

Controle do Processo de Produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* empregando melaço de cana-de-açúcar como substrato

Autores

Valmir Eduardo Alcarde
Tais Helena Martins Lacerda
Ivana Cristina Spolidorio Mcknight
Luana Macedo Athayde

Apoio Financeiro

Fap

1. Introdução

Segundo NETO (2003) a América Latina tem uma participação de 5,0% no mercado farmacêutico mundial e no ano de 2001 o faturamento bruto da indústria farmacêutica no Brasil foi de US\$ 7,69 bilhões gerados por 306 companhias nacionais e 63 multinacionais. Grande parte dos antibióticos de última geração estão incluídos no grupo β -lactâmicos. Destes, mais de 50% são derivados da molécula de cefalosporina C.

A molécula de cefalosporina C é sintetizada por diferentes microrganismos, mas é o fungo *Cephalosporium acremonium* o microrganismo utilizado na biossíntese desse composto nas grandes indústrias que o produzem via processo fermentativo (ANDRIETTA, 1998).

Os avanços alcançados na indústria de produção de antibiótico por via fermentativa passam por dois diferentes caminhos: melhoramento do microrganismo e/ou otimização do meio de cultivo e das variáveis de processo.

A otimização das variáveis de processo (agitação, pH, temperatura, forma de alimentação) assim como a formulação dos meios de cultivo, da mesma maneira que o melhoramento das linhagens é realizado dentro da própria planta industrial não existindo o acesso a esses dados por parte da comunidade científica.

O melaço de cana-de-açúcar é o licor resultante da cristalização final do açúcar, apresentando em sua composição água, carboidratos fermentescíveis (glucose, frutose e sacarose), compostos não açúcares de origem orgânica (aminoácidos, vitaminas, proteínas) e uma fração mineral composta principalmente por cálcio, magnésio, sódio e potássio. O melaço pode ser utilizado como substrato na produção de produtos fermentados de interesse econômico uma vez que apresenta altos teores de açúcares como sacarose, glucose e frutose (62% em média) e é um subproduto da indústria açucareira relativamente barato e disponível em grandes quantidades. A produção mundial está na faixa de 35 milhões de toneladas sendo o Brasil um dos países exportadores. (RAMBLA *et al.*, 1999)

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos fazer um acompanhamento cinético, controle e monitoramento da

produção de cefalosporina C empregando substratos formulados a partir de melaço de cana-de-açúcar, com teores de 5% e 10% de açúcares redutores totais; avaliar a necessidade e os efeitos da suplementação de duas fontes nitrogenadas, sulfato de amônio e uréia, na produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* e contribuir com informações para a indústria produtora de antibióticos visando racionalizar o processo de produção, aumentando a disponibilidade da molécula de interesse econômico e reduzir os custos de fabricação.

3. Desenvolvimento

3.1. Microrganismo, Manutenção e Propagação da Cultura

O microrganismo utilizado foi o *Cephalosporium acremonium* (linhagem C-10). Para se obter inóculo para os ensaios realizados foram utilizados criotubos da cultura congelada. O criotubo foi descongelado e transferidos para frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 20 ml de meio recomendado (ANDRIETTA, 1998). As condições de incubação foram: 28°C +/- 1, sob agitação de 250 rpm +/- 5 por 72 horas.

3.2. Métodos Analíticos

3.2.1. Análise de Açúcares: A análise do teor de açúcares foram realizadas através da determinação de Brix refratométrico e de açúcares redutores totais (ART) (ZAGO *et al.*, 1996).

3.2.2. Análise de Massa Celular Produzida: Alíquotas de 10 ml do fermentado foram filtradas em funil de Buchner sob vácuo, em papel de filtro WHATMAN nº 5 previamente tarado. O papel de filtro foi seco em estufa à temperatura de 80 °C +/- 5 até o peso permanecer constante (cerca de 10 horas).

3.2.3. Medida do pH do Meio de Cultivo: As medidas do pH do meio de fermentação foram realizadas em potenciômetro.

3.2.4. Análise de Cefalosporina C: As análises da concentração da cefalosporina C foram realizadas microbiologicamente, de acordo com PEREZ-MARTINES & PEBERDY (1985).

3.3. Delineamento Experimental

O controle e monitoramento do processo de fermentação para produção de cefalosporina C foi avaliada empregando-se as seguintes formulações de substrato:

Tratamento 1: meio basal de fermentação (controle)

Tratamento 2: substrato formulado com melaço (5% de ART)

Tratamento 3: substrato formulado com melaço (10% de ART)

Tratamento 4: meio basal suplementado com sulfato de amônio (4% N)

Tratamento 5: meio basal suplementado com uréia (4% N)

Tratamento 6: substrato formulado com melaço (5% de ART) suplementado com sulfato de amônio (4% N)

Tratamento 7: substrato formulado com melaço (5% de ART) suplementado com uréia (4% N)

Tratamento 8: substrato formulado com melaço (10% de ART) suplementado com sulfato de amônio (4% N)

Tratamento 9: substrato formulado com melaço (10% de ART) suplementado com uréia (4% N)

Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 ml com 100 ml de meio de cultivo. As condições de incubação foram 28°C +/-1, sob agitação de 250 rpm +/- 5 por 216 horas. Amostras em duplicata foram coletadas com 72, 120, 168 e 216 horas de fermentação, sendo que, nos 5 últimos tratamentos (Tratamentos 5 a 9), foram também coletadas amostras com 240 e 504 horas de fermentação.

3.4. Tratamento Estatístico dos Dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos nos testes foram analisados através da análise de variância com a aplicação do teste gráfico de controle.

4. Resultados

4.1. Controle e monitoramento da produção de cefalosporina C

A associação em relação à massa celular e teor de cefalosporina C produzida tem sido observada por alguns pesquisadores. ZHOU *et al.* (1992) e ANDRIETTA (1998) acreditam que exista uma estreita relação entre esses dois parâmetros. Pelos resultados obtidos nos ensaios de fermentação realizados notou-se que o Tratamento 9 foi o que proporcionou uma maior concentração de massa celular associada a maior concentração de cefalosporina C. Os substratos que apresentaram menores valores de massa celular, foram os mesmos que proporcionaram menores rendimentos em cefalosporina C.

Os substratos suplementados com uréia apresentaram melhores desempenhos em relação a produção de cefalosporina C e massa celular quando comparados aos substratos suplementados com sulfato de amônio, como pode ser observado nos Tratamentos 6-7 e 8-9. No Tratamento 6 foi observado a produção de 8,25 g/L de massa celular e 50-100 ppm de cefalosporina C com 216 horas de fermentação, enquanto no Tratamento 7 foi encontrado 8,86 g/L de massa celular e 50-100 ppm de cefalosporina C praticamente no mesmo tempo de fermentação. Porém analisando os Tratamentos 8 e Tratamento 9 foram observados a produção de 8,86 g/L de massa celular contra 10,76 g/L de massa celular e teores entre 50 a 100 ppm de cefalosporina C contra 100 ppm de cefalosporina C com 216 horas de fermentação, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com SHEN *et al.* (1984) que já haviam relatado a repressão na produção de

cefalosporina C quando sulfato de amônio é utilizado no preparo do substrato.

As concentrações de açúcares residuais observados ao final de 216 horas de fermentação em todos os tratamentos indicam que esse tempo de fermentação foi insuficiente para que os açúcares fossem totalmente consumidos, indicando que uma maior concentração de cefalosporina C poderia ser obtida.

Por outro lado a máxima produção de cefalosporina C ocorreu com 216 horas de fermentação para todos os tratamentos utilizados, sendo observado que após esse tempo de fermentação houve uma redução no teor do antibiótico no caldo fermentado. A partir deste ponto pode-se dizer que inicia-se a degradação da cefalosporina C produzida. USHER *et al.* (1988) reportam que a cefalosporina C em caldo de fermentação é instável e, sua taxa de degradação a 25°C é de 0,48% por hora.

A redução da biomassa celular observada após 216 horas de fermentação pode ser atribuída a autólise celular do microrganismo utilizado.

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de fermentação realizados indicou que os melhores rendimentos em relação a produção de cefalosporina C e biomassa celular ocorreu no Tratamento 9 onde o halo de inibição detectado foi de 1,9 cm e a biomassa celular 10,76 g/L, respectivamente com 120 horas de fermentação.

5. Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados conclui-se que:

- A utilização do melaço de cana-de-açúcar pode ser considerado um substrato com potencial para ser empregado em processo fermentativo para produção de cefalosporina C por *C. Acremonium*. No entanto deve-se considerar que esta matéria-prima pode não conter alguns fatores promotores da síntese de cefalosporina C.
- A suplementação de uma fonte de nitrogênio aumentou a produção de cefalosporina C comparado com o tratamento onde não foi realizada a suplementação deste elemento. A suplementação com uréia apresentou melhores resultados comparado com a utilização de sulfato de amônio como fonte nitrogenada no meio de cultivo.
- Existe uma estreita relação entre a massa celular do *C. acremonium* e a quantidade de cefalosporina C produzida. Os maiores valores do antibiótico foram obtidos nos meios de cultivo onde foram observadas maiores concentrações celulares.
- o processo fermentativo conduzido com substrato formulado com melaço de cana-de-açúcar a 10% de ART suplementado com uréia 4% N foi o que apresentou melhor rendimento em relação a produção de cefalosporina C (0,1g/L).

Referências Bibliográficas

ANDRIETTA, M.G.S. Estudo de meio de cultivo industrial para produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium*. Campinas. 1998, 94p. (Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP).

NETO, S.B. Seminário Internacional de Rastreabilidade e Segurança do Consumidor. Associação Brasileira das Indústrias Farmacêuticas. 2003

PEREZ-MARTINEZ, G. & PEBERDY, J.F. Production of cephalosporin C, and its intermediates, by raised of *Acremonium chrysogenum*. *Enz. Microb. Technol.*, 7: 389-394, 1985.

RAMBLA, M.A O; PRADA, A R.; COOPAT, T.S. CARRACEDO, G.B. Méis. *Manual dos derivados da cana-de-açúcar*. Instituto Cubano de Pesquisas dos Derivados da Cana-de-Açúcar. Cap. 2.4, p. 49-55. 1999.

SHEN, Y.Q.; HEIM, J.; SOLOMOM, N.A; WOLFE,S.; DEMAIN, A.L. Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen source. *J. Antibiot.*, 37:503-511,1984.

USHER, J.J; LEWIS, M.A.;DORIS,W; COMPTON, B.J. Development of cephalosporin C taking into account the instability of cephalosporin C. *Biotech. Let.*, 10: 543-548, 1988.

ZAGO, E.A ; SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. *Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool*, Piracicaba, Fermentec/Fealq/Esalq-USP. 198p. 1996.

ZHOU, W.; RIEGER, H.R.; DORS, M.; SCHUGERL, K. Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain in *Cephalosporium acremonium*. *J. Biotechnology*, 23: 315-329, 1992.