



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
DEFESA DE MESTRADO



Renata Maria de Magalhães Gomes Pontes Ribeiro

**Efeitos da velocidade de cisalhamento e
transferência de oxigênio em biorreator
convencional na produção de ácido
clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***

Araraquara-SP

2017

RENATA MARIA DE MAGALHÃES GOMES PONTES RIBEIRO

**Efeitos da velocidade de cisalhamento e transferência de oxigênio
em biorreator convencional na produção de ácido clavulânico
por *Streptomyces clavuligerus***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de pesquisa e desenvolvimento de fármacos e medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

ARARAQUARA - SP

2017

RENATA MARIA DE MAGALHÃES GOMES PONTES RIBEIRO

Efeitos da velocidade de cisalhamento e transferência de oxigênio em biorreator convencional na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

Dissertação apresentado ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de pesquisa e desenvolvimento de fármacos e medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 24 de abril de 2016

R484e Ribeiro, Renata Maria de Magalhães Gomes Pontes.
Efeitos da velocidade de cisalhamento e transferência de oxigênio em biorreator convencional na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* / Renata Maria de Magalhães Gomes Pontes Ribeiro. – Araraquara: [S.n.], 2017.
86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marcel Otavio Cerri.

1. Ácido clavulânico. 2. Taxa de cisalhamento. 3 Transferência de oxigênio. 4. Biorreator convencional. 5. Morfologia. 6. $k_L a$. I. Cerri, Marcel Otavio, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPE: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

RESUMO

Streptomyces clavuligerus é uma bactéria filamentosa, capaz de produzir ácido clavulânico (AC), um importante fármaco β -lactâmico. Sendo necessário o controle de parâmetros como pH, temperatura, homogeneização do caldo, adequada transferência de oxigênio e cisalhamento para melhora de processos biotecnológicos. Sabe-se que a partir da transferência de oxigênio e da velocidade média de cisalhamento imposta ao sistema nesses biorreatores, por meio do uso de maiores ou menores rotações dos impelidores, a produção de ácido clavulânico é afetada, pois essas variáveis influenciam no crescimento do microrganismo, na reologia e morfologia do microrganismo presente no caldo fermentativo e na formação e estabilidade da molécula de AC. No presente trabalho, foram realizados experimentos para determinação volumétrica de oxigênio com diferentes conformações para encontrar o melhor posicionamento dos impelidores. Com a melhor conformação, estudou-se a transferência de oxigênio com diferentes vazões e rotações de ar. Os resultados desses experimentos mostram que um sistema pode apresentar melhores ou piores resultados de transferência de oxigênio para o processo, dependendo da sua geometria. A variação na distância entre os impelidores aumentou em até 83% a transferência de oxigênio do biorreator. Foram realizados cultivos de *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional com diferentes vazões, rotações e composição de gás para comparar os diversos efeitos sofridos na morfologia dos microrganismos, consumo de substrato, densidade ótica e reologia e produção de ácido clavulânico. Com diferentes rotações e aeração foi possível estudar a velocidade de cisalhamento e transferência de oxigênio independentemente, sendo capaz de saber como cada variável afeta a produção de ácido clavulânico. O aumento da transferência de oxigênio acelerou a produção do ácido clavulânico, mas não aumentou sua produção, os resultados obtidos evidenciam que a condição de cisalhamento é a grande responsável pelo aumento na produção do fármaco, pois ocorre a formação de hifas não ramificadas no caldo fermentativo, aumentando a produção do metabólito em até 45%.

Palavras-chave: ácido clavulânico, taxa de cisalhamento, transferência de oxigênio, biorreator convencional, morfologia, k_La

ABSTRACT

Streptomyces clavuligerus is a filamentous bacterium, producing of clavulanic acid (CA), an important β -lactam drug. It is necessary to control parameters such as pH, temperature, broth homogenization, adequate oxygen transfer and shear to improve biotechnological processes. Knows that from the transfer of oxygen and the average shear velocity imposed to the system in these bioreactors, through the use of greater or smaller rotations of the impellers, affect the production of clavulanic acid, since these variables influence the growth of the microorganism, in the rheology and morphology of the microorganism present in the fermentative broth and in the formation and stability of the CA molecule. In the present work, experiments were carried out for the volumetric determination of oxygen with different conformations to find the best positioning of the impellers. With the best conformation, the transfer of oxygen with different flow rates and air rotations was studied. The results of these experiments show that a system can present better or worse oxygen transfer results to the process depending on its geometry. The variation in distance between the impellers increased by up to 83% the transfer of oxygen from the bioreactor. *Streptomyces clavuligerus* cultures were grown in conventional bioreactor with different flow rates, rotations and gas composition to compare the different effects of microorganism's morphology, substrate consumption, optical density and rheology and clavulanic acid production. With different rotations and aeration it was possible to study the shear rate and oxygen transfer independently, being able to know how each variable affects the production of clavulanic acid. The increase in oxygen transfer accelerated the production of clavulanic acid, but did not increase its production, the results obtained show that the shear condition is the major responsible for the increase in the production of the drug, since the formation of unbranched hyphae occurs in the fermentative broth, Increasing the production of the metabolite by up to 45%.

Keywords: clavulanic acid, shear rate, oxygen transfer, conventional bioreactor, morphology, k_{La}

SUMÁRIO

I.	LISTA DE FIGURAS.....	7
II.	LISTA DE TABELAS.....	10
III.	LISTA DE ABREVIATURAS	11
1.	INTRODUÇÃO.....	6
2.	OBJETIVO.....	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1.	Microrganismo.....	22
3.2.	Meios de cultura	23
3.2.1.	Meio de cultura de reativação	23
3.2.2.	Meios de cultura de crescimento e produção	23
3.3.	Solução de coloração utilizada no estudo da morfologia dos microrganismos ..	24
3.4.	Equipamentos	25
3.5.	Metodologias.....	29
3.5.1.	Estudo da transferência de oxigênio	29
3.5.1.1.	Teste preliminar com diferentes distâncias entre os impelidores no eixo.....	29
3.5.1.2.	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) e k_e (constante de tempo de atraso do eletro)	31
3.5.2.	Avaliação de parâmetros reológicos e da influência das condições de cisalhamento nos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	33
3.5.3.	Cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado.....	33
3.6.	Metodologias analíticas	34
3.6.1.	Análise de concentração de ácido clavulânico	34
3.6.2.	Determinação da concentração de glicerol	34
3.6.3.	Análise morfológica de <i>Streptomyces clavuligerus</i> nos diferentes cultivos em biorreator	35
3.6.4.	Análise de densidade ótica.....	35
3.6.5.	Produção de ácido clavulânico e análise morfológica de <i>Streptomyces clavuligerus</i> em mesa incubadora rotativa utilizando frascos Erlenmeyers com diferentes configurações.	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	Estudo da transferência de oxigênio	37
4.1.1.	Teste preliminar com diferentes distâncias entre os impelidores no eixo.....	37

4.1.2.	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) e k_e (constante de tempo de atraso do eletro)	40
4.2.	Cultivos em biorreator convencional.....	44
4.2.1.	Avaliação de parâmetros reológicos e da influência das condições de cisalhamento nos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	55
4.3.	Análise morfológica de <i>Streptomyces clavuligerus</i> nos diferentes cultivos em biorreator	58
4.4.	Produção de ácido clavulânico e análise morfológica de <i>Streptomyces clavuligerus</i> em mesa incubadora rotativa utilizando frascos Erlenmeyers com diferentes configurações.....	63
5.	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A.....	77

I. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subgrupos das classes dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Baptista Neto, 2004)	7
Figura 2. Micélio de <i>Streptomyces clavuligerus</i> (arquivo próprio).....	10
Figura 3 – Estrutura molecular do ácido clavulânico (Liras e Rodríguez-Garcia, 2000)...	11
Figura 4. Ilustração das resistências associadas à dissolução e ao consumo de oxigênio em processos aeróbios (adaptado de Schmidell, 2001)	15
Figura 5. Tensão de cisalhamento (τ) versus velocidade de cisalhamento (γ) para líquidos Newtonianos e não Newtonianos (adaptado de Campesi, 2007).....	19
Figura 6. Quatro diferentes classes morfológicas apresentadas por microrganismos filamentosos nos ensaios fermentativos: (a) pellet (aumento 40x), (b) clump (aumento 40x), (c) hifas ramificadas (aumento 40x), (d) hifas não ramificadas (aumento 40x) (arquivo próprio).....	21
Figura 7. Biorreator convencional TEC-BIO-FLEX (arquivo próprio).....	25
Figura 8. Viscosímetro LV-DVIII+ (arquivo próprio)	26
Figura 9. Desenho esquemático do “Trap”, suas saídas e entradas (arquivo próprio).....	28
Figura 10. (a) “Trap” (b) “Saídas e entrada do Trap” (arquivo próprio)	28
Figura 11. Desenho esquemático do biorreator e suas dimensões (arquivo próprio)	29
Figura 12. Distância entre os impelidores no eixo (a) conformação 1 (b) conformação 2 (c) conformação 3 (d) conformação 4 (e) conformação 5 (f) conformação 6 (arquivo próprio).	31
Figura 13. Procedimento experimental para produção de ácido clavulânico em biorreator com <i>Streptomyces clavuligerus</i> (arquivo próprio).....	33
Figura 14. Ilustração do perfil e fundo dos Erlenmeyers (a) com três chicanas (b) convencional (arquivo próprio)	36
Figura 15. Ilustração do experimento para análise de produção de AC em diferentes configurações de frascos Erlenmeyers (arquivo próprio)	37
Figura 16. Comparação entre os k_{La} (h^{-1}) obtidos para as seis diferentes conformações em 2,5 e 5,0 $L \cdot min^{-1}$	38
Figura 17. k_{La} (h^{-1}) em água 28° C com aeração 2,5 $L \cdot min^{-1}$ (■) e 5,0 $L \cdot min^{-1}$ (●).	41
Figura 18. k_c (h^{-1}) em água 28° C com aeração 2,5 $L \cdot min^{-1}$ (■) e 5,0 $L \cdot min^{-1}$ (●).	41
Figura 19. Valores de k_{La} (h^{-1}) em água 28° C com aeração 2,5 $L \cdot min^{-1}$ obtidos experimentalmente versus valores calculados pela equação 4.	43

Figura 20. Valores de k_{La} (h^{-1}) em água 28° C com aeração 5,0 L.min ⁻¹ obtidos experimentalmente versus valores calculados pela equação 5.	44
Figura 21. Biorreator convencional durante os cultivos sob mesmas condições de temperatura e pH com diferentes condições de rotação e aeração (a) 600 rpm (b) 800 rpm (c) 1000 rpm (d) 600 rpm com enriquecimento de oxigênio (e) 600 rpm com oxigênio puro (arquivo próprio).	46
Figura 22. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 1 (600 rpm).	47
Figura 23. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 2 (800 rpm).	48
Figura 24. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 3 (1000 rpm).	49
Figura 25. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 4 (600 rpm; enriquecido 0,5 vvm).	50
Figura 26. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 5 (600 rpm; 0,1 vvm; oxigênio puro).	51
Figura 27. Perfil de oxigênio dissolvido (%) em todos os cultivos realizados em reator convencional.	54
Figura 28. Perfil de comportamento do índice de consistência nos diferentes cultivos com término em 72 horas.	55
Figura 29. Perfil do comportamento do índice de escoamento nos diferentes cultivos com término em 72 horas.	56
Figura 30. Perfil de velocidade de cisalhamento média ao longo do tempo para 600 (com e sem enriquecimento), 800 e 1000 rpm.	58
Figura 31. Imagens diluídas 100x obtidas (a) aumento de 10x, 600rpm, 24 horas (b) aumento de 10x, 800 rpm, 36 horas (c) aumento de 10x, 1000 rpm, 24 horas (d) aumento de 10x, 600 rpm enriquecido, 24 horas (e) aumento de 10x, 600 rpm 0,1 vvm, 24 horas (arquivo próprio).	60

Figura 32. Imagens diluídas obtidas no aumento de 10x (a) 600 rpm, 60 horas, diluída 100 x (b) 600 rpm, 72 horas, diluída 100 x (c) 800 rpm, 48 horas, diluída 100x (d) 800 rpm, 72 horas, diluída 100x (e) 1000 rpm, 36 horas, diluída 100x (f) 1000 rpm, 72 horas, diluída 100x (g) 600 rpm, enriquecimento de oxigênio, 36 horas, diluída 100x (h) 600 rpm, enriquecimento de oxigênio, 72 horas, diluída 100x (i) 600 rpm, oxigênio puro, 48 horas, diluída 100x (j) 600 rpm, oxigênio puro, 72 horas, diluída 100x (arquivo próprio)62

Figura 33. Imagens diluídas 100x obtidas (a) aumento de 4x com chicana (b) aumento de 4x sem chicana (c) aumento de 10x com chicana (d) aumento de 10x sem chicana (e) aumento de 40x com chicana (f) aumento de 40x sem chicana (arquivo próprio).....65

Figura A1. Curva de calibração de ácido clavulânico, equação modelo e coeficiente de correlação linear.....77

Figura A2. Curva de calibração de glicerol, equação modelo e coeficiente de correlação linear.....77

II. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meio de cultura de Rosa et al. (2005).....	23
Tabela 2. Composição dos meios de cultura de crescimento e produção, baseados no meio proposto por Teodoro et al. (2006)	23
Tabela 3. Apresentação das dimensões do biorreator nas seis diferentes conformações ...	30
Tabela 4. Fator de diluição ao longo do cultivo.....	35
Tabela 5. Valores de k_{LA} , desvio padrão e referência (%) obtido para as seis diferentes conformações para 2,5 L.min ⁻¹	40
Tabela 6. Apresentação de k_{LA} , desvio padrão e referência (%) obtido para as seis diferentes conformações para 5,0 L.min ⁻¹	40
Tabela 7. Valores experimentais obtidos para as constantes α , b e R^2 para 2,5 e 5,0 L.min ⁻¹	42
Tabela 8. Valores obtidos para o índice de consistência (k), densidade ótica máxima (DO _{máx}), concentração de ácido clavulânico máxima (Cp _{máx}), tempo de esgotamento do glicerol e tempo de pico na produção de ácido clavulânico	53
Tabela 9. Concentração de ácido clavulânico obtida para os diferentes Erlenmeyers.....	63

III. LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - absorvância (nm)

Abs600 - medida de absorvância a 600 nm (nm)

AC - ácido clavulânico

a - área interfacial de troca de massa (m^2)

α - parâmetro de ajuste da equação 7 para determinar k_{La} modelo (h^{-1})

b- parâmetro de ajuste da equação 7 para determinar k_{La} modelo (-)

C - concentração de oxigênio no meio líquido ($gO_2.m^{-3}$)

Cx - concentração de células ($g.L^{-1}$)

Cs - concentração de substrato (glicerol) ($g.L^{-1}$)

Cp - concentração de AC ($mg.L^{-1}$)

Cpmax - concentração máxima de AC ($mg.L^{-1}$)

di - diâmetro interno do reator (cm)

DO - densidade ótica (-)

EF - ensaio fermentativo

H - altura do reator (cm)

Hi - espaço livre no eixo entre os impelidores (cm)

Hj - distância do 1º impelidor ao líquido (cm)

Hi - altura do líquido (cm)

Hm - distância do segundo impelidor ao final do eixo (cm)

Hn - distância do aspersor e o fundo da dorna (cm)

K - índice de consistência ($dina.cm^{-2}.s^{-n}$)

k_e - constante de tempo de atraso do eletrodo (h^{-1})

k_L - coeficiente convectivo de transferência de massa

k_{La} - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

$K_{máx}$ - índice de consistência máximo ($dina.cm^{-2}.s^{-n}$)

Lc - Largura da chicana (cm)

MC - meio de crescimento

MP - meio de produção

MR - meio de reativação

n - índice de comportamento do escoamento (-)

no_2 - fluxo de oxigênio ($gO_2. m^{-2}. h^{-1}$)

N_{O_2} - velocidade volumétrica de transferência de oxigênio ($gO_2. m^{-3}. h^{-1}$)

OD - oxigênio dissolvido ($\text{gO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

OD% - porcentagem de oxigênio dissolvido (%)

rpm- rotações por minuto (-)

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

t - tempo de cultivo (h)

t_0 - tempo inicial (s)

V - volume (L)

μ : viscosidade do líquido (dina.cm^{-1})

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

τ_e - tempo de atraso do eletrodo de oxigênio dissolvido (-)

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

γ_{av} - velocidade de cisalhamento média (s^{-1})

Φ_{ar} - vazão específica de alimentação de ar (vvm)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por me iluminar e abençoar a minha trajetória, permitindo que eu chegasse até aqui.

Ao Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri pela orientação, paciência, incentivo, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança e por ser o maior incentivador na superação dos meus limites.

Ao Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto pela solicitude, atenção e por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos meus pais, Renato e Filomena, pelo amor incondicional e onipresente. Pelo incentivo em todos os momentos, não me deixando desistir mesmo quando tudo parecia impossível.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Pedro, por me darem a certeza que nunca estarei sozinha, mesmo estando distante.

Ao Diego, por todo amor, cuidado, incentivo e companheirismo. Obrigada por tornar os meus sonhos, os nossos sonhos!

A Thamiris pela amizade sincera, por me levantar em todos os momentos de fraquezas e por sempre estar ao meu lado.

A Thaís por ter me acolhido, pelo carinho, motivação e companheirismo.

Aos colegas de laboratório, em especial à Ana Paula, Bárbara, Vanessa, Flávia, Helene e Rodrigo por me auxiliarem diversas vezes, tornando a caminhada mais fácil de ser seguida.

A todos os professores que contribuíram e enriqueceram o meu conhecimento em toda minha trajetória acadêmica.

À CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro. A UNESP e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas por abrirem as portas para realização do meu sonho, fornecendo todas as condições para a realização desse trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram e torceram pelo sucesso deste trabalho, muito obrigada

1. INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC), um metabólito secundário, sintetizado por *Streptomyces clavuligerus* é um potente inibidor de enzimas β -lactamases, responsáveis pela clivagem do anel β -lactâmico, resultando na perda da ação antibacteriana dos antibióticos. A resistência microbiana aos antibióticos β -lactâmicos tem se tornado cada vez mais comum resultando em surgimento de microrganismos mais potentes e resistentes. Torna-se evidente a necessidade de β -lactâmicos mais estáveis à ação das β -lactamases uma vez que os grupos penicilina e cefalosporina de β -lactâmicos representam 45% do mercado de antibióticos utilizados (Rosa et al., 2005; Saudagar et al., 2008; Cerri e Badino, 2012; Hamad, 2010).

Entre as formas de se evitar a ação destrutiva das enzimas β -lactamases tem-se: alteração da estrutura dos compostos β -lactâmicos, tornando-os insensíveis a hidrólise pela β -lactamase e mantendo seu potencial antibiótico ou utilização de um reagente em conjunto com o antibiótico β -lactâmico, o que em outras condições seria rapidamente desativado pela enzima (Hakimelahi et al., 2002)

Assim como o ácido clavulânico, as estruturas moleculares dos metabólitos secundários de modo geral podem ser formadas por anéis β -lactâmicos, peptídeos cíclicos contendo aminoácidos não proteicos, açúcares incomuns, nucleosídeos e políenios. Apenas algumas espécies de gêneros específicos são capazes de produzi-los, através de processos fermentativos. (Demain e Fang, 1995; Baptista Neto et al., 2005).

Todos os antibióticos da classe dos β -lactâmicos, os mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas, têm mecanismo de ação via inibição da síntese da parede celular, possuem em sua estrutura molecular o anel β -lactâmico e podem ser divididos em cinco subgrupos, entre eles o clavamas na qual o AC se inclui, de acordo com a estrutura molecular básica, conforme mostra a Figura 1:

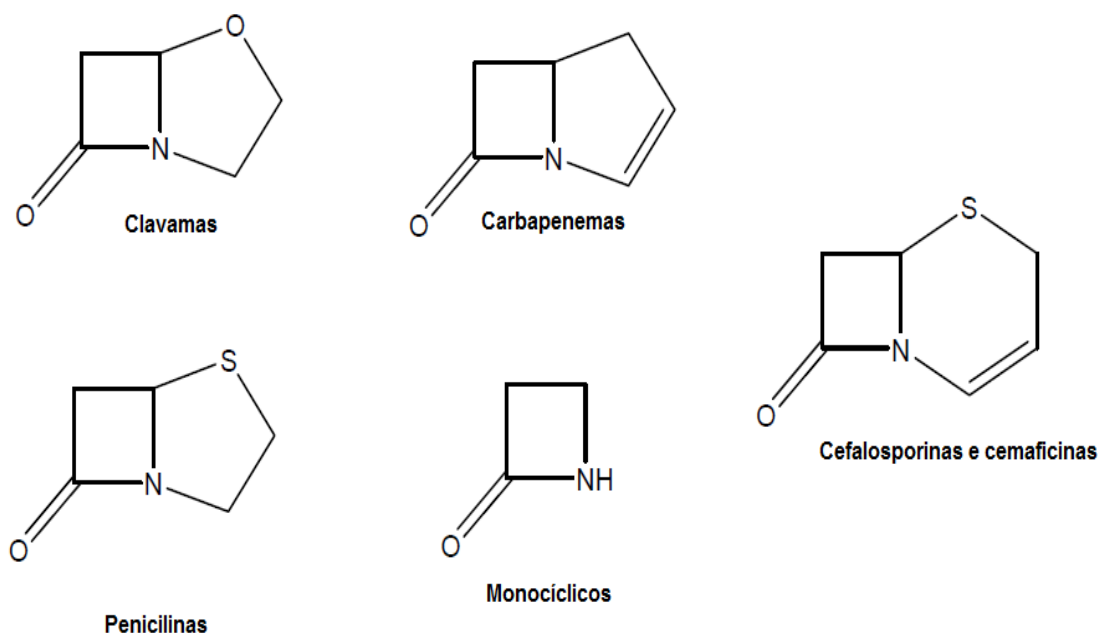


Figura 1. Subgrupos das classes dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Baptista Neto, 2004)

Comercialmente o ácido clavulânico é encontrado no Brasil como Clavulin®, contendo amoxilina e clavulanato de potássio fornecido pelos laboratórios BRAINFARMA; EMS; EUROFARMA; MEPHA; NOVARTIS e RANBAXY (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA). Apesar da sua baixa atividade antibacteriana, o AC é bastante utilizado em combinação com antibióticos mais potentes. A baixa produtividade do AC é o grande desafio para sua obtenção em larga escala, sendo necessárias condições especiais de cultivo como pH, temperatura, agitação e aeração (Dekun et al., 2013).

Assim como o cultivo de *Streptomyces clavuligerus*, em geral, bioprocessos com microrganismos são majoritariamente processos aeróbios ou aeróbios facultativos, sendo o oxigênio essencial no suprimento de energia para o metabolismo, crescimento, síntese de produtos, transporte, e outras atividades celulares. (Schimidell, 2001; Berg et al., 2007). Apesar da importância da biodisponibilidade do oxigênio no meio reacional, sua baixa solubilidade no meio de cultivo quando comparada à solubilidade de outros nutrientes, pode ser a etapa limitante para se obter as melhores condições de cultivo. O que é ainda mais agravado na presença de microrganismos aeróbios, devido à demanda elevada e crescente de consumo global de oxigênio em biorreatores batelada e batelada alimentada. (Garcia- Ochoa e Gomez, 2009; Bustamante, 2013).

O processo de transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, no caso de cultivos de fungos filamentosos ou bactérias é limitado pela geração de caldos mais viscosos, à medida que as células vão se reproduzindo, o que dificulta a transferência de massa em um sistema heterogêneo (gases, meio de cultura e microrganismos) (Campesi, 2007; Bustamante, 2013; Campani, 2014). Assim, a demanda de oxigênio requerida em cultivos aeróbicos varia de acordo com o tipo de microrganismo, o comportamento de crescimento e a concentração celular. Por isso equacionar a real demanda de oxigênio requerida e controlar a taxa de transferência de oxigênio gasoso para o meio de cultura é crucial na melhora de processos biotecnológicos, garantindo seu bom desempenho em diferentes escalas e diferentes condições de operação (Garcia-Ochoa e Gomez, 2009; Bustamante, 2013; Esperança, 2014).

Para avaliar a taxa a transferência de oxigênio em biorreatores, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), definido como o produto do coeficiente convectivo de transferência de massa (k_L) e área interfacial de troca de massa (a), dada pela relação entre a área total das bolhas e o volume útil do biorreator, deve ser determinado. Sendo esse um parâmetro importante para avaliar a capacidade de transferência de oxigênio em reatores, com diferentes condições operacionais e geométricas, assim como a diferença entre misturas.(Kargi e Moo-Young, 1985).

A taxa de transferência de oxigênio pode ser afetada pelos parâmetros geométricos, características reológicas do meio, como viscosidade e tensão superficial, condições operacionais e pela concentração e morfologia dos microrganismos. Portanto, acompanhar o desempenho de transferência de oxigênio em um sistema, através do controle do k_La é muito importante em processos aeróbicos ou aeróbicos facultativos, para manter uma adequada concentração de oxigênio no meio de cultivo e para que juntamente com modificações em parâmetros operacionais, tais como a frequência de rotação do agitador (N), vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) ou enriquecimento do gás com O_2 puro, seja alcançada a homogeneização e aeração desejadas no caldo de cultivo, garantindo o melhor desempenho do sistema (Rollins et al., 1988; Gavrilescu et al., 1993).

Em bioprocessos aeróbicos, além da aeração adequada do sistema é extremamente necessário conhecer o comportamento reológico do seu meio de cultura, pois de acordo com seu perfil um processo pode demandar maiores cuidados do que outros para se obter um sistema adequado de transferência de massa (Campesi, 2007). Um dos parâmetros que pode ser alterado de acordo com o perfil reológico de um fluido é o cisalhamento, definido como

a força resultante das tensões paralelas à secção transversal de um objeto, que tem a função de causar a deformação de um corpo (Bustamante, 2013). A velocidade de cisalhamento é a variável responsável por garantir a correta e suficiente transferência de massa e energia para o meio, assegurando o suprimento para o metabolismo celular, crescimento, síntese de produtos, transporte, e outras atividades celulares. Dessa forma, quando a força hidrodinâmica é subestimada pode ter uma perda da biossíntese do produto enquanto o excesso da taxa de cisalhamento pode resultar em perda de viabilidade, rompimento das células e morte microbiana. Sendo assim, o conhecimento e controle desse parâmetro em processos que envolvam microrganismos sensíveis ao cisalhamento, é muito importante no projeto e no controle operacional do biorreator, a fim de garantir que o efeito hidrodinâmico seja positivo (Contreras et al., 1999; Cerri e Badino, 2012).

A sensibilidade celular ao cisalhamento pode estar relacionada ao cisalhamento causado pelo impelidor e/ou as condições de cisalhamento pela aeração impostos ao longo do cultivo. Dessa forma, é necessário assegurar as melhores condições de agitação e aeração no meio, levando em conta a forma de fornecimento de oxigênio, o tipo e o grau de agitação que serão utilizados no cultivo, sem provocar efeitos negativos na morfologia, metabolismo, composição, biossíntese e viabilidade celular, garantindo um ambiente físico-químico adequado aos microrganismos (Meijer et al., 1993). Em biorreatores convencionais, a velocidade de cisalhamento está diretamente ligada à frequência do impelidor, porém diminuir a velocidade de agitação do meio pode não ser uma alternativa viável, uma vez que essa acarreta em baixa transferência de massa para o meio de cultivo, limitando o processo (Ho e Olshue, 1987; Badino e Schimidell, 2001).

A relação entre o produto de interesse e a morfologia do microrganismo é de grande importância em uma fermentação, sendo a variação morfológica responsável por alterar as propriedades reológicas do caldo fermentativo, afetar os fenômenos de transporte no interior do biorreator e a eficiência e produtividade do processo global. (Papagianni, 2004; Robson et al., 2008). Assim, estudos vem sendo desenvolvidos para que se obtenha um grau adequado de mistura nos processos bioquímicos, favorecendo a transferência de massa e calor nos cultivos, suficientes para um bom crescimento celular e elevada produtividade, porém com menores danos às células (Patel e Thibault, 2009; Michelin, et al., 2013; Lan, et al., 2013).

Diante do apresentado, observa-se a importância de condições ótimas de cultivo, como transferência de oxigênio e cisalhamento, sobre o crescimento, produção de AC e

morfologia de *Streptomyces clavuligerus*. Apesar de ambos serem dependentes da agitação imposta no biorreator e a vazão de ar de operação, é de extrema importância o estudo de forma dissociada dos efeitos causados por cada um desses parâmetros na produção de ácido clavulânico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Streptomyces clavuligerus*

Streptomyces clavuligerus é uma bactéria gram-positiva, filamentosa, estritamente aeróbia, na qual foi descrita inicialmente como microrganismo produtor apenas de cefamicina C, sendo posteriormente reportada como produtora de outros antibióticos (β -lactâmicos ou não) tais como o ácido clavulânico e penicilina (Higgins e Kastner, 1971; Liras e Rodríguez-García, 2000).

Refere-se à uma bactéria pertencente ao grupo dos actinomicetos, caracterizado por possuir uma estrutura mais complexa quando comparado aos outros grupos bacterianos, embora seja mais simples que os fungos. De maneira geral, esse grupo possui hifas com diâmetro entre 0,5 e 1,0 μm (Alexander, 1977). *Streptomyces clavuligerus*, inicialmente formada por um micélio aéreo composto por um emaranhado de hifas ramificadas é representada pela Figura 2.

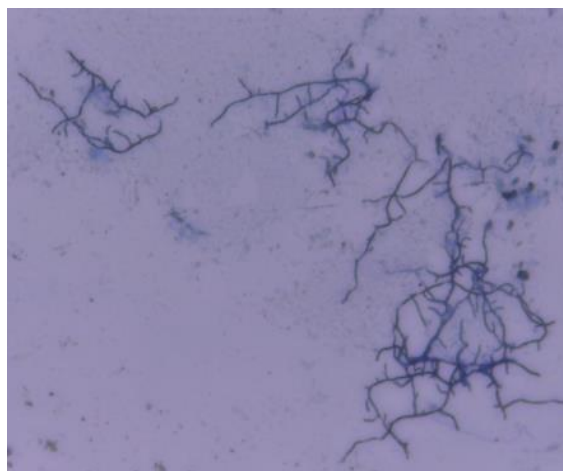


Figura 2. Micélio de *Streptomyces clavuligerus* (arquivo próprio).

Em sua maioria a espécie do gênero *Streptomyces* são mesófilas e neutrofílicas, tendo ótimo crescimento em temperaturas de 28 a 45 °C e em ambientes de pH neutro (Ballows et al., 1992). Em relação a fonte de carbono, essa bactéria não consome facilmente mono e dissacarídeos, como glicose, frutose, lactose e sacarose, que são geralmente utilizados em

processos fermentativos como principal fonte de carbono e energia. Dessa forma, utiliza-se glicerol como fonte de carbono. (Puentes et al., 1989)

Do ponto de vista industrial *Streptomyces clavuligerus* é um dos mais importantes microrganismos, sendo capaz de produzir até 21 metabólitos secundários, incluindo alguns que apresentam atividade antibacteriana como Cefamicina C e Penicilina N e de inibidores de β -lactamases como BLIP e o ácido clavulânico. (Paradkar et al., 1998; Neves et al., 2001; Liu et al., 2004).

2.2. Ácido clavulânico

O Ácido Clavulânico (AC) consiste em uma estrutura que não possui grupos hidrofóbicos fortes e apresenta como propriedade característica baixa estabilidade química, o que leva a baixos rendimentos de em processos de recuperação (Mayer et al., 1996). O mecanismo de ação do AC consiste na sua ligação irreversível ao grupo hidroxila de uma serina no centro ativo das β -lactmases, produzindo um intermediário estável e inativando a enzima (Liras e Rodríguez-Garcia, 2000). Como ilustrado na Figura 3, a estrutura molecular do AC é formada por dois anéis, o β -lactâmico e o oxazolidino.

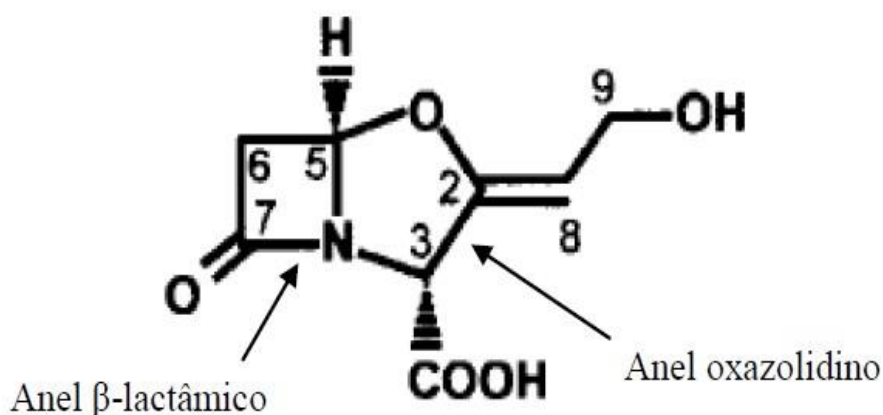


Figura 3 – Estrutura molecular do ácido clavulânico (Liras e Rodríguez-Garcia, 2000).

A baixa atividade antibacteriana do AC, quando comparado a outros antibióticos, torna inviável utilizá-lo sozinho no tratamento antibacteriano, tornando comum formulações conjuntas entre ele e outros antibióticos β -lactâmicos sensíveis à ação de β -lactamases, tais como penicilina e cefalosporina. A aplicação de combinações como estas, tem resolvido o problema da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos (Dekun, 2013; Cerri e Badino, 2012; Baggaley et al., 1997).

O AC apesar de ser um fármaco de alto valor agregado, tem sua escala industrial comprometida, fruto da sua baixa produtividade. As associações farmacêuticas contendo o AC, comercializadas no Brasil, são provenientes de multinacionais e é comercializado como um composto de amoxilina e clavulanato de potássio.

2.3. Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

O AC é tradicionalmente produzido a partir de processos fermentativos utilizando a bactéria *Streptomyces clavuligerus*, tendo seu crescimento celular, consumo de substrato e taxa de produção influenciados pelo pH, temperatura, composição do meio, agitação, aeração impostos (Gouveia et al., 1999; Kirk et al., 2000, Saudagar et al., 2008).

A composição do meio é de extrema importância nesse e em outros processos fermentativos, em especial carbono e nitrogênio, que resultam no acúmulo de diferentes metabólitos. Para a produção de AC os meios mais utilizados na literatura apresentam glicerol ou lipídeo como fonte de carbono e derivados da soja (como farinha de soja, isolado proteico de soja, farelo de soja) como fonte de nitrogênio (Saudagar et al., 2008). Quanto aos tipos de derivados da soja, como fontes de nitrogênio, estudos literários mostram que a produção de AC é maior nos cultivos que utilizam farinha de soja como derivado, sendo benéfica para o crescimento de *Streptomyces clavuligerus* e produção do fármaco. (Wang et al., 2005; Ortiz et al., 2007; Saudagar et al., 2008).

A partir dos estudos de Teodoro et al. (2006) conclui-se que uma grande concentração inicial de nitrogênio resulta em maior liberação de amônia durante o cultivo devido ao catabolismo de aminoácidos, inibindo a produção de AC, pois apresentam efeito negativo sobre o metabolismo secundário, como repressão de enzimas responsáveis pela assimilação de outras fontes de nitrogênio (como aminoácido e ureia) causando citotoxicidade em alguns microrganismos. Portanto, a concentração da fonte de nitrogênio e consequentemente a concentração de íons amônio, devem assegurar um crescimento celular satisfatório combinado com uma elevada biossíntese do produto de interesse. (Demain e Fang, 1995; White, 1995; Roubos et al., 2002) A concentração inicial de nitrogênio próxima a 3,0 g.L⁻¹ de N total proporcionou bom crescimento celular e a maior produção específica de AC ao longo de todo o cultivo.

Streptomyces clavuligerus é incapaz de assimilar a glicose a glicose como fonte de carbono, pois não consegue transportá-la através da membrana celular. Sendo assim, a fonte de energia mais utilizada tem sido lipídeos. Embora as fontes de energia mais simples para

o crescimento celular e produção de metabólitos secundários sejam derivadas do carbono, é necessário assegurar que sejam usadas fontes de baixa solubilidade (como lipídeos), pois fontes muito solúveis podem atuar como inibidores na biossíntese de metabólitos secundários de interesse, tais como penicilina e cefalosporina. (Zhang e Demain, 1992; Saudagar et al., 2008)

Quanto aos efeitos dos óleos vegetais (óleo de soja, óleo de girassol e óleo de milho) no cultivo de *Streptomyces clavuligerus*, tem-se comportamentos similares nos cultivos realizados, na produção de AC e crescimento microbiano. De maneira geral, a fonte carbono principal do microrganismo é o glicerol, sendo a produção de AC maior nos cultivos que utilizam concentrações iniciais menores de lipídeos, uma vez que são consumidos apenas após total aproveitamento de glicerol como substrato (Maranesi et al., 2005; Ortiz et al., 2007).

2.4. Biorreator convencional

Biorreatores são todos os equipamentos utilizados para converter matérias-primas em produtos utilizando microrganismos, células animais, vegetais ou enzimas. Sendo responsáveis por manter os microrganismos envolvidos em um ambiente adequado, na tentativa de prover condições ótimas de crescimento, como temperatura, pH, substrato, sais nutricionais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios), possibilitando que as células cresçam e produzam os metabólitos de interesse (Schügerl, 1992).

A homogeneização e mistura num biorreator é fundamental para o sucesso da fermentação, pois a falta de um nutriente pode ser crucial para o crescimento do microrganismo. Além deste fator, a homogeneização também é importante para a dispersão de sólidos insolúveis, a homogeneização de temperatura, pH e nutrientes em todo o reator e a transferência de oxigênio para o meio líquido (Cerri, 2009).

Embora existam muitos modelos de biorreatores empregados em processos biotecnológicos, o biorreator do tipo tanque agitado e aerado é o mais empregado de todos os reatores, por isso conhecido como convencional ou padrão, em todas as escalas de produção, desde os laboratórios de pesquisa até as indústrias de bioprocessos.

Charles (1985) justifica os biorreatores convencionais serem os mais utilizados na indústria de fermentação por assegurar correta distribuição dos nutrientes, sendo a agitação desse biorreator a responsável pelas transferências de massa, calor, movimento e homogeneização das suspensões. Por retornar um mínimo de morte celular resultante da

adição de ácido e base concentrados para o controle de pH e a facilidade no aumento de escala.

A necessidade de otimização de tarefas específicas no biorreator convencional, resultou na elaboração de diferentes tipos de impelidores, sendo mais utilizado o impelidor turbina de seis pás planas ou tipo *Rushton*, com o aspensor de gás localizado abaixo do impelidor (Asenjo e Merchuck, 1994).

Tendo em vista a importância da agitação do meio, é de se esperar que quanto maior for a agitação, maior será a transferência de oxigênio, fator limitante em processos fermentativos envolvendo o cultivo de microrganismos aeróbios. No entanto, quanto maior a agitação maior também será o cisalhamento celular que pode causar mudanças morfológicas irreversíveis no microrganismo, e por consequência, mudanças reológicas no caldo fermentativo, influenciando desta forma a biossíntese do produto de interesse. Portanto, valores extremamente baixos de agitação e aeração irão ocasionar em perda de biossínese do produto de interesse, em contrapartida o seu excesso pode ser prejudicial ao metabolismo e morfologia celular. (Merchuck e Gluz, 1999; Garcia -Ochoa et al., 2015).

2.5. Transferência de oxigênio

Projetar adequadamente um processo que tenha correta transferência de massa para todo o cultivo é de extrema importância. Porém o oxigênio tem uma baixa solubilidade, que chega a ser de 1.000 a 10.000 vezes menor quando comparado a outros nutrientes presentes no meio, como a glicose, tornando esse um problema característico em bioprocessos. Esse problema é ainda mais agravado à medida que o processo evolui, estando associado às altas taxas de velocidades de respiração, demandando uma alta transferência de oxigênio para o meio fermentativo (Bailey e Ollis, 1986). Dessa forma, em culturas aeróbicas, equacionar a real demanda de oxigênio requerida pelo meio, independente da escala e das condições operacionais, garante o fornecimento correto de oxigênio para o meio e consequentemente otimização da produção dos metabólitos desejados (Cerri, 2009).

O oxigênio gasoso sofre inúmeras resistências até o seu consumo final, conforme ilustrado na Figura 4.

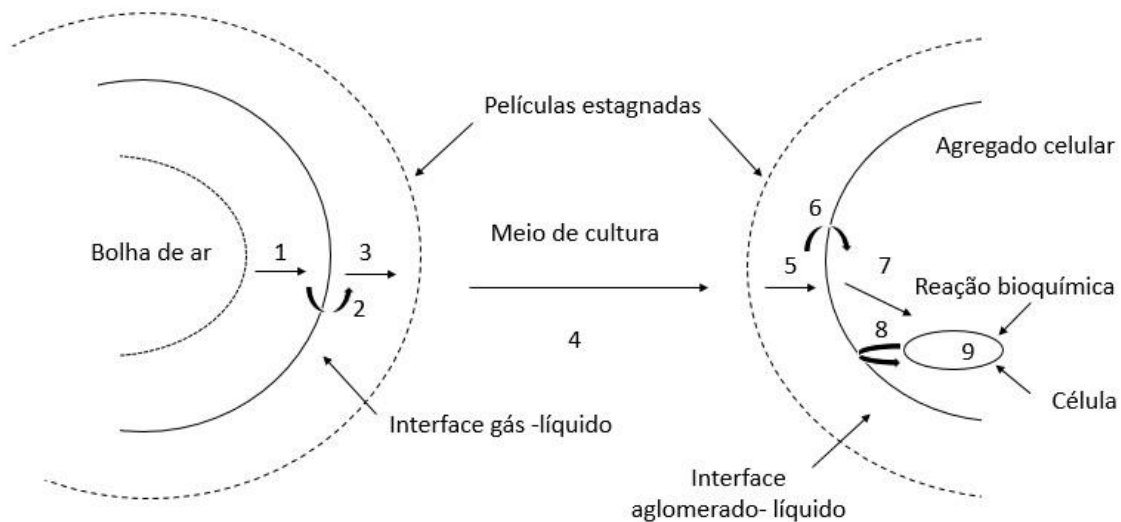


Figura 4. Ilustração das resistências associadas à dissolução e ao consumo de oxigênio em processos aeróbios (adaptado de Schmidell, 2001).

As nove resistências ilustradas são divididas em (1) difusão através da película estagnada de gás; (2) interface gás-líquido; (3) difusão através da película estagnada de líquido; (4) difusão de oxigênio até a célula; (5) difusão através da película líquida em torno da célula; (6) passagem pela interface caldo-agregado celular; (7) difusão através do agregado celular; (8) passagem pela membrana celular; (9) difusão no citoplasma celular.

De uma maneira geral as resistências associadas à transferência de oxigênio para o meio celular podem ser divididas em três fases distintas: A primeira é a fase de transferência do oxigênio para o líquido, na qual existem três resistências (1, 2 e 3) a serem vencidas. Dados literários permitem deduzir que em razão da intensa movimentação molecular do oxigênio gasoso, a resistência 1 é desprezada. Assim como a resistência da interface gás-líquido (resistência 2) é menosprezível, quando não opera na presença de substâncias no meio com capacidade de adesão a essa superfície, como os antiespumantes. Dessa forma, a barreira dominante na primeira fase de transferência de oxigênio é representada pela resistência 3, relativa à película líquida estagnada, que é função da difusividade do oxigênio no meio líquido e a espessura da camada de película estagnada. A resistência 4, segunda fase, representa a difusão do oxigênio líquido até a superfície celular. (Schmidell, 2001).

Por fim, tem-se a fase do consumo do oxigênio pelo interior das células (resistências 5, 6, 7, 8 e 9). Devido ao pequeno tamanho celular em conjunto com a elevada área de células expostas ao meio líquido, a resistência 5 pode ser desprezada. Tal como a resistência 6 e 7, uma vez que a membrana celular não faz barreira para o oxigênio, que penetra no interior

das células por difusão. Assim sendo, a resistência associada a taxa de consumo de oxigênio na respiração celular (resistência 8) é a resistência mais significativa perante as demais (Schmidell, 2001).

As resistências 1, 2 e 3 são conhecidas por um mecanismo muito conhecido de transferência de massa em sistemas gás-líquido e podem ser descritos pela teoria das películas estagnadas proposta por Lewis e Whitman (1924). O equacionamento da velocidade de transferência de oxigênio do ar para o meio de cultura a partir dessa teoria é proposto abaixo pela equação 1:

$$n_{O_2} \cdot a = k_L a (C_s - C) \quad (1)$$

Na qual:

n_{O_2} = Fluxo de oxigênio por área interfacial ($g\ O_2/m^2\ h$);

a = Área superficial interfacial de troca de massa (m^{-1});

$k_L a$ = Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});

C_s = Concentração de oxigênio dissolvido no seio líquido em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio da fase gasosa (p_g), segundo a lei de Henry ($g\ O_2/m^3$);

C = Concentração de oxigênio no meio líquido ($g\ O_2/m^3$)

Quando o sistema não estiver em estado estacionário, a variação da concentração de oxigênio dissolvido no meio líquido em função do tempo é equacionada como:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) \quad (2)$$

Assim, para avaliar a taxa de transferência de oxigênio utiliza-se o $k_L a$ como parâmetro. Sendo k_L proporcional à raiz quadrada da difusividade e dependente da tensão aplicada ao longo do processo e características moleculares. Enquanto a área interfacial seja dependente do grau de turbulência no sistema, promovendo o contato gás-líquido. Assim, esse parâmetro dependerá do tipo de sistema de aeração envolvido (Higbie, 1935; Dankwertz, 1951). A temperatura também afeta o coeficiente de transferência de oxigênio de maneira direta, pois ao elevarmos a temperatura altera-se a velocidade das moléculas de oxigênio na água e no ar acima da superfície livre, aumentando a difusão molecular do soluto gasoso no filme líquido superficial (Corrêa, 2006).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio é um parâmetro utilizado para comparar a capacidade de transferência de oxigênio entre diferentes biorreatores, assim como a diferença entre misturas. Sendo o produto dos termos (k_L e a) dependente do sistema, da escolha do biorreator e condições operacionais, o controle do k_{La} em um sistema é fundamental para manter uma adequada concentração de oxigênio no meio de cultivo em bioprocessos aeróbios, garantindo o melhor desempenho do sistema.

2.6. Reologia

Assim como o controle da aeração adequada, em fermentações é extremamente necessário conhecer o comportamento reológico do seu meio de cultura, pois de acordo com seu perfil, um processo pode demandar maiores cuidados, do que outros para se obter um sistema adequado de transferência de massa (Campesi, 2007). Um dos parâmetros que pode ser alterado de acordo com o perfil reológico de um fluido é o cisalhamento, responsável pela deformação de um corpo (Bustamante, 2013).

Charles e Wilson (1994), relatam que a maioria dos meios fermentativos são fluidos Newtonianos, sendo a sua viscosidade independente da velocidade e da tensão de cisalhamento, apresentando uma proporcionalidade entre elas, porém ambas dependentes de outros parâmetros físico-químicos como temperatura, pH e composição, sendo representados pela equação da “Lei de Newton da viscosidade (equação 3)”:

$$\tau = \mu \cdot \gamma \quad (3)$$

Onde:

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

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

μ : viscosidade do líquido (dina.cm^{-1})

São exemplos de fluidos Newtonianos: água e a maioria dos meios de cultura com bactérias e fungos não filamentosos. Com

$n > 1$ para fluido dilatante

$n < 1$ para fluido pseudo-plástico

Com $n = 1$ para fluido Newtoniano. Nesses casos, tem-se:

$$\mu = K \quad (4)$$

A viscosidade de um fluido pode sofrer variações de acordo com o tipo do biorreator e as condições operacionais empregadas no cultivo, como agitação, aeração, vazão volumétrica, entre outros. A equação 5 estabelece a relação desse parâmetro com a velocidade e tensão de cisalhamento (Campani, 2014).

$$\tau = K.\gamma^n \quad (5)$$

Onde:

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

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

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

n: índice de comportamento do escoamento (-)

Sendo K e n dependentes exclusivamente de características celulares como a morfologia, condição de crescimento, concentração, composição, entre outros (Chisti, 1987).

A Figura 5 ilustra as possíveis variações sofridas por um fluido na tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento.

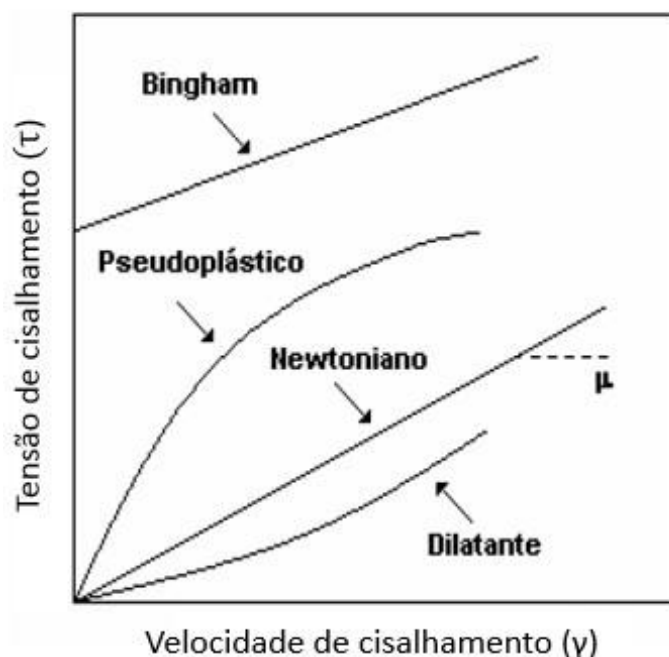


Figura 5. Tensão de cisalhamento (τ) versus velocidade de cisalhamento (γ) para líquidos Newtonianos e não Newtonianos (adaptado de Campesi, 2007).

2.7. Efeitos da velocidade de cisalhamento

Em bioprocessos, conhecimento e controle da velocidade de cisalhamento é muito importante no projeto. Embora de maneira geral na literatura o cisalhamento apareça como uma variável prejudicial ao meio fermentativo, devido à elevada sensibilidade das células, se faz necessário nos cultivos um cisalhamento mínimo, responsável por garantir correta transferência de massa e energia, bem como favorecer o metabolismo celular. (Contreras et al., 1999; Cerri e Badino, 2012).

Em geral fungos e bactérias não filamentosas são mais resistentes ao cisalhamento do que microrganismos filamentosos. E esses, por sua vez suportam condições mais extremas do que células animais e vegetais, que são mais frágeis e requerem condições mais amenas (Bustamante, 2013). Quando comparados entre si, microrganismos gram-negativos são os mais sensíveis ao cisalhamento, seguido por microrganismos gram-positivos e por fim, os mais resistentes, as leveduras (Engler e Robinson, 1981).

A alta sensibilidade de microrganismos e células ao cisalhamento se deve aos danos gerados pelo impelidor e às condições de cisalhamento por borbulhamento de ar. Dessa forma, é necessário assegurar as melhores condições de agitação e aeração no meio, levando em conta à forma de fornecimento de oxigênio, o tipo e o grau de agitação que serão utilizados no cultivo, sem provocar efeitos negativos na morfologia, metabolismo, composição, biossíntese e viabilidade celular, garantindo um ambiente físico-químico adequado aos microrganismos (Meijer et al., 1993).

A velocidade do cisalhamento pode acarretar em diferentes consequências na morfologia dos microrganismos filamentosos, a partir da fragmentação dos micélios, assim como a reologia do meio de cultura. Sendo indispensável o estudo do tipo e o grau de cisalhamento a ser imposto, através da escolha correta do tipo de impelidor, o grau de agitação e aeração imposto ao cultivo (Oh et al., 1992; Jüsten et al., 1996; Contreras et al., 1999; Chisti, 2001).

2.8. Morfologia

O adequado grau de mistura em um ensaio fermentativo é o responsável pela homogeneização do meio, transferências de massa e energia e pela manutenção morfológicas dos microrganismos, condicionando-os a um bom crescimento celular (Makagiansar, 1993). A morfologia microbiana também é capaz de alterar as características reológicas do caldo, os fenômenos de transporte e pôr fim a eficiência do processo, expondo a extrema necessidade dos esforços e estudos realizados para a melhoria de controle desse parâmetro (Papagianni, 2004).

Diferentes morfologias são apresentadas por microrganismos filamentosos ao longo dos cultivos na literatura: hifas ramificadas, hifas não ramificadas, *clumps* (emaranhados de hifas) e *pellets* (emaranhados de clumps de alta densidade celular) (Cox et al., 1998; Pamboukian et al., 2002).

A Figura 6 ilustra essas quatro classes morfológicas, como proposto por Cox et al. (1998):

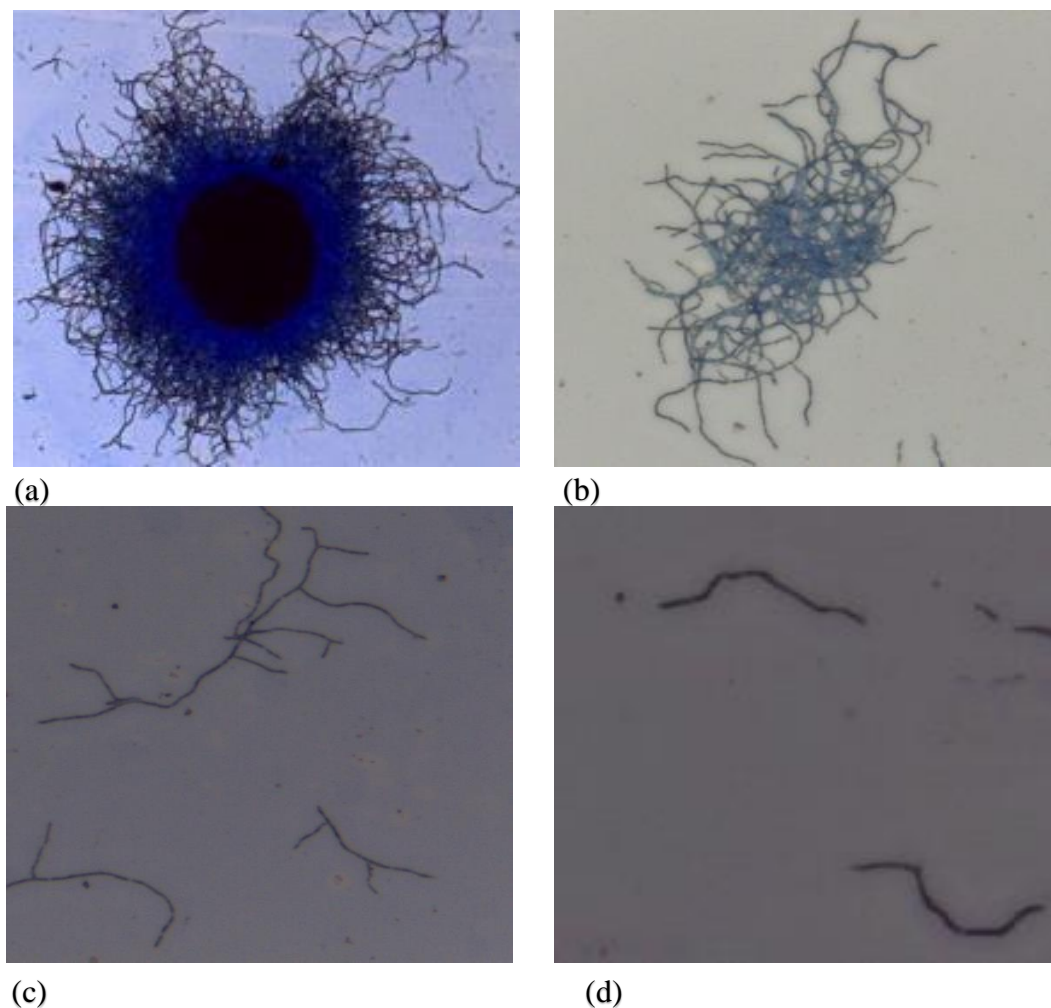


Figura 6. Quatro diferentes classes morfológicas apresentadas por microrganismos filamentosos nos ensaios fermentativos: (a) *pellet* (aumento 40x), (b) *clump* (aumento 40x), (c) hifas ramificadas (aumento 40x), (d) hifas não ramificadas (aumento 40x) (arquivo próprio).

Diversos estudos vêm correlacionando as imagens realizadas ao longo dos cultivos, caracterizando as células qualitativa e quantitativamente a fim de relacionar a produtividade com a morfologia apresentada, pois alterações morfológicas a partir da fragmentação dos micélios interferem na produção de metabólitos primários e secundários (Pamboukian et al., 2002; Papagianni, 2004).

No cultivo de *Streptomyces clavuligerus* na produção de ácido clavulânico, Belmar-Beiny e Thomas (1991) mostram que o aumento na frequência de rotação dos impelidores, aumenta a fragmentação das hifas. Para o cultivo de *Aspergillus oryzae* e *Penicillium chrysogenum*, Amanullah et al. (2000) estuda a diminuição dos *clumps* com o aumento da agitação. A partir de estudo realizados por Pinto et al. (2001) sabe-se que a quantidade de células viáveis em cultivos de *S.clavuligerus* é muito influenciada pelo estado inicial do inoculo. Por fim, Pamboukian et al. (2002) relatam que o cisalhamento imposto no biorreator é responsável pela formação de *clumps* e hifas, a partir do fragmento dos *pellets*.

3. OBJETIVO

O presente trabalho visou avaliar cultivos de *S.clavuligerus* em biorreator convencional empregando diferentes condições operacionais (rotação e aeração), com ou sem enriquecimento de oxigênio para viabilizar o estudo do cisalhamento e transferência de oxigênio de forma isolada.

Etapas do trabalho

- ✓ Realizou-se medidas do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para o biorreator convencional de 5,0 litros para diferentes condições de rotação de impelidor e vazão de ar.
- ✓ Cultivou-se *Streptomyces clavuligerus* em biorreatores convencionais para a produção de AC com diferentes condições de rotação de impelidor e velocidades de transferência de oxigênio.
- ✓ Correlacionou-se o efeito das variáveis de operação no processo na produção de AC.
- ✓ Estudou-se a morfologia de *Streptomyces clavuligerus* submetidos a diferentes condições de cisalhamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

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

4.2. Meios de cultura

421. Meio de cultura de reativação

Todos os ensaios utilizaram o meio de cultura de reativação proposto por Rosa et al. (2005), descrito na Tabela 1. O pH foi ajustado para 6,8 e o meio de cultura esterilizado em autoclave a 121°C por 25 minutos.

Tabela 1. Meio de cultura de Rosa et al. (2005).

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L ⁻¹)	15,0
Peptona bacteriológica (g.L ⁻¹)	10,0
Extrato de Malte (g.L ⁻¹)	10,0
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	1,00
Tampão MOPS ⁽¹⁾ (g.L ⁻¹)	21,0
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	2,50
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,75
Solução de sais ⁽²⁾ (g.L ⁻¹)	1,00

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

⁽²⁾ Composição (g.L⁻¹ em água destilada): MnCl₂.4H₂O (1,0); FeSO₄.7H₂O (1,0); ZnSO₄.7H₂O (1,0).

422. Meios de cultura de crescimento e produção

O meio de cultura de crescimento teve a mesma composição do meio de cultura de produção, descrito na Tabela 2. Ambos foram baseados no meio proposto por Teodoro et al. (2006).

Tabela 2. Composição dos meios de cultura de crescimento e produção, baseados no meio proposto por Teodoro et al. (2006).

Componentes	Concentração
Glicerol (g.L ⁻¹)	15,0
Isolado proteico de soja (g.L ⁻¹)	20,0
Tampão MOPS ⁽¹⁾ (g.L ⁻¹)	21,0
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	0,80
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,75
Solução de sais ⁽²⁾ (g.L ⁻¹)	1,00

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

⁽²⁾ Composição (g.L⁻¹ em água destilada): MnCl₂.4H₂O (1,0); FeSO₄.7H₂O (1,0); ZnSO₄.7H₂O (1,0).

O pH dos meios de crescimento e produção foram ajustados para 6,8 utilizando solução de NaOH 1M e a esterilização realizada em autoclave a 121°C por 50 minutos para o meio de crescimento e para o meio de produção, garantindo uma completa esterilização.

O meio de cultura original proposto por Teodoro et al. (2006) contém óleo de soja (1 g.L⁻¹) na sua composição. Neste trabalho, o óleo de soja não foi utilizado para garantir que o glicerol fosse a única fonte de carbono e apenas o mesmo influenciasse na produção de AC e concentração de células.

4.3. Solução de coloração utilizada no estudo da morfologia dos microrganismos

Para realização da coloração das lâminas feitas a partir de amostras diluídas do caldo fermentativo, utilizou-se o reagente azul de metileno com a seguinte composição: azul de metileno 1,5 g dissolvido em 10 mL de álcool 95% (v/v) e 5 mL de fenol fundido. O volume foi completado até 100 mL com água destilada e homogeneizado. Após 24 horas, a mistura obtida foi filtrada e o líquido resultante utilizado como reagente.

4.4. Equipamentos

A. Biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreator comercial tipo tanque agitado e aerado, TEC-BIO-FLEX Tecnal-Brasil®, apresentado na Figura 7, equipado com controlador de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, rotação, rotâmetro para aeração e bombas de alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e adição de soluções ácidas e básicas. O biorreator dispõe de volume total de 7,5 L, e volume útil de 5,0 L. O sistema dispõe de quatro chicanas opostas diametralmente com largura de 1,5 cm, o diâmetro interno do biorreator é 19,0 cm e diâmetro externo 21,7 m. O sistema foi montado utilizando dois impelidores do tipo turbinas *Rushton*.



Figura 7. Biorreator convencional TEC-BIO-FLEX (arquivo próprio).

B. Câmara de fluxo laminar

Utilizou-se câmara de fluxo laminar asséptica VECO BIO SEG 12 equipada com lâmpada germicida UV para garantir a assepsia do local e de todos os materiais envolvidos nos ensaios.

C. Autoclave

Todos os materiais envolvidos nos cultivos foram esterilizados em autoclave modelo AV 75, PHOENIX®, a 121°C.

D. Espectrofotômetro

Para a realização das análises espectrofotométricas de determinação de ácido clavulânico, glicerol e densidade ótica, utilizou-se o espectrofotômetro GENESYS 10S, THERMO SCIENTIFIC®.

E. Viscosímetro

Todas as análises reológicas do caldo fermentativo foram feitas no viscosímetro de cilindros concêntricos, LV-DVIII+, BROOKFIELD® (Figura 8).



Figura 8. Viscosímetro LV-DVIII+ (arquivo próprio).

F. Mesa incubadora rotativa

Em todos os experimentos, as etapas de reativação e crescimento do microrganismo foram realizadas em mesa incubadora rotativa TECNAL® TE-421, contendo controles de temperatura e rotação. Em alguns experimentos, a etapa de produção também foi realizada em mesa incubadora rotativa.

G. Ultrafreezer

Tanto os criotubos contendo as suspensões celulares microbianas, quanto os microtubos contendo as amostras para as análises de produção de ácido clavulânico e consumo de glicerol foram armazenados em ultrafreezer THERMO FORMA®, modelo 904, a temperatura de -70°C .

H. Centrífuga refrigerada

As amostras retiradas durante os ensaios fermentativos para posterior análise de ácido clavulânico e glicerol foram centrifugadas em centrífuga refrigerada modelo UNIVERSAL 320R, HETTICH®, para obter o sobrenadante.

I. Microscópio

As lâminas resultantes dos esfregaços para estudo da morfologia dos microrganismos foram analisadas em microscópio óptico Leica® modelo ICC50 HD e software Leica Imaging, equipado com câmara e software de análise de imagens.

J. Banho termostático

Para posterior análise da concentração de ácido clavulânico e glicerol no meio fermentativo, utilizou-se o banho termostático com circulação, LUCADEMA®, modelo 152/10.

K. Agitador de tubos tipo Vortex

Para agitar os tubos contendo caldo fermentativo diluído, utilizou-se o agitador de tubos tipo Vortex, Lab1000®, modelo LM-MX-S,

L. *Trap* (armadilha de espuma)

No presente projeto desenvolveu-se um sistema de captura de espuma (*Trap*) para controlar a altura do biorreator durante o cultivo na fase noturna.

Controlou-se o nível de espuma pela adição de antiespumante e o nível de caldo nutriente por meio do *trap* desenvolvido, a fim de reciclar para o biorreator todo conteúdo (espuma) que por alguma ventura vazasse da dorna. Dessa maneira, o frasco reagente (coletor de espuma) com uma entrada e duas saídas. A entrada do *trap* é conectada à saída do condensador, uma das saídas é responsável pelo retorno da espuma para biorreator, e a outra saída aberta para o ambiente, com filtro de ar. Uma bomba peristáltica, operando com vazão em torno de 160 mL/minuto é a responsável pelo bombeamento e retorno da espuma ao reator. A vazão específica da bomba foi determinada de acordo com a demanda do cultivo (mais ou menos formação de espuma).

A Figura 9 abaixo esquematiza o “Trap”, suas entradas e saídas:

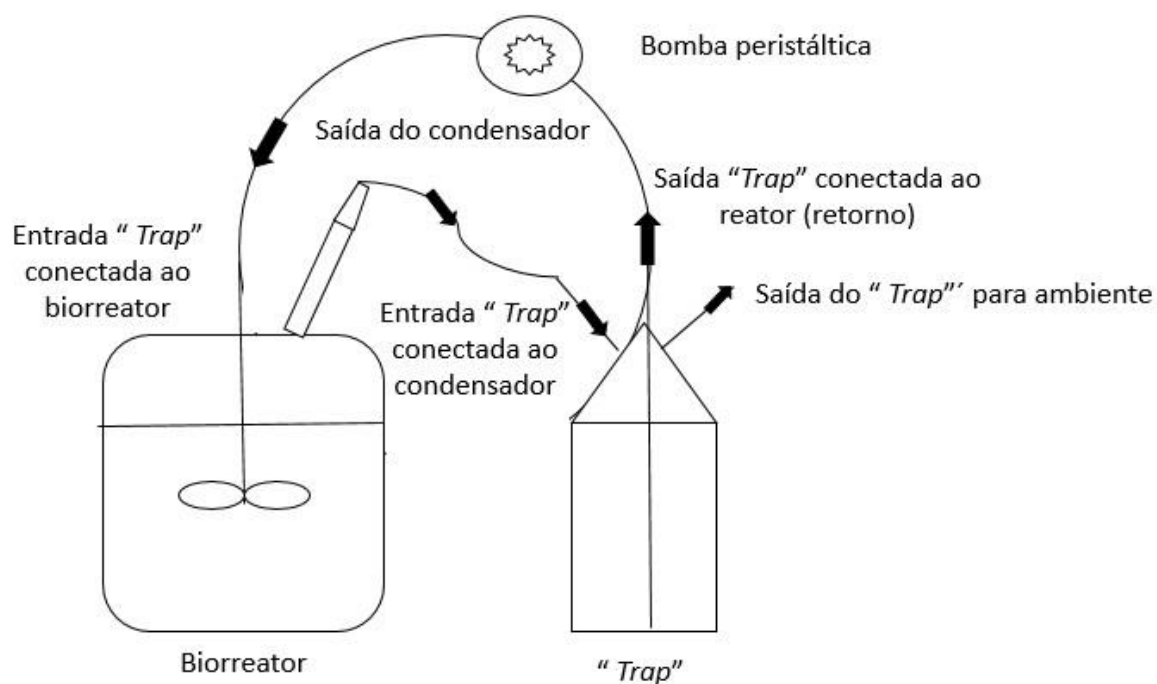


Figura 9. Desenho esquemático do “Trap”, suas saídas e entradas (arquivo próprio).

A Figura 10 abaixo ilustra o reciclo utilizado em todos os experimentos realizados.

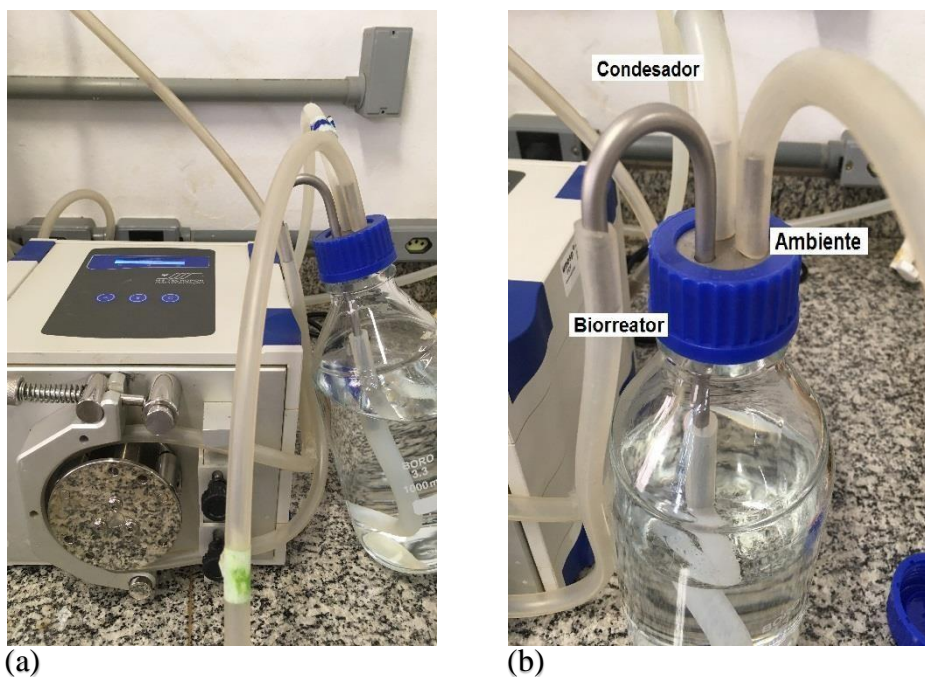


Figura 10. (a) “Trap” (b) “Saídas e entrada do Trap” (arquivo próprio)

4.5. Metodologias

4.5.1. Estudo da transferência de oxigênio

4.5.1.1. Teste preliminar com diferentes distâncias entre os impelidores no eixo

Inicialmente foram testadas cinco diferentes conformações do biorreator, além do original de fábrica, com relação a disposição dos dois impelidores turbina tipo *Rushton*. A forma de comparação foi a estimativa do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando como fluido água à 28°C, a agitação imposta foi de 1000 rpm, e os valores obtidos de acordo com o método dinâmico, foram tratados como proposto por Cerri et al. (2016). A aeração foi fixada primeiramente em 0,5 vvm ($2,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) e posteriormente foi mantida em 1,0 vvm ($5,0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$), para todas as condições geométricas testadas no sistema.

A Figura 11 abaixo, representa o desenho esquemático do biorreator utilizado e os diferentes parâmetros medidos.

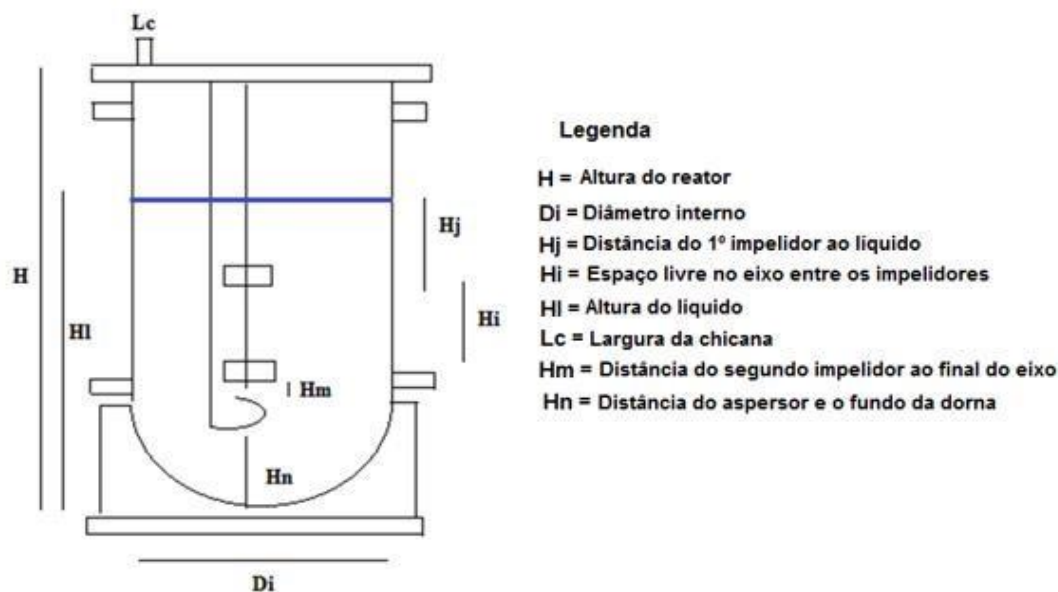


Figura 11. Desenho esquemático do biorreator e suas dimensões (arquivo próprio).

A Tabela 3 a seguir detalha os diferentes posicionamentos dos impelidores testado. A Figura 12 é uma representação real das posições dos impelidores no eixo, nas diferentes condições.

Tabela 3. Apresentação das dimensões do biorreator nas seis diferentes conformações

Parâmetro	Conformação					
	1	2	3	4	5	6
H (cm)	36,5	36,5	36,5	36,5	36,5	36,5
Di (cm)	19	19	19	19	19	19
Hj (cm)	5,75	5	4	3,25	7	5,5
Hi (cm)	7,5	9	10	10	7	7,6
Hi (cm)	19,2	19,2	19,2	19,2	19,2	20,5
Lc (cm)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Hm (cm)	0,75	0	0	0,75	0	1
Hn (cm)	3	3	3	3	3	3
V (L)	4,65	4,65	4,65	4,65	4,65	5,1



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 12. Distância entre os impelidores no eixo (a) conformação 1 (b) conformação 2 (c) conformação 3 (d) conformação 4 (e) conformação 5 (f) conformação 6 (arquivo próprio).

4.5.1.2. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) e k_e (constante de tempo de atraso do eletrodo)

Para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}), as medidas foram feitas em triplicatas utilizando água destilada à 28°C como fluido em seis diferentes condições de agitação (400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 rpm) e em duas diferentes condições de aeração em 0,5 vvm (2,5 L.min⁻¹) e 1,0 vvm (5,0 L.min⁻¹), totalizando 42 experimentos de determinação de k_{LA} e k_e . Trabalhou-se com 5,1 L de fluido (conformação 6). O sistema utilizado dispõe de quatro chicanas opostas diametralmente com

largura de 1,5 cm, o diâmetro interno do biorreator é 19,0 cm e diâmetro externo 21,7 cm. O sistema foi montado utilizando dois impelidores do tipo turbinas *Rushton*, com uma distância de 7,6 cm entre um e outro, com seis lâminas. A distância entre o aspersor e o fundo do recipiente utilizado foi 3,0 cm e a distância do impelidor inferior ao final do eixo 1,0 cm.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi determinado através do método dinâmico (Chisti, 1987). Este método consiste na utilização de um sensor para medir a concentração de oxigênio dissolvido no meio líquido, com sistema de aquisição de dados em tempo real. Inicialmente, o sistema é aerado, calibrando-se o eletrodo para a condição de saturação de oxigênio (100%). Então borbulha-se nitrogênio no meio para eliminação do oxigênio dissolvido, até a concentração igualar-se a zero. Em seguida, o sistema é alimentado com uma vazão de gás conhecida, registrando-se os valores de concentração ao longo do tempo. Com estes valores foi possível calcular o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La).

A estimativa de k_La foi obtido com independência de tempo de atraso do eletrodo de oxigênio (τ_e) como descrito no trabalho de Cerri et al. (2016). Levando em consideração a variação sofrida pela película estagnada na ponta do eletrodo de oxigênio no meio líquido, de acordo com o tipo de fluido, rotação do impelidor e vazão de gás imposta ao sistema. A partir da equação 6 (Cerri et al., 20016) é possível estimar k_e a partir de k_La .

$$k_e = \frac{K_L a}{\left[1 - \left(\frac{OD_0 - 100}{OD_e - 100}\right)e^{-k_L a (t - t_0)}\right]} \quad (6)$$

A partir desse estudo preliminar foram obtidas as equações de previsão de velocidade de cisalhamento média (γ) para os diferentes experimentos realizados, sendo correlacionadas com a frequência de rotação do impelidor (N), conforme a equação 7 abaixo (Ryu e Humphrey, 1972):

$$k_L a = \alpha \cdot N^b \quad (7)$$

4.5.2. Avaliação de parâmetros reológicos e da influência das condições de cisalhamento nos cultivos de *Streptomyces clavuligerus*

A variação da produção do ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreatores convencionais de cinco litros foi avaliada com condições de operação de 600, 800 e 1000 rpm para velocidade de cisalhamento e com taxa de transferência de oxigênio fixa em vazão de ar de 2,5 L.min⁻¹. Posteriormente foi realizado um cultivo em 600 rpm com entrada de 2,0 L.min⁻¹ de ar e 0,5 L.min⁻¹ de oxigênio puro, totalizando uma vazão de 2,5 L.min⁻¹ e um cultivo em 600 rpm com entrada de 0,5 L.min⁻¹ de oxigênio puro.

As amostras foram retiradas de seis em seis horas do caldo fermentativo do biorreator, para fazer avaliação da produção de ácido clavulânico, consumo de substrato (glicerol), densidade ótica, K (índice de consistência) e η (índice de escoamento do fluido).

A metodologia para determinar os parâmetros reológicos, foi baseada na Lei da Potência (equação 5; $\tau = K \cdot \gamma^n$).

Cabe ressaltar que o índice de consistência está relacionado com a concentração celular, mostrando que é importante o seu monitoramento durante toda a fermentação.

4.5.3. Cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado

O procedimento utilizado em todos os ensaios fermentativos foi descrito por Rosa et al. (2005) e pode ser dividido em três etapas: reativação do microrganismo, crescimento e produção, descritos pela Figura 13 abaixo:



Figura 13. Procedimento experimental para produção de ácido clavulânico em biorreator com *Streptomyces clavuligerus* (arquivo próprio).

Os procedimentos realizados em cada etapa são descritos a seguir:

- ✓ Reativação: inoculou-se 2,0 mL de solução contendo células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus* em cada frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 48,0 mL de meio de reativação e foram incubados a 30°C e 250 rpm durante 24 horas.
- ✓ Crescimento: Retirou-se 6,0 mL do meio de reativação e inoculou-se em 10 frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 45,0 mL de meio de crescimento. Novamente incubou-se a 30°C e 250 rpm durante 24 horas.
- ✓ Produção: Por fim, 510 mL de meio de crescimento foi inoculado ao biorreator, contendo 4,59 L de meio de produção. Assim sendo, o volume final utilizado em todos os experimentos no biorreator foi 5,1 L e o inóculo corresponde a 10% desse volume total. Os cultivos foram realizados em 28°C, pH controlado em 6,8 pela adição de ácido (H₂SO₄ 1M) ou base (NaOH 1M) e aeração e agitação do sistema foi variada de acordo com a condição experimental. A etapa de produção foi realizada em biorreator convencional do tipo tanque agitado e aerado (Figura 7), durante 72 horas.

Em todos os cultivos, amostras do caldo fermentativo foram retiradas de 6 em 6 horas e determinou-se concentração de ácido clavulânico, concentração de glicerol, densidade ótica e parâmetros reológicos (índice de consistência, K e índice de comportamento de escoamento, n).

4.6. Metodologias analíticas

4.6.1. Análise de concentração de ácido clavulânico

Para a determinação da concentração de ácido clavulânico foi utilizado o método espectrofotométrico proposto por Bird et al. (1982), que consiste na leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 311 nm do produto da derivação do ácido clavulânico com o reagente imidazol. A curva de calibração (Figura A1, do Apêndice A) foi construída utilizando como padrão o AC do produto farmacêutico Clavulin® (Glaxo SmithKline - Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil). As amostras foram retiradas e centrifugadas a 4°C e 3.720 x g por 15 minutos. O material em suspensão foi congelado em ultrafreezer a -70°C, para posterior análise de ácido clavulânico.

4.6.2. Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol no meio de cultivo foi determinada por método enzimático utilizando um kit para triacilglicerídeos (Triglycerides GPO-PAP, Liquid Stable Mono-reagent, Laborlab, Brasil) a partir da curva de calibração (Figura A2, do Apêndice A).

As amostras foram centrifugadas a 4°C, 3.720 x g por 15 minutos e o sobrenadante congelado em ultrafreezer a -70°C, para posterior análise de glicerol.

4.6.3. Análise morfológica de *Streptomyces clavuligerus* nos diferentes cultivos em biorreator

Para as análises morfológicas utilizou-se a metodologia proposta por Pinto et al. (2001). As amostras foram retiradas e diluídas em solução salina 0,9% em duas diferentes concentrações, segundo fator de diluição apresentado na Tabela 4, utilizando 0,3 mL de amostra já diluída para realização do esfregaço das células em lâminas, que foram posteriormente coradas com azul de metileno e deixadas em repouso por aproximadamente 2 minutos. Consecutivamente lavou-se o excesso de corante com água destilada, as lâminas foram secadas naturalmente e por fim armazenadas. Esse processo garantiu a estabilidade dos micélios na lâmina, permitindo que as análises feitas pudessem ser manipuladas posteriormente.

Tabela 4. Fator de diluição ao longo do cultivo

Tempo de cultivo (h)	Fator de diluição
0	50/70
6	50/70
12	70/100
18	70/100
24	70/100
30	100/150
36	100/150
Após 42	100/200

4.6.4. Análise de densidade ótica

Para estimar a densidade ótica no cultivo adaptou-se a metodologia proposta por Mayer e Deckwer (1996), retirando amostras de seis em seis horas diluindo-as conforme a turbidez. Após diluídas as amostras foram agitadas em agitador de tubos tipo vórtex por 30 segundos e por fim foram realizadas as leituras em espectrofotômetro, fazendo a leitura da

absorbância a 600 nm das suspensões celulares. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

4.6.5. Produção de ácido clavulânico e análise morfológica de *Streptomyces clavuligerus* em mesa incubadora rotativa utilizando frascos Erlenmeyers com diferentes configurações.

Com o objetivo de testar a influência da diferente configuração geométrica na morfologia do *Streptomyces clavuligerus* e produção de AC realizou-se cultivos em dois diferentes tipos de Erlenmeyers como mostra a Figura 14.

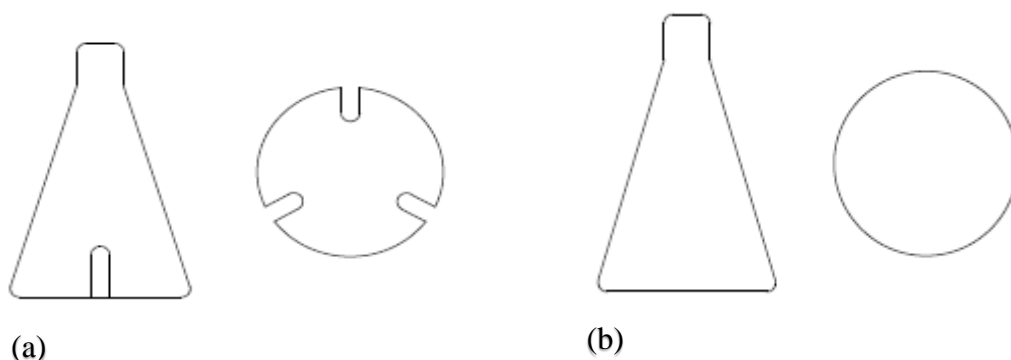


Figura 14. Ilustração do perfil e fundo dos Erlenmeyers (a) com três chicanas (b) convencional (arquivo próprio).

O experimento, realizado em duplicata, foi realizado em duas etapas. A etapa inicial consiste na em analisar a produção de ácido clavulânico em diferentes configurações de frascos Erlenmeyers (Figura 14), e para tanto utilizou-se os mesmos meios descritos anteriormente. Todas as etapas utilizaram frascos Erlenmeyers de 500 mL, tendo sido utilizados na etapa de reativação e de crescimento frascos Erlenmeyers convencionais, enquanto na etapa de produção utilizou-se frascos Erlenmeyers convencionais e frascos Erlenmeyers com três chicanas. Todos os experimentos foram realizados com 10% de preenchimento do frasco Erlenmeyer. A Figura 15 ilustra o procedimento.



Figura 15. Ilustração do experimento para análise de produção de AC em diferentes configurações de frascos Erlenmeyers (arquivo próprio).

Para a segunda etapa, análises morfológicas, utilizou-se a metodologia proposta por Pinto et al. (2001). As amostras foram retiradas no final do cultivo (72 horas de ensaio) e diluídas 100 e 200 vezes.

Utilizou-se para esses ensaios o meio de reativação proposta por Rosa et al.(2005) e para o meio de crescimento e produção utilizou-se o meio de cultura proposto por Teodoro et al. (2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da transferência de oxigênio

4.1.1. Teste preliminar com diferentes distâncias entre os impelidores no eixo

Primeiramente, realizou-se medidas do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) para seis diferentes conformações entre os impelidores, apresentadas na Tabela 3, para assim selecionar a melhor conformação para a produção de AC. A Figura 16, apresenta os resultados obtidos para as diferentes associações, nas condições de 1000 rpm e aeração de 2,5 e 5,0 L.min⁻¹ (0,5 e 1,0 vvm).

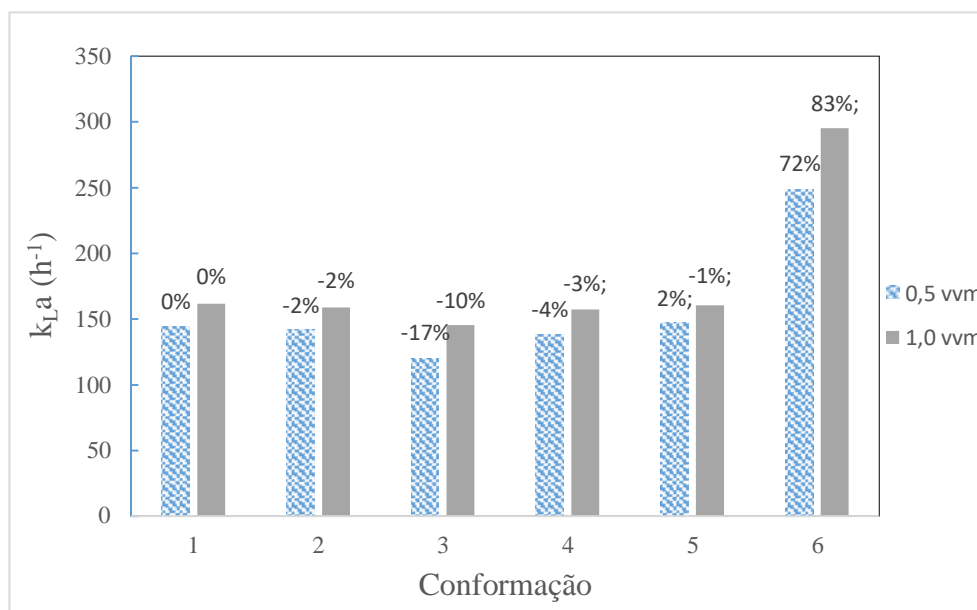


Figura 16. Comparação entre os k_{La} (h^{-1}) obtidos para as seis diferentes conformações em 2,5 e 5,0 $L \cdot min^{-1}$.

Para efeitos comparativos adotou-se a conformação 1 como referência (conformação vinda da fábrica).

Para avaliar as condições ótimas do biorreator utilizado, o efeito da taxa de transferência de oxigênio é de suma importância em processos aeróbicos, como no cultivo de *Streptomyces clavuligerus*, esse é um dos primeiros parâmetros que devem ser estudados antes de se iniciar um processo bioquímico, garantindo processos mais eficazes e consequentemente uma maior produção de ácido clavulânico.

Cerri (2009), ao estudar diferentes conformações geométricas em biorreatores *airlift* mostra ser de extrema importância estimar de forma precisa a velocidade de transferência de oxigênio em diferentes condições operacionais, garantindo a transferência correta de oxigênio para o processo, maior produção do metabólito desejado em culturas aeróbias e bom desempenho de biorreatores.

A Figura 16 possibilita verificar que diferentes conformações acarretam em grandes variações de k_{La} , apresentando valores de k_{La} até 82,62% maior do que a conformação original, proveniente de fábrica. Porém algumas associações, como a condição 3, apresentou valores de k_{La} até 16,71% menor quando comparado à conformação de fábrica do produto. Tal fato deve-se a maior ou menores interferências na hidrodinâmica e consequentemente na transferência do oxigênio da fase gasosa para a fase líquida.

A condição 3 por ter a maior distância entre os impelidores cria duas zonas de circulação de líquidos muito distantes entre elas, causando uma baixa transferência de oxigênio. Da mesma forma, como mostra a Tabela 3, é necessária uma distância mínima de H_m para se obter melhores resultados de transferência de oxigênio. Isso se deve ao fato de ter uma distância mínima entre o nascimento da bolha no difusor e o impelidor, tornando-o acessível a mais bolhas quebrando-as, consequentemente, aumentando a área superficial das bolhas e consequentemente o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

Os resultados obtidos também indicam que o fluido sofre maior influência da condição geométrica impostas aos impelidores *Rushton* do que o aumento na aeração fornecida ao sistema, na variável k_{La} . Assim sendo, como mostras a Tabelas 5 e 6, observa-se que na mesma condição operacional, como a condição 6, dobrar a aeração fornecida ao sistema, não dobra a transferência de oxigênio, aumentando essa variável em apenas 21%. Porém, variando-se a conformação dos impelidores, comparando a condição 4 e a 6, na mesma aeração (0,5 vvm) pode-se obter valores de k_{La} até 79% maior.

Tabela 5. Valores de k_{LA} , desvio padrão e referência (%) obtido para as seis diferentes conformações para 2,5 L.min⁻¹ (0,5 vvm).

Conformação	k_{LA} (h ⁻¹)	Desvio padrão (1/h)	% Referência
Fábrica (1)	144,36	0,09	-
2	141,84	6,33	-1,75
3	120,24	2,60	-16,71
4	138,60	1,12	-3,99
5	147,60	4,62	2,24
6	248,40	1,90	72,07

Tabela 6. Apresentação de k_{LA} , desvio padrão e referência (%) obtido para as seis diferentes conformações para 5,0 L.min⁻¹ (1,0 vvm).

Conformação	k_{LA} (h ⁻¹)	Desvio padrão (1/h)	% Referência
Fábrica (1)	161,64	4,22	-
2	158,76	1,77	-1,78
3	145,44	2,38	-10,02
4	157,32	3,70	-2,67
5	160,56	1,89	-0,67
6	295,20	2,29	82,62

Analisando todos os efeitos sofridos na variável responsável pela transferência de oxigênio ao sistema, obteve-se a conformação que apresentou os melhores resultados, sendo a conformação 6 escolhida para trabalhar ao longo dos cultivos e prosseguir com o estudo.

4.12. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) e k_e (constante de tempo de atraso do eletro)

Depois de se obter a melhor conformação de impelidores estudou-se o efeito da variação de rotação e aeração no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, variando-se a rotação de 400 a 1000 rpm e aeração de 2,5 e 5,0 L.min⁻¹.

Os dados obtidos experimentalmente para as quatorze associações (7 rotações e 2 aerações) são apresentados nas Figuras 17 e 18.

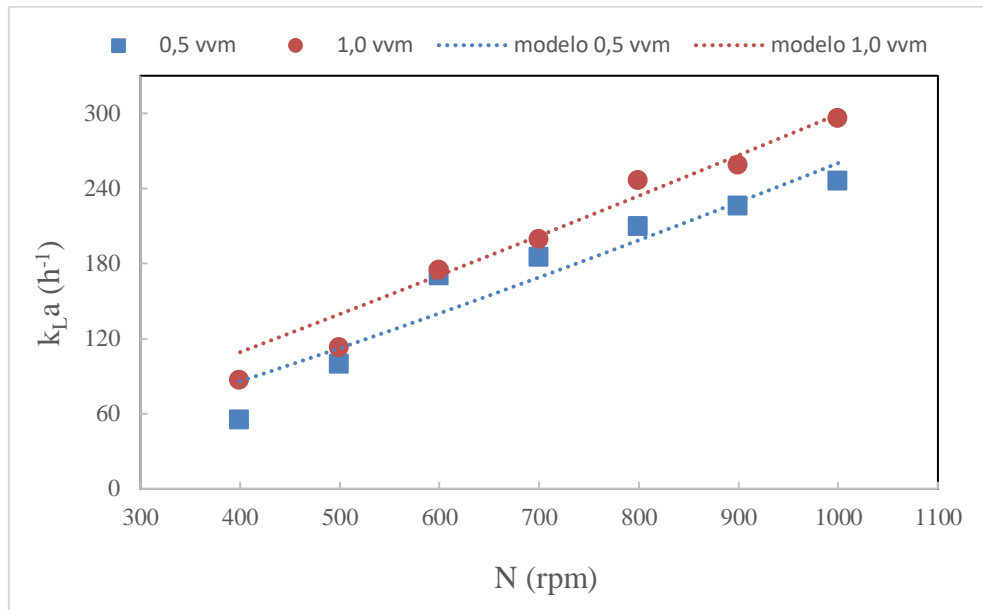


Figura 17. k_{La} (h^{-1}) em água 28° C com aeração 2,5 L.min⁻¹ (■) e 5,0 L.min⁻¹ (●).

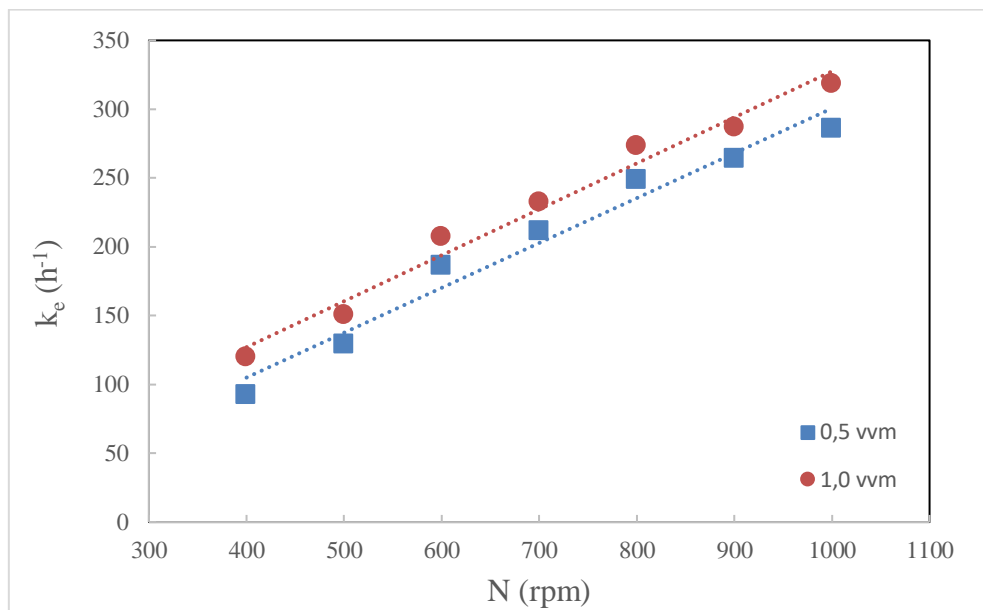


Figura 18. k_e (h^{-1}) em água 28° C com aeração 2,5 L.min⁻¹ (■) e 5,0 L.min⁻¹ (●).

Nas Figura 17 e 18, verifica-se, que ambas as variáveis (k_{La} e k_e) apresentam o mesmo comportamento. Como pode ser observado, o aumento na rotação imposta ao sistema desencadeia no aumento de ambas as variáveis. Comprovando que utilizar k_e fixo acarretará em valores não verdadeiros e superestimados, por não considerar alterações externas que ocorrem no sistema.

Bailey e Ollis (1986) discutem as diferentes resistências que dificultam o processo de transferência de oxigênio do estado gasoso até a estrutura celular. Sendo a resistência global a soma dessas resistências desencadeadas pela reologia do caldo fermentativo, atividade e concentração celular. Sabe-se que uma das influências sofridas na transferência de oxigênio gasoso para o meio líquido é devido à resistência do próprio líquido (RL), variando de acordo com o fluido em questão, porém ao se afixar um valor de k_e essa resistência é ignorada, considerando apenas a resistência interna do eletrodo, acarretando em medições imprecisas. O aumento de k_e ao dobrar-se a vazão de ar imposta ao sistema comprova o esperado, pois o aumento na taxa de fluxo de ar desencadeia em uma diminuição na RL, minimizando o tempo de resposta do eletrodo de oxigênio dissolvido.

Como esperado e apresentado por Campesi et al. (2008) o aumento na vazão de alimentação de ar (Φ_{ar}) também favorece a transferência de oxigênio, como pode ser observado na Figura 17. Esse aumento é justificado pela diminuição da película líquida estagnada ao redor das bolhas de gás, diminuindo a resistência de transferência de oxigênio.

Os resultados obtidos estão de acordo com o apresentado por Chen e Chen (1999), Amaral et al. (2008) e Karimi et al. (2013), pois mostram que a agitação dos impelidores tem maior influência sobre os valores de kLa do que a aeração mesmo em outras vazões.

Para cada condição imposta ao sistema foi realizado um ajuste experimental dos valores dados pela correlação com a equação 7 ($kLa = \alpha \cdot Nb$). Assim sendo, ajustou-se as constantes α e b para cada rotação (N) em cada uma das vazões de ar (Φ_{ar}) impostas ao sistema. Segue abaixo na Tabela 7 o valor mínimo encontrado para as constantes e valores de correlação.

Tabela 7. Valores experimentais obtidos para as constantes α , b e R^2 para 2,5 e 5,0 L.min⁻¹.

Φ_{ar} (L.min ⁻¹)	α (h ⁻¹)	b (-)	R^2
2,5	0,061	1,21	0,91
5,0	0,15	1,10	0,967

Observa-se que os valores encontrados experimentalmente estão próximos dos valores dos modelos, dada pela correlação apresentada.

A partir dos valores apresentados na Tabela 7, tem-se as equações 8 e 9, para 2,5 e 5,0 L.min⁻¹, respectivamente.

$$k_La = 0,061 \cdot N^{1,21} \quad (8)$$

$$k_La = 0,15 \cdot N^{1,10} \quad (9)$$

Através das figuras 19 e 20 é possível ver as correlações entre os valores obtidos experimentalmente e os valores esperados.

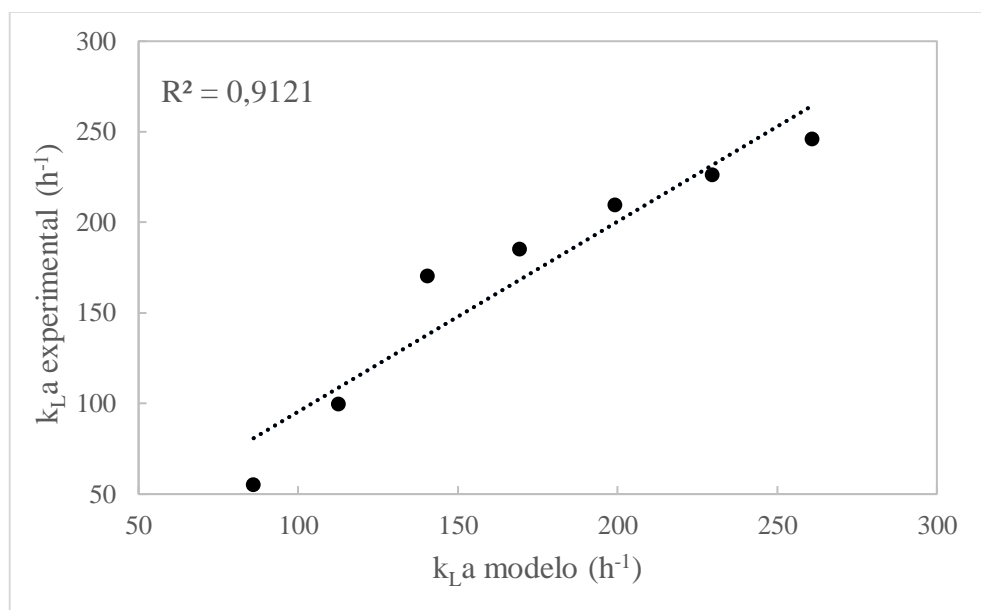


Figura 19. Valores de k_La (h⁻¹) em água 28° C com aeração 2,5 L.min⁻¹ obtidos experimentalmente versus valores calculados pela equação 4.

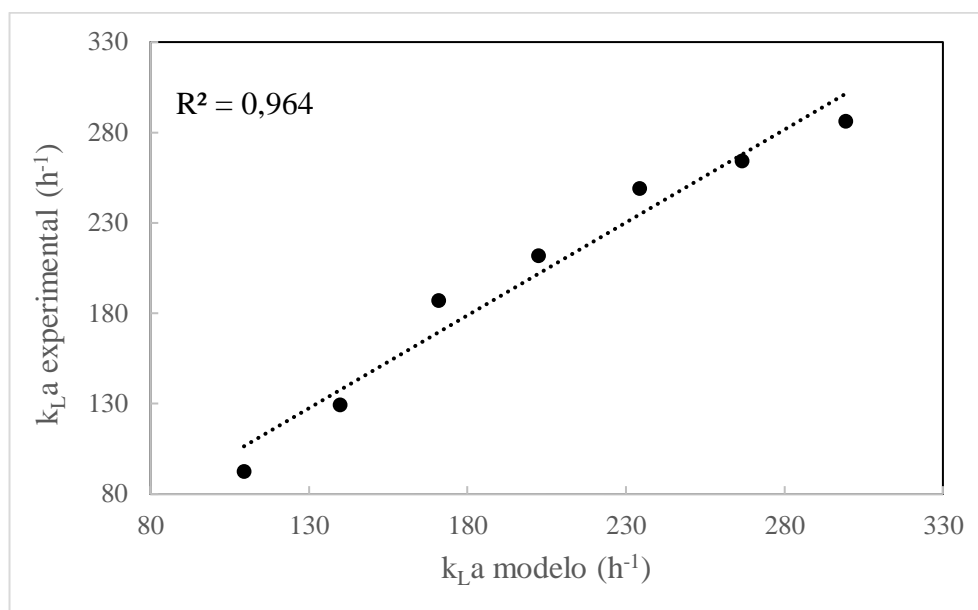


Figura 20. Valores de k_{La} (h^{-1}) em água 28° C com aeração 5,0 L.min⁻¹ obtidos experimentalmente versus valores calculados pela equação 5.

4.2. Cultivos em biorreator convencional

Para avaliar o comportamento do caldo fermentativo, assim como as características morfológicas e reológicas e seus efeitos na produção de ácido clavulânico utilizando *S.clavuligerus*, realizou-se cultivos em biorreator convencional. Para fim comparativo, todos os ensaios fermentativos (EF) foram mantidos com a mesma temperatura, pH, volume de líquido e aeração.

A Tabela 8 abaixo apresenta os cultivos realizados, com código, agitação, vazão, aeração e composição gasosa em cada um dos ensaios fermentativos.

Tabela 8. Apresentação dos valores de agitação, vazão, aeração e composição gasosa para os cinco ensaios fermentativos.

Código	Agitação (rpm)	Vazão (vvm)	Aeração (L.min⁻¹)	Composição gasosa (base mássica)
600 rpm	600	0,5	2,5	23% O ₂ ; 77% N ₂
800 rpm	800	0,5	2,5	23% O ₂ ; 77% N ₂
1000 rpm	1000	0,5	2,5	23% O ₂ ; 77% N ₂
600 enriquecido	600	0,5	2,5	33,3% O ₂ ; 66,7% N ₂
600 O₂	600	0,1	0,5	100 % O ₂

A Figura 21 ilustra os cinco diferentes cultivos realizados com sucesso, em 24 horas de fermentação.

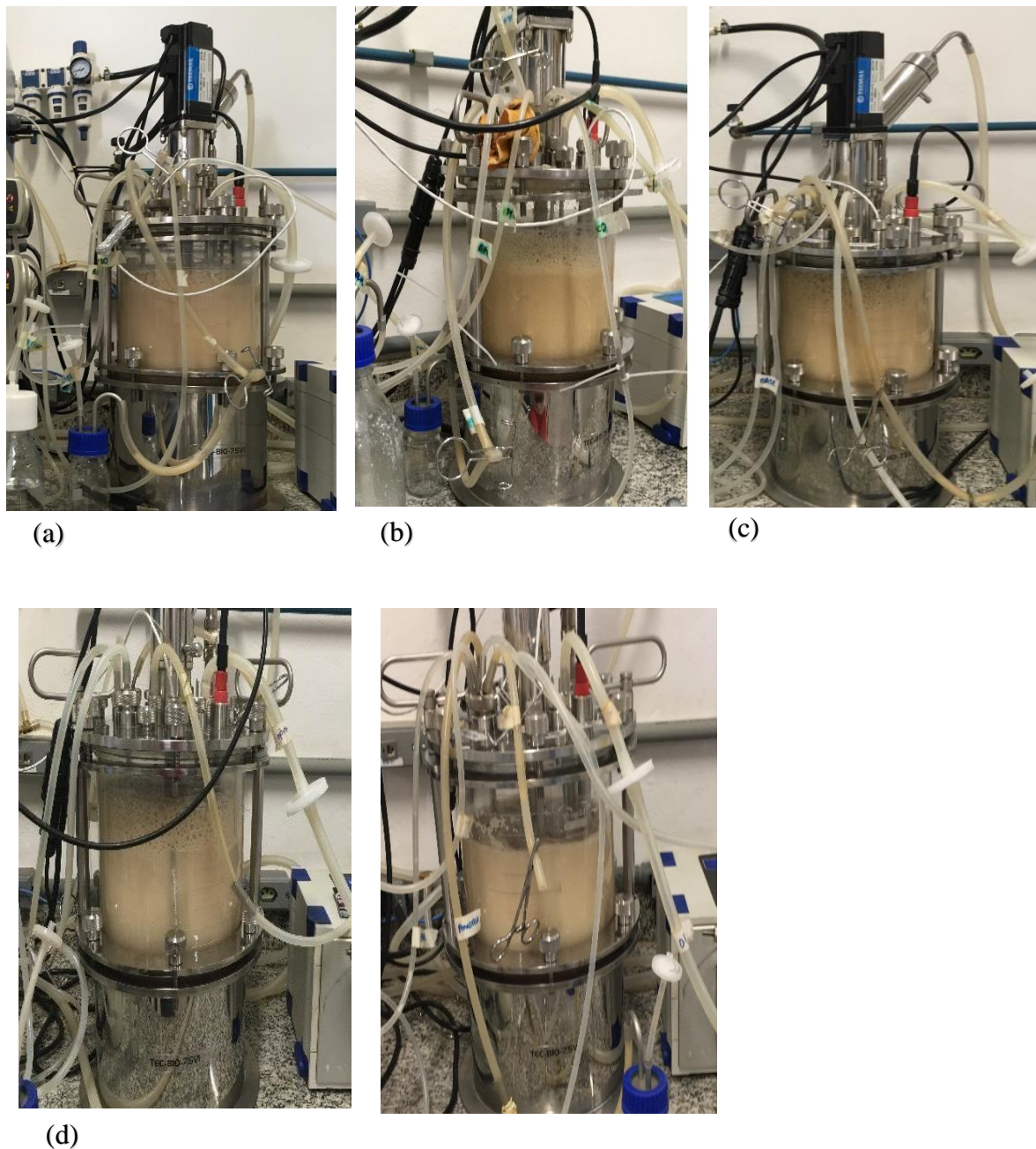


Figura 21. Biorreator convencional durante os cultivos sob mesmas condições de temperatura e pH com diferentes condições de rotação e aeração (a) 600 rpm (b) 800 rpm (c) 1000 rpm (d) 600 rpm com enriquecimento de oxigênio (e) 600 rpm com oxigênio puro (arquivo próprio).

Como mostra a Figura 21, na maior rotação o nível de espuma manteve-se alto durante todo o cultivo, devido à alta turbulência gerada pelos impelidores.

Os cultivos são apresentados nas Figuras 22, 23, 24, 25 e 26. Com os perfis de produção de ácido clavulânico (Cp), consumo de substrato (Cs) e densidade ótica (DO) ao longo de 72 horas.

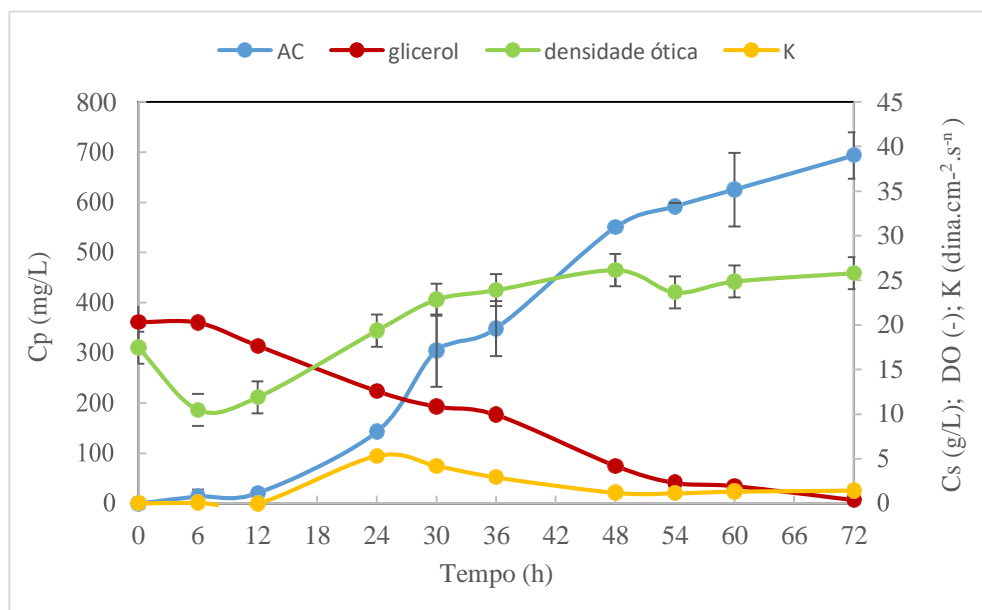


Figura 22. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 1 (600 rpm).

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram o cultivo a 600 rpm e a produção máxima de ácido clavulânico ocorreu em 72 horas (639,19 mg/L). O consumo total do substrato (glicerol) ocorreu após 66 horas. A densidade ótica torna-se praticamente estável após as 48 horas de cultivo. No ponto zero hora a densidade ótica encontra-se mascarada pela grande quantidade inicial de interferentes do meio, como o antiespumante utilizado no início para controlar a espuma da fermentação. Após 24 horas, o índice de consistência começa a decrescer, enquanto o índice de escoamento estabiliza no cultivo, pois aumenta-se a presença de células cisalhadas, diminuindo a viscosidade do fluido. Assim como a densidade ótica, correlacionada com a concentração celular, após 48 horas a presença de glicerol passa a ser praticamente fixo, mostrando a relação direta entre as duas variáveis e a morfologia apresentada no momento pelo microrganismo. Dessa forma, como estudado por Cerri e Badino (2012) relaciona-se o decréscimo do índice de consistência com a desestruturação de hifas ou ocorrência de rupturas nas células.

Rosa et al. (2005) para o cultivo sobre as mesmas condições obteve produção máxima do metabólito igual a 254 mg/L, 60% menor do que o encontrado nesse trabalho.

A Figura 23 abaixo, representa o perfil de concentração das variáveis em função do tempo para a rotação de 800 rpm.

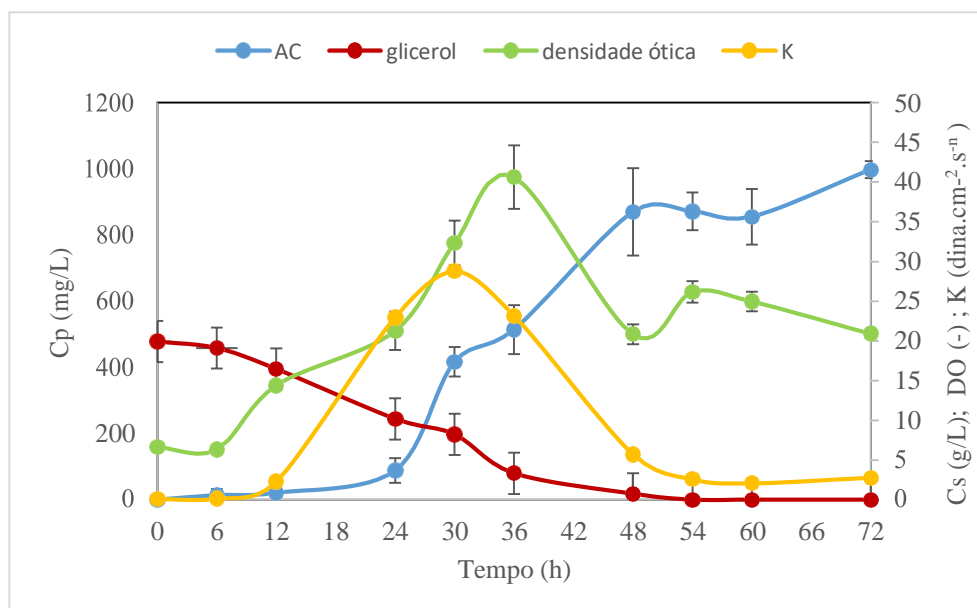


Figura 23. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 2 (800 rpm).

Como pode ser observado nesse ensaio fermentativo, o glicerol foi praticamente todo consumido após 36 horas. A produção de AC máxima (997,42 mg/L) ocorreu em 72 horas, embora possa ser considerada uma produção estável após 48 horas. O maior delta na produção do metabólito ocorreu após as 24 horas corridas. O índice de consistência teve seu pico em 30 horas e decaiu após passado esse tempo, sendo afetado pelo cisalhamento. A densidade ótica no segundo ensaio chegou à 40,63 (-) em 72 horas, 57% maior que a obtida no cultivo 1 (25,82) e a produção de AC no segundo cultivo (997,42) é 56% maior do que a produção no primeiro (639,19), devido a maior rotação. A produção máxima de ácido clavulânico no cultivo 2, sob as mesmas condições, foi 108% maior que o encontrado por Rodrigues (2015), que obteve 478,8 mg/L. Neto et al. (2005), obteve produção máxima de 194 mg/L e Teodoro et al. (2010) obteve 509 mg/L.

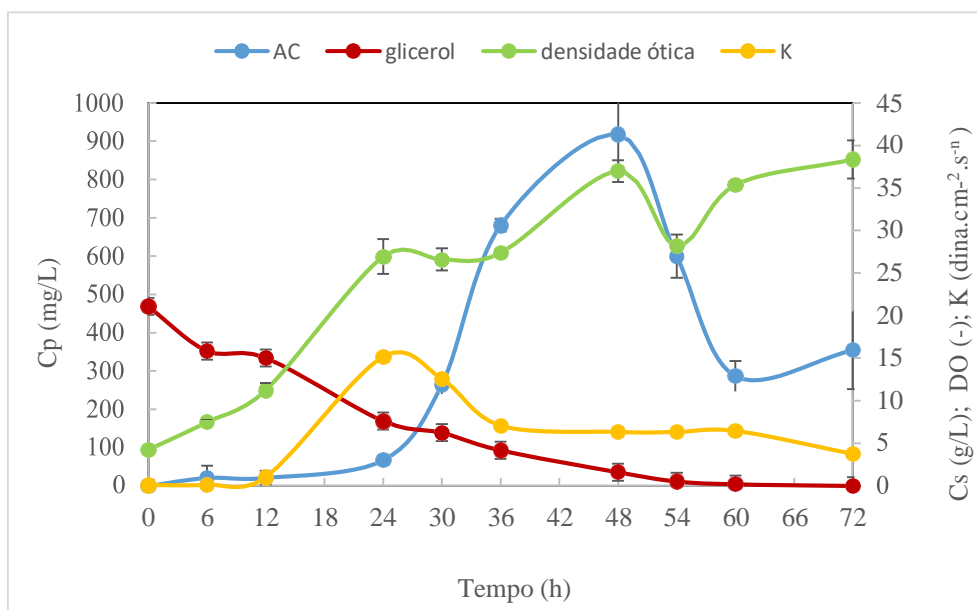


Figura 24. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 3 (1000 rpm).

Para o cultivo a 1000 rpm o valor máximo da densidade ótica, ilustrado pela Figura 24, foi 38,37 (-) alcançado em 72 horas decorridas do ensaio fermentativo. O índice de consistência, assim como em 600 rpm, teve seu pico em 24 horas e decaiu após passado esse tempo, sendo afetado pelo alto cisalhamento.

Após 30 horas obteve-se a maior variação na produção de AC, passando de 264,83 mg/L pra 680,29. Nesse cultivo a produção máxima de ácido clavulânico (917,5 mg/L) foi atingida em 48 horas de cultivo, ocorrendo uma queda na produção após esse período. A produção de AC aumentou de forma mais rápida nesse ensaio fermentativo, quando comparada aos outros cultivos, pois o alto cisalhamento imposto pela condição de agitação favoreceu a ramificação do microrganismo, contribuindo para produção. O consumo do glicerol no ensaio com maior rotação ocorreu mais rapidamente, chegando a ser totalmente consumido após 48 horas de cultivo, justamente onde houve a produção máxima de AC. Evidenciando sua relação inversamente proporcional à produção.

Rosa et al. (2005) para o cultivo a 1000 rpm 0,5 vvm obteve 614 mg/L de ácido clavulânico.

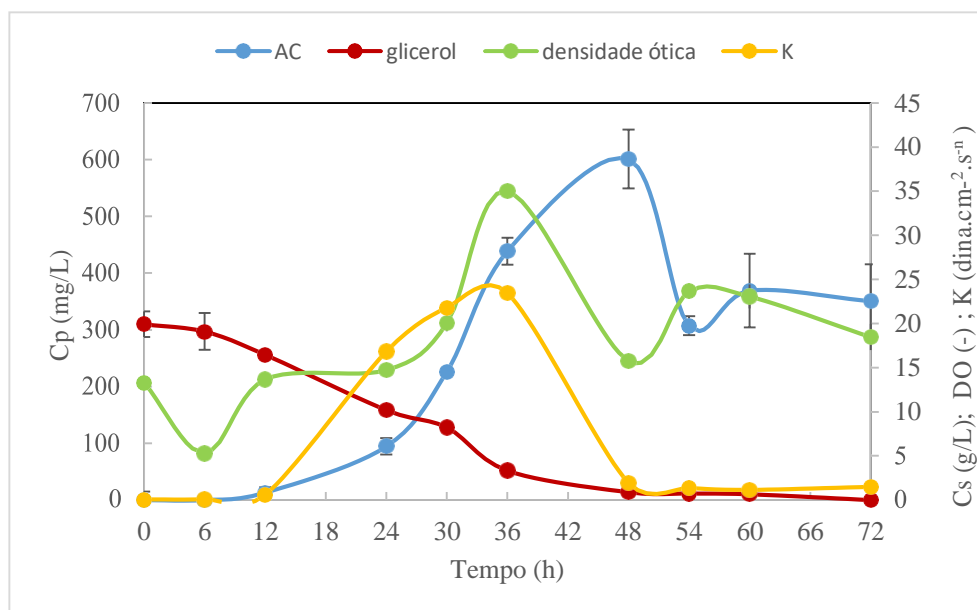


Figura 25. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 4 (600 rpm; enriquecido 0,5 vvm).

No cultivo enriquecido com 0,5 L.min⁻¹ de oxigênio puro, houve um deslocamento para a esquerda na curva de produção do fármaco. Assim sendo, embora a produção de AC máxima (601,1 mg/L) tenha sido muito semelhante a produção máxima na mesma rotação sem enriquecimento de oxigênio (639,19 mg/L), a produção ocorreu de maneira mais rápida (48 horas) no cultivo enriquecido, comportando-se como no cultivo em 1000 rpm. Em contrapartida, no cultivo com enriquecimento houve uma queda brusca na produção do metabólito, chegando à 350,54 mg/L em 72 horas, presumindo que o oxigênio tornou-se prejudicial ao AC, possivelmente oxidando o mesmo. Assim como o EF3 (1000 rpm), o substrato foi totalmente consumido após 48 horas de cultivo. O índice de consistência teve seu pico em 36 horas, tempo em que houve maior densidade ótica do cultivo (35,02), tornando o cultivo mais viscoso.

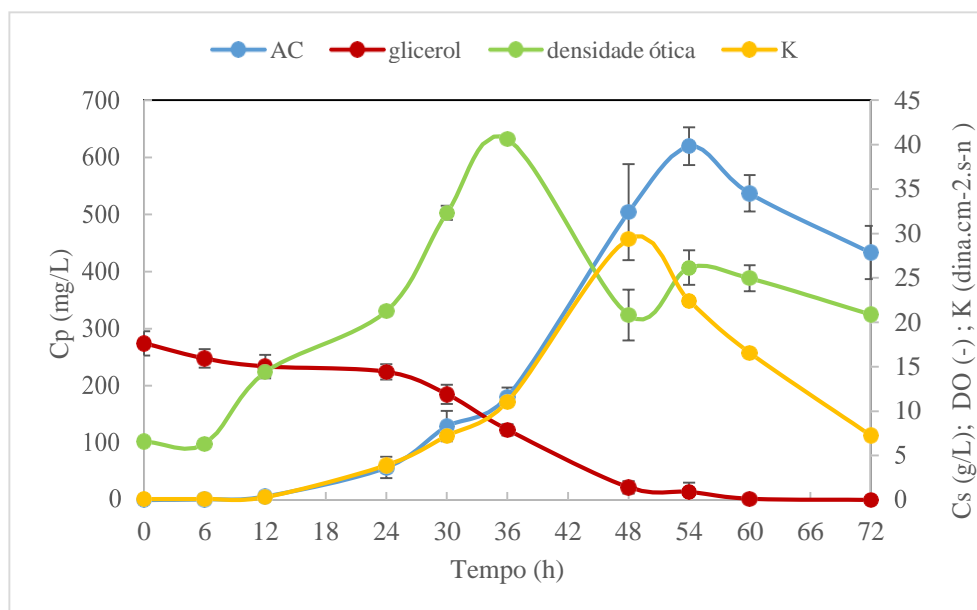


Figura 26. Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp), glicerol (Cs), densidade ótica (DO) e variação do índice de consistência (K) ao longo do tempo no cultivo 5 (600 rpm; 0,1 vvm; oxigênio puro).

Para o cultivo a 600 rpm com aeração $0,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (0,1 vvm) aerado apenas com oxigênio puro, tem-se o valor máximo da densidade ótica de 40,63 (-) alcançado em 36 horas, tempo em que tem-se o maior pico na produção de AC. Esse valor idêntico ao alcançado em 800 rpm é o mais alto valor atingido para a densidade ótica, entre todos os outros cultivos, comprovando que embora a produção máxima do fármaco esteja relacionada com a quantidade de células, a qualidade das mesmas é a grande responsável pela produção.

A produção máxima de AC (619,52) ocorreu após 54 horas de cultivo. Quando comparado aos outros cultivos na mesma rotação, essa produção pode ser considerada estável, tendo uma variação muito pequena entre eles. Porém, fica claro que a utilização de oxigênio puro adianta a curva de crescimento do microrganismo, tornando o processo mais rápido. Como exemplo, o cultivo sem enriquecimento tem sua produção máxima apenas em 72 horas, o cultivo com mesma vazão ($2,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) aerado e enriquecido com oxigênio puro tem sua produção máxima em 48 horas e o cultivo que utilizou apenas oxigênio puro, porém em menor vazão ($1,0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) atinge o pico de produção em 54 horas.

Assim como o cultivo 4, nesse cultivo a produção máxima de ácido clavulânico foi atingida e após esse período houve uma queda na produção, porém de maneira menos brusca, chegando a 433,15 mg/L ao final do cultivo. O glicerol nesse ensaio chegou a ser totalmente consumido após 54 horas, novamente correlacionando com a produção máxima de AC.

Conforme o apresentado por Ser et al. (2016), a produção máxima de ácido clavulânico obtida em todos os cultivos (sem enriquecimento) apresentados nesse trabalho está acima dos valores encontrados na literatura.

Para efeito comparativo, tem-se a produção máxima de ácido clavulânico com um aumento significativo ao longo dos três primeiros cultivos (600, 800 e 1000 rpm) cultivos, sendo a produção à 1000 rpm 44% maior do que em 600 rpm. Assim, quanto maior a condição de rotação imposta ao caldo fermentativo maior foi a produtividade do microrganismo. A utilização de oxigênio no ensaio permiti observar que quanto maior o enriquecimento com oxigênio mais rapidamente atingiu-se a produção máxima do metabólito, porém não se alterou a produção máxima atingida. Tais resultados fazem acreditar que o oxigênio atrasou o processo como um todo, embora acelere o crescimento celular, o oxigênio em excesso torna-se prejudicial ao metabolismo do microrganismo.

Comparando os EF, de modo geral tem-se que o aumento na rotação influenciou no aumento do índice de consistência (k) encontrado para os diferentes cultivos. Como apresentado por Campesi (2007) já era de se esperar uma queda nos valores de K com o aumento da rotação, assim como valores menores de densidade ótica máxima. Deve-se ao fato da correlação direta entre concentração celular (densidade ótica) e o índice de consistência, quanto maior o K maior a densidade ótica.

O tempo em que obteve-se o maior pico na produção do metabólito também pode ser correlacionado com o tempo de esgotamento do substrato, o que é esperado na produção de metabólitos secundários, como pode ser visualizado na Tabela 9.

Tabela 9. Valores obtidos para o índice de consistência máximo ($K_{m\acute{a}x}$), densidade ótica máxima ($DO_{m\acute{a}x}$), concentração de ácido clavulânico máxima ($Cp_{m\acute{a}x}$), tempo de esgotamento do glicerol, tempo de pico na produção de ácido clavulânico e relação entre produto e densidade ótica.

Rotação (rpm)	$K_{m\acute{a}x}$ ($dina.cm^{-2}.s^{-n}$)	$DO_{m\acute{a}x}$ (-)	$Cp_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	Tempo esgotamento glicerol (h)	Tempo $Cp_{m\acute{a}x}$ (h)	$Y_{P/DO}$
600	5,33	26,15	639,19	66	72	24,44
800	28,75	40,63	997,42	48	72	24,54
1000	15,2	38,37	917,5	48	48	23,91
600 enriquecido	23,45	35,02	601,1	48	48	17,16
600 O₂	29,37	40,63	619,52	48	54	15,24

Quanto ao oxigênio dissolvido, a Figura 27 ilustra o perfil apresentado em cada rotação. Como citado por Rosa et al. (2005) em cultivos de *S.clavuligerus*, a produção de ácido clavulânico é afetada positivamente pelo aumento na frequência da rotação imposta aos impelidores e pelo aumento na taxa de oxigênio dissolvido. Em nenhum dos três cultivos a produção de AC foi afetada por limitação de oxigênio, sendo a menor concentração de oxigênio dissolvido encontrada a 600 rpm com e sem enriquecimento (59,5%), valor justificado pela menor homogeneização do meio e consequentemente transferência de massa subestimada. Em contrapartida, no cultivo aerado apenas com oxigênio puro a porcentagem de oxigênio dissolvido manteve-se alta durante todo o cultivo, atingindo em 36 horas o menor valor (85,8%).

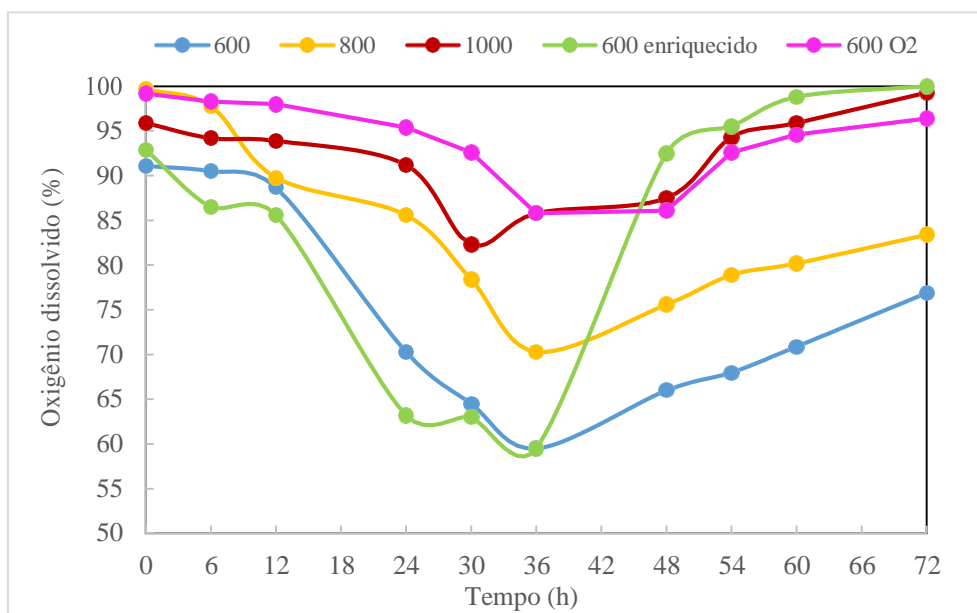


Figura 27. Perfil de oxigênio dissolvido (%) em todos os cultivos realizados em reator convencional.

Maiores rotações são responsáveis por maiores produções do fármaco e maior concentração de OD disponível no sistema. Em 600 rpm sem presença de oxigênio puro, obteve-se o menor valor de oxigênio dissolvido no caldo fermentativo, chegando a apenas 60%, já no cultivo a 1000 rpm, o oxigênio dissolvido permaneceu entre 100 e 80%. É possível observar que no cultivo a 600 rpm com enriquecimento de oxigênio durante as primeiras 36 horas o perfil de oxigênio dissolvido no meio assemelha-se ao cultivo de 600 rpm sem enriquecimento. Porém, após esse período o cultivo comporta-se como a 1000 rpm, obtendo valores bem maiores quando comparado ao de 600 rpm sem enriquecimento. Por exemplo, em 72 horas para o cultivo a 600 rpm sem enriquecimento tem-se 76,9% de OD, enquanto a 1000 rpm e 600 rpm com enriquecimento atinge-se 100% de oxigênio dissolvido no meio.

De maneira geral todos os cultivos seguiram o mesmo perfil, decrescendo até 36 horas e depois retomando altos valores de oxigênio dissolvido.

Além das variáveis já estudadas, a reologia do caldo e a morfologia dos microrganismos presente no cultivo são alteradas por maiores ou menores rotações dos impelidores. Sendo essas análises de extrema importância para o melhor entendimento dos resultados apresentados.

4.2.1. Avaliação de parâmetros reológicos e da influência das condições de cisalhamento nos cultivos de *Streptomyces clavuligerus*

Considerando os ensaios fermentativos como fluidos pseudoplásticos, valores de τ (tensão de cisalhamento) e $\dot{\gamma}$ (velocidade de cisalhamento) foram obtidos pelo reômetro e a partir da regressão não linear seguindo a equação 3 ($\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$), os valores de índice de consistência (K) e índice de comportamento do escoamento (n), ao longo do cultivo foram calculados. As Figuras 28 e 29 abaixo ilustram o comportamento desses parâmetros reológicos (K e n) respectivamente, nas diferentes condições de cultivo (600 – com e sem enriquecimento-, 800 e 1000 rpm) e 600 com e sem O₂).

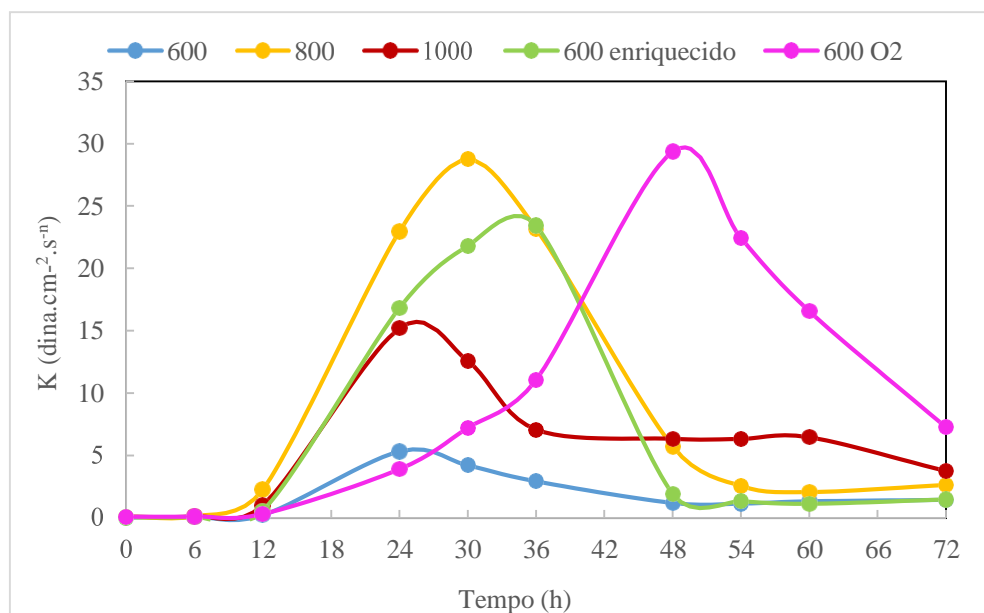


Figura 28. Perfil de comportamento do índice de consistência nos diferentes cultivos com término em 72 horas.

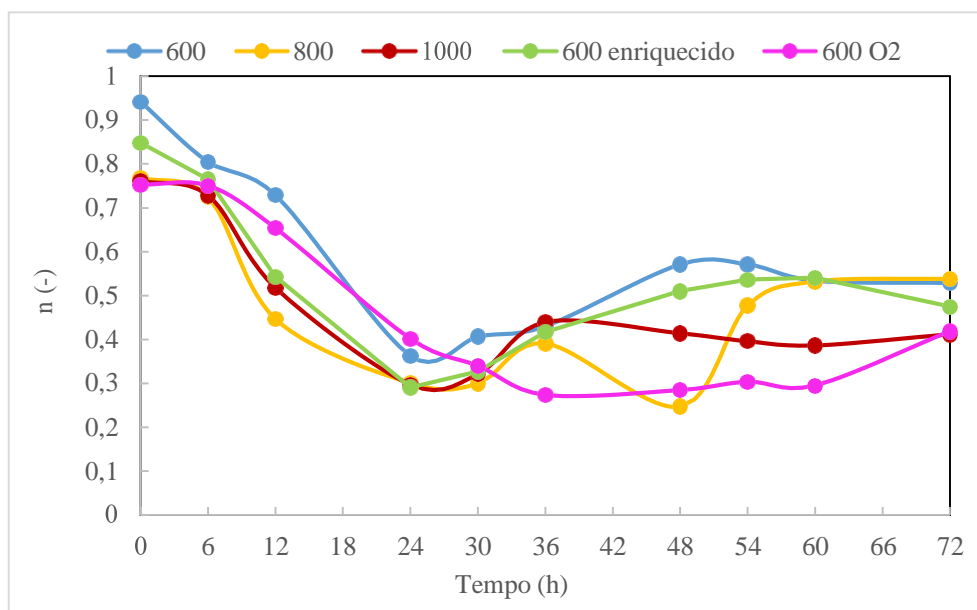


Figura 29. Perfil do comportamento do índice de escoamento nos diferentes cultivos com término em 72 horas.

Quanto ao índice de consistência, todos os cultivos atingem um pico máximo e posteriormente decrescem, apresentando maior ou menor pico no valor conforme a rotação imposta aos impelidores. Assim sendo, o cultivo em 1000 rpm apresentou um valor máximo para K de 15,20 ($\text{dina.cm}^{-2}.\text{s}^{-n}$), enquanto para 600 rpm o valor máximo atingido foi 5,33 ($\text{dina.cm}^{-2}.\text{s}^{-n}$). Em relação à presença do oxigênio puro, nos dois cultivos que ele foi utilizado, o índice de consistência máxima foi atingido mais tardiamente (36 horas em 600 rpm com enriquecimento e 48 horas em 600 rpm com 0,1 vvm), evidenciando que o oxigênio em excesso é prejudicial ao metabolismo celular, oxidando o meio de cultivo. Os índices de consistência alcançaram os valores máximos em 24, 30, 24, 36 e 48 horas de cultivo, para 600, 800, 1000 rpm, 600 (com enriquecimento) e 600 (com oxigênio puro) rpm, respectivamente. Tal fato pode ser explicado, por essa ser uma variável dependente da concentração celular e da morfologia predominante no momento, como estudado por Badino et al. (1999) e diretamente relacionado com a densidade ótica máxima, dessa maneira maiores densidades óticas acarretam em maiores índices de consistência.

É possível observar na Figura 29 que os índices de escoamento decrescem ao longo do cultivo, apresentando ao final da fermentação valores entre 0,41 e 0,53. Nos cultivos com 600 rpm, 6000 rpm com enriquecimento e 1000 rpm o menor valor de n é atingido em 24 horas de cultivo. Enquanto na fermentação de 800 rpm o índice demora mais para atingir seu

menor valor, alcançado em 48 horas de cultivo. O cultivo com 600 rpm, aerado apenas com oxigênio atingiu o menor valor em 36 horas.

Tal fato pode ser justificado pelo maior prolongamento para se obter um grande salto de produção de ácido clavulânico. Embora em 800 rpm tenha tido maior produção do fármaco que em 600 rpm, obteve-se maior dificuldade do microrganismo entrar na fase exponencial, pois seu estado de latência é dependente do estado fisiológico da cultura usada. Da mesma forma, em 600 rpm com oxigênio puro o microrganismo demorou mais para entrar na fase log, quando comparado ao cultivo na mesma rotação. Como exemplo tem-se em 24 horas a produção de AC no cultivo sem enriquecimento igual a 142,9 mg/L enquanto no cultivo aerado apenas com oxigênio nesse momento do cultivo a produção manteve-se igual a 56,91 mg/L.

Sob as mesmas condições de cultivo em biorreator convencional, 800 rpm, 0,5 vvm, os valores para os índices de consistência estão próximos aos encontrados na literatura. Campesi (2007) tem o K máximo igual a 33,17 dina.cm⁻².s⁻ⁿ, enquanto Bustamante (2013) tem seu índice de consistência máximo de 19,4 dina.cm⁻².s⁻ⁿ em 24 horas de cultivo e Rodrigues (2015), 24,02 dina.cm⁻².s⁻ⁿ. Da mesma forma, os valores encontrados para o índice de escoamento também estão próximos aos da literatura. Campesi (2007) tem o índice de escoamento de 0,21 em 21 horas de cultivo, Bustamante (2013) em 24 horas de cultivo tem o índice de escoamento de 0,24.

A velocidade de cisalhamento média (γ) como estudado por Robertson e Ulbrecht (1987) e Kelly e Gigas (2003) deve ser correlacionada com a frequência dos impelidores e parâmetros reológicos (K e n), além da aeração imposta ao sistema. Dessa forma, conforme discutido e apresentado por Campesi et al. (2008) a equação 10 abaixo mostra-se satisfatória para sistemas com aeração igual a 0,5 vvm, sendo possível estimar a velocidade de cisalhamento média (γ_{av}) para os quatro diferentes cultivos em função do tempo. Para o cultivo realizado apenas com oxigênio puro não é possível utilizar a correlação proposta por Campesi et al. (2008), pois a equação dada para o mesmo relaciona-se apenas com ensaios fermentativos realizados em 0,5 vvm, e no cultivo apenas com oxigênio, foi utilizado uma aeração de 0,1 vvm, não sendo apresentado na Figura 30.

$$\gamma_{av} = \left(1,571^{\frac{2,876}{(1-n)}} \cdot K^{\frac{0,609}{(1-n)}} \cdot N^{\frac{1,343}{(1-n)}} \right) \quad (10)$$

Os valores obtidos experimentalmente são apresentados na Figura 30 a seguir. Como no começo de todos os cultivos os valores de γ são muito elevados, devido ao n estar próximo de 1 ou comportando-se praticamente como fluido Newtoniano, os cálculos foram feitos a partir de 36 horas de cultivo.

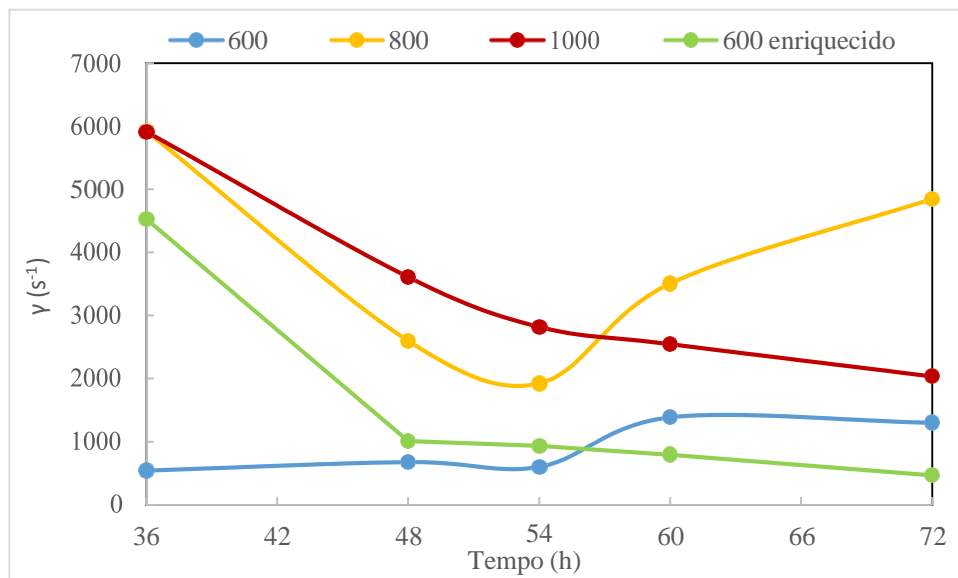


Figura 30. Perfil de velocidade de cisalhamento média ao longo do tempo para 600 (com e sem enriquecimento), 800 e 1000 rpm.

De maneira geral, o aumento na rotação favorece a velocidade de cisalhamento ao longo dos cultivos. Conforme apresentado em 1000 rpm, o rigoroso cisalhamento imposto ao sistema contribui para maiores fragmentações celulares, tornando o caldo fermentativo menos viscoso ao longo do tempo.

4.3. Análise morfológica de *Streptomyces clavuligerus* nos diferentes cultivos em biorreator

A fim de correlacionar velocidade de cisalhamento com as diferentes morfologias apresentadas, em todos os cultivos foram realizadas imagens das lâminas. Pois a maior ou menor formação de *pellets* no meio fermentativo influencia na viscosidade, tornando-o mais ou menos produtivo. Dessa forma, caracterizou-se e quantificou quatro diferentes classes apresentadas pela *S. clavuligerus*, como apresentado por Bustamante (2013).

Foram analisadas 3000 imagens (600 por fermentação) ao longo do processo para avaliar as classes mais abundantes em cada cultivo e em cada um dos tempos.

Ao decorrer dos processos os *pellets* desaparecem, decorrente da alta fragmentação do microrganismo, tornando o fluido menos viscoso, conforme já discutido na seção anterior.

Em todos os cultivos houve formação de *pellets*, porém a quantidade e o tempo de aparecimento/desaparecimento da morfologia variaram entre eles. Em 600 rpm, houve formação de *pellets* até as primeiras 24 horas e após 48 horas, hora em que se obteve a maior densidade ótica do cultivo. Em 800 rpm verifica-se essa morfologia presente até o final do cultivo, porém em maior quantidade é vista até as primeiras 36 horas, momento em que tem, um grande decréscimo no índice de consistência e consequentemente na viscosidade do cultivo. Em 1000 rpm há uma pequena formação de *pellets* até as primeiras 36 horas e após 66 horas a morfologia passa a ser mais presente, provavelmente devido ao aumento na densidade ótica. Para o EF de 600 rpm enriquecido com oxigênio os *pellets* estiveram presente até o final do cultivo, porém se mantiveram mais presentes até as primeiras 36 horas e após 66 horas, como o cultivo a 1000 rpm. Em 600 rpm, utilizando apenas oxigênio puro em menor vazão, houve formação da classe morfológica desde as primeiras horas porém em menor quantidade, sendo mais intenso após 24 horas corridas do bioprocessos, com considerável diminuição (quase desaparecimento) dos *pellets* apenas após 56 horas, na qual obteve-se maior produção de AC.

A Figura 31 abaixo, compara a morfologia dos *pellets* apresentados em 24 horas para 600 rpm, 24 horas para 800 rpm, 24 horas para 1000 rpm, 24 horas para 600 rpm enriquecido e 24 horas para 600 rpm com oxigênio puro.

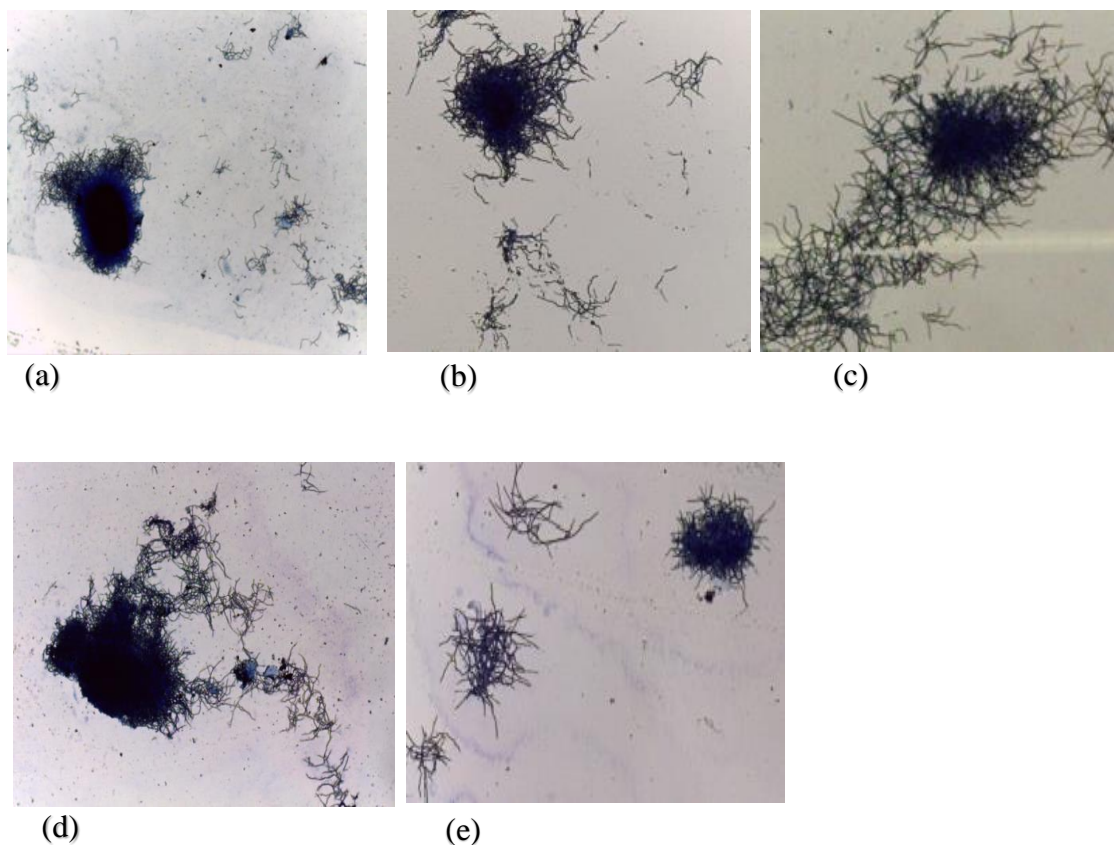
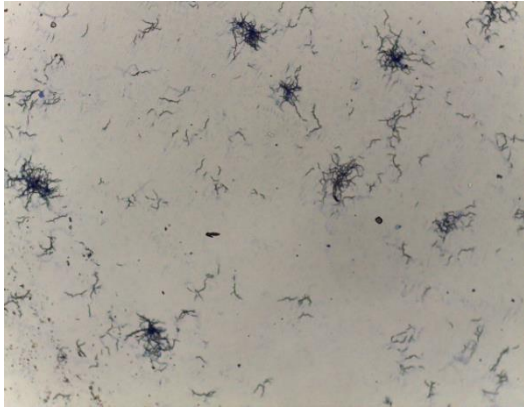


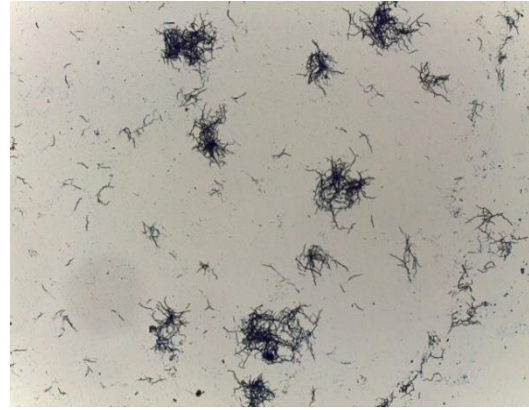
Figura 31. Imagens diluídas 100x obtidas (a) aumento de 10x, 600rpm, 24 horas (b) aumento de 10x, 800 rpm, 36 horas (c) aumento de 10x, 1000 rpm, 24 horas (d) aumento de 10x, 600 rpm enriquecido, 24 horas (e) aumento de 10x, 600 rpm 0,1 vvm, 24 horas (arquivo próprio).

O aparecimento mais tardiamente ou mais rapidamente em um ensaio fermentativo pode ser justificado pelo maior ou menor tempo de fase de adaptação, permanecendo por mais ou menos tempo como fluido Newtoniano, quando comparado aos outros cultivos.

A Figura 32 representa as imagens obtidas no tempo em que antecede a maior produção de ácido clavulânico de cada cultivo e no final do cultivo (72 horas), para assim comparar os efeitos da morfologia na produção do fármaco.



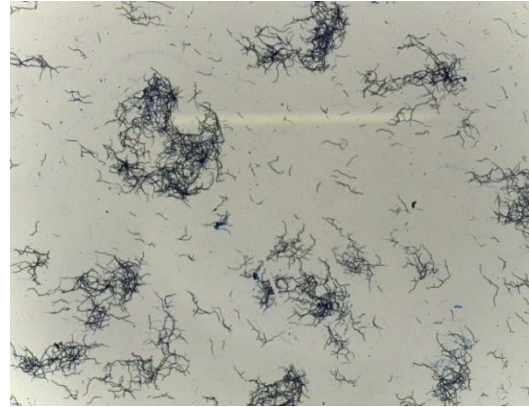
(a)



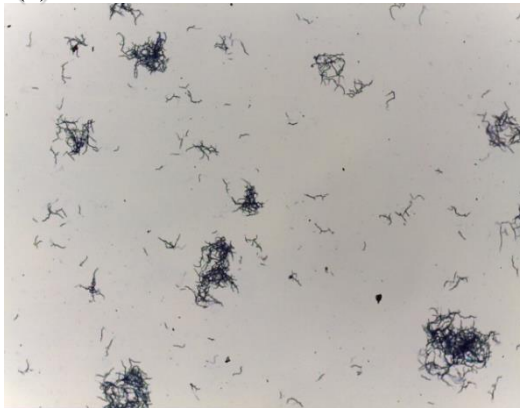
(b)



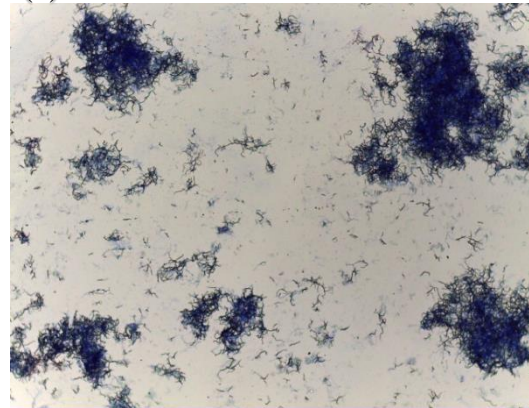
(c)



(d)



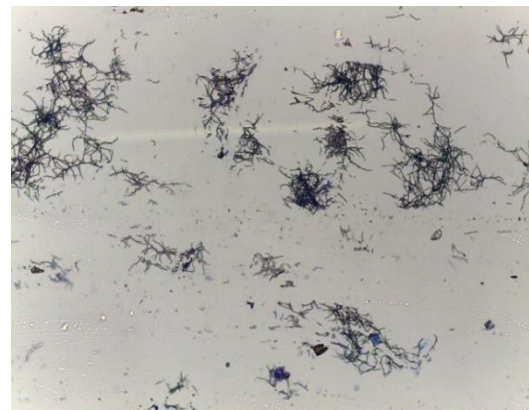
(e)



(f)



(g)



(h)

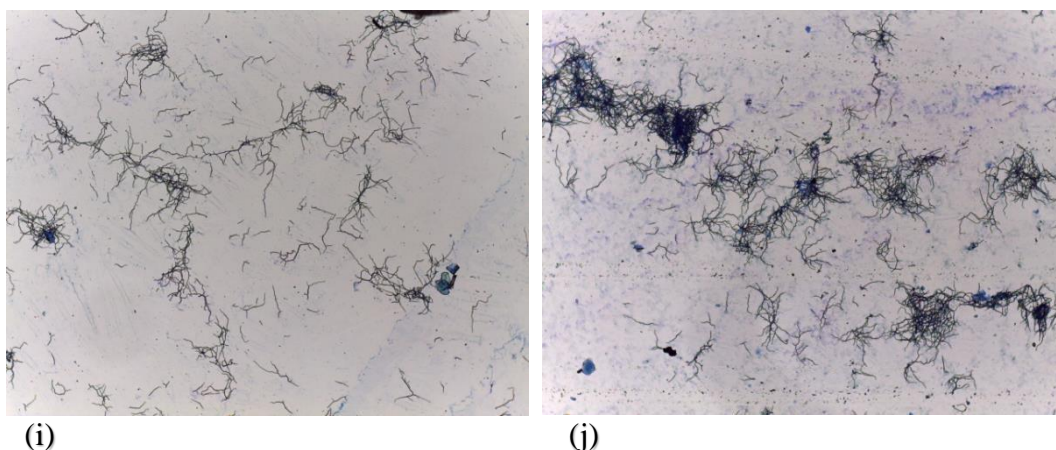


Figura 32. Imagens diluídas obtidas no aumento de 10x (a) 600 rpm, 60 horas, diluída 100 x (b) 600 rpm, 72 horas, diluída 100 x (c) 800 rpm, 48 horas, diluída 100x (d) 800 rpm, 72 horas, diluída 100x (e) 1000 rpm, 36 horas, diluída 100x (f) 1000 rpm, 72 horas, diluída 100x (g) 600 rpm, enriquecimento de oxigênio, 36 horas, diluída 100x (h) 600 rpm, enriquecimento de oxigênio, 72 horas, diluída 100x (i) 600 rpm, oxigênio puro, 48 horas, diluída 100x (j) 600 rpm, oxigênio puro, 72 horas, diluída 100x (arquivo próprio).

É possível observar pela Figura 32 que com o aumento da rotação e consequentemente o aumento do cisalhamento sofrido pelo microrganismo, a morfologia vai se alterando. Em 600 rpm as morfologias predominantes são hifas ramificadas e *clumps*, já em 8000 rpm há formação de *clump* em maiores quantidades que em 1000 rpm, sendo a morfologia dominante de hifas ramificadas. Na maior rotação (1000 rpm), verifica-se hifas mais distribuídas na lâmina e prevalece a presença de hifas não ramificadas. A presença de hifas não ramificadas induz na maior produção do metabólito, ocasionando em novos centros produtores de AC. Em 600 rpm enriquecido com oxigênio há maior formação de *clumps*, quando comparado ao cultivo na mesma rotação e o cultivo realizado a 600 rpm, aerado com oxigênio puro foi o que teve maior número de células, porém teve quantidades maiores de hifas ramificadas e quase nenhuma formação de hifas não ramificadas.

A formação de alguns *clumps* e *pellets*, como no cultivo a 1000 rpm após a maior produção de AC, deve-se a junção de hifas ramificadas pelo excesso de células no cultivo. Sendo a taxa de concentração celular maior do que a fragmentação do microrganismo. Comprovando que embora o aumento na concentração celular esteja diretamente ligado a produção do metabólito, nem sempre a maior produção está no tempo de cultivo com mais

células, pois algumas dessas não podem ser consideradas produtoras ativas. Comprovando tal fato, em 72 horas de cultivo a densidade ótica chega a 38,37 (-), e em 48 horas (tempo de maior produção de AC), a densidade ótica é 36,98 (-).

A maior formação de *pellets* e *clumps* nos cultivos dificulta a transferência de oxigênio para o microrganismo, afetando negativamente na produção de AC. Dessa forma, cultivos operados com um cisalhamento mais rigoroso fragmentam mais as células, aumentando a área superficial para transferência de massa e conseqüentemente beneficia a produção do metabólito de interesse (Bustamante, 2013; Pinto et al.; 2001; Garcia-Ochoa e Gomes, 1998).

4.4. Produção de ácido clavulânico e análise morfológica de *Streptomyces clavuligerus* em mesa incubadora rotativa utilizando frascos Erlenmeyers com diferentes configurações.

Na Tabela 10 abaixo, são apresentados os resultados obtidos durante os cultivos em frascos Erlenmeyers convencionais e com três chicanas.

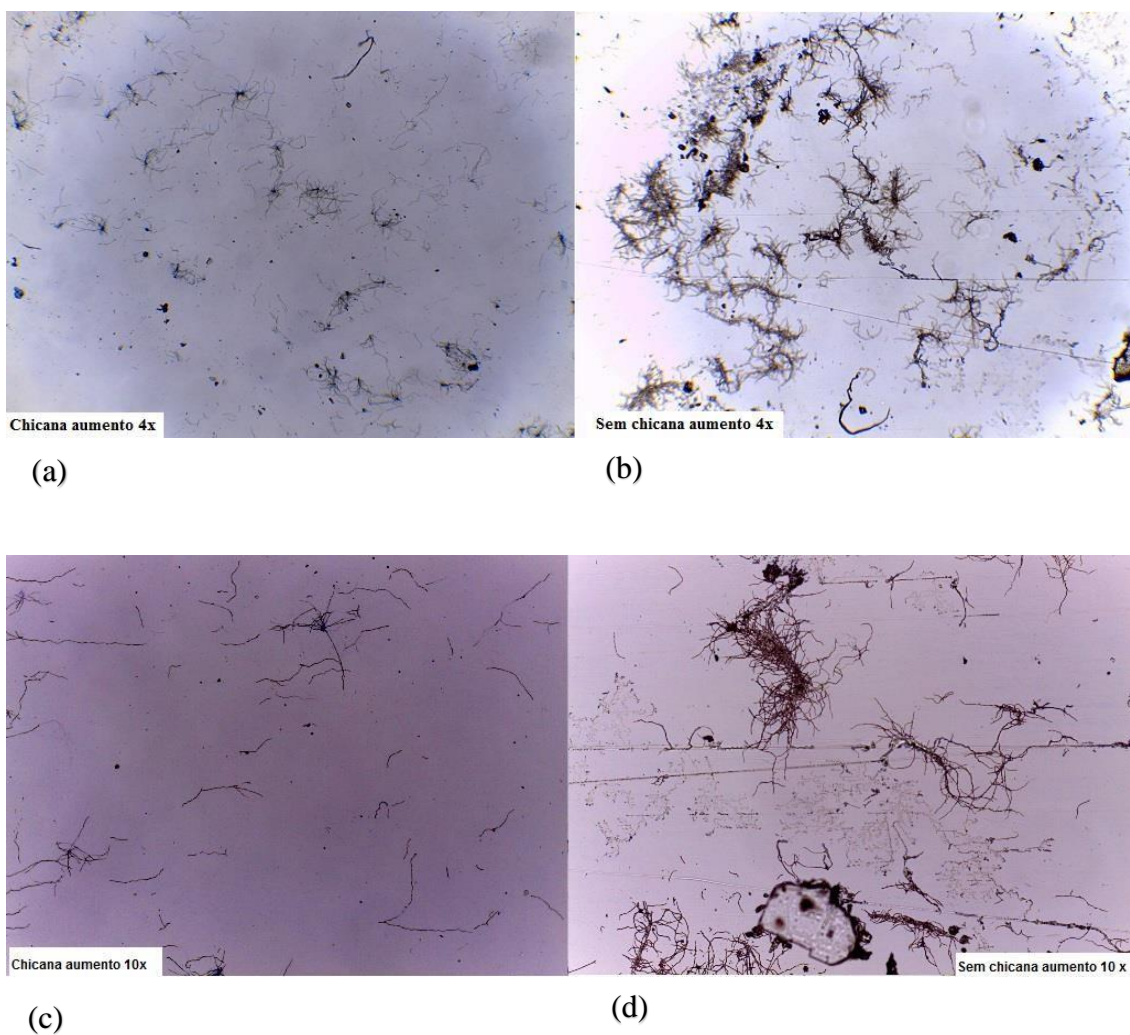
Tabela 10. Concentração de ácido clavulânico obtida para os diferentes Erlenmeyers.

Erlenmeyers	AC (mg/L)	Desvio padrão (mg/L)
Com chicanas	559,67	13,28
Com chicanas	597,79	12,50
Convencional	502,76	59,38
Convencional	514,36	32,03

Os resultados obtidos na produção de AC em Erlenmeyers com três chicanas, apresentou valores médios 12,6% maiores do que os realizados em Erlenmeyers padrões. O que pode ser explicado pelo aumento na aeração do sistema, causado pela associação de chicanas em frascos Erlenmeyers e pela maior taxa de cisalhamento fornecida. Em bioprocessos, a velocidade de cisalhamento é a variável responsável pela correta e suficiente transferência de massa e energia para o meio, por isso essa força hidrodinâmica, quando é subestimada pode levar a uma perda da biossíntese do produto, como mostrado por Chisti, (2001) e Cerri e Badino, (2012). Sendo assim, tal modificação favorece a transferência de massa, homogeneização e conseqüentemente a transferência de oxigênio para o sistema.

Quanto à sensibilidade na estrutura morfológica causada pelo aumento na taxa de cisalhamento, se faz necessário assegurar condições ótimas de agitação e aeração, levando em conta à aeração fornecida, o tipo e o grau de agitação que serão utilizados no cultivo, como estudado por Meijer et al., (1993). Dessa maneira, minimiza-se os possíveis efeitos negativos na morfologia, metabolismo, composição, biossíntese e viabilidade celular, garantindo um ambiente físico-químico adequado aos microrganismos.

Através da Figura 33, observa-se que a produção de AC em frascos Erlenmeyers modificados proporcionou hifas menores, mais ramificadas e menos aglomeradas.



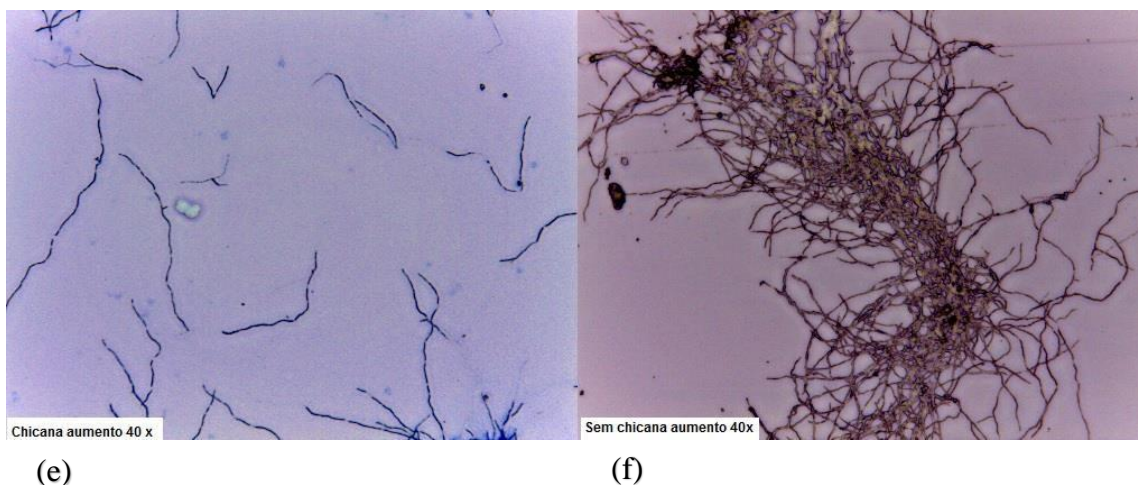


Figura 33. Imagens diluídas 100x obtidas (a) aumento de 4x com chicana (b) aumento de 4x sem chicana (c) aumento de 10x com chicana (d) aumento de 10x sem chicana (e) aumento de 40x com chicana (f) aumento de 40x sem chicana (arquivo próprio).

Essa observação está de acordo com o estudado no trabalho de Belmar-Beiny e Thomas (1991). Assim, como o trabalho de Bustamante (2013), que correlaciona hifas mais ramificadas em cultivos com maiores agitações.

Relacionando a produção com a morfologia apresentada, conclui-se que para a mesma condição de rotação e temperatura a utilização de chicanas e consequente aumento da taxa de cisalhamento beneficia a produção do fármaco, pois a ruptura celular geralmente leva a renovação celular. Bustamante (2013) justifica essa maior produção pela ruptura das antigas estruturas morfológicas, formando a partir dessa fragmentação, novas células produtoras do metabólito de interesse.

Assim, fica claro que a taxa de cisalhamento correlacionada com a morfologia do microrganismo é de extrema importância, a fim de garantir que o efeito hidrodinâmico seja positivo e consequentemente melhore a produção dos metabólitos desejados.

6. CONCLUSÃO

A produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* foi influenciada pela aeração e rotação imposta ao sistema. Dentre essas variáveis, o aumento na rotação dos impelidores beneficiou mais o aumento da taxa de transferência de oxigênio do que o aumento da vazão de ar, sendo a utilização de mecanismos cisalhantes uma estratégia promissora nesse bioprocessos.

Diferentes conformações de geometria no biorreator acarretam em diferentes valores de k_{La} , uma vez que alteram a transferência de massa e oxigênio do sistema. Sendo o estudo dos impelidores e sua conformação geométrica de extrema importância para a transferência de oxigênio para o processo e bom desempenho do reator. Esse estudo preliminar representa uma estratégia de melhoria no desempenho do processo de produção de ácido clavulânico.

A produção de AC máxima foi alcançada no cultivo realizado com maiores rotações (800 e 1000 rpm). Em sistemas mais cisalhantes há maior ruptura das células, aumentando o número de células renovadas, tornando-as melhores produtoras. Os menores níveis de AC alcançado no cultivo com menor rotação imposta, pode ser atribuído à maior dificuldade do microrganismo em romper-se, a maior formação de *pellets* e consequentemente menor transferência de oxigênio pro sistema, dificultando o crescimento do microrganismo sob essa condição.

Fica claro com os resultados obtidos que o método proposto para análise morfológica mostrou-se satisfatório, contribuindo para o entendimento dos efeitos causados pelo aumento da velocidade de cisalhamento na produção de AC, comprovando que hifas ramificadas multiplicam-se à medida que aumenta-se o cisalhamento, favorecendo a produção do fármaco.

Através da utilização do oxigênio puro em alguns cultivos evidencia que o aumento na transferência de oxigênio contribui para antecipar a produção do metabólito (16 e 8 horas mais rápido, respectivamente) quando comparado ao cultivo padrão, porém não favorece a produção do AC, uma vez que oxida o bioprocessos tornando prejudicial ao metabolismo microbiano. Por outro lado, a condição de cisalhamento imposta no biorreator, devido as modificações causadas na morfologia microbiana, aumenta consideravelmente a produção de AC.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. p. 467.
- AMANULLAH, A.; JÜSTEN, P.; DAVIES, A.; PAUL, G. C.; NIENOW, A. W.; THOMAS, C. R. Agitation induced mycelial fragmentation of *Apergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5 n.2, p.109- 114, 2000.
- AMARAL, P.F.F.; FREIRE, M.G.M.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P.; COELHO M.A.Z. Optimization of oxygen mass transfer in a multiphase bioreactor with perfluorodecalin as a second liquid phase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n.3, p. 588-598, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Lista de genéricos registrado. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/registrados.htm> Acessado em 17 de março de 2017.
- ASENJO, J. A.; MERCHUCK, J. C. **Bioreactor System Design**. New York: Basel; Marcel Dekker, 1994. p. 339-375. (Bioprocess Biotechnology, v. 21)
- BADINO, A.C.; FACCIOOTTI, M.C.R.; SCHIMIDELL, W. Estimation of the rheology of glucoamylase fermenatition broth from the biomass concentration and shear conditions. **Biotechnology Techniques**, v.13, n.10, p.723-726, 1999.
- BADINO, A.C.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v.2: Engenharia Bioquímica, cap. 15: Variação de escala, São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- BAGGALEY, K.H.; BROW, A.G.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Production Report**, v. 14, n. 4, p.309-333, 1997.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering**. New York: McGraw Hill, 1986.

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

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

BELMAR-BEINY, M.T.; THOMAS, C.R. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirred speed in batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, n.5, p. 456-462, 1991.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry.** 6th. ed. New York, N.Y.: W. H. Freeman, 2007. 1026p.

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

BUSTAMANTE, M.C.C. **Transferência de Oxigênio e Condições de Cisalhamento em Biorreator Convencional com Impelidores Orelha de Elefante.** 2013. (Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

CAMPANI, G.J. **Reator airlift operado em sobrepressão: Construção, caracterização da transferência de oxigênio e aplicação em cultivos de *Escherichia coli* recombinante.** 2014. (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

CAMPESI, A. **Avaliação da Velocidade de Cisalhamento Média em Biorreator Convencional tipo Tanque agitado e Aerado.** 2007. (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

CAMPESI, A.; CERRI, M.O.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Determinaton of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.32, p.241-248, 2008.

CERRI, M.O. **Hidrodinâmica e Transferência de Oxigênio em Três Biorreatores Airlift de Circulação Interna Geometricamente Semelhantes**. 2009. (Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

CERRI, M.O.; BADINO, A.C. Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 977-84, 2012.

CERRI, M. O.; ESPERANÇA, M. N.; BADINO, A.C.; RIBEIRO, M. P. A. A new approach for $k_L a$ determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 91, p.3061- 3069, 2016.

CHARLES, M.; WILSON, J. Fermentor design. In: MOO -YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p.57-75,

CHARLES, M.; WILSON, J. Fermentor design. In: LYDERSEN, B. K.; D'ELIA, N. A.; NELSON, K. L. **Bioprocess engineering systems, equipment and facilities**, New York: John Willey & Sons. p. 3-67, 1994.

CHEN, Z.D.; CHEN, J.J.J. Comparison of mass transfer performance for various single and twin impellers. **Chemical Engineering Research and Design**, v.77, n.2, p. 104–109, 1999.

CHISTI, M.Y.; MOO-YOUNG, M. Airlift reactors: characteristics, applications, and design considerations. **Chemical Engineering Communications**, v.60, p. 195-242, 1987.

CHISTI, M.Y. Hydrodynamic damage to animal cells. **Critical Review Biotechnology**. v.21, n.2, p.67–110, 2001.

CONTRERAS, A.; GARCIA, F.; MOLINAA, E.; MERCHUK, J.C. Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p.820-830, 1999.

CORRÊA, L. C. **Controle do Processo da Transferência de Oxigênio em Corpos Hídricos**. 2006. (Mestrado), Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

COX, P. W.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. **Microbiology**, v.44, p. 817-827, 1998.

DANCKWERTS, P.V. Significance of liquid film coefficients in gas absorption. **Industrial & Engineering Chemical**, v43, n. 6, . p. 1960–1967, 1951.

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

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

ENGLER, C. R. ; ROBINSON, C. W. Effects of organism type and growth conditions on cell disruption by impingement. **Biotechnology Letters**, v.3, n.2, p.83-88, 1981.

ESPERANÇA, M.N. **Influência de aspectos geométricos na hidrodinâmica e transferência de oxigênio de biorreatores airlift de circulação interna**. 2014. (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, p. 1-10, 1998.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153-76, 2009

GARCIA-OCHOA, F.; ESCOBAR, S.; GOMEZ, E. Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects, **Chemical Engineering Science**, v.122, p.491-499, 2015.

GAVRILESCU, M.; ROMAN, R.V.; EFIMOV, V. The volumetric oxygen mass-transfer coefficient in antibiotic biosynthesis liquids. **Acta Biotechnologica**, v. 13, n. 1, p. 59-70, 1993.

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

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

HAKIMELAHI, GH.; SHIA, KS.; XUE, C.; HAKIMELAHI, S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; KHALALI-NEZHAD, A.; SOLTANI-RAD, M. N.; OSYETROV, V.; WANG, K. P.; LIAO, JH.; LUO, FT. Design, synthesis, and biological evalution of a series of beta-lactam- based prodrugs. **Bioorganic & medical chemistry**, v. 10, p. 3489-3498, 2002.

HIGBIE, R. The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. s **Journal Transaction of American Institute of Cheminical Engineers**, vol. 31, p. 365-390, 1935.

HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a P-Lactam Antibiotic Producer. **International journal of systematic bacteriology**, v.21, p.326-331, 1971.

HO, C.S.; OLSHUE, J.Y. **Biotechnology processes scaleup and mixing**. New York: American Institute of Chemical Engineering, 1987.

JÜSTEN, P.; PAUL, G.C.; NIENOW, A.W.; THOMAS, C.R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and.Bioengineering**.v. 52, p.672–684, 1996.

KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. Transport phenomena in bioprocess. In: PRESS, P. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 1, v.2, p.5-56, 1985.

KARIMI, A.; GOLBABAELI, F.; MEHRNIA, M.R.; NEGHBAB, M.; MOHAMMAD, K.; NIKPEY, A.; POURMAND, A.R. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes **Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering**, v.10, p.1-9, 2013.

KELLY, W.; GIGAS, B. Using CFD to predict the behavior of power law fluids near axial-flow impellers operation in the transitional flow regime. **Chemical Engineering Science**. v. 58, p. 2141–2152, 2003.

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

LAN, T.Q.; WEI, D.; YANG, S.T.; LIU, X. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresour Technol**, v.133, p.175-182, 2013.

LEWIS, W. K.; WHITMAN, W.G. Principles of gas absorption. **Industrial and Engineering Chemistry**. v.16, n.12, p. 825-833, 1924.

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

LIU, H. B.; CHUI, K. S.; CHAN, C.L.; TSANG, C.W.; LEUNG, Y.C. An efficient heat-inducible *Bacillus subtilis* bacteriophage 105 expression and secretion system for the production of the *Streptomyces clavuligerus* beta-lactamase inhibitory protein (BLIP). **Journal of Biotechnology**, v.108, p.207-217, 2004.

MAKAGIANSAR, H. Y.; SHAMLOU, P. A.; THOMAS, C. R.; LILLY, M. D. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Bioprocess Engineering**, v.9, p. 83-90, 1993.

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

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

MEIJER, J.J.; HOOPEN, H.J.G.; LUYBEN, K.CH.A.M.; LIBBENGA, K. R. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 3, p. 234-238, 1993.

MERCHUCK, J.C.; GLUZ, M. Bioreactors, air-lift reactors, In: **Encyclopedia of Bioprocess Technology**, v.1-5. New York: John Willey & Sons, 1999. p. 320-353.

MICHELIN, M.; MOTA, A. M. O.; POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A . Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank internal-loop airlift bioreactors. **Biocheminical Engineering**, v.80, p.19-26, 2013.

NEVES, A. A.; VIEIRA, L. M.; MENEZES, J. C. Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n.6, 2001.

NETO, A. B.; HIRATA, D. B.; CASSIANO FILHO, L. C. M.; BELLÃO, C.; BADINO JUNIOR, A. C.; HOKKA, C. O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 22, p. 557–563, 2005.

OH, S.K.W.; NIENOW, A.W.; AL- RUBEAI, M.; EMERY, A.N. Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. **Journal of Biotechnology**. v.22, p. 245–270, 1992.

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

PAMBOUKIAN, C. R. D.; GUIMARÃES, L. M.; FACCIOTI, M. C. R. Applications of Image Analysis in the Characterization of *Streptomyces olindensis* in Submerged Culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 17-21, 2002.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PARADKAR, A. S.; AIDOO, K. A.; JENSEN, S. E. A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Molecular Microbiology**, v.27, n.4, p. 831-843, 1998.

PATEL, N.; THIBAUT, J. Enhanced in situ dynamic method for measuring K(L)a in fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1-3, p. 48-54, 2009.

PINTO, L.S.; VIEIRA, L.M.; PONDS, M.N.; FONSECA, M.M.R.; MENEZES, J.C. Monitorização de processos biológicos: III. Análises digital de imagem. **Boletim de Biotecnologia**. v. 70, p. 12-21., 2001.

PUENTES, J. L. F. C.; VALLE, M. A. M.; MALDONADO, F. S.; IZARD, T. O.; PLA, L. C.; SOUZA-FARO, J. M. **Preparation of clavulanic acid and its salts and esters**. Patent Number EP0312813, 1989.

ROBERTSON, B.; ULBRECHT, J.J. Measurement of shear rate on an agitator in a fermentation broth, In: Ho CS, Oldshue JY. **Biotechnology Processes, Scale up and mixing**. New York: American Institute of Chemical Engineers, 1987. p.31-35,

ROBSON, G.D.; PUCCI, J.; THRONDSSET, W.; COLEMAN, N.D. Oxidative Stress, Fragmentation and Cell Death During Bioreactor Growth of Filamentous Fungi. **British Mycological Society Symposia Series**, v. 27, p.129-142, 2008.

RODRIGUES, K.C.S. **Estudo da influência do pH e temperatura na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional**. 2015. (Mestrado). Universidade Federal de São João Del Rei, Minas Gerais.

ROLLINS, M.J.; JENSEN, S.E.; WESTLAKE, D.W.S. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces Clavuligerus*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 357-364, 1988.

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

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

RYU, D. Y.; HUMPHREY, A. E. Reassessment of oxygen transfer rate in antibiotics fermentation. **Journal of Fermentation Technology**, v.50, p. 424-431, 1972.

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

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHÜGERL, K. Bioreaction Engineering: characteristic features of bioreactors. **John Wiley & Sons**, v.2, 1992.

SER, H.L.; LAW, J.W.F.; CHAIYAKUNAPRUK, N.; JACOB, S.A.; PALANISAMY, U.D.; CHAN, K.G.; GOH, B.H.; LEE, L.H. Fermentation Conditions that Affect Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology** .v.7, p.1-20, 2016.

TEODORO, J.C.; BAPTISTA-NETO, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, I.L.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-

batch cultivation with medium containing glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p.450-455, 2006.

TEODORO J. C.; BAPTISTA-NETO, A.; ARAUJO, M. L. G. D. C.; HOKKA, C. O.; BADINO JUNIOR, A. C. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acidproduction by *Streptomyces clavuligerus*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 27, p. 499–506, 2010.

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

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

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

APÊNDICE A

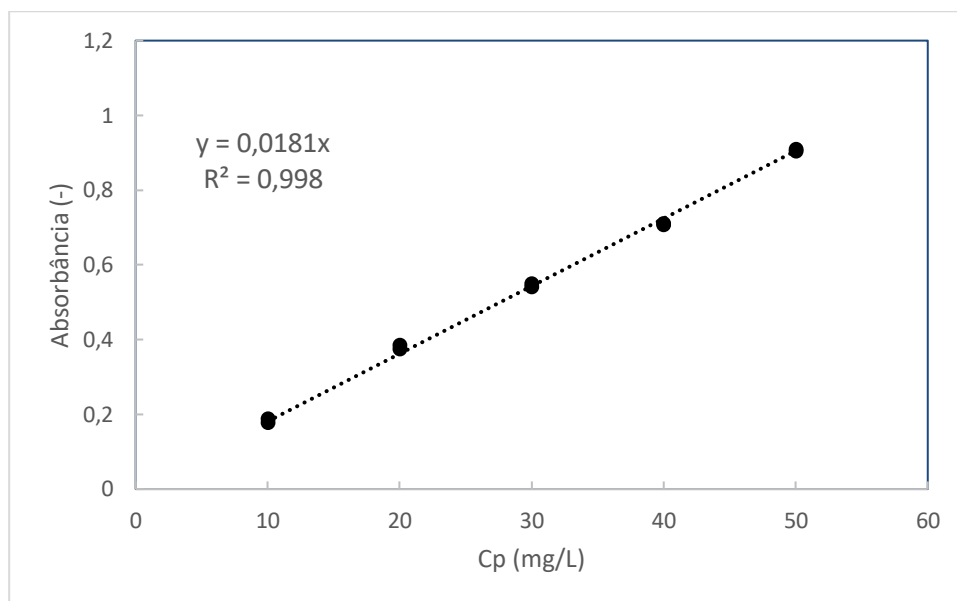


Figura A1. Curva de calibração de ácido clavulânico, equação modelo e coeficiente de correlação linear.

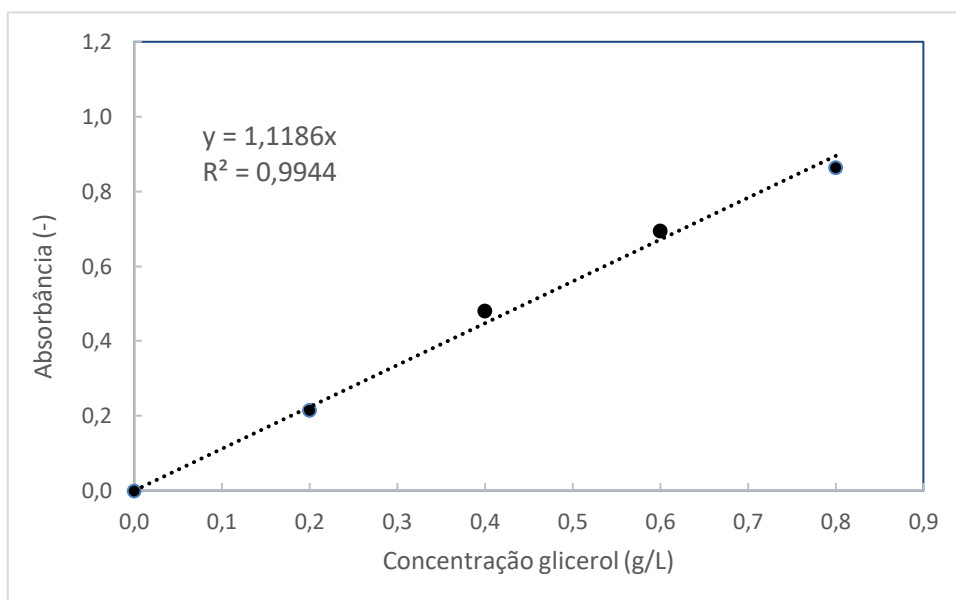


Figura A2. Curva de calibração de glicerol, equação modelo e coeficiente de correlação linear.