

## Aumento na Produção de Ácido Clavulânico com o uso de Quorum Sensing

Gracindo, A.<sup>1</sup>, Santos, D. Z. T.<sup>1</sup>, Fonseca, G. A.<sup>1</sup>, Pedrolli, D. B.<sup>1</sup>, Cerri, M. O.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.

E-mail para contato: [marcel@fcfar.unesp.br](mailto:marcel@fcfar.unesp.br)

**RESUMO** – O aumento da resistência bacteriana a antibióticos vem trazendo cada vez mais preocupação para a área da saúde, portanto, fica mais evidente a necessidade de pesquisas voltadas para essa área a fim de solucionar tal problema. Trabalhos voltados para a produção de ácido clavulânico são de extrema importância nesse quesito, já que este metabolito, produzido pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*, tem a capacidade de auxiliar na eficiência de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Com esse projeto objetiva-se obter uma otimização na produção de ácido clavulânico com o uso de quorum sensing que nada mais é que uma comunicação celular entre microrganismos a partir de moléculas sinais, onde as concentrações de tais moléculas são utilizadas para quantificar as concentrações de outros organismos presentes no meio. Assim, essa técnica, pode trazer vantagens a um microrganismo, como a produção de antibiótico para o preavalecimento de uma única espécie. O efeito quorum sensing pode estimular *Streptomyces clavuligerus* a produzir mais antibióticos na presença dessas moléculas sinais. Para isso será necessário primeiramente realizar o cultivo de *S. clavuligerus* com amostra estéreis de solo, possibilitando analisar se alguma dessas moléculas vão causar interferência, ou seja, aumento na produção de ácido clavulânico.

### 1. INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC) é um metabólico secundário (caracterizado como uma vantagem ao microrganismo) produzido pelas bactérias *Streptomyces clavuligerus*, uma bactéria filamentosa aeroestricta. O AC é utilizado para otimizar antibióticos que possuem o anel  $\beta$ -lactâmico, tais como a penicilina. A ação do composto se baseia na quebra de uma enzima presente nos microrganismos resistentes aos antibióticos, essa enzima é denominada  $\beta$ -lactamase. A enzima  $\beta$ -lactamase seria responsável por quebrar o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico causando assim a sua ineficiência, porém com a ação do AC de degradar essa enzima, o antibiótico não sofre danos, podendo assim atuar na morte do microrganismo (Nurmohamadi *et al.*, 2014).

Quorum sensing (QS) pode ser entendido como uma comunicação celular feita através de moléculas sinalizadoras, ocorrem tanto em bactérias gram-negativas como em gram-positivas. (Decho *et al.*, 2005).

Nas bactérias gram-positivas o QS ocorre usando modificações em oligopeptídeos como molécula sinal e uma cadeia de fosforilação como receptor em outra célula. O que ocorre é

que as moléculas sinais são produzidas e após eliminadas para o meio externo, quando sua concentração atinge um limite, uma quinase presente na membrana celular consegue captá-las fosforilando o próximo componente (uma proteína reguladora) no ambiente interno celular. Essa proteína tem a capacidade de se ligar ao DNA regulando sua expressão. Desse modo a bactéria consegue ativar genes necessários a partir do QS, ou seja, da concentração de microrganismos a sua volta. (Galloway *et al.*, 2005).

A produção de AC ocorre nas bactérias na fase estacionária, ou seja, quando a densidade populacional atingiu um equilíbrio, nesse momento os microrganismos já começam a ter a necessidade de disputar a fonte de alimento, ou seja, de energia. Nesse ponto a capacidade de produzir antibióticos se torna vantajosa, já que nesse momento eles começam a ser liberados para eliminar espécies que não possuem resistência, diminuindo assim a competição entre espécies. (Nurmohamadi *et al.*, 2014). Esse projeto tem como principal função a utilização de QS para se obter uma maior produção de AC.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Preparo dos Meios de cultura

Para cultivo do microrganismo *S. clavuligerus* foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al.* (2005). Já o meio de cultura de crescimento teve a mesma composição do meio de cultura de produção. Ambos foram baseados no meio proposto por Teodoro *et al.* (2006). O pH de todos os meios foi ajustado para 6,8 e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

O meio de cultura de reativação (Rosa et al, 2005) é composto por 15 g/L de glicerol; 10 g/L de peptona bacteriológica; 10 g/L de extrato de malte; 1 g/L de extrato de levedura; 21 g/L de tampão MOPS; 2,5 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,75 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1 mL/L de solução de sais.

Já o meio de crescimento e de produção são iguais, ambos propostos por Teodoro et al (2006). Temos como composição desse meio 15 g/L de glicerol; 20 g/L de isolado proteico de soja; 21 g/L de tampão MOPS; 0,8 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,75 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1 mL/L de solução de sais.

### 2.2 Testes Realizados

Ao longo do projeto já foram realizados 3 ensaios. Em todos eles foram necessários obter uma solução de água com terra estéril, nos dois primeiros testes eram realizados a filtração utilizando o filtro analítico e uma bomba a vácuo da solução com terra com que posteriormente foram autoclavados a 121°C por 20 min obtendo assim uma solução estéril. No último teste (teste 3), foram realizados os mesmos passos iniciais, mas ao invés de autoclavar a solução no final, foi feita uma filtração em filtro de 0,22 micrometros para torna-la estéril.

No primeiro teste foi feita uma solução de 0,1 grama de terra por mL de água como solução A1 e a partir dessa solução foram realizadas diluições de 1/10 (solução B1), 1/100 (solução C1) e 1/500 (solução D1) e com essas soluções foram realizados os cultivos de *S. clavuligerus* junto com um cultivo normal (solução P1) sem a presença de terra para analisar a interferência da solução estéril de terra na produção de AC.

No segundo teste foi feita uma solução de 0,2 grama de terra por mL de água como solução A2 e a partir dessa solução foram realizadas diluições de 1/10 (solução B2), 1/100 (solução C2) e 1/500 (solução D2) e com essas soluções foram realizados os cultivos de *S. clavuligerus* junto com um cultivo normal (solução P2) sem a presença de terra para analisar a interferência da solução estéril de terra na produção de AC.

E por fim no último teste (teste 3) foi realizado um cultivo de 0,2 grama de terra por mL de água que ao invés de autoclavar foi realizado a filtração em filtro de 0,22 micrometros e um cultivo normal (sem terra), pois assim seria possível analisar se autoclavando o meio estaríamos prejudicando as moléculas presentes e diminuindo a produção de AC.

Todos os cultivos foram realizados em Erlenmeyer de 250 mL com um volume útil de 10%, ou seja, 25 mL de meio de cultura. Onde o meio de reativação foi inoculado e deixado em um shaker por 24 horas a 30°C e 250 rpm, para que após 2,5 mL fossem passadas para o meio de crescimento que permaneceu mais 24 horas em shaker a 30°C e 250 rpm e por último 2,5 mL fossem transferidas para o meio de produção sendo mantida no shaker por 72 horas a 28°C e 250 rpm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas e as suas análises também foram feitas em duplicatas, portanto, ao fim foram obtidos valores em quadruplicata e com isso tornou-se possível avaliar melhor os resultados obtidos. Por fim amostras do meio de cultura foram centrifugadas a 3720 rpm a uma temperatura de 4°C por 15 min, para que assim ocorra a separação das células e do AC, sendo que o nosso produto de interesse permaneceu no sobrenadante (composto extracelular). Após realizado todos esses procedimentos, foi realizada a análise de concentração de AC por método de espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982) utilizando o reagente imidazol e fazendo a leitura de absorbância à 311nm em cubetas de quartzo. A partir da absorbância foi possível obter a concentração de AC com o uso da equação 1 obtida pela curva de calibração de ácido clavulânico.

$$\text{Absorbância} = 0,0204[\text{AC}]$$

1

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Teste 1

Após realizado todos os procedimentos do primeiro foi obtido os valores da tabela 1 e a figura 1 para a produção de AC.

Tabela 1. Tabela com os valores obtidos de AC do teste 1.

Diluição da solução A	Amostra	Concentração de terra (g/mL)	Concentração AC (mg/L)	Produção Normalizada
-	A1	0,1	407,1	2,00
1/10	B1	0,009	237,7	1,17
1/100	C1	0,0009	306,4	1,50
1/500	D1	0,00018	248,5	1,22
-	P1	0	203,9	1,00

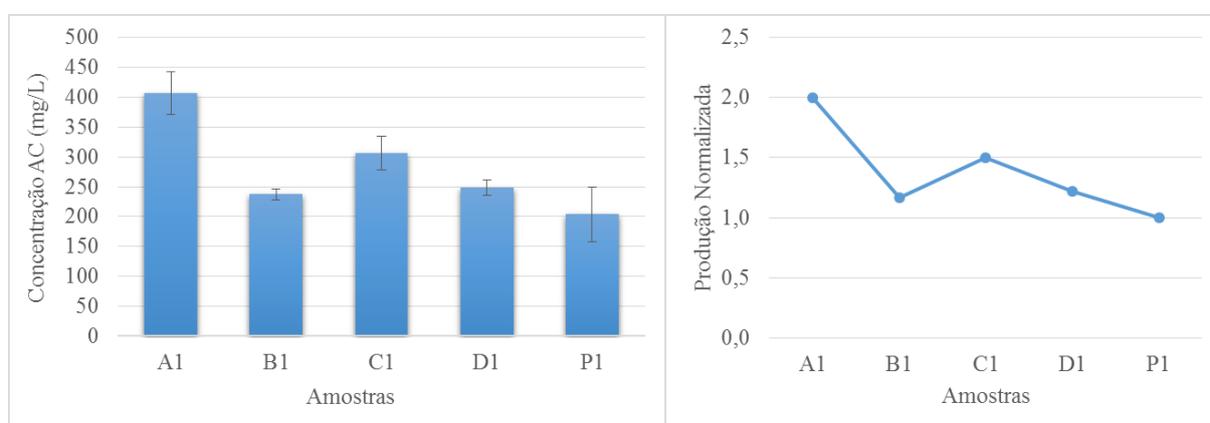


Figura 1. A esquerda encontra-se um gráfico demonstrando a concentração de AC obtida no teste 1. Na direita é possível verificar a produção normalizada do teste 1.

Com a análise desses valores foi possível observar grande aumento na produção de AC com o uso de 0,1 g/mL de terra (aumento de 2x do que o meio P1). Com isso foi decidido aumentar a concentração máxima de terra para 0,2 g/mL para que fosse possível testar como a produção foi afetada nessa nova concentração (teste 2).

## 4.2 Teste 2

Após realizado todos os procedimentos do primeiro foi obtido os valores da tabela 2 e a figura 2 para a produção de AC.

Tabela 2. Tabela com os valores obtidos de AC do teste 2.

Diluição da solução A	Amostra	Concentração de terra (g/mL)	Concentração AC (mg/L)	Produção Normalizada
-	A2	0,2	740,4	1,7
1/10	B2	0,018	299,5	0,7
1/100	C2	0,0018	269,6	0,6
1/500	D2	0,00036	579,1	1,3
-	P2	0	438,5	1,0

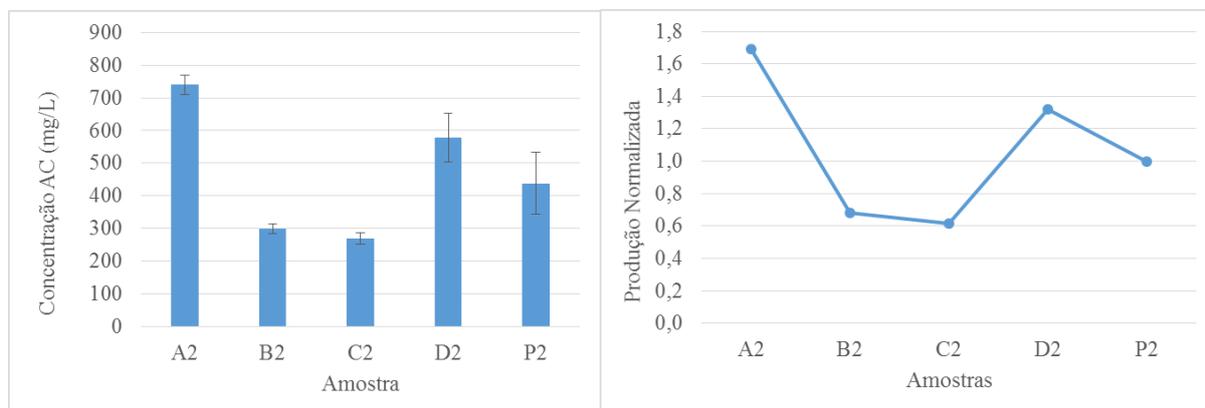


Figura 2. A esquerda encontra-se um gráfico demonstrando a concentração de AC obtida no teste 2. Na direita é possível verificar a produção normalizada do teste 2.

Analisando o teste 2 foi possível confirmar que a maior produtividade ocorreu com a concentração de 0,2 g/mL de terra, já que esta apresentou uma produção 1,7 vezes maior que a produção isenta de terra (solução P2).

### 4.3 Teste 3

Após realizado todos os procedimentos do primeiro foi obtido os valores da tabela 3 e a figura 3 para a produção de AC.

Tabela 3. Tabela com os valores obtidos de AC do teste 3.

Amostra	Concentração AC (mg/L)	Produção Normalizada
Terra (0,2 g/mL)	474,8	1,5
Normal (s/ terra)	323,0	1,0

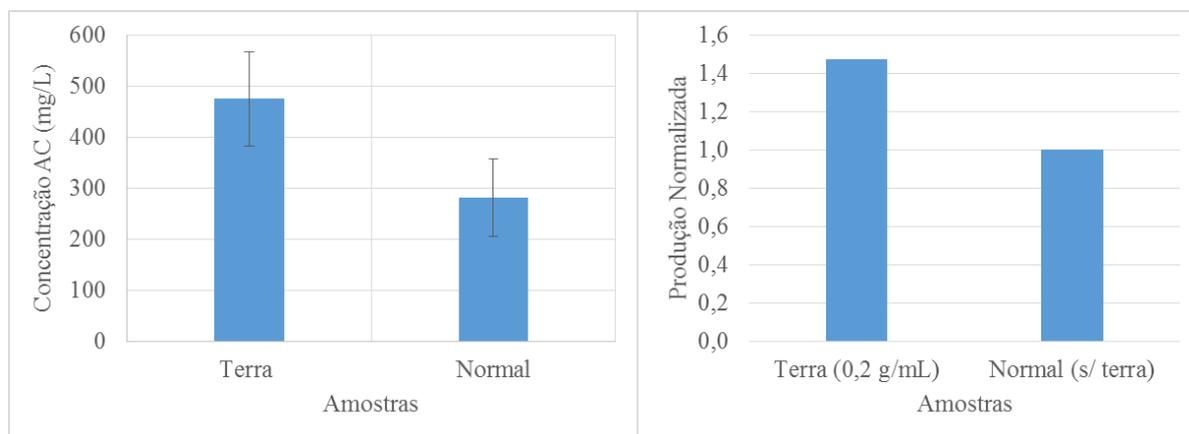


Figura 3. A esquerda encontra-se um gráfico demonstrando a concentração de AC obtida no teste 3. Na direita é possível verificar a produção normalizada do teste 3.

Fazendo algumas análises no teste 3, foi possível observar que a produção de AC também teve um aumento significativo quando foi realizado o cultivo em uma solução de terra a 0,2 g/mL sem autoclavar, já que nesse caso foi realizada a filtração com o filtro 0,22 micrometros para esteriliza-la.

## 5. CONCLUSÃO

Observando os valores obtidos para a produção de AC em todos os cultivos pode-se perceber que a inserção de terra no meio de cultivo em todos os casos aumentou a quantidade de AC produzida. Em relação ao teste 3 o cultivo com 0,2 g/mL de terra produziu 1,47 vezes mais que o cultivo normal (sem terra), entretanto no teste 2 o cultivo com 0,2 g/mL de terra (solução A2) produziu 1,7 vezes mais que o cultivo padrão sem a terra (P2), isso quer dizer que a solução A2 (teste 2) foi a que demonstrou maior produtividade, mostrando que apenas autoclavando o meio para torna-lo estéril foi mais eficaz. Pode-se dizer que esse fato ocorreu por causa do filtro usado do teste 3 (filtro de 0,22 micrometros), muito provavelmente o filtro impediu a passagem de células, mas também das moléculas sinais que atuam no quorum sensing, mostrando ser ineficiente nesse projeto.

Em relação ao quorum sensing, tudo indica que o aumento na produção de AC foi devido a interação do microrganismo *S. clavuligerus* com as moléculas sinais presentes no meio (quorum sensing), entretanto, o projeto ainda está nas etapas iniciais, portanto ainda são necessários novos testes que possam confirmar de fato a sua ocorrência.

## 6. REFERÊNCIAS

- 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.
- DECHO A.W.; NORMAN R.S.; VISSCHER P.T. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Cell. Trends in Microbiology* Vol.18 No.2, p.73-80, 2005
- GALLOWAY W.R.J.D.; HODGKINSON J.T.; BOWDEN S.; WELCH M.; SPRING R. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram -negative bacteria. *Cell. Trends in Microbiology* September, Vol. 20, No. 9, p.449-458, 2012.
- NURMOHAMADI M.; POURGHASSEM H. Clavulanic acid production estimation based on color and structural features of streptomycesclavuligerus bacteria using self-organizing map and genetic algorithm. Elsevier. *Computer methods and programs in biomedicine* 114, p.337-348, 2014.
- 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*, **Bioproc Biosyst Eng**, v.27, p.99-104, 2005.
- TEODORO, J.C.; BAPTISTA-NETO, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, I.L.; HOKKA, C.O.; BADINO-JR, A.C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p.450-455, 2006.