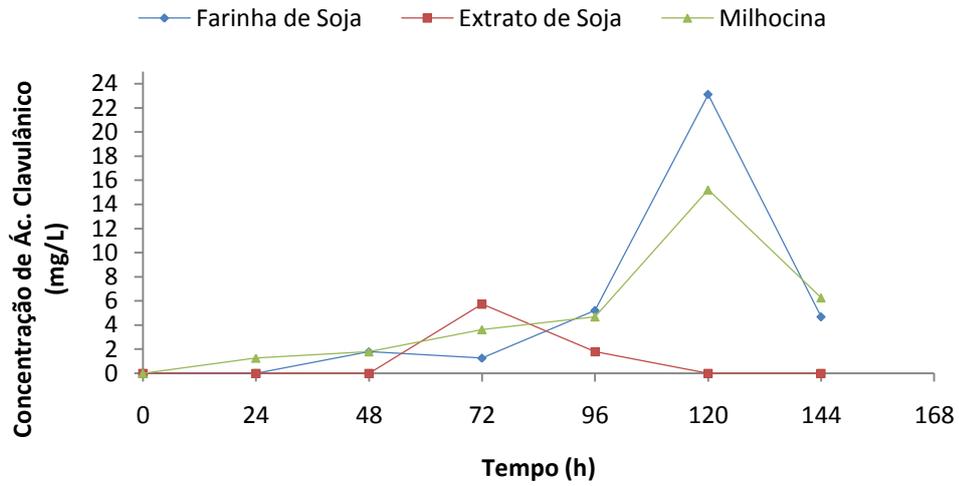
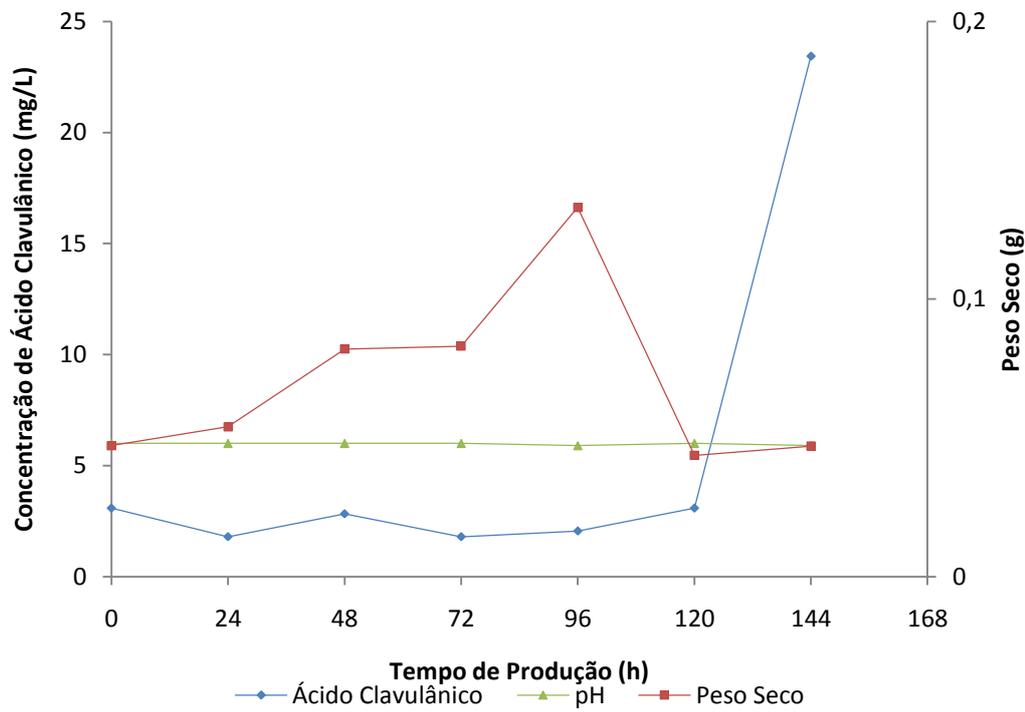


Figura 2.



6 CAPÍTULO III

PRODUCTION OF CLAVULANIC ACID BY *Streptomyces* sp. DPUA 1542 STRAIN USING FACTORIAL DESIGN

Este capítulo refere-se à produção de ácido clavulânico usando planejamento fatorial pela linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA 1542 pertencente à Coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (Manaus, AM, Brasil). Este manuscrito será submetido para publicação na Revista Applied Biochemistry and Biotechnology.

PRODUCTION OF CLAVULANIC ACID BY *Streptomyces* sp. DPUA 1542 STRAIN USING FACTORIAL DESIGN

Vanessa Régia Francisco Couto¹; Márcia Nieves Carneiro da Cunha²; Camila Souza Porto²; Maria Francisca Simas Teixeira³; Tatiana Souza Porto²; Ana Lúcia Figueiredo Porto²

¹Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil; ²Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brazil; ³Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus-AM, Brazil.

6.1 ABSTRACT

Clavulanic acid (CA) is a potent β -lactamase inhibitor produced by *Streptomyces* in fermentation processes. The influence of substrate concentration in the culture medium as well as environmental variables such as pH and temperature are of fundamental importance in the production of certain biocompound and such parameters can be evaluated by factorial design. This study aimed to evaluate the influence of carbon and nitrogen sources in the production of CA by *Streptomyces* sp. DPUA 1542. The production media used varied according to the carbon source (glycerol 5, 10 and 15 g/L), nitrogen source (soybean flour 10, 20 and 30 g/L) and pH (6,3, 6,8 and 7,4) having the temperature set at 28°C and orbital agitation at 250 rpm for 168 hours of fermentation. The three variables tested – soybean flour and glycerol concentrations and pH – had their effects demonstrated in the production of CA to a level of confidence 95%. The highest concentration of CA in run 4 was obtained after 96 hours (soybean flour 30 g/L, glycerol 15 g/L and pH 6,3). Cell growth and substrate consumption were recorded during the 168 hours of fermentation in shake flasks. The factorial design showed satisfactory results suggesting the possibility of using it as an industrial bioprocess, especially after studying pre-purification of the CA.

Keywords: Clavulanic acid; Soybean flour; Glycerol; *Streptomyces* sp.; Factorial design.

6.2 INTRODUCTION

Clavulanic acid (CA) is a potent β -lactamase inhibitor isolated in 1976 from fermentations of *Streptomyces clavuligerus* (1). When administered in combination with penicillin group antibiotics, the β -lactam antibiotics, it inhibits the resistance against bacteria that produce β -lactamases, enzymes which turn the drug inactive. CA is an antibiotic with a low intrinsic antibacterial activity, however, the similarity in chemical structure causes the molecule to act as a competitive β -lactamase inhibitor, which conserves the activity of β -lactam antibiotic for treatment against bacteria β -lactam antibiotics resistant (2).

The definition of the composition of the medium is of fundamental importance in the development of fermentation bioprocesses. The culture medium must provide energy through carbon and nitrogen sources and minerals for cell growth and the synthesis of bioproducts (3,4). Optimization of the fermentation medium is of primary importance in the development of some fermentation processes, and the use of factorial designs for the production of clavulanic acid is well documented in the literature (5,6). Sometimes, the culture medium factors are combined with operational parameters such as temperature, agitation and aeration (7).

For CA synthesis, derived of soy has been extensively employed as nitrogen sources (4). Glycerol and vegetable oils as a source of carbon are used successfully in the antibiotics production. In his work, Maranesi and co-workers (8) tested different media of production, differing in relation to carbon and nitrogen sources. The authors used glucose, glycerol, soluble starch and soybean oil at different concentrations as carbon sources, and, soybean flour and soy protein hydrolyzates as nitrogen sources. The highest concentration of CA (478 mg/L) was obtained when starch and soybean oil were added to the medium at 120 hours of fermentation.

Glycerol is an essential carbon source for the CA production. In the absence of glycerol, *Streptomyces clavuligerus* not produce CA, however produce other antibiotic, cephamycin C (5). Arginine and ornithine with an intermediate C3 of the glycolytic pathway as glycerate or pyruvate act as CA precursors (2).

Although several studies report CA production, there is still controversy about which substrates favor or not its production, besides the fact it is a molecule of difficult isolation and purification because of its high rate of degradation and instability (9).

The aim of this study was to investigate the influence of nutritional and environmental conditions in the production of clavulanic acid by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 strain in submerged cultures in shake flasks using factorial design. The glycerol consumption was evaluated during the fermentation time to assess the relationship between consumption and production of CA.

6.3 MATERIALS AND METHODS

6.3.1 Microorganism

The *Streptomyces* sp. DPUA 1542 strain is deposited in the collection of microorganisms of the Department of Parasitology, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil. The microorganism used in this study, described by Cunha and co-workers (10) as a producer of β -lactamase inhibitor was isolated from lichens of the Amazon Region and stored at -20°C in cryotubes with glycerol (10%, v/v).

6.3.2 Culture media

The sample preserved in 2,0 mL cryotubes was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL seed medium described by Ortiz et al. (4) having the following composition (in g/L distilled water): glycerol, 15; bacto-peptone, 10; malt extract, 10; yeast extract, 1,0; K_2HPO_4 , 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,75; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001. The pH was adjusted to 6,8 with NaOH 1M and then autoclaved for 15 min at 121°C . After 24 hours of cultivation in the seed medium, the inoculum, representing 5% of the total culture medium was transferred to production medium characterized by Maranesi et al. (8) and composed of (in g/L distilled water) glycerol, 10; soybean flour, 20; K_2HPO_4 , 1,2; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0,001; ZnSO₄·7H₂O, 0,001, and acid 3-(N-morpholino) propanesulfonic (MOPS) buffer, 21,0, pH 6,8.

6.3.3 Fermentation conditions

After 24 hours of culture in the inoculum medium, aliquots corresponding to 5% of the total volume of culture medium were transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml capacity. The production medium was the same to that used inoculum, varying in concentration glycerol (5, 10 and 15 g/L), soybean flour concentration (10, 20 and 30 g/L) and pH (6,3, 6,8 and 7,4) at temperature and agitation intensity at 28°C and 250 rpm, respectively. The flasks were incubated for 168 hours on orbital shaker under different conditions according to the factorial design described in the next section. Every 24 hours an Erlenmeyer flask was used to determine CA concentration, cell growth and pH curve.

6.3.4 Factorial design

To determine the best conditions for production of CA, we performed a statistical 2³ complete factorial design with four replications at the central point proposed by Barros Neto et al. (11) under the conditions described in table 1. Repetitions in the central point were performed to allow calculation of experimental error.

6.4 ANALYTICAL METHODS

6.4.1 Evaluation of clavulanic acid production

The fermented liquid was centrifuged at 5.500×g for 10 min at 4°C and the supernatant used for the CA determination according to the method described by Bird et al. (12) using the spectrophotometric assay quantified by measuring the increase in density optical to 311 nm by the formation of the product [1-(8-hydroxy-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazole] resulting from the reaction of imidazole (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil) and CA. The optical density was

determined spectrophotometrically (Micronal B582). Standard solutions of different concentrations of potassium clavulanate (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil) from *Streptomyces clavuligerus* was used to determine the CA concentration.

6.4.2 Assay for determining the glycerol concentration

Glycerol concentration was determined spectrophotometrically according to the method described by Hae Bok and Demain (13). An aliquot of 1 mL samples containing glycerol was added to 1 mL of sodium metaperiodate in tubes. After 10 min at room temperature, 2 mL of L-rhamnose 0,1% was added to each test tube. The mixture was vortexed and, after stirring, 4 mL of Nash reagent was added to the mixture. The tubes were put on a water bath for 15 min at 53°C. The yellow color developed in the reaction was measured at 412 nm in a spectrophotometer (Micronal B582). A linear calibration curve was obtained from Nash reagent in the range of 0–50 mg/mL. All the analyses were performed in duplicate.

6.4.3 Determination of the dry weight and pH curve

Dry weight of raw samples was gravimetrically determined, with the sample being vacuum filtered on filter paper (Whatman n°1) previously dried and weighed. The filter with the sample was dried at 100°C for 24 hours inside a Petri dish, and the difference of mass corresponding to the dry weight. Cell growth was evaluated in parallel with the pH, the latter was potentiometry determined.

6.5 RESULTS AND DISCUSSION

The relationship between substrate consumption, cell growth (dry weight) and CA production can be evidenced in figure 1. In this study, we observed that all concentrations of carbon and nitrogen sources tested supplied the nutritional requirements for growth of actinobacteria, however with the highest concentrations tested there was a greater production of secondary metabolite, CA. This suggests that at the end of the stationary growth phase where there is greater

depletion of the available nutrients and thus increased production of secondary metabolites were still available in the culture medium the carbon source (glycerol) for the synthesis of antibiotics. As Chen et al. (14) evidenced that the *Streptomyces* sp. glycerol used by for the production of CA and glycerol able to supply a cell's metabolism and the effective production of clavulanic acid.

Statistical analysis was performed in all runs for all variables tested – nitrogen source and carbon source concentrations and pH – with the software Statistica 8.0 (15). The estimated effects of variables during the production time of 168 hours and their interactions in the CA production are shown in table 2. All variables had statistically significant effect on production of CA at a level of 95% ($p \leq 0,05$).

The highest CA production (63,93 mg/L) was the time interval of 96 hours in run 4, where the conditions corresponded to carbon source (15%), nitrogen source (30%) and pH 6,3, the highest concentrations of dietary sources. The literature reports the use of soy and glycerol to induce the CA production by *Streptomyces*, which could be noted in this study showed that both positive effect on the production of β -lactamase inhibitor.

After 96 hours of fermentation in shake flasks, the carbon and nitrogen sources exerted a positive effect on the synthesis of antibiotics and the interaction between them, during which cell growth was in decline and much of the available food sources had been almost completely consumed.

In table 3 we can observe that the first 24 hours of production, carbon and nitrogen sources showed a significant effect on production by supplying nutrients supply for cell growth and the interaction between these two variables (1X2) also showed significant, though with a negative value, which have been suggested antagonistic effect of a variable over another. Positive effect on the CA production was found between the variable carbon source and pH during the same period. At the time of 96 hours was observed that increased production of the biomolecule, all variables showed significant effects on production as well as their interactions except the interaction between the carbon source and pH (2X3), which was not statistically significant.

The interaction between the carbon and nitrogen sources showed positive effect in the production of β -lactamase inhibitor represented in the diagram for geometric interpretation (Figure 2), indicating that when both variables were present in higher concentration of soybean flour (30%) and glycerol (15%), the output CA reached the highest level of 63,93 mg/L. These results corroborate with the experimental results described by Chen et al. (14). The authors examined the influence of initial concentration of glycerol (0–40 g/L) in the CA production by *Streptomyces clavuligerus*, the highest yields was obtained in glycerol concentrations of 10–20 g/L, and the highest CA production was with a initial concentration of 15g/L. However, these authors did not evaluate the influence of different operating variables on production by factorial design. Also, the interaction between the highest nitrogen source concentration (30%) and lower carbon source concentration (5%) had less significant effect was obtained the lowest CA level of 41,89 mg/L at the same fermentation time.

The figure 3 represents the CA production in all trials of the factorial design in the best production time with a graph that combines time and production values, carbon and nitrogen sources. The CA values output of the four center point replicates (runs 9–12) were similar, which consists of a data statistically significant, as the central point corresponds to the best condition found in a previous production, and the error value for this response and less significant effect.

The pH is one of the most important variables in the synthesis of bioproducts and CA, and this study, this variable had a significant negative effect with higher production in the culture medium at pH 6,3. Santos et al. (16) evaluated the effect of different pH ranges, different types and concentrations of salts and temperature on the stability of CA. Regarding the pH, the authors reported the optimum stability of the biomolecule at pH values ranging from 6,0 to 7,2 more than in acidic ranges (pH 4,0), which corroborates with the experimental results found in this work. It is, therefore, this controlled variable by using the MOPS buffer in order to keep the pH stable, since variations exert an adverse effect on the biomolecule of CA leading to its degradation while synthesis is carried out.

Temperature and stirring orbital are parameters studied in the production of many metabolites by microorganisms, however, in this study these parameters were fixed at 28°C and 250 rpm, since several studies established these values or near values for CA production (4,17).

6.6 CONCLUSIONS

In this study we investigated the influence of pH, concentrations of soybean meal and glycerol in the CA production by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 using a 2³ factorial design with four central points. Results showed that the actinobacteria tested presented significant CA production (63,93 mg/L) in the time interval of 96 hours fermentation with the highest soybean flour (30%) and glycerol (15%) concentrations at pH 6,3 at 28°C. Through a further work we will evaluate purification and recovery process of the biomolecule CA by extractive fermentation in order to optimize the production for industrial purposes.

6.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco – FACEPE (Process n°. IBPG-0584-2.12/09), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq for financial support of this research and scholarships.

6.8 REFERENCES

1. Perez-Llarena, F. J. and Bou, G. (2009) *Curr. Med. Chem.* 16, 3740-3765.
2. Saudagar, P. S.; Survase, S. A.; Singhal, R. S. (2008) *Biotechnol. Adv.* 25, 335-351.
3. Li, R. and Townsend, C. A. (2006) *Metab. Eng.* 8, 240-252.
4. Ortiz, S. C. A.; Hokka, C. O.; Badino, A. C. (2007) *Enzyme Microb. Tech.* 40, 1071-1077.
5. Saudagar, P. S.; Singhal, R. S. (2007) *Biores. Technol.* 98, 2010-2017.
6. Viana, D. A.; Carneiro-Cunha, M. N.; Araújo, J. M.; Barros-Neto, B.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Pessoa-Júnior, A.; Porto, A. L. F. (2010) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 1797-1807.
7. Mandenius, C. F. and Brundin, A. (2008) *Biotechnol. Progr.* 24, 1191-1203.
8. Maranesi, G. L.; Baptista-Neto, A.; Hokka, C. O.; Badino, A. C. (2005) *World J. Microb. Biot.* 21, 509-514.
9. Oliveira, J. H. H. L.; Granato, A. C.; Hirata, D. B.; Hokka, C. O.; Barboza, M. (2009). *Quím. Nova.* 2, 8, 2142-2150.
10. Cunha, M. N. C.; Silva, N. M. V.; Teixeira, M. F. S.; Mota, R. A.; Lima-Filho, J. L.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F. (2010) *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 6, 1312-1319.
11. Barros Neto, B. et al. (2002) *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 2nd ed., Editora da Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.
12. Bird, A. E.; Bellis, J. M.; Gasson, B. C. (1982) *Analyst.* 107, 1241-1245.
13. Hae Bok, S. and Demain, A. L. (1977) *Anal. Biochem.* 81, 18-20.

14. Chen, K. C.; Lin, Y. H.; Tsai, C. M.; Hsieh, C. H.; Hounng, J. Y. (2002) *Biotech. Lett.* 24, 455-458.
15. Statsoft, INC. (2008) *Statistica*, version 8.0.
16. Santos, V. C.; Pereira, J. F. B.; Haga, R. B.; Rangel-Yagui, C. O.; Teixeira, J. A. C.; Converti, A.; Pessoa Jr, A. (2009) *Biochem. Eng. J.* 45, 89-93.
17. Domingues, L. C. G.; Teodoro, J. C.; Hokka, C. O.; Badino, A. C.; Araújo, M. L. G. C. (2010) *Bioch. Eng. J.* 53, 7-11.

6.9 FIGURE CAPTIONS AND TABLES

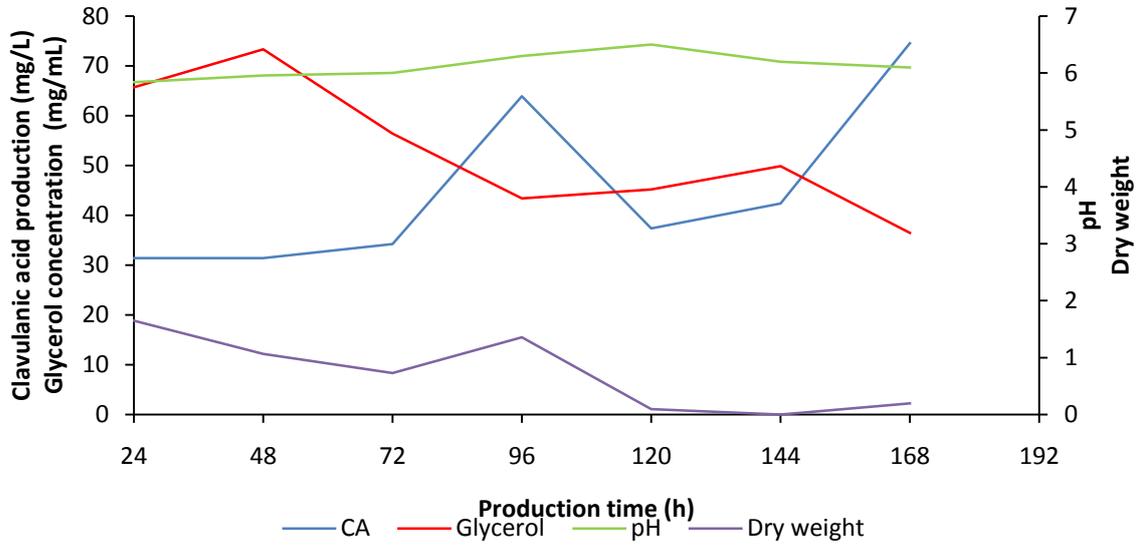


Figure 1. CA production, glycerol consumption, pH range and dry weight of *Streptomyces* sp. DPUA 1542 strain cultivation in orbital shaker for 24–168 hours.

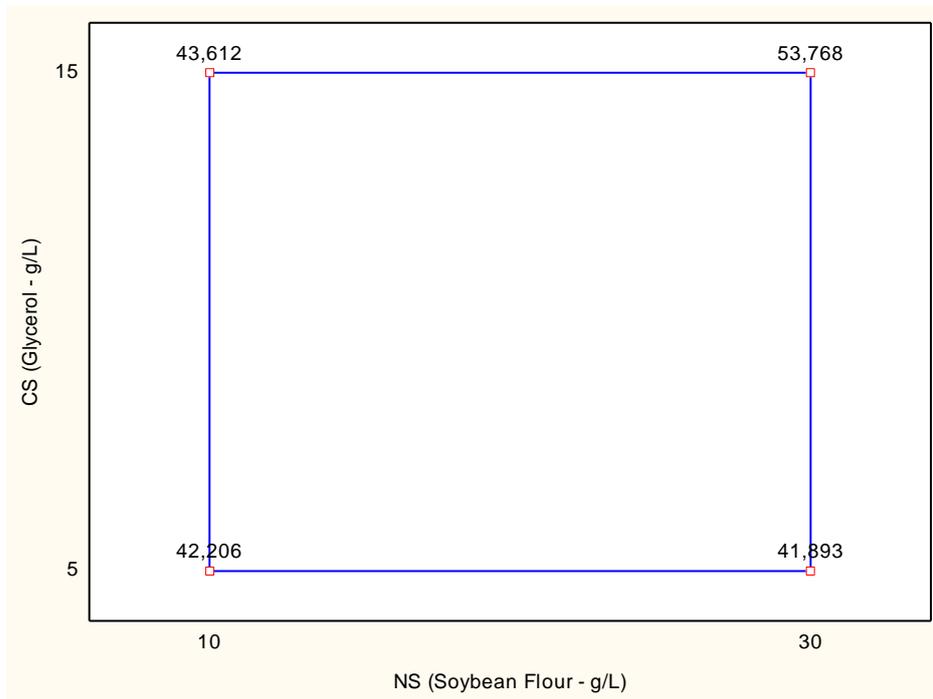


Figure 2. Diagram for geometric interpretation of the effects of interaction between the independent variables soybean flour and glycerol concentrations in the response variable CA production.

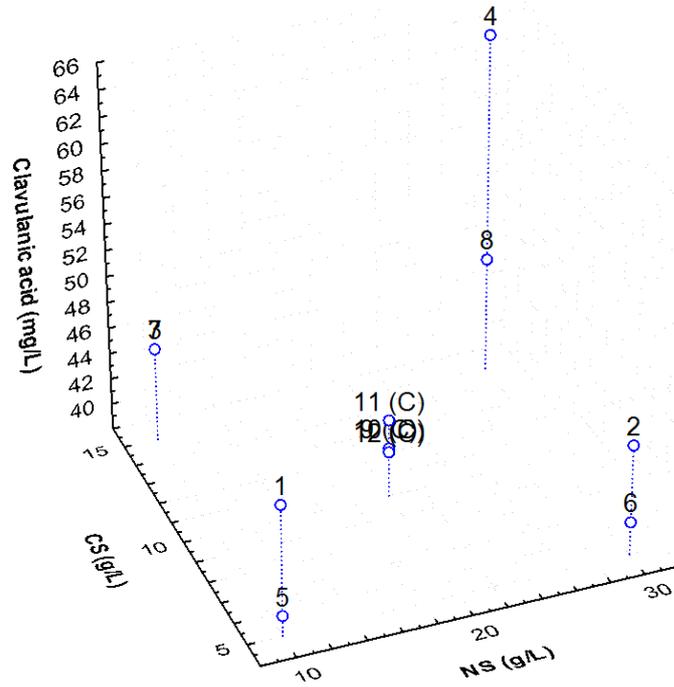


Figure 3. Tridimensional graphic of CA production (mg/L) in optimum time of 96 hours in all runs of the factorial design.

Table 1. CA production by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 in shake flasks under different conditions

Coded values	Levels		
	Lower (-1)	Central (0)	Higher (+1)
(1) pH	6,3	6,8	7,4
(2) Glycerol concentration (g/L)	5	10	15
(3) Soybean flour concentration (g/L)	10	20	30

Table 2. Statistical matrix of factorial design 2^3 with four replications at the central point and influence of the independent variables on CA production after 96 hours.

Run	pH	CS-Glycerol (g/L)	NS-Soybean Flour (g/L)	Clavulanic acid (mg/L)
1	6,3	5,0	10,0	48,00
2	6,3	5,0	30,0	46,43
3	6,3	15,0	10,0	45,18
4	6,3	15,0	30,0	63,93
5	7,4	5,0	10,0	39,56
6	7,4	5,0	30,0	40,5
7	7,4	15,0	10,0	45,18
8	7,4	15,0	30,0	46,75
9 (C)	6,8	10,0	20,0	41,75
10 (C)	6,8	10,0	20,0	41,75
11 (C)	6,8	10,0	20,0	43,93
12 (C)	6,8	10,0	20,0	45,18

CS–Carbon Source, NS– Nitrogen Source

Table 3. Effect of variables in the CA production according to the 2³ factorial design by *Streptomyces* sp. DPUA 1542 strain.

Variables	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
(1) NS	27,17*	-1,63	-0,75	6,02*	0,56	-5,10*	-0,02
(2) CS	1,69	-1,02	1,14	8,12*	0,56	-2,27	2,81
(3) pH	30,91*	-1,75	-1,27	-9,65*	-0,07	-2,27	1,50
1X2	-5,43*	0,42	0,62	6,40*	-0,07	1,72	0,0
1X3	-30,57*	-0,78	-1,01	-4,49*	0,33	-0,31	-0,35
2X3	4,41*	-0,42	1,79	-0,86	0,33	-0,47	-1,71
1X2X3	2,71	1,26	0,62	-6,02*	0,82	-2,12	-0,26

CS–Carbon Source, NS–Nitrogen Source

*Significative effects p ($\leq 0,05$)

7 CAPÍTULO IV

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces* sp. DPUA 1542 UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

Este capítulo refere-se à produção e extração de ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 em sistemas de duas fases aquosas usando planejamento fatorial, o qual será destinado para publicação na revista Química Nova.

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces* sp. DPUA 1542 UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

Vanessa Régia Francisco Couto¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) – Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária – CEP: 50670-420 – Recife-PE

Márcia Nieves Carneiro da Cunha²

Camila Souza Porto²

Tatiana Souza Porto²

*Ana Lúcia Figueiredo Porto²

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) – Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900, Recife – PE

*analuporto@yahoo.com.br

PRODUCTION AND EXTRACTION OF CLAVULANIC ACID BY *STREPTOMYCES* sp. DPUA 1542 STRAIN USING EXTRACTIVE FERMENTATION IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM

7.1 ABSTRACT

Extractive fermentation in aqueous two-phase system (ATPS) is part of the product formation and purification in a single step process, which facilitates immediate recovery of biomolecules. By extractive fermentation process have been produced enzymes, antibiotics, solvents, surfactants and antibodies. Clavulanic acid (CA) is a potent β -lactamase inhibitor used clinically to combat diseases caused by bacteria resistant to antibiotics. The simultaneous extraction and production by extractive fermentation in ATPS using PEG/phosphate systems was the target of this study. Using a statistical design 2^3 , we evaluated the effect of three variables in the process of obtaining the CA, these variables were PEG molar mass (M_{PEG}) (400, 1.000 and 8.000 g/mol), PEG concentrations (C_{PEG}) (15, 20 and 25 m/m%) and phosphate salts concentrations (C_{SAL}) (15, 20 and 25 m/m%). The extractive fermentation in shake flasks was performed in a period of 144 hours, and the increased production of CA obtained after 120 hours of cultivation, found in the salt-rich phase (69,56 mg/L) and PEG-rich phase (54,88 mg/L) with higher values of partition coefficient ($K=3,27$) and activity yield ($Y=63,2\%$) found at this phase. Based on the conditions tested, the extractive fermentation using ATPS proved to be effective for the simultaneous production and recovery of CA which effectively reduces the cost and time of the process may constitute a promising alternative for use in large-scale.

Keywords: Extractive fermentation, Aqueous two-phase system, Clavulanic acid

7.2 INTRODUÇÃO

Ácido clavulânico atua como um potente inibidor de enzimas β -lactamases produzidas por uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quando administrado em combinação com antibióticos do grupo da penicilina (β -lactâmicos).¹ Este inibidor de β -lactamases é produzido em processos fermentativos por *Streptomyces* e sua recuperação e purificação a partir do meio de cultivo fermentado são baseadas em operações de separação como extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas, adsorção ou troca iônica.²

Sistemas de duas fases aquosas (SDFA) têm sido amplamente explorados em aplicações biotecnológicas para a recuperação de biomoléculas alvo de diversas fontes, pois consiste em um sistema fácil de escalonar, que pode ser diretamente aplicado a caldos de fermentação e por constituírem soluções aquosas adequadas para biomoléculas. SDFA são formados espontaneamente quando componentes estruturalmente diferentes, tais como dois polímeros ou um polímero e um sal, são misturados acima de certas concentrações críticas.^{3,4}

Os sistemas polímero-sal, a exemplo do polietilenoglicol (PEG)/fosfato, são mais comumente utilizados por apresentarem algumas vantagens como baixo custo e por estarem em uma faixa de pH (6,0–9,0) em que os SDFA são estáveis. Neste sistema de extração, o produto de interesse fica concentrado na fase que contém predominantemente água e concentração aumentada de um dos componentes formadores de fase, que na maioria dos casos é o PEG.⁵

Através de vários estudos têm sido reportada a separação e purificação de numerosos produtos biológicos através de SDFA tais como, enzimas,^{6,7} proteínas,⁸ toxinas⁹, anticorpos humanos¹⁰ e antibióticos.^{11,2} No entanto esse sistema de purificação ainda não é extensivamente utilizado a nível comercial.⁵

Quando se planeja avaliar a influência de importantes variáveis experimentais em um bioprocessamento ou para executar uma otimização das mesmas em um sistema biotecnológico, o planejamento fatorial consiste em uma valiosa metodologia que evita erros experimentais além de reduzir o número necessário de experimentos.¹²

No presente estudo, a produção e simultânea partição de ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 foi realizada por fermentação extrativa em SDFA composto pelo polímero polietilenoglicol (PEG) e sais fosfatos através de um planejamento fatorial 2^3 com o objetivo de estabelecer as melhores condições para produção e recuperação simultânea do ácido clavulânico. Parâmetros relevantes como massa molecular do polímero, concentração do PEG e concentração dos sais fosfatos na partição da molécula foram investigados.

7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

7.3.1 Micro-organismo e manutenção

Streptomyces sp. DPUA 1542 isolado de líquens da Região Amazônica é pertencente à coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). Este foi gentilmente cedido pela Prof^a Dr^a Maria Francisca Simas Teixeira, tendo sido descrito como produtor de inibidor de β -lactamases por Cunha e colaboradores.¹³ O micro-organismo é mantido em criotubos contendo glicerol 10% (v/v) e armazenado à -20°C .

7.3.2 Meios de cultura

O meio de cultivo utilizado para a reativação do micro-organismo apresenta a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 15; peptona bacteriológica, 10; extrato de malte, 10; extrato de levedura, 1,0; K_2HPO_4 , 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,75; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001, pH 6,8. Para o inóculo foi utilizado o meio descrito por Maranesi et al.,¹⁴ com a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 10; farinha de soja (FS), 20; K_2HPO_4 , 1,2; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001, pH 6,8. O meio de cultivo utilizado para a fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas foi obtido através de diferentes concentrações de PEG e sais fosfatos de acordo com o planejamento experimental e da adição de um meio de cultivo contendo 30 g/L de FS e 15 g/L de glicerol, o pH foi ajustado para 6,3. Todos os meios utilizados foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

7.3.3 Condições de cultivo

A reativação do micro-organismo foi realizada através da adição de uma suspensão de esporos contida em criotubos a Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL do meio de reativação, incubados a 28°C e 250 rpm, por 24 horas. Alíquotas de 5,0 mL desta reativação foram adicionadas a 45 mL do meio de pré-inoculo e mantidos em 250 rpm a 28°C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 5,0 mL dessa cultura foram transferidas para Erlenmeyers de 150 mL contendo 45g do meio de fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas em diferentes concentrações, as fermentações foram mantidas sob agitação orbital de 250 rpm a 28°C por 144 horas. Um frasco Erlenmeyer foi retirado a cada 24 horas, o líquido fermentado foi centrifugado a 5.500×g por 20 minutos a 4°C, após a centrifugação, o volume de cada fase foi observado, as fases superior e inferior foram separadas cuidadosamente com auxílio de uma pipeta, e utilizadas para determinação da concentração de AC em cada uma das fases.

7.3.4 Planejamento Fatorial

Um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 1) composto por 8 ensaios e 4 pontos centrais foi utilizado para verificar a influência de variáveis sob a produção e extração do AC utilizando fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas, as variáveis independentes foram massa molar do PEG (M_{PEG}), concentração do PEG (C_{PEG}) e concentração dos sais fosfato (C_{SAL}). As variáveis-resposta foram: coeficiente de partição (K) e rendimento das fases superior e inferior (Y). Após os experimentos foram realizadas as análises estatísticas dos resultados, com o auxílio do software *Statistica* 8.0.¹⁵

7.3.5 Determinação da concentração de ácido clavulânico

A determinação da concentração do AC nas amostras foi realizada de acordo com o método descrito por Bird et al.¹⁶ através do ensaio espectrofotométrico quantificada pela medição do aumento da densidade ótica a 311 nm pela formação do produto [1-(8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-

enol)-imidazol] resultante da reação entre imidazol (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) e o ácido clavulânico. A densidade ótica foi determinada espectrofotometricamente (Micronal B582). Soluções-padrão de diferentes concentrações de clavulanato de potássio (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) de *Streptomyces clavuligerus* foram usadas para determinar a concentração de AC.

7.3.6 Metodologia para a análise dos resultados

A distribuição de AC entre as fases foi expressa em termos de coeficiente de partição (K), calculado da seguinte forma:

$$K = \frac{C_S}{C_I}$$

Onde: C_S e C_I são as concentrações de AC em mg/L na fase superior e inferior, respectivamente.

Para avaliar a eficiência da extração o rendimento (Y) do AC foi calculado nas fases do sistema de fermentação extrativa.

$$Y = \frac{100}{1 + \frac{1}{V_r} + \frac{1}{K}}$$

Onde: V_r é a razão dos volumes da fase superior e inferior e K o coeficiente de partição.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso estudo, no ensaio 1 (M_{PEG} 400 g/mol; C_{PEG} 15 m/m%; C_{SAL} 15 m/m%) após a fermentação não ocorreu a formação de fases, porém no sistema sem a fermentação (branco) ocorreu a separação das fases. A composição deste ensaio foi próxima da concentração crítica e o crescimento do micro-organismo levou ao consumo de nutrientes, principalmente os sais, alterando assim a concentração total do sistema, desta forma não houve concentração suficiente do sal para formação de duas fases aquosas.

De acordo com Sinha et al.¹⁷ em uma fermentação extrativa ideal, as células e o substrato devem se concentrar de preferência em uma das fases, enquanto que a biomolécula (produto) deve se concentrar na fase oposta, tal situação facilitaria a remoção do produto do seu local de produção eliminando a influência de inibição pelo produto, e realizando uma pré-purificação da molécula.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que em todos os ensaios as células particionaram para interfase (Figura 1). Resultados similares foram também obtidos por Viana Marques et al.¹⁸ quando estudaram a produção de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060 utilizando fermentação extrativa observaram a partição das células para a interfase. Quanto à partição do AC, foi possível observar atividade na fase rica em sal e na fase rica em PEG, ensaios 3 e 5, respectivamente. Porém houve uma tendência para a partição do AC para a fase sal do sistema, apenas nos ensaios 5, 6 e 8 o AC particionou para a fase rica em PEG, nos demais ensaios a molécula particionou preferencialmente para a fase inferior rica em sal.

Na tabela 2 estão descritas as variáveis independentes (M_{PEG} , C_{PEG} e C_{SAL}) e as variáveis respostas (K e Y) obtidas na fermentação utilizando *Streptomyces* sp. DPUA 1542 para a produção e extração simultânea do AC de acordo com o planejamento fatorial 2³. Todos os resultados estatisticamente significantes foram a um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

A maior produção de AC foi obtida após 120 horas de cultivo, no ensaio 3 (M_{PEG} 400 g/mol; C_{PEG} 25 m/m%; C_{SAL} 15 m/m%) e no ensaio 5 (M_{PEG} 400 g/mol; C_{PEG} 15 m/m%; C_{SAL} 25 m/m%) com produção de 69,56 mg/L e 54,88 mg/L, respectivamente, sendo o maior valor do coeficiente de partição ($K=3,27$) e rendimento ($Y= 63,2\%$) observado no ensaio 5 (Tabela 2). Silva et al.¹⁹ avaliaram os fatores envolvidos na purificação do AC no caldo fermentado em SDFa, tais autores observaram que a massa molar do PEG apresentou um efeito negativo para a produção do AC. Ou seja, o aumento da massa molar do PEG de 600 para 4.000 g/mol levou a uma diminuição do K .

No presente estudo a produção do AC na fase superior após 120 horas de cultivo foi influenciada positivamente pela concentração dos sais fosfatos presente no sistema, bem como suas interações, apenas a interação entre C_{PEG} e C_{SAL} teve efeito negativo sob a produção da biomolécula

(Figura 2). Já que a concentração do sal foi a variável independente que apresentou efeito estatisticamente significativo e positivo, o contrário foi observado em relação a concentração do PEG, onde a interação entre ambas foi estatisticamente significativa, porém com efeito negativo.

A maior produção do AC nos sistemas com o PEG de menor massa molecular 400 g/mol, indica que apesar da molécula do AC ser pequena e possuir baixo peso molecular, é possível que nos sistemas constituídos de PEGs com massa molecular mais elevada pode ter ocorrido o efeito de exclusão da biomolécula pelo volume, ou seja, não havia espaço livre disponível para acomodação da molécula, quando foram utilizados PEGs com massas molares superiores a 400 g/mol.

No ensaio 3, a produção mais elevada do AC foi obtida na fase rica em sal, neste ensaio a maior concentração do PEG (25 m/m%) e menor dos sais fosfatos (15 m/m%) foram favoráveis para o aumento da solubilidade do AC na fase inferior, visto que, quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível na fase, o que implica em uma diminuição de solubilidade do produto na fase rica em polímero, havendo conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição.²⁰

O ensaio 5 composto por PEG 400 g/mol em menor concentração (15 m/m%) e mais elevada concentração de sais fosfatos (25 m/m%), o AC foi obtido na fase rica em PEG, ou seja, a elevada concentração de sais na fase inferior formou um ambiente com elevada força iônica que favoreceu a partição da molécula de AC para a fase superior onde encontrou maior solubilidade, sendo tal efeito denominado *salting out*.

Silva et al.¹⁹ propuseram que quanto menor a massa molar do PEG e a concentração do mesmo no sistema, mais alta é a interação entre o AC e as moléculas que compõem o sistema. Tais observações condizem com os resultados obtidos por Ribeiro e colaboradores²¹ que utilizaram SDFa PEG/fosfato com PEGs de diferentes massas molares (300, 400, 600, 1.000 e 1.500 g/mol) para purificação de glicose 6-fosfato desidrogenase e observaram que com PEG de menores massas molares (300, 400, 600 g/mol) a enzima teve uma maior tendência de estar na fase superior, o

contrário sendo observado com as maiores massas molares (1.000 e 1.500 g/mol), onde a enzima ficou em maior quantidade na fase inferior.

Como já foi anteriormente mencionado maiores valores de rendimento (63,2%) foram obtidos no ensaio 3 (Tabela 2), resultados que corroboram com os obtidos por Hirata et al.²² que estudaram a separação do AC em SDFa utilizando diferentes concentrações de PEG (400, 600, 1.000 e 4.000 g/mol), tais autores verificaram que o melhor valor para a recuperação do ácido clavulânico (94%) na fase PEG foi obtido nos ensaios onde o PEG com massa molar de 400 g/mol foi utilizado.

Segundo Huddleston et al.²³ em SDFa, o pH é um importante fator na influência do K . Alterando o pH ocorrem mudanças na distribuição das cargas das proteínas, portanto é importante trabalhar próximo do ponto isoelétrico onde a somatória de cargas da mesma é praticamente nula.

No atual estudo, o pH foi inicialmente fixado em 6,3 apresentando uma pequena variação entre 6,3–7,0 em todos os ensaios durante o período da fermentação. Hirata et al.²² em seus estudos observaram que o pH influi no SDFa possibilitando o aumento da concentração do ácido clavulânico na fase PEG, sugerindo que o K do ácido clavulânico aumenta com o aumento do pH e com a redução do peso molecular do PEG.

7.5 CONCLUSÕES

A produção e extração simultânea de AC por fermentação extrativa utilizando SDFa foi realizada e a influência das variáveis independentes M_{PEG} (400, 1.000 e 8.000 g/mol), C_{PEG} (15, 20 e 25 m/m%) e C_{SAL} (15, 20 e 25 m/m%) foram investigadas através de um planejamento fatorial 2^3 . O efeito da massa molar do PEG, bem como as concentrações do PEG e do sal foram as variáveis independentes que influenciaram nas variáveis resposta coeficiente de partição (K) e rendimento (Y) nas fases superiores e inferiores do sistema bifásico. O coeficiente de partição (K) da molécula nas fases sofreu influência das concentrações das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial (C_{PEG} e C_{SAL}) sendo mais evidente nos ensaios 3 e 5. Os maiores valores de rendimento

($Y=63,2\%$) e coeficiente de partição ($K=3,27$) foram evidenciados nas condições ($M_{\text{PEG}} 400 \text{ g/mol}$; $C_{\text{PEG}} 15 \text{ m/m\%}$; $C_{\text{SAL}} 25 \text{ m/m\%}$) sendo provavelmente estas as melhores condições para a produção de AC pelo micro-organismo testado. No entanto vale ressaltar que o AC é uma molécula muito instável com elevadas velocidades de degradação, o que dificulta seu processo de isolamento e purificação. Sua baixa estabilidade resulta na diminuição do rendimento durante as etapas de purificação de forma que se tornam necessários novos estudos visando aprimorar os processos de produção e extração do AC por fermentação extrativa.

7.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saudagar, P. S.; Survase, S. A.; Singhal, R.S. *Biotech. Adv.* **2008**, 26.
2. Silva, C. S.; Cuel, M. F.; Barreto, V. O.; Kwong, W. H.; Hokka, C. O.; Barboza, M. *New Biotech.* **2011**, 0, 0.
3. Silvério, S. C.; Madeira, P. P.; Rodríguez, O.; Teixeira, J. A.; Macedo, E. A. *J. Chem. Eng. data*, **2008**, 53.
4. Azevedo, A. M.; Rosa, P. A. J.; Ferreira, I. F.; Aires-Barros, M. R. *Trends Biotechnol.* **2009**, 4, 27.
5. Rito-Palomares, M. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 807.
6. Porto, T. S.; Medeiros e Silva, G. M.; Porto, C. S.; Cavalcanti, M. T. H.; Neto, B. B.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Porto, A. L. F.; Pessoa Jr., A. *Chem. Eng. Process.* **2008**, 47.
7. Porto, T. S.; Marques, P. P.; Porto, C. S.; Moreira, K. A.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Pessoa, A.; Porto, A. L. F. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, 160.
8. Oliveira, F. C.; Coimbra, J. S. R.; Silva, L. H. M.; Rojas, E. E. G.; Silva, M. C. H. *Biochem. Eng. J.* **2009**, 47.

9. Cavalcanti, M. T. H.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Brandi, I. V.; Porto, T. S.; Converti, A.; Lima Filho, J. L.; Porto, A. L. F.; Pessoa, A. *Chem. Eng. Process.* **2008**, 47.
10. Azevedo, A. M.; Gomes, A. G.; Rosa, P. A. J.; Ferreira, I. F.; Pisco, A. M. M. O.; Aires-Barros, M. R. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 65.
11. Jiang, Y.; Xia, H.; Yu, J.; Guo, C.; Liu, H. *Chem. Engineer. J.* **2009**, 147.
12. Mandenius, C. F.; Brundin, A. *Biotechnol. Progr.* **2008**, 24.
13. Cunha, M. N. C.; Silva, N. M. V.; Teixeira, M. F. S.; Mota, R. A.; Lima-Filho, J. L.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2010**, 6, 62.
14. Maranesi, G. L.; Baptista-Neto, A.; Hokka, C. O.; Badino, A. C. W. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 21.
15. StatSoft, Inc; Statistica 8.0; Program for data analysis, 2008.
16. Bird, A. E.; Bellis, J. M.; Gasson, B. C. *Analyst*, **1982**, 107.
17. Sinha, J.; Dey, P. K.; Panda, T. *Biochem. Eng. J.* **2000**, 6.
18. Viana Marques, D. A.; Pessoa-Júnior, A.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Perego, P.; Porto, A. L. F. *Biotechnol. Progr.* **2011**, 1, 27.
19. Silva, C. S.; Boverotti, E. E.; Rodrigues, E. M. I.; Hokka, E. C. O.; Marlei Barboza, E. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2009**, 32.
20. Albertsson, P. A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules: Separation and Purification of Biomolecules, Cell Organelles, Membranes, and Cells in Aqueous Polymer Two Phase Systems and Their Use in Biochemical Analysis and Biotechnology*, 3th ed., Wiley: New York, 1986.

21. Ribeiro, M. Z.; Silva, D. P.; Vitolo, M.; Roberto, I. C.; Pessoa-Jr, A. *Braz. J. Microbiol.* **2007**, 38.
22. Hirata, D. B., Badino-Júnior, A. C., Hokka, C. O.; *Trabalhos completos do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, Brasil, 2011.*
23. Huddleston, J. G., Ottomar, K. W., Ngonyani, D. M., Lyddiatt, A. *Enzyme Microb. Technol.* 1991, 13.

7.7 FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Fermentação extrativa em SDFA (ensaio 5): formação de fases no branco (A) e após 120 horas de cultivo (B) com a partição das células para a interfase.

Figura 2. Gráfico de Pareto mostrando a interação entre as variáveis (1) massa molar do PEG (M_{PEG}), (2) concentração do PEG (C_{PEG}) e (3) concentração do SAL (C_{SAL}) e suas interações na produção e extração simultânea da molécula de AC na fase superior após 120 horas de cultivo.

Figura 1.

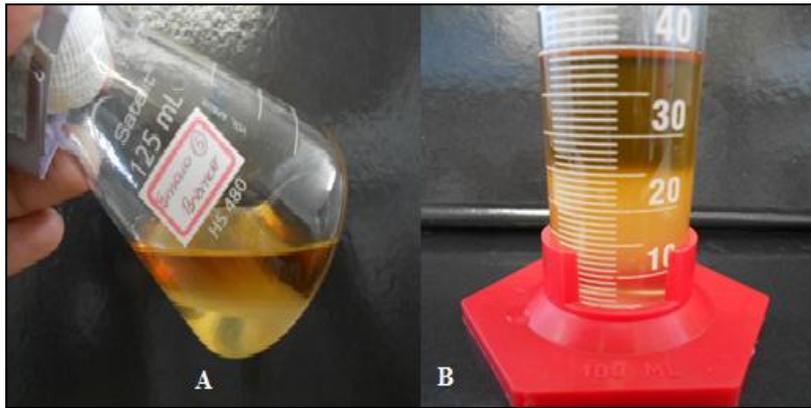


Figura 2.

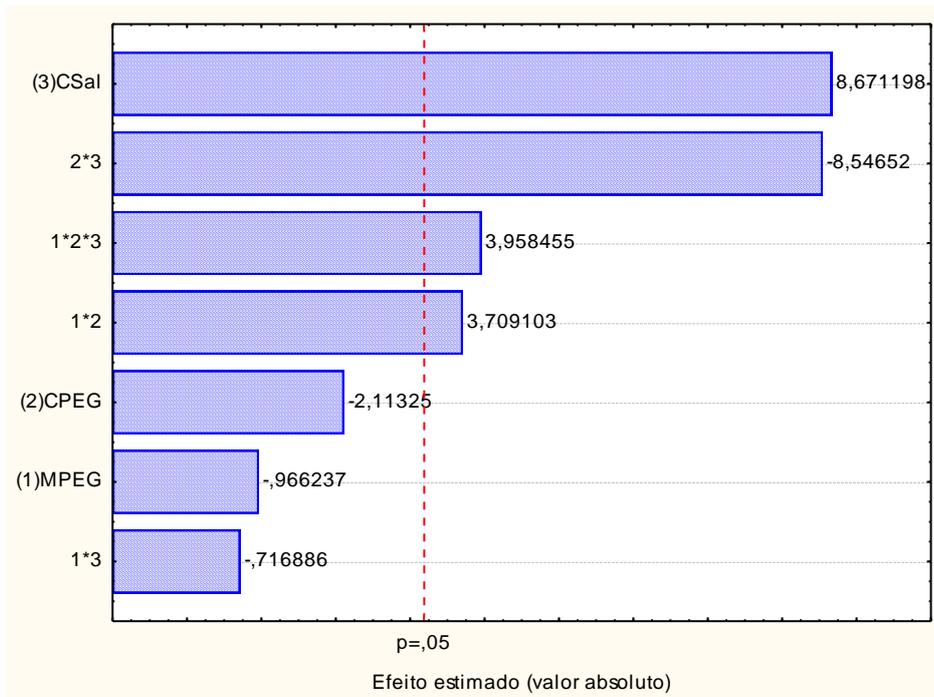


Tabela 1. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2³.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Massa molar do PEG (g/mol)	400	1.000	8.000
Concentração do PEG (m/m %)	15	20	25
Concentração dos sais fosfatos (m/m %)	15	20	25

Tabela 2. Influência de variáveis independentes nas respostas *K* e *Y* de acordo com o planejamento fatorial 2³ após 120 horas de cultivo em frascos agitados.

Ensaio	Massa molar do PEG (M_{PEG} g/mol)	Concentração do PEG (C_{PEG} m/m %)	Concentração dos Sais fosfatos (C_{SAL} m/m %)	AC-PEG (mg/L)	AC - SAL (mg/L)	(<i>K</i>)	<i>Y</i> (%)
1	400	15	15	0,00	0,00	0,00	0,0
2	8.000	15	15	0,00	6,75	0,00	0,0
3	400	25	15	16,75	69,56	0,24	19,2
4	8.000	25	15	15,50	20,81	0,74	39,3
5	400	15	25	54,88	16,75	3,27	63,2
6	8.000	15	25	31,44	13,63	2,30	38,2
7	400	25	25	8,94	17,06	0,52	31,5
8	8.000	25	25	23,94	15,19	1,57	47,5
9 (C)	1.000	20	20	21,44	23,31	0,91	39,2
10 (C)	1.000	20	20	14,56	21,75	0,66	35,4
11 (C)	1.000	20	20	19,25	25,81	0,75	36,8
12 (C)	1.000	20	20	14,25	18,00	0,79	36,6

K= Coeficiente de partição; *Y*= Rendimento da fermentação extrativa.

8 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos evidenciaram que a linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA 1542 apresentou potencial para produção do inibidor de β -lactamases AC.
- Dentre as fontes de nitrogênio testadas, a farinha de soja foi a mais eficiente em relação à milhocina e ao extrato de soja. Estes substratos forneceram os subsídios necessários para a síntese de AC em cultivo submerso, assim como a fonte de carbono (glicerol) empregada neste trabalho.
- Os resultados apresentados demonstraram que a mais alta produção de AC ocorreu no fim da fase estacionária do crescimento celular de *Streptomyces* sp. DPUA 1542, período em que houve maior consumo de substrato.
- A linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA 1542 apresentou atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* multirresistente a antibióticos em meio de cultura agar Müller Hinton acrescido de penicilina-G.
- As condições mais favoráveis do meio de cultivo para produção de ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 selecionadas neste estudo através do planejamento fatorial foram as concentrações das fontes de nitrogênio e carbono sendo 30% e 15%, respectivamente, e pH inicial 6,3.
- No cultivo em fermentação extrativa em SDFa, a separação da biomolécula nas fases sofreu influência das variáveis independentes testadas (M_{PEG} , C_{PEG} , C_{SAL}).
- A variável independente que exerceu maior influência na partição (K) da molécula de AC para a fase superior foi a mais alta C_{SAL} (25%) na fase inferior (Efeito “Salting-out”). Sendo observado o maior rendimento de produção do AC na fermentação extrativa ($Y=63,2\%$) nesta condição do planejamento fatorial.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I: Trabalho intitulado “Influência de Diferentes Meios de Cultura na Produção de Pigmentos por Actinomicetos isolados de Líquens da Região Amazônica”, apresentado no XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos realizado em Caxias do Sul/RS no período de 24 a 27 julho de 2011.

9.2 ANEXO III: Normas para Publicação da Revista Applied Biochemistry and Biotechnology (Capítulo III).

9.3 ANEXO IV: Normas para Publicação da Revista Química Nova (Capítulos II e IV).

9.1 ANEXO I



Influência de Diferentes Meios de Cultura na Produção de Pigmentos por Actinomicetos Isolados de Líquens da Região Amazônica

Márcia Nieves Carneiro da Cunha^{1,2}, Vanessa Régia Francisco Couto², Janete Magali de Araújo⁵, Camila Souza Porto², Tatiana Souza Porto^{2,3}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{1,2}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO)

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO)
–52171-900 Recife – PE

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Av. Bom Pastor S/N Boa Vista Garanhuns/PE CEP 55.296-901

⁴Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

⁵Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos

⁶Universidade Federal do Amazonas – Depto. de Parasitologia - Laboratório de Micologia
- 69077-000 – Manaus - AM

RESUMO

Os actinomicetos apresentam características distintas que possibilita diferencia-los das demais bactérias. Entre essas características encontram-se a produção do micelio, produção de hifas filamentosas ramificadas e em algumas espécies a produção de pigmentos. Este trabalho teve como objetivo a investigar a influência do meio de cultivo na produção de pigmentos pelos actinomicetos Streptomyces DPUA 1543, Streptomyces DPUA 1566, Streptomyces DPUA 1568 e Nocardia DPUA 1571 isolados de líquens da Região Amazônica, foram utilizados os meios ISP-3, ISP-5, caseína-amido e GL (glicose e extrato de levedura), os microrganismos foram cultivados por 168 horas, após esse período verificou-se a produção de pigmentos hidrossolúveis. As espécies com capacidade de produzir pigmentos foram Streptomyces DPUA 1566 e Streptomyces DPUA 1568, os meios que mais favoreceram a produção de pigmentos hidrossolúveis por esses microrganismos foram o ISP-3 e o ISP-5, tais microrganismos demonstraram ser uma fonte viável para produção de pigmentos hidrossolúveis visando sua utilização biotecnológica.

Palavras-chave: Actinomicetos, *Streptomyces*, produção de pigmentos.

INTRODUÇÃO

As bactérias da ordem Actinomycetales são denominadas genericamente por actinomicetos, apresentam características específicas, tais como: sensibilidade às lisoenzimas e agentes antibacterianos; apresentam filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas com diâmetro entre 0,5 a 2,0µm, tipicamente ramificados e denominados micélios (BOONE E CASTENHOLZ, 2001).

Os actinomicetos possuem uma morfologia que superficialmente assemelham-se à dos fungos filamentosos; no entanto, os filamentos dos actinomicetos consistem de células muito menores que a dos fungos filamentosos (TORTORA et al., 2000). São bactérias Gram positivas encontradas, sobretudo no solo, estima-se que cada grama de solo contenha 10^6 - 10^9 células dessas bactérias, os actinomicetos podem ainda estar presentes nos mais diversos ambientes, como águas, plantas e até mesmo em associação com líquens (GONZÁLEZ et al., 2005).

Estas bactérias se caracterizam por apresentar alta diversidade morfológica e metabólica, são produtoras de uma grande variedade de pigmentos responsáveis pela cor do micélio aéreo e vegetativo, além disso, também podem ser formados pigmentos coloridos que se difundem no meio com ágar, cuja produção depende em grande parte da composição do meio e condições de cultivo (OLIVEIRA, 2003).

Pigmentos naturais são derivados de fontes como plantas, insetos e microrganismos, os quais têm ganhado maior atenção devido à estabilidade dos pigmentos produzidos, além disso, a produção de pigmentos por biotecnologia microbiana apresenta-se como uma fonte de matéria-prima viável e são independentes de condições climáticas. Devido à importância cada vez maior de se descobrir microrganismos com capacidade de produzir pigmentos para a utilização industrial, este trabalho teve como objetivo estudar a influência de diferentes meios de cultivo na produção de pigmentos por actinomicetos isolados de líquens de Região Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram actinomicetos: *Streptomyces* DPUA 1543, *Streptomyces* DPUA 1566, *Streptomyces* DPUA 1568 e *Nocardia* DPUA 1571 isolados de líquens da Região Amazônica, pertencentes à coleção de microrganismos do Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas (DPUA), cedidos pela Profa. Maria Francisca Simas Teixeira. As culturas foram semeadas em tubos de ensaio inclinados contendo o meio ISP-2 descrito por Pridham et al., 1957 e modificado pela retirada da glicose. Os tubos semeados foram incubados a 30°C por 168 horas e mantidas em temperatura ambiente, as amostras foram repicadas a cada 30 dias.

2. Meio de Cultura

Para avaliar a produção de pigmentos pelas linhagens foram utilizados cinco meios de cultura, as composições desses meios de cultura estão descritos na tabela 1. Ao meio ISP-3 foi adicionada uma solução de traços de sais constituída de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10,0 \text{ mg/L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($10,0 \text{ mg/L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10,0 \text{ mg/L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($10,0 \text{ mg/L}^{-1}$).

Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min, e distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas.

3. Influência dos diferentes meios de cultura na produção de pigmentos por actinomicetos

Partes das colônias dos microrganismos crescidos em tudo inclinado contendo o meio ISP-2 foram transferidas para placas de Petri contendo os meios de cultura utilizados neste estudo com auxílio de uma alça de platina. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 168 horas. Após esse período foram observadas as características morfológicas de cada microrganismo, tais como tamanho da colônia, formato, coloração e produção de pigmentos no meio de cultura.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura, componentes e suas respectivas concentrações.

Componentes do meio de cultura	Meios de Cultura				
	ISP-2	ISP-3	ISP-5	GL	Caseína-Amido Ágar
Amido solúvel					10,0 g/L
Farinha de aveia		20,0 g/L			
Peptona				10,0 g/L	
Caseína (livre de vitaminas)					2,0 g/L
Extrato de carne					
Extrato de levedura	4,0 g/L			10,0 g/L	
Extrato de Malte	10,0 g/L				
Glicerol			10,0 g/L		
Glicose	4,0 g/L			10,0 g/L	
L-Asparagina			1,0 g/L		
K ₂ HPO ₄			1,0 g/L		2,0 g/L
MgSO ₄ . H ₂ O					0,05 g/L
NaCl				5,0 g/L	2,0 g/L
CaCO ₃					0,02 g/L
KNO ₃					2,0 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O					0,01 g/L
Solução traços de sais		1,0 mL/L			
Ágar	15,0 g/L	15,0 g/L	15,0 g/L	15,0 g/L	15,0 g/L
pH	7,2	7,2	7,0	6,9-7,1	7,0-7,4

4. Produção de pigmentos hidrossolúveis

A produção de pigmentos hidrossolúveis pelos actinomicetos foi detectada de acordo com o descrito por Oliveira (2003), um fragmento da cultura crescida nos diferentes meios de cultura foi adicionado em tubos contendo água destilada. Após alguns minutos de agitação manual, observou-se se havia ocorrido alguma mudança na coloração da água.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os actinomicetos apresentaram diferentes perfis de crescimento, esporulação e produção de pigmentos para cada um dos meios de cultura testados. Dentre as espécies testadas duas produziram pigmentos hidrossolúveis, *Streptomyces* DPUA 1566 (Figura 1) e *Streptomyces* DPUA 1568 (Figura 2). Resultados semelhantes aos observados por Fischer et al., (2003) que estudaram a produção de pigmentos por 17 espécies de *Streptomyces* ssp. isolados de batata (*Solanum tuberosum*) entre as quais apenas três produziram pigmentos difundidos no meio de cultura.

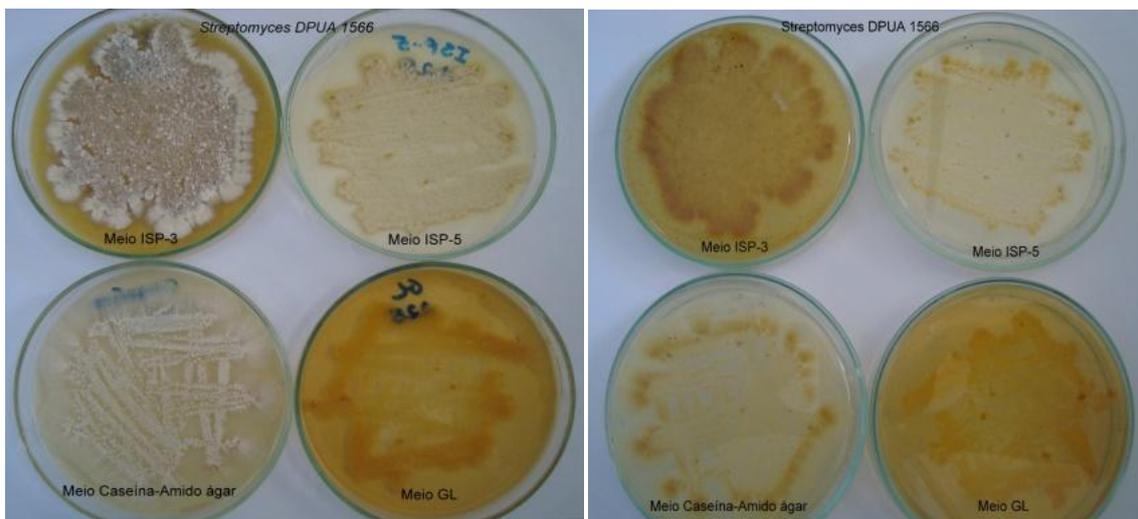


Figura 1. Foto das placas frente e reverso das colônias de *Streptomyces* DPUA 1566 nos meios de cultura ISP-3, ISP-5, Caseína Amido e GL após 168 horas de cultivo

Streptomyces DPUA 1566 após 168 horas de cultivo apresentou bom crescimento nos meios utilizados, exceto no meio GL, a coloração das colônias variou entre brancas e laranjas como pode ser observado na figura 2, o microrganismo produziu exudatos apenas no meio ISP-5 e produziu pigmentos de cor amarela em nos meios de cultura ISP-3 e ISP-5 sendo estes pigmentos hidrossolúveis, com maior produção de pigmentos no meio ISP-3.

Os meios ISP-3 e ISP-5 também favoreceram a produção de pigmentos hidrossolúveis de coloração alaranjada por *Streptomyces* DPUA 1568. Após 168 horas de cultivo, este microrganismo apresentou características diferentes para cada meio estudado, apresentando ótimo crescimento e esporulação no meio ISP-3 (Figura 3), com micélio aéreo cinza escuro e reverso da colônia marrom escuro

Oliveira (2003) identificou e caracterizou actinomicetos isolados de processos de compostagem e observou que produção de pigmentos por esses microrganismos responsáveis por uma grande variedade na coloração do micélio (branco, cinza, azul, rosa, marrom e creme) não ficava restrita ao micélio e se difundia no meio de cultivo alterando desta forma a coloração do meio, refletindo a diversidade de espécies e também a grande capacidade dos actinomicetos em produzirem pigmentos diversos.

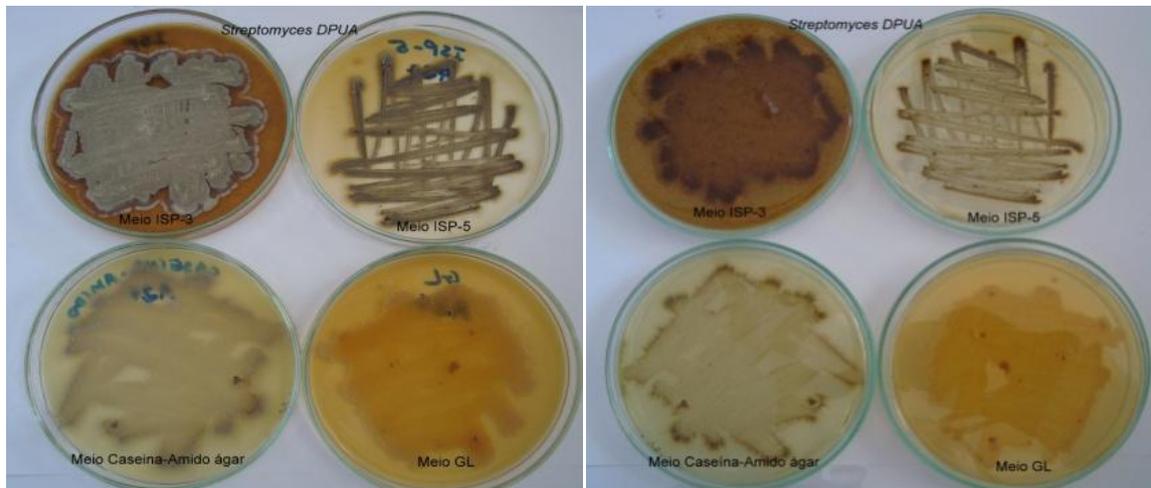


Figura 2. Foto das placas frente e reverso das colônias de *Streptomyces* DPUA 1568 nos meios de cultura ISP-3, ISP-5, Caseína Amido e GL após 168 horas de cultivo

CONCLUSÕES

Estes estudos preliminares demonstraram que os microrganismos *Streptomyces* DPUA 1566, *Streptomyces* DPUA 1568 quando cultivados por 168 horas nos meios ISP-3 e ISP-5 apresentaram produção de pigmentos hidrossolúveis, desta forma, estudos posteriores serão necessários para possíveis aplicações biotecnológicas destes microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Zahrami, S. H. M. Studies on antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Jazan JKAU: Sci., n.19, p.127-138, 2007.
- Boone, D. R.; Castenholz, R. W., Eds., In: Garrity G. M. (2001), ed.-in-chief. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York: Springer, 2 ed., v.1, p. 721.
- Chater, K. F. (2006), *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v.361, p. 761 – 798.

- Embley, T. M.; Stackebrandt, E. (1994) The molecular phylogeny and systematics of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, Canada, v. 48, p. 257-289.
- Fischer, I. H.; Kimati, H.; Martins, M. C. (2003) Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* spp. da batata. *Fitopatologia Brasileira* v. 28, p.650-655.
- González, I.; Sacido, A. A.; Anderson, A.; Geniloud, O. (2005), Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford, England, v. 54, p. 401-415.
- Lechevalier, H. A. (1989) A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Williams, S. T.; Sharpe, M. E.; Holt, J. G.; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: William Wilkins, v.4
- Oliveira, M. F. (2003) Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem, Dissertação, UFGS, Porto Alegre – RS.
- Pridham, T. G.; Aderson, P.; Foley, C.; Lindenfelser, L. A.; Hesseltine, C. W.; Benedict, R.G. (1957), A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. *Antibiotics Manual*, p.947-953.
- Sato S. Produção de antibióticos. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani, W, Schmidell W. (2001), *Biotechnology industrial - Processos fermentativos e enzimáticos*. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p.101-124.
- Sylvester-Bradley, R.; Asakawa, N.; Latorraca, S.; Magalhães, F. M. M.; Oliveira, L.A.; Pereira, R. M. (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na amazônia. *Acta Amazonica*. Manaus, v. 12, p. 15-22.
- Shirling, E. B.; Gottlieb, D. (1992) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Identification of Organic Compounds*. New York, John Wiley e Sons, v.6
- Tortora, G. J.; Funck, B. R., Case, C. L. (2000) *Microbiologia*, 6ª edição, Porto Alegre, Artmed.

9.2 ANEXO II – Normas para Publicação (Revista Applied Biochemistry and Biotechnology)

Submissions may be made online using Springer's Editorial Manager electronic submission site at <http://abab.edmgr.com>. First-time users will need to Register before submitting a manuscript. If you experience any problems, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Manuscripts

- Type manuscript in English, double-spaced on numbered pages with 1- to 1.5-inch margins. Please prepare the article as a Microsoft Word document. See the Computer Graphics section for figure specifications.
- A cover letter must accompany the submission giving the rationale for publication in Applied Biochemistry and Biotechnology, particularly with respect to the originality, scientific merit and importance to the field of Applied Biochemistry and Biotechnology. Author(s) also are required to provide names and contact information (mailing address, phone and fax numbers, and e-mail address) of at least three experts in the field as potential reviewers for the manuscript. Please do not suggest anyone who may have a conflict of interest in reviewing your manuscript, such as former advisors, students, or recent collaborators.

Abstracts

Abstracts should be 100–200 words.

Index Entries

Include 5–10 index entries/key words.

Artwork

- Number figures consecutively with Arabic numerals, callouts (if any) should be lowercase letters. Include figure captions. All figures must be cited in text; figures will be placed as close as possible to the first text citation.

Include figure captions on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. All illustrations, including chemical structures, must be

provided in professional quality, finished form ready for direct reproduction without revision by us.

- Photographs should be of high quality and with strong contrasts to withstand some reduction. Please indicate the magnification by a rule on the photograph. Additional specifications apply regarding Computer Graphics and Color Art.
- Computer Graphics: If your submission includes Computer Graphics, acceptable software formats are: Adobe Illustrator and Adobe Photoshop v5 and up. File formats are as follows: EPS (Encapsulated Postscript), TIFF, JPEG (high-quality, low-compression) and those native software formats listed above. Unfortunately we cannot accept Microsoft PowerPoint files at this time. dpi specifications: line art should be no less than 1200 dpi; halftone scans should be 300 dpi.
- Color Art: Color art cannot be accepted unless the author is willing to assume the additional production costs involved; quotes given on request.

Nomenclature

Authors should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. All abbreviations should be fully defined in the text.

Tables

Type on separate pages. Number consecutively with Arabic numerals in order of mention in the text. Provide titles for all tables.

References

Cite in the text by italic Arabic numerals in parentheses, set on the text line, numbered in the order they appear. List at the end of the paper in consecutive order. Please follow the style indicated below:

- Journal reference: 1. Haselbeck, A. and Hösel, W. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 42, 207–219.
- Chapter in book: 2. Gaastra, W. (1984), in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2: *Nucleic Acids* (Walker, J. M., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 333–341.
- Book reference: 3. Franks, F. (1993) *Protein Biotechnology*, 2nd ed., Humana, Totowa, NJ.

- Report/Document: 4. Macgregor, S. (1993), PhD thesis, University of Hertfordshire, Hatfield, UK.
- Online: 5. Cancer Facts and Figures 2006. Available from: www.cancer.org. Accessed December 31, 2006.

Page Charges

There are NO page charges for accepted articles.

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in:

Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

- [Edanz Editing Global](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文

章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需

自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- [理文编辑](#)

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダングroupジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- [エダングroup ジャパン](#)

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- [Edanz Editing Global](#)

Reprints

Reprints and/or a final PDF file are available to authors at standard rates when ordered prior to publication.

9.3 ANEXO III – Normas para publicação (Revista Química Nova)

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de

origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

Preparação de manuscritos

Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*). No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado,

ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de

referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil,

1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

Submissão Dos Artigos

A *QN* oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.s bq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo *.pdf*, a partir de arquivo *.doc* ou *.rtf*, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será

enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar - Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

Manuscritos revisados

Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de três meses ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de

Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão on line de *QN*.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL - Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr*, *eps*, *cdx* ou *opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright ©2009 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos,

inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.