



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Otimização da Produção de Desmetiltetraciclina por *Streptomyces aureofaciens*

**Marina Soraia dos Santos Guerra**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Engenheiro Jorge Santos  
Co-orientador: Professor Doutor Luís Passarinha

**Covilhã, Outubro de 2014**



*Esta dissertação não pode ser reproduzida para fins científicos nem exposta em qualquer local público.*



## Agradecimentos

Como em todas as etapas da nossa vida, existiram pessoas que contribuiram para a realização desta dissertação e às quais quero agradecer pelo apoio e amizade na superação de mais uma batalha.

Ao Engenheiro Jorge Santos pelo conhecimento e experiência transmitidos sobre o tema, pela orientação e apoio na criação de ideias, pela ajuda e colaboração no solucionar de dúvidas no decorrer deste trabalho e também por me proporcionar esta experiência única que jamais irei esquecer.

À Doutora Anabela Frazão pela orientação, conhecimento e apoio dados ao longo deste tempo de estágio e pela disponibilidade e ajuda na descoberta de sugestões.

Ao Professor Luís Passarinha pela orientação e ajuda prestadas ao longo destes meses, pelo conhecimento e interesse na procura de soluções e pelo rigor e clareza na elaboração da tese.

Ao Engenheiro Joaquim Queiroga pelo tempo dispensado na leitura e apreciação da minha dissertação.

Aos colegas na CIPAN que rapidamente se tornaram amigos, Marli Ferreira, Cristina Inverno, Sofia Rato, Ana Gama e João Leite, pelo carinho e pela amizade, pois fizeram com que tivesse forças para continuar esta luta e pelo companheirismo ao longo destes meses e a todos os meus amigos, que mesmo longe estiveram sempre perto, por me darem uma palavra de apoio e conforto. Obrigado a todos, pois fizeram toda a diferença.

Ao meu namorado, Ricardo, pelo apoio incondicional em todas as decisões, por toda a força que me transmite e pelo amor que me proporciona todos os dias. Obrigado por caminhares sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Catarina e Carlos, à minha avó e aos pais do Ricardo pela ajuda em ultrapassar os obstáculos, por todo o amor, carinho e força que me deram ao longo destes anos e por sempre acreditarem em mim e nas minhas capacidades para vencer mais esta etapa.

A todos eles, um muito obrigado do fundo do meu coração e é a eles que dedico esta dissertação!



## Resumo

Neste trabalho de investigação pretendeu-se aumentar a produção de desmetiltetraciclina (DMT), tornando-a o produto dominante da fermentação, utilizando uma estirpe de *Streptomyces aureofaciens*, originalmente produtora de desmetilclorotetraciclina (DMCT) e DMT.

Deste modo, procedeu-se ao desenvolvimento e otimização de um meio constituído por diferentes fontes de carbono e azoto que permitiria esta produção de um modo viável, uma vez que a constituição do meio em conjunto com a capacidade metabólica do microrganismo influencia a síntese do produto.

Para isso, foram realizadas várias experiências a nível laboratorial onde foram efetuadas diversas alterações de matérias-primas como o uso de sulfato de amónio, tiosulfato de sódio, corn steep liquor, tiocianato de benzilo, entre outras, de forma a diminuir a concentração de íões cloreto em solução e, conseqüentemente, conduzir ao aumento do produto pretendido, a DMT. Posteriormente, analisou-se quais os efeitos destas variações na produção de desmetiltetraciclina. Estes ensaios foram avaliados tendo em consideração o pH, packed mycelium volume e o rendimento de produção determinado por HPLC.

Os resultados obtidos foram bastante favoráveis, tendo-se destacado o uso de sulfato de amónio que foi essencial para o aumento de DMT, atingindo uma média de produção 7 vezes superior à DMCT.

## Palavras-chave

Desmetiltetraciclina, desmetilclorotetraciclina, *Streptomyces aureofaciens*, fermentação, sulfato de amónio.



## Abstract

The aim of this research is to increase production of demethyltetracycline (DMT) making it the dominant fermentation product by using a strain of *Streptomyces aureofaciens* that originally produces both demethylchlortetracycline (DMCT) and DMT.

Thus, we proceeded to the development and optimization of a culture medium consisting of different sources of carbon and nitrogen that would allow viable production, since the constitution of the medium together with the metabolic capacity of the organism influences the synthesis of the desired product.

For this, several laboratory experiments were conducted where various changes of existing raw materials such as the use of ammonium sulfate, sodium thiosulfate, corn steep liquor, benzyl thiocyanate, among others, in order to reduce the concentration of chloride ions in solution and consequently lead to an increase of the desired product, DMT. Subsequently, we analyzed their effects on the production of demethyltetracycline. These assays were evaluated taking into consideration the pH, packed mycelium volume and the production yield determined by HPLC.

The results were quite favorable, having stood out the use of ammonium sulfate which was essential for the increase of DMT production averaging seven times higher than DMCT.

## Keywords

Demethyltetracycline, demethylchlortetracycline, *Streptomyces aureofaciens*, fermentation, ammonium sulfate.



# Índice

## Capítulo 1

### 1. Introdução

1.1. Tetraciclinas	1
1.2. Minociclina	6
1.3. Desmetilclorotetraciclina e Desmetiltetraciclina	8
1.4. Objetivos do estudo	12

## Capítulo 2

### 2. Material e Métodos

2.1. Reagentes	13
2.2. Meios de Cultura	14
2.3. Material Biológico	16
2.4. Material não Biológico	16
2.5. Equipamento	17
2.6. Método Experimental	17
2.6.1. Inoculação de placas de Petri e seleção de colônias	17
2.6.2. Inoculação de tubos / Frascos de cultura	18
2.6.3. Preparação das suspensões de esporos	18
2.6.4. Teste de suspensões em balão	19
2.6.5. Tratamento das amostras após período de incubação	19

## Capítulo 3

### 3. Apresentação e Discussão dos Resultados

3.1. <u>Experiência 1</u> - Estudo do efeito do Sulfato de Amônio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	22
3.2. <u>Experiência 2</u> - Estudo do efeito do Sal dipotássico 1,3,4-tiazol-2,5-ditiol (C <sub>2</sub> K <sub>2</sub> N <sub>2</sub> S <sub>3</sub> ) no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	26
3.3. <u>Experiência 3</u> - Estudo do efeito do Tiosulfato de Sódio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	39
3.4. <u>Experiência 4</u> - Estudo do efeito de Nutrafin Aqua + Plus no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	58
3.5. <u>Experiência 5</u> - Estudo do efeito de Corn Steep Liquor (CSL) no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	62
3.6. <u>Experiência 6</u> - Estudo do efeito do Citrato Trissódico dihidratado (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O) no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	65
3.7. <u>Experiência 7</u> - Estudo do efeito de uma solução de Micronutrientes no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	69

3.8. <u>Experiência 8</u> - Estudo do efeito do Tiocianato de Benzilo (BTC) no meio fermentativo de <i>S. aureofaciens</i>	73
<u>Capítulo 4</u>	
4. Conclusão	77
<u>Capítulo 5</u>	
5. Perspetivas Futuras	81
<u>Capítulo 6</u>	
6. Bibliografia	83

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> (Adaptado de (4)).	1
<b>Figura 2</b> - Relação estrutura-atividade das tetraciclinas. Sombreado: região de contacto com ribossoma bacteriano; circundado a azul: região comum a todas as tetraciclinas com similaridade de 99%; arco laranja: região modificável a alterações estruturais (Adaptado de (5)).	2
<b>Figura 3</b> - Conformações possíveis e substituintes do anel A que determinam as diferentes atividades das tetraciclinas (Adaptado de (5)).	3
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da clorotetraciclina, tetraciclina de primeira geração (Adaptado de (7)).	3
<b>Figura 5</b> - Esquema ilustrativo que mostra o mecanismo de ação das tetraciclinas (Adaptado de (9)).	4
<b>Figura 6</b> - Estrutura química da Doxiciclina e Minociclina, respetivamente, tetraciclinas de segunda geração (Adaptado de (7)).	5
<b>Figura 7</b> - Estrutura química da Tigeciclina, tetraciclina de terceira geração (Adaptado de (7)).	6
<b>Figura 8</b> - Estrutura química da minociclina e substâncias relacionadas (Adaptado de (16)).	7
<b>Figura 9</b> - Estrutura química da desmetilclorotetraciclina (Adaptado de (21)).	8
<b>Figura 10</b> - Processo de conversão de DMCT em minociclina. Abreviaturas: DMCT, 7-cloro-6-desmetiltetraciclina; DMT, 6-desmetiltetraciclina; DOT.T, sal de 6-desmetil-6-desoxitetraciclina; DOT.B, 6-desmetil-6-desoxitetraciclina; 7-HT, derivado hidrazínico; MC. Sal, sal de minociclina; MC. HCl Bruta, cloridrato de minociclina bruta; MC. HCl Pura, cloridrato de minociclina pura (Adaptado de (22)).	9
<b>Figura 11</b> - Estrutura química da demeclociclina e das suas principais impurezas (Adaptado de (27)).	10
<b>Figura 12</b> - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 1).	22
<b>Figura 13</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 10 ppm (experiência 2).	26
<b>Figura 14</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 20 ppm (experiência 2).	29
<b>Figura 15</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 50 ppm (experiência 2).	32
<b>Figura 16</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 75 ppm (experiência 2).	35
<b>Figura 17</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 80 ppm (experiência 3).	39

<b>Figura 18</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 150 ppm (experiência 3). .....	42
<b>Figura 19</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 300 ppm (experiência 3). .....	45
<b>Figura 20</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 450 ppm (experiência 3). .....	48
<b>Figura 21</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 800 ppm (experiência 3). .....	51
<b>Figura 22</b> - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 1500 ppm (experiência 3). .....	54
<b>Figura 23</b> - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 4). .....	58
<b>Figura 24</b> - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 5). .....	62
<b>Figura 25</b> - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 6). .....	65
<b>Figura 26</b> - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 7). .....	69
<b>Figura 27</b> - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 8). .....	73

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais membros da classe das tetraciclina (Adaptado de (7)).....	6
Tabela 2 - Constituição do meio para placas 656 de <i>Streptomyces aureofaciens</i> . ....	14
Tabela 3 - Constituição do meio para tubos 655 de <i>Streptomyces aureofaciens</i> . ....	14
Tabela 4 - Constituição do meio vegetativo 704 de <i>Streptomyces aureofaciens</i> . ....	15
Tabela 5 - Constituição do meio fermentativo 708 de <i>Streptomyces aureofaciens</i> . ....	15
Tabela 6 - Constituição do meio fermentativo 708/2 de <i>Streptomyces aureofaciens</i> , semelhante ao meio 708 mas com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em substituição de NH <sub>4</sub> Cl. ....	15
Tabela 7 - Constituição da solução de micronutrientes (experiência 7). ....	16
Tabela 8 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 1). ....	22
Tabela 9 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 1). ....	23
Tabela 10 - Registo dos resultados obtidos na experiência 1. ....	24
Tabela 11 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 1. ....	25
Tabela 12 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2). ....	26
Tabela 13 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 10 ppm (experiência 2). ....	27
Tabela 14 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 10 ppm, na experiência 2. ....	27
Tabela 15 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 10 ppm. ....	28
Tabela 16 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2). ....	29
Tabela 17 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 20 ppm (experiência 2). ....	30
Tabela 18 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 20 ppm, na experiência 2. ....	30
Tabela 19 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 20 ppm. ....	31
Tabela 20 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2). ....	32
Tabela 21 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 50 ppm (experiência 2). ....	33
Tabela 22 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 50 ppm, na experiência 2. ....	33
Tabela 23 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 50 ppm. ....	34
Tabela 24 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2). ....	35
Tabela 25 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 75 ppm (experiência 2). ....	36

Tabela 26 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 75 ppm, na experiência 2. ....	36
Tabela 27 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 75 ppm. ....	37
Tabela 28 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3). ....	40
Tabela 29 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 80 ppm (experiência 3). ....	40
Tabela 30 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 80 ppm, na experiência 3. ....	40
Tabela 31 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 80 ppm. ....	41
Tabela 32 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3). ....	42
Tabela 33 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meio para a concentração de 150 ppm (experiência 3).....	43
Tabela 34 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 150 ppm, na experiência 3. ....	43
Tabela 35 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 150 ppm.....	44
Tabela 36 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3). ....	45
Tabela 37 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 300 ppm (experiência 3).....	45
Tabela 38 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 300 ppm, na experiência 3. ....	46
Tabela 39 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 300 ppm.....	47
Tabela 40 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3). ....	48
Tabela 41 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 450 ppm (experiência 3).....	48
Tabela 42 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 450 ppm, na experiência 3. ....	49
Tabela 43 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 450 ppm.....	50
Tabela 44 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3). ....	51
Tabela 45 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 800 ppm (experiência 3).....	51
Tabela 46 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 800 ppm, na experiência 3. ....	52
Tabela 47 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 800 ppm.....	53
Tabela 48 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3). ....	54

Tabela 49 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 1500 ppm (experiência 3). .....	54
Tabela 50 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 1500 ppm, na experiência 3. ....	55
Tabela 51 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 1500 ppm. ....	56
Tabela 52 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 4). ....	58
Tabela 53 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 4). ....	59
Tabela 54 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 4. ....	59
Tabela 55 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 4, para a adição de ambos os volumes de Aqua + plus.....	60
Tabela 56 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 5). ....	62
Tabela 57 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 5). ....	62
Tabela 58 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 5. ....	63
Tabela 59 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 5. ....	64
Tabela 60 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 6). ....	65
Tabela 61 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 6). ....	65
Tabela 62 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 6. ....	66
Tabela 63 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 6. ....	67
Tabela 64 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 7). ....	69
Tabela 65 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 7). ....	69
Tabela 66 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 7. ....	70
Tabela 67 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 7. ....	71
Tabela 68 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 8). ....	73
Tabela 69 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 8). ....	73
Tabela 70 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 8. ....	74
Tabela 71 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 8. ....	75



## Lista de Acrónimos

4-EMC	4-epiminociclina
6-DODMTC	6-desoxi-6-desmetiltetraciclina
7-AT	7-amino-6-desmetil-6-desoxitetraciclina
7-DDMMC	7-didesmetilminociclina
7-HT	Derivado hidrazínico
7-MDMMC	7-monodesmetilminociclina
9-MC	9-minociclina
BTC	Tiocianato de Benzilo
CIPAN	Companhia Industrial Produtora de Antibióticos
CSL	Corn Steep Liquor
DMCT	Desmetilclorotetraciclina
DMT	Desmetiltetraciclina
DOT.B	6-desmetil-6-desoxitetraciclina
DOT.T	Sal de 6-desmetil-6-desoxitetraciclina
EDMCT	Epidesmetilclorotetraciclina
EDMT	Epidesmetiltetraciclina
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fácil Metabolização
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
MC	Minociclina
PMV	Packed Mycelium Volume
PPM	Partes Por Milhão
Q.B.	Quanto baste
RPM	Rotações por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tetraciclina



# Capítulo 1

## 1. Introdução

### 1.1. Tetraciclina

As tetraciclina (TC) foram descobertas em 1948 como produtos naturais de fermentação por uma bactéria do solo denominada *Streptomyces* (1).

O género *Streptomyces* é representado pelo maior número de espécies e variedades, produzindo a maioria dos antibióticos conhecidos entre a família Actinomycetaceae (2).

As espécies *Streptomyces* são amplamente reconhecidas como os organismos industrialmente importantes pela sua capacidade de produzirem diferentes tipos de metabolitos secundários (3). O ciclo de vida de *Streptomyces* é apresentado na figura 1.

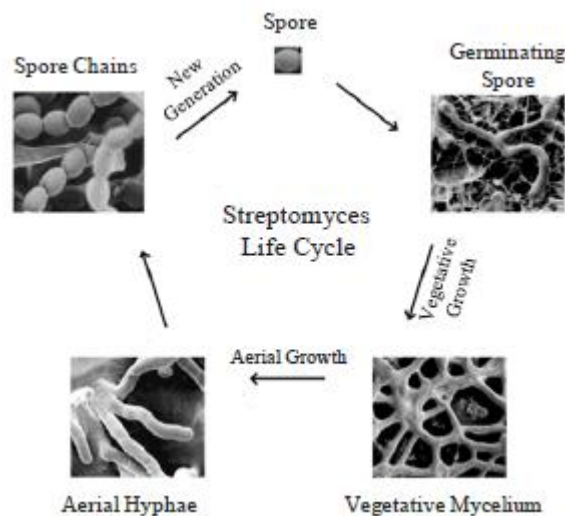


Figura 1 - Ciclo de vida de *Streptomyces* (Adaptado de (4)).

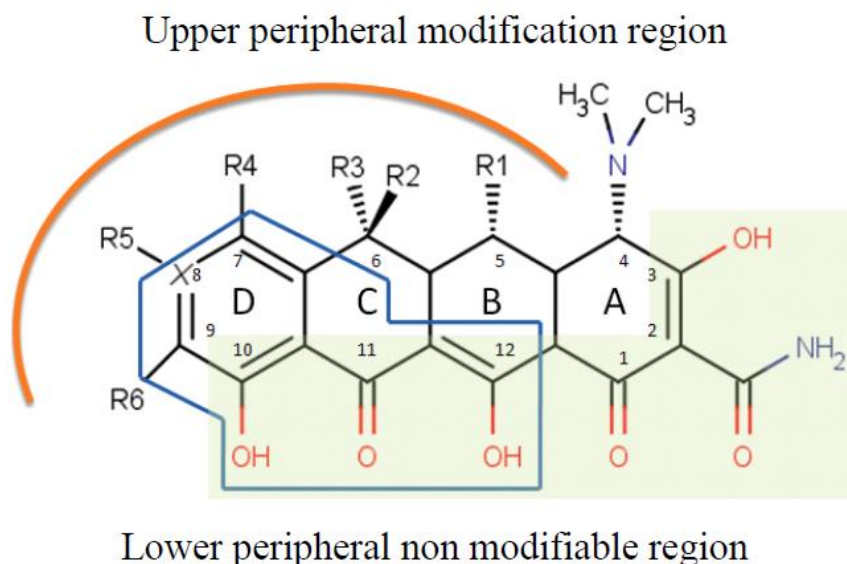
A capacidade das culturas de *Streptomyces* para formar os antibióticos não é uma qualidade fixa, esta tem de ser controlada em diferentes condições de nutrição e cultivo. Portanto, a constituição do meio em conjunto com a capacidade metabólica do organismo influencia a biossíntese do antibiótico (2).

A estrutura química das tetraciclinas consiste num sistema de anel tetracíclico, rodeado por zonas periféricas superiores e inferiores fortemente oxidadas (figura 2). Estas contêm vários grupos funcionais e substituintes em diferentes posições (1).

Uma tetraciclina ativa, ou seja, com atividade antibacteriana, deve possuir um sistema de anéis naftaceno DCBA, dispostos linearmente. Para exercerem a sua função corretamente, a molécula das tetraciclinas tem de ser composta por um grupo dimetilamino na posição C4 e tautómeros cetona-enólicos na posição C1 e C3 do anel A. As várias conformações do anel A, que determinam qual a sua atividade específica, estão apresentadas na figura 3. É ainda requerido um fenol na posição C10 e uma estrutura cetona-enol no C11-C12 em conjunto com o grupo 12a-OH, na zona periférica inferior (5).

Desta forma, todos estes substituintes são indispensáveis para o reconhecimento e ligação às subunidades do ribossoma. Qualquer modificação química nestes grupos da molécula suprime a sua bioatividade (5).

A região que é suscetível a alterações estruturais está localizada na zona periférica superior, particularmente nas posições C5 até C9 da molécula. Esta região é responsável pela formação de novas tetraciclinas, sendo o anel D o mais flexível de alterar (1).



**Figura 2** - Relação estrutura-atividade das tetraciclinas. Sombreado: região de contacto com ribossoma bacteriano; circundado a azul: região comum a todas as tetraciclinas com similaridade de 99%; arco laranja: região modificável a alterações estruturais (Adaptado de (5)).

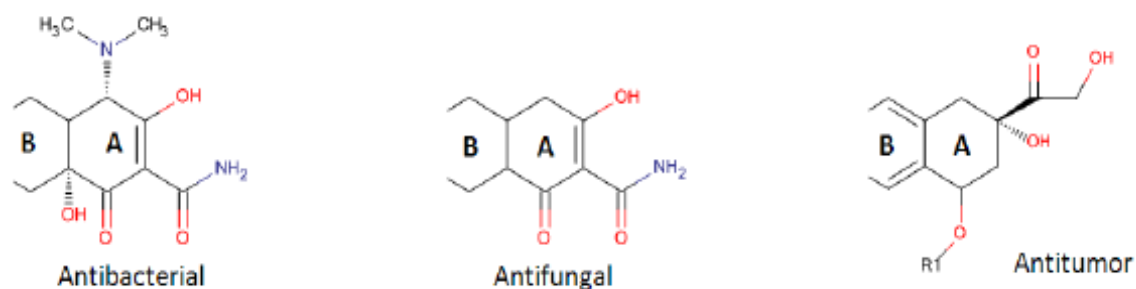


Figura 3 - Conformações possíveis e substituintes do anel A que determinam as diferentes atividades das tetraciclina (Adaptado de (5)).

A primeira tetraciclina quimicamente purificada foi a clorotetraciclina (figura 4) (1). Esta foi isolada a partir de *Streptomyces aureofaciens* e nomeada como aureomicina devido à sua cor amarela (6).

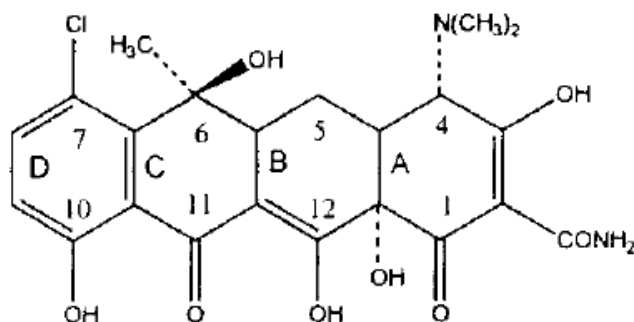


Figura 4 - Estrutura química da clorotetraciclina, tetraciclina de primeira geração (Adaptado de (7)).

Atualmente existem três grupos de tetraciclina: as naturais, as semissintéticas e as tetraciclina quimicamente modificadas (1). As tetraciclina de primeira geração ou naturais são obtidas por biossíntese, enquanto que as TC de segunda geração derivam das primeiras, logo são chamadas de semissintéticas. Por último, as TC de terceira geração são obtidas por síntese total (5).

A importância das tetraciclina é reconhecida devido à sua efetividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e -negativas, organismos como clamídeas, micoplasmas e rickettsias e alguns protozoários (6). As favoráveis propriedades antimicrobianas destes agentes e a ausência de efeitos secundários adversos levaram à sua ampla utilização no tratamento de infecções em seres humanos e animais (7) (8).

As tetraciclina são antibióticos de largo espectro que atuam ao nível do ribossoma onde interferem com a síntese de proteínas ao impedir a associação do RNA aminoacil transferase

com o ribossoma bacteriano, impedindo assim a adição de novos aminoácidos na cadeia polipeptídica em formação (figura 5) (7) (9) (10).

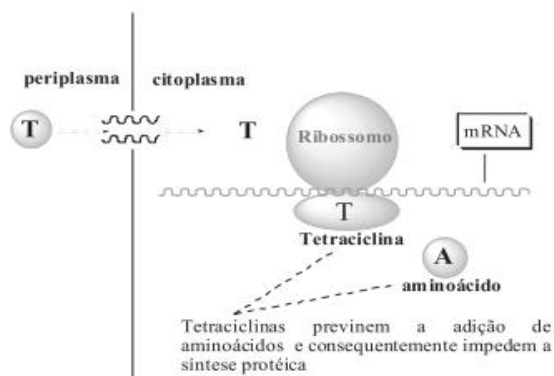


Figura 5 - Esquema ilustrativo que mostra o mecanismo de ação das tetraciclinas (Adaptado de (9)).

Para interagir com os seus alvos, estas moléculas necessitam de atravessar um ou mais sistemas de membranas, dependendo se o organismo é suscetível a bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (7).

Para além de atuarem como antibióticos, as ações biológicas das tetraciclinas podem também afetar a inflamação (11) (12), apoptose (13), proliferação celular (1), metabolismo ósseo (14) e angiogénese (15).

Deste modo, todas estas ações conduziram ao aparecimento de mecanismos de resistência e a uma diminuição na eficácia das tetraciclinas como antibióticos de primeira linha (6).

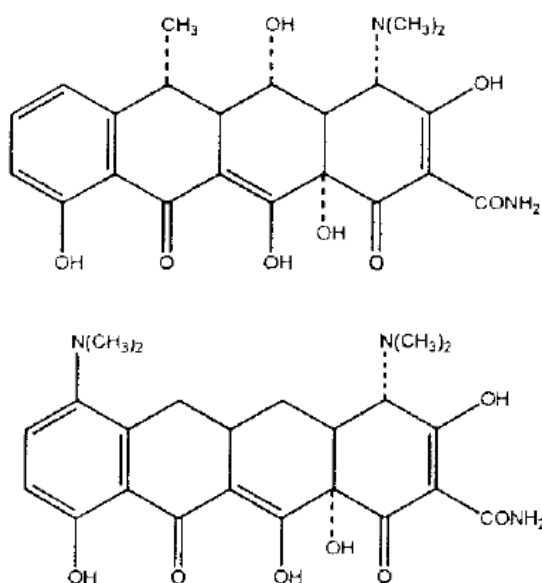
Os mecanismos clínicos mais importantes de resistência às tetraciclinas resultam da aquisição de genes de resistência à tetraciclina (*tet*), que codificam proteínas que conferem o efluxo de tetraciclina, ou proteção ribossomal (10).

No mecanismo por efluxo, característico de bactérias Gram-negativas, há uma diminuição do acesso das tetraciclinas ao ribossoma por redução da concentração intracelular de antibiótico. Neste mecanismo, proteínas transmembranares (Tet A) exportam as tetraciclinas para fora da célula, provocando um decréscimo da concentração de antibiótico dentro da célula bacteriana. A Tet A acopla o transporte de uma molécula de tetraciclina, na forma de um complexo de Mg(II), [TCMg], de dentro para fora da célula (9).

No mecanismo por proteção ribossomal, proteínas citoplasmáticas protegem o ribossoma da ação das tetraciclinas e a síntese proteica prossegue normalmente. Em bactérias mais sensíveis, as tetraciclinas ligam-se ao ribossoma interrompendo a síntese proteica (9).

Atualmente existem 40 genes de resistência às tetraciclina (6) (8).

A gravidade desta resistência bacteriana criou a necessidade de desenvolver novos derivados de forma a combater esses mecanismos. Para alcançar este objetivo, apareceram as variantes semissintéticas que vieram representar a segunda geração de tetraciclina. Dentro deste grupo as mais importantes são a minociclina e a doxiciclina (figura 6), que são produzidas a partir de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina (desmetilclorotetraciclina) e oxitetraciclina, respectivamente. Estes análogos são mais lipofílicos que os seus precursores o que faz com que a absorção para dentro da célula seja mais eficiente. No entanto, ambas foram ineficazes quando expostas a mecanismos de resistência de proteção ribossomal (6).



**Figura 6** - Estrutura química da Doxiciclina e Minociclina, respectivamente, tetraciclina de segunda geração (Adaptado de (7)).

Depois de um longo período de desenvolvimento, surgiram as glicilciclina ou a chamada terceira geração de tetraciclina. A tigeciclina é o único membro representativo deste grupo (figura 7). Estas tetraciclina têm modificações na posição C9 relativamente à estrutura da minociclina, o que leva a que sejam eficazes a mecanismos de resistência de proteção ribossomal, tornando-as uma opção viável contra infecções resistentes à tetraciclina (6).

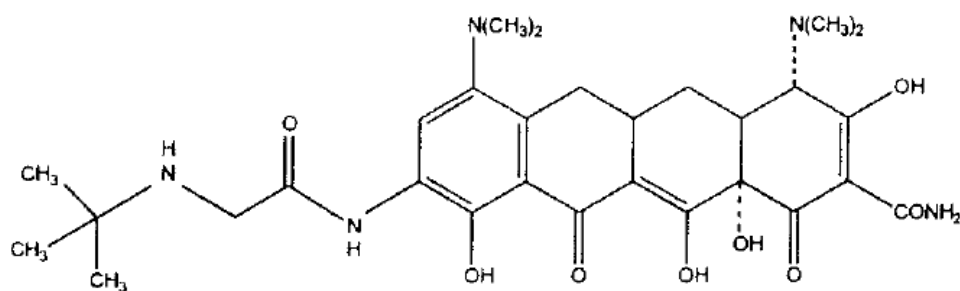


Figura 7 - Estrutura química da Tigeciclina, tetraciclina de terceira geração (Adaptado de (7)).

Os antibióticos referidos na tabela 1 representam a primeira geração (1948 até 1963), segunda geração (1965 até 1972) e terceira geração de tetraciclina (7).

Tabela 1 - Principais membros da classe das tetraciclina (Adaptado de (7)).

Nome químico	Nome genérico	Nome comercial	Ano de descoberta
7-Clorotetraciclina	Clorotetraciclina	<i>Aureomycin</i>	1948
5-Hidroxitetraciclina	Oxitetraciclina	<i>Terramycin</i>	1948
Tetraciclina	Tetraciclina	<i>Achromycin</i>	1953
6-Desmetil-7-clorotetraciclina	Desmetilclorotetraciclina	<i>Declomycin</i>	1957
2-N-Pirrolidinametiltetraciclina	Rolitetraciclina	<i>Reverin</i>	1958
2-N-Lisinometiltetraciclina	Limeciclina	<i>Tetralysal</i>	1961
N-Metilol-7-clorotetraciclina	Clomociclina	<i>Megaclor</i>	1963
6-Metileno-5-hidroxitetraciclina	Metaciclina	<i>Randomycin</i>	1965
6-Desoxi-5-hidroxitetraciclina	Doxiciclina	<i>Vibramycin</i>	1967
7-Dimetilamino-6-desmetil-6-desoxitetraciclina	Minociclina	<i>Minocina</i>	1972
9-(t-butilglicilamido)-minociclina	Terciário-butilglicilamidominociclina	<i>Tigilcyclin</i>	1993

## 1.2. Minociclina

A minociclina (MC) ou 7-dimetilamino-6-desmetil-6-desoxitetraciclina é uma tetraciclina semissintética usada no tratamento de uma grande variedade de agentes patogênicos extracelulares ou intracelulares (16).

Este antibiótico foi aprovado pela FDA e indicado (100-200 mg/dia) para o acne vulgaris, algumas doenças sexualmente transmissíveis e artrite reumatoide (17).

A minociclina tem sido usada há mais de 30 anos. É uma molécula altamente lipofílica que pode passar facilmente a barreira hemato-encefálica, permitindo a sua utilização no tratamento de muitas doenças do sistema nervoso central (SNC). Esta exibe atividade antibiótica, devido à sua capacidade para se ligar à subunidade ribossômica das bactérias e inibir a síntese de proteínas (18).

Mais recentemente, vários estudos têm demonstrado uma variedade de ações biológicas para além da sua atividade antimicrobiana, incluindo as atividades anti-inflamatórias (19) e anti-apoptóticas (20), a inibição da proteólise, assim como a supressão da angiogénese e metástases tumorais (1) (18).

Como esta tetraciclina é produzida por modificação química da desmetilclorotetraciclina contém diversos compostos relacionados estruturalmente denominados como impurezas tais como 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina (6-DODMTC), 7-didesmetilminociclina (7-DDMMC) e 7-monodesmetilminociclina (7-MDMMC). A 9-minociclina (9-MC) é um produto secundário, enquanto a 4-epiminociclina (4-EMC) é um produto de degradação e é a principal impureza (figura 8) (16).

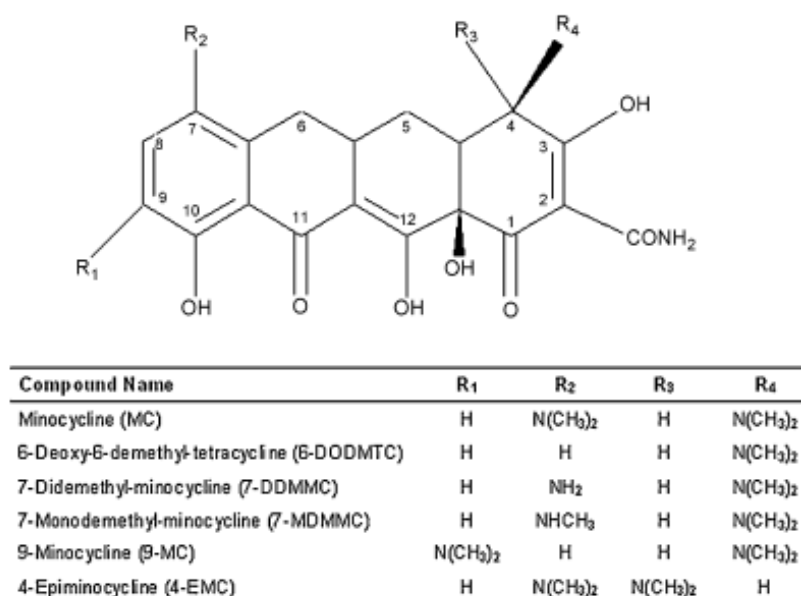


Figura 8 - Estrutura química da minociclina e substâncias relacionadas (Adaptado de (16)).

### 1.3. Desmetilclorotetraciclina e Desmetiltetraciclina

A desmetilclorotetraciclina (DMCT), também designada por demeclociclina, é um antibiótico com um peso molecular de 465 Da, produzida em escala industrial na CIPAN S.A., por fermentação de uma estirpe de *Streptomyces aureofaciens* (21).

Como outras tetraciclinas, DMCT apresenta um largo espectro de efetividade e é bastante tolerada pelos humanos. A fórmula química da desmetilclorotetraciclina é  $C_{21}H_{21}ClN_2O_8$  e na figura 9 está representada a sua estrutura (21).

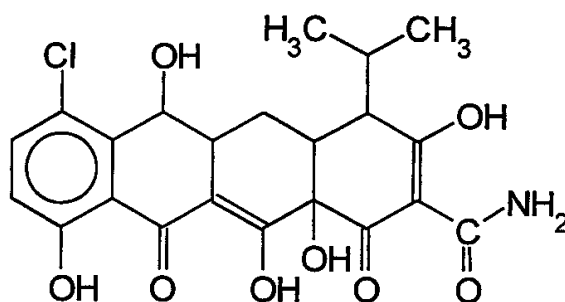
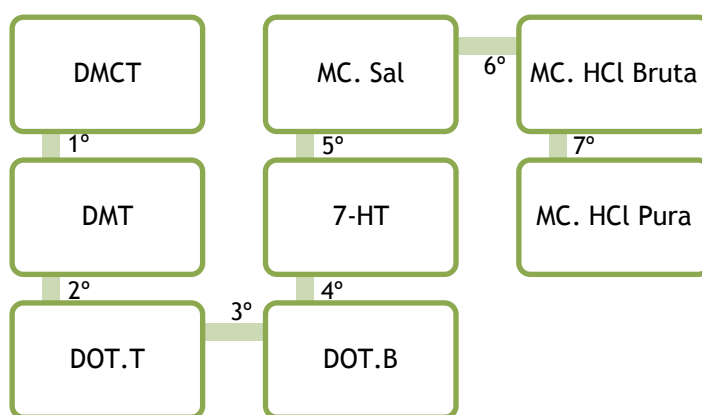


Figura 9 - Estrutura química da desmetilclorotetraciclina (Adaptado de (21)).

A empresa AtralCipan tem como principais processos a fermentação de desmetilclorotetraciclina (demeclociclina) e a síntese química da minociclina (22).

A desmetilclorotetraciclina é usada, basicamente, como matéria-prima para a produção de um antibiótico de semisíntese - a minociclina (23).

O processo de conversão da desmetilclorotetraciclina em minociclina pode ser visualizado na figura 10. Este consiste em sete passos essenciais, cujo primeiro é a transformação de desmetilclorotetraciclina em desmetiltetraciclina (22).



**Figura 10** - Processo de conversão de DMCT em minociclina. Abreviaturas: DMCT, 7-cloro-6-desmetiltetraciclina; DMT, 6-desmetiltetraciclina; DOT.T, sal de 6-desmetil-6-desoxitetraciclina; DOT.B, 6-desmetil-6-desoxitetraciclina; 7-HT, derivado hidrazínico; MC. Sal, sal de minociclina; MC. HCl Bruta, cloridrato de minociclina bruta; MC. HCl Pura, cloridrato de minociclina pura (Adaptado de (22)).

A 6-desmetiltetraciclina (DMT) difere da tetraciclina na falta de um grupo metil na posição 6 da molécula da tetraciclina (24).

A produção de 6-desmetiltetraciclina pode ser descrita de duas formas distintas. O primeiro processo consiste na fermentação de estirpes mutantes de *Streptomyces aureofaciens* (24).

As espécies *S. aureofaciens* são conhecidas por produzir, em condições de fermentação convencionais, o antibiótico clorotetraciclina, enquanto que algumas modificações controladas no meio de cultura levam à produção simultânea de clorotetraciclina e tetraciclina. Deste modo, uma estirpe mutante de *S. aureofaciens* tende a produzir 6-desmetilclorotetraciclina e paralelamente 6-desmetiltetraciclina, ainda que em menor quantidade (24).

A produção única de 6-desmetiltetraciclina implica um procedimento complicado e um corte no rendimento na separação das substâncias antibióticas relacionadas (24).

Outro método conhecido para produzir DMT consiste na hidrogenação catalítica de 6-desmetilclorotetraciclina com base num catalisador de paládio suportado em carvão ativado (24). Atualmente, este é o processo de produção efetuado na empresa AtralCipan. O objetivo da reação de hidrogenação é, a partir da DMCT, retirar o cloro da posição 7, que é substituído por um átomo de hidrogénio obtendo o produto de reação, a DMT (22).

Para além destes, têm sido descritos numerosos processos que podem levar à produção de desmetiltetraclina por fermentação. Um primeiro exemplo consiste na produção de tetraciclina por um organismo produtor de clorotetraciclina num meio no qual os iões de cloro tenham sido reduzidos, eventualmente por troca iónica ou através de diálise (25).

Outro procedimento compreende a produção de tetraciclina num meio de fermentação isento de cloro em que ocorre a precipitação dos íons de cloro por nitrato de prata. Outro diz que a razão tetraciclina/clorotetraciclina no produto de fermentação é aumentada pela adição de íons brometo a um meio contendo cloreto (25).

Um último método caracteriza-se pela produção fermentativa de tetraciclina, em que os meios nutritivos contêm inibidores de cloração (25).

Estes processos de fermentação apresentam duas desvantagens, por um lado são dispendiosos na preparação de meios livres de íons cloro, por outro são ineficientes uma vez que o uso frequente de inibidores de cloração leva a que os organismos produtores de tetraciclina sejam sensivelmente reduzidos (25).

A produção de metabolitos secundários é um processo influenciado por diversos fatores físico-químicos, incluindo o fornecimento de nutrientes, a oxigenação, temperatura e pH. Estes fatores têm sido tradicionalmente controlados e otimizados em fermentações industriais, a fim de aumentar a produção dos metabolitos (26).

Neste caso, as fermentações são conduzidas durante cerca de 200 horas, com um pH entre 6,0 e 6,2 e a temperatura compreendida entre 26 e 29°C (21).

O meio de fermentação tem como fontes de carbono o amido de milho e a dextrina e, como fontes de azoto a pharmanédia, a farinha de soja e o cloreto de amónio. O carbonato de cálcio é usado como um tampão e o óleo de soja como um agente anti-espuma. Vários sais inorgânicos, também são utilizados para fornecer as necessidades do microrganismo (21).

A DMCT, como outras tetraciclinas, sofre epimerização na posição C4, resultando a epidesmetilclorotetraciclina (EDMCT). Por sua vez, da DMT resulta a epidesmetiltetraciclina (EDMT). As estruturas da demeclociclina e das suas principais impurezas são apresentadas na figura 11 (27).

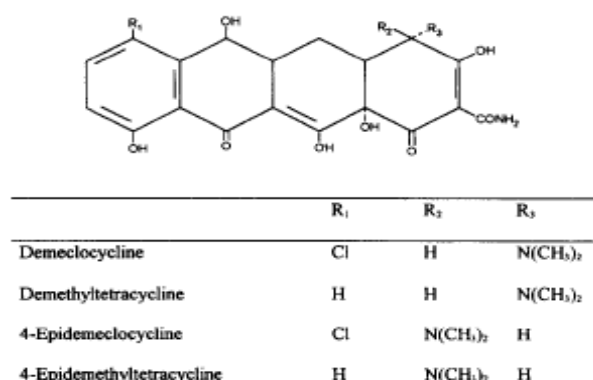


Figura 11 - Estrutura química da demeclociclina e das suas principais impurezas (Adaptado de (27)).

A determinação da concentração de desmetilclorotetraciclina e dos seus produtos relacionados podem ser analisados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção ultravioleta (21).

#### 1.4. Objetivos do Estudo

O presente trabalho tem como objetivo otimizar a produção de desmetiltetraciclina por via fermentativa utilizando uma estirpe de *Streptomyces aureofaciens* originalmente produtora de desmetilclorotetraciclina.

Ambos os antibióticos são produzidos por *S. aureofaciens*, no entanto a DMCT é produzida em maior quantidade que a DMT.

Como a DMT é um produto com maior importância para a CIPAN S.A. que a DMCT urge otimizar a produção deste composto para valores semelhantes aos obtidos para a produção de DMCT.

A necessidade de produção deste antibiótico em quantidades mais elevadas deve-se ao facto de este ser usado como matéria-prima para a síntese de minociclina. Desta forma, já não seria necessário efetuar o processo de hidrogenação de desmetilclorotetraciclina, usando um catalisador de paládio suportado em carvão ativado, sendo este um método demasiado dispendioso para a empresa.

Deste modo, ao longo deste projeto o objetivo é desenvolver e otimizar um meio de cultura que permita esta produção de um modo viável a nível industrial, analisando quais os efeitos às alterações efetuadas no meio, relativamente à produção de DMT.

## Capítulo 2

### 2. Material e Métodos

#### 2.1. Reagentes

Para a realização deste trabalho foi necessário o uso de diversos reagentes. Durante todo o seu processo de utilização, manuseamento e preparação de meios, foi confirmado que o material se encontrava lavado e em bom estado de utilização assegurando deste modo ótimas condições de manuseamento. O material é esterilizado de acordo com as indicações do documento C220IT05033\_2 - Preparação do material e fardamento para esterilização em autoclave.

A listagem dos reagentes encontra-se abaixo descrita:

- Água destilada;
- Amido de Milho;
- Aqua + Plus;
- Carbonato de Cálcio,  $\text{CaCO}_3$  MVM;
- Caseína;
- Citrato trissódico dihidratado,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;
- Cloreto de Amônio,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;
- Cloreto de Cobalto hexahidratado,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;
- Corn Steep Liquor;
- Desmetiltetraciclina;
- Dextrina FM;
- Levedura de Cerveja;
- Óleo de Soja;
- Pharmamédia;
- Sal dipotássico 1,3,4-tiazol-2,5-ditiol,  $\text{C}_2\text{K}_2\text{N}_2\text{S}_3$ ;
- Sulfato de Amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;
- Sulfato de Cobre pentahidratado,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;
- Sulfato de Ferro heptahidratado,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- Sulfato de Manganês monohidratado,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- Sulfato de Zinco heptahidratado,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- Tiocianato de benzilo;

- Tiosulfato de sódio, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

## 2.2. Meios de Cultura

A constituição dos meios usados ao longo da dissertação pode ser visualizada nas tabelas 2 até 7, bem como a quantidade utilizada de cada matéria-prima e o respectivo lote. Para garantir a viabilidade dos resultados obtidos, foi verificado que todos os lotes se encontravam dentro do prazo de validade e em boas condições de utilização.

Tabela 2 - Constituição do meio para placas 656 de *Streptomyces aureofaciens*.

Meio 656		
Matéria-Prima	Quantidade	Lote
CSL	10 g	03/13
Sacarose	10 g	0296C
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	132468
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g	13J290003
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g	382353
Agar	25 g	2150413
H <sub>2</sub> O destilada q.b.	1000 mL	-

Nota: O pH do meio é corrigido a 6,40, antes de esterilização em autoclave.

Tabela 3 - Constituição do meio para tubos 655 de *Streptomyces aureofaciens*.

Meio 655		
Matéria-Prima	Quantidade	Lote
CSL	8,5 g	03/13
Sacarose	10 g	0296C
Extrato de Malte	5 g	2116016
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g	132468
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g	382353
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g	13J290003
Agar	25 g	2150413
H <sub>2</sub> O destilada q.b.	1000 mL	-

Nota: O pH do meio é corrigido a 7,00, antes de esterilização em autoclave.

Tabela 4 - Constituição do meio vegetativo 704 de *Streptomyces aureofaciens*.

Meio 704		
Matéria-Prima	Quantidade	Lote
CSL	38 g	03/13
Dextrina FM	20 g	01/12
Pharmamédia	2 g	01/12
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	04/13
CaCO <sub>3</sub> mvm	6 g	01/12
Óleo de Soja	0,1 mL/b	03/12
H <sub>2</sub> O destilada q.b.	1000 mL	-

Tabela 5 - Constituição do meio fermentativo 708 de *Streptomyces aureofaciens*.

Meio 708		
Matéria-Prima	Quantidade	Lote
Dextrina FM	20 g	01/12
Amido de Milho	20 g	01/12
Pharmamédia	40 g	01/12
Levedura de Cerveja	1 g	02/12
NH <sub>4</sub> Cl	1 g	131020027
CaCO <sub>3</sub> mvm	5 g	01/12
Caseína	3,5 g	01/12
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05 g	80310
Óleo de Soja	0,9 mL/b	03/12
H <sub>2</sub> O destilada q.b.	1000 mL	-

Tabela 6 - Constituição do meio fermentativo 708/2 de *Streptomyces aureofaciens*, semelhante ao meio 708 mas com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em substituição de NH<sub>4</sub>Cl.

Meio 708/2		
Matéria-Prima	Quantidade	Lote
Dextrina FM	20 g	01/12
Amido de Milho	20 g	01/12
Pharmamédia	40 g	01/12
Levedura de Cerveja	1 g	02/12
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,23 g	04/13
CaCO <sub>3</sub> mvm	5 g	01/12
Caseína	3,5 g	01/12
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05 g	80310
Óleo de Soja	0,9 mL/b	03/12
H <sub>2</sub> O destilada q.b.	1000 mL	-

Tabela 7 - Constituição da solução de micronutrientes (experiência 7).

Matéria-Prima	Quantidade	Lote
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2 g	402808
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5 g	SLBC1104V
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5 g	A0331854
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25 g	STBC2891V
H <sub>2</sub> O destilada q.b.	50 mL	-

A composição dos restantes meios utilizados foi semelhante à do meio descrito na tabela 5, com a única diferença na adição do reagente que estava a ser estudado.

### 2.3. Material Biológico

O material biológico utilizado no decorrer do estudo de otimização da produção de desmetiltetraciclina foi o microrganismo *Streptomyces aureofaciens*. Este pode ser usado de duas formas distintas, através de uma suspensão de esporos ou de um liofilizado. As suspensões são guardadas no frigorífico e são utilizáveis durante 1 a 2 meses. Por outro lado, a liofilização é efetuada através da mistura da suspensão de esporos com Skim Milk (20% p/v) na proporção de 1:4 e liofilizando-se volumes de cerca de 0,4 mL. Os liofilizados podem ser conservados durante vários anos, não apresentando limite máximo de conservação. Por experiência da empresa, liofilizados com 12 anos de conservação encontram-se em ótimo estado de utilização.

### 2.4. Material Não Biológico

- Ansas;
- Balões de pirex com septo de 500 mL;
- Balões de pirex de 250 mL;
- Cestos de autoclave;
- Copos de plástico;
- Elásticos;
- Espátulas;
- Folha de pano para esterilização;
- Pipetas descartáveis 1 mL e 2 mL;
- Raspadores;
- Tampas vileda para balões;

- Varetas.

Todos estes materiais foram devidamente lavados e/ou esterilizados quando necessário.

## 2.5. Equipamento

Para a realização deste trabalho foi necessária a utilização de vários equipamentos. Estes são submetidos regularmente a uma verificação adequada de forma a garantir não só o bom funcionamento do aparelho mas também a viabilidade dos resultados obtidos.

A listagem dos equipamentos bem como a sua marca encontra-se abaixo descrita:

- Agitador alternativo, New Brunswick;
- Agitador rotativo, New Brunswick;
- Autoclave, Fedegari;
- Balança analítica, Mettler Toledo AG204;
- Balança de laboratório, Mettler PM2000;
- Balança de laboratório, Mettler;
- Câmaras de Incubação 31-A e 40;
- Centrífuga, Hermle Z320;
- Medidor de pH, MeterLab.

## 2.6. Método Experimental

### 2.6.1. Inoculação de placas de Petri e seleção de colónias

Fazem-se cerca de 8 a 10 diluições de 1 mL:10 mL de soro fisiológico estéril de uma suspensão de esporos de *S. aureofaciens* ou de um liofilizado. Em seguida, inoculam-se 5 a 6 placas de Petri, contendo 23 mL de meio 656, com 0,1 mL das últimas 6 ou 7 diluições. Incubam-se as placas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 8 a 10 dias.

No fim deste período, as placas deverão apresentar colónias redondas com contorno regular, pouco elevadas, de cor castanha no centro e creme no rebordo.

## 2.6.2. Inoculação de tubos / frascos de cultura

- Tubos

Recolhem-se 4 a 5 colónias para inocular séries de 4 tubos, contendo 18 mL de meio 655 em rampa. Transfere-se as colónias para um tubo estéril contendo 1 mL de soro fisiológico estéril e com o auxílio de uma pipeta de vidro procede-se à sua homogeneização. Inocula-se cada slant com 0,2 mL desta suspensão. Após inoculação, incubam-se os tubos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 11 a 13 dias.

No fim deste período, os tubos deverão estar uniformemente esporulados e apresentarem uma coloração branca acinzentada.

- Frascos de cultura

Inoculam-se os frascos *CellStar*, contendo 200 mL de meio 655, com 2 mL de uma suspensão de esporos ou 10 colónias. A quantidade de meio usada em cada frasco é esterilizada individualmente em frascos graduados com rosca e só depois vertido para os frascos *CellStar*. Após inoculação, incubam-se os frascos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 11 a 13 dias.

No fim deste período, os frascos deverão apresentar as mesmas características acima mencionadas para os tubos.

## 2.6.3. Preparação das suspensões de esporos

- Tubos

Adicionam-se 4 a 5 mL de soro fisiológico estéril a cada tubo e com uma ansa/raspador soltam-se os esporos que se suspendem nessa solução. Recolhe-se a suspensão de esporos (derivada de colónias) com uma pipeta para um balão estéril devidamente marcado com: nome da estirpe, nome da nova suspensão, nome da suspensão que lhe deu origem e data da preparação.

- Frascos de cultura

Adicionam-se 40 a 50 mL de soro fisiológico estéril a cada frasco e procede-se de forma semelhante ao que foi acima descrito para os tubos.

Ambas as suspensões obtidas são guardadas no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo utilizáveis durante 1 a 2 meses.

#### 2.6.4. Teste de suspensões em balão

Inocula-se um balão de 500 mL, contendo 50 mL de meio 704, com 0,2 mL de cada suspensão de esporos e incuba-se a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  num agitador alternativo com 120 rotações por minuto (rpm), durante cerca de 48 horas.

No fim deste período, a cultura terá normalmente um pH de  $6,00 \pm 0,5$  e um volume micelar (pmv ou sedimento) entre 6 e 11%.

Antes da inoculação, pesam-se os balões fermentativos uma única vez. Esta operação repete-se após o período de fermentação. Com base nestes valores calcula-se a percentagem de evaporação que ocorreu no meio, o que permite fazer uma correção dos valores obtidos no doseamento por HPLC com deteção ultravioleta.

Posteriormente, utilizam-se 2,5 mL desta cultura e inocula-se um balão de 250 mL, contendo 30 mL de meio 708. Incubam-se a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  num agitador rotativo com 250 rpm, durante cerca de 168 horas.

#### 2.6.5. Tratamento das amostras após o período de incubação

Retiram-se os balões do agitador e pesam-se. Uniformiza-se ou homogeneiza-se o melhor possível o seu conteúdo e lê-se o pH. Envia-se as amostras para o Controlo de Qualidade para doseamento em HPLC com deteção ultravioleta.

Este procedimento experimental está de acordo com as indicações do documento C220IT05002\_5 - Cpn15B *Streptomyces aureofaciens*, na empresa.



## Capítulo 3

### 3. Apresentação e Discussão dos Resultados

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar um meio de cultura 708 para a produção de desmetiltetraciclina por via fermentativa, usando uma estirpe de *Streptomyces aureofaciens*.

Os meios de cultura utilizados são meios complexos constituídos por fontes de carbono e azoto e suplementados com micronutrientes, que em conjunto com o controlo de temperatura, pH e agitação, permitem otimizar o processo fermentativo (21).

Com a influência que os meios têm na produção dos antibióticos é possível, com alterações controladas dos constituintes, mudar o perfil dos metabolitos, ou seja, utilizando o meio de cultura base verifica-se maior produção de DMCT em relação à DMT, mas com algumas modificações na sua constituição pode-se inverter essa produção.

Para tal, no meio fermentativo já existente foram efetuadas várias alterações, adicionar e/ou retirar matérias-primas, usar inibidores de cloração, indutores de produção de tetraciclina e também acrescentar micronutrientes que ajudam no desenvolvimento do microrganismo.

A desmetilclorotetraciclina difere da desmetiltetraciclina, principalmente, na presença de iões cloro. Deste modo, o principal foco foi a remoção e/ou inibição desses mesmos iões no meio fermentativo.

Cada experiência é sempre realizada em triplicado, utilizando duas suspensões diferentes para confirmação dos resultados, o meio vegetativo mantém a sua constituição inicial enquanto que o meio fermentativo foi sujeito a várias modificações em termos de composição. O período de incubação foi de 8 dias.

### 3.1. Experiência 1 - Estudo do efeito do Sulfato de Amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Neste ensaio foi efetuada uma alteração no meio fermentativo em que houve a troca de Cloreto de Amônio por Sulfato de Amônio. Desta forma, a concentração de íons de cloro presentes no meio foi reduzida pela substituição do cloreto pelo sulfato, mantendo-se a presença de amônio necessário ao crescimento do microrganismo e ao desenvolvimento sustentável da fermentação.

As combinações de meios efetuadas durante a realização destes estudos podem ser visualizadas na figura 12. Foram utilizadas duas suspensões 3976 e 3977 cujo pH e sedimento são descritos na tabela 8. O pH dos meios fermentativos (708 e 708/2) foi equivalente, antes e após esterilização (tabela 9).

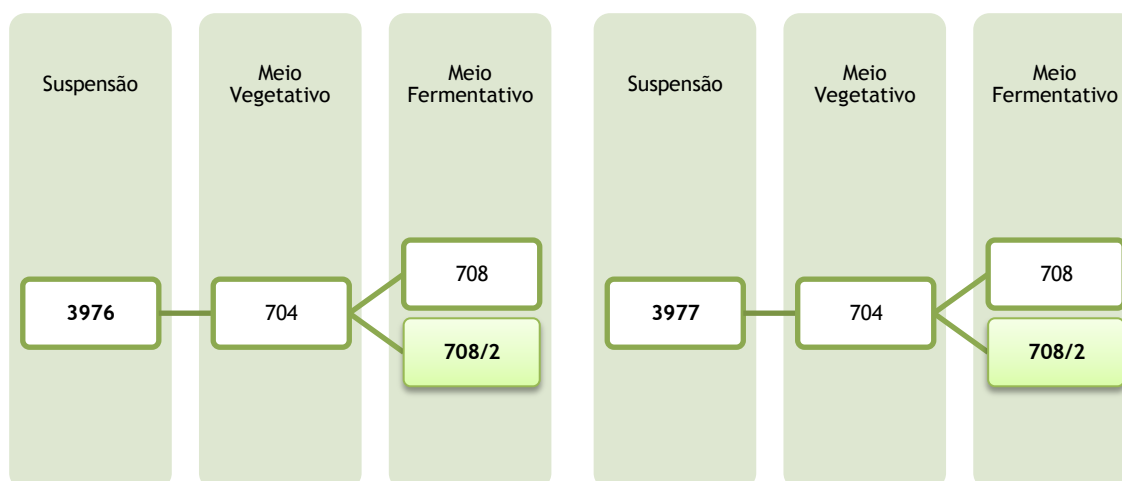


Figura 12 - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 1).

Tabela 8 - Registro do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 1).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3976	6,02	8
3977	5,99	8

**Tabela 9** - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 1).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,37	5,69
708	6,30	6,91
708/2	6,34	7,03

Os resultados obtidos da experiência 1 são apresentados na tabela 10. Foram testados dois meios fermentativos, 708 e 708/2, sendo o primeiro o controlo e o segundo a adição de sulfato de amónio. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

O tratamento dos resultados foi efetuado através das fórmulas abaixo descritas, tendo como base os valores de HPLC DMCT ( $\mu\text{g/mL}$ ) e HPLC DMT ( $\mu\text{g/mL}$ ) que foram obtidos por HPLC com deteção ultravioleta.

$$DMCT \text{ Real } (\mu\text{g/mL}) = (32,5 - \text{diferença de peso do balão}) \times \frac{HPLC \text{ DMCT } (\mu\text{g/mL})}{32,5} \quad (1)$$

$$DMCT \text{ Real } (\%) = \frac{DMCT \text{ Real } (\mu\text{g/ml}) \times 100}{HPLC \text{ Total } (\mu\text{g/ml})} \quad (2)$$

$$DMT \text{ Real } (\mu\text{g/mL}) = (32,5 - \text{diferença de peso do balão}) \times \frac{HPLC \text{ DMT } (\mu\text{g/mL})}{32,5} \quad (3)$$

$$DMT \text{ Real } (\%) = \frac{DMT \text{ Real } (\mu\text{g/ml}) \times 100}{HPLC \text{ Total } (\mu\text{g/ml})} \quad (4)$$

$$HPLC \text{ Total } (\mu\text{g/mL}) = DMCT \text{ Real } (\mu\text{g/mL}) + DMT \text{ Real } (\mu\text{g/mL}) \quad (5)$$

HPLC DMCT e DMCT Real significam a concentração de desmetilclorotetraciclina produzida por balão, após o período de incubação. No entanto, DMCT Real expressa a concentração de antibiótico real, ou seja, através da fórmula consegue-se calcular a percentagem de evaporação que ocorreu no meio, o que permite fazer uma correção dos valores obtidos no doseamento por HPLC. É de referir que a diferença de peso do balão significa a diferença entre o peso do balão antes de inocular e o peso do balão antes de analisar. O valor 32,5 é a soma entre o volume de meio e o volume de inóculo.

O mesmo se aplica a HPLC DMT e DMT Real, só que neste caso refere-se à desmetiltetraciclina.

Tabela 10 - Registo dos resultados obtidos na experiência 1.

Suspensão	Meio	Nº de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3976	708	1	5922	5557	95	308	289	5	5846
		2	7217	6995	95	384	372	5	7366
		3	6164	5785	95	328	307	5	6092
	708/2	4	1062	1029	28	2672	2590	72	3619
		5	1111	1008	29	2686	2438	71	3447
		6	1097	1013	29	2664	2460	71	3472
3977	708	7	6549	6045	95	363	335	5	6380
		8	6114	6020	96	278	273	4	6294
		9	6332	5747	96	289	262	4	6010
	708/2	10	998	983	28	2549	2510	72	3493
		11	970	940	27	2619	2538	73	3479
		12	992	962	27	2632	2551	73	3513

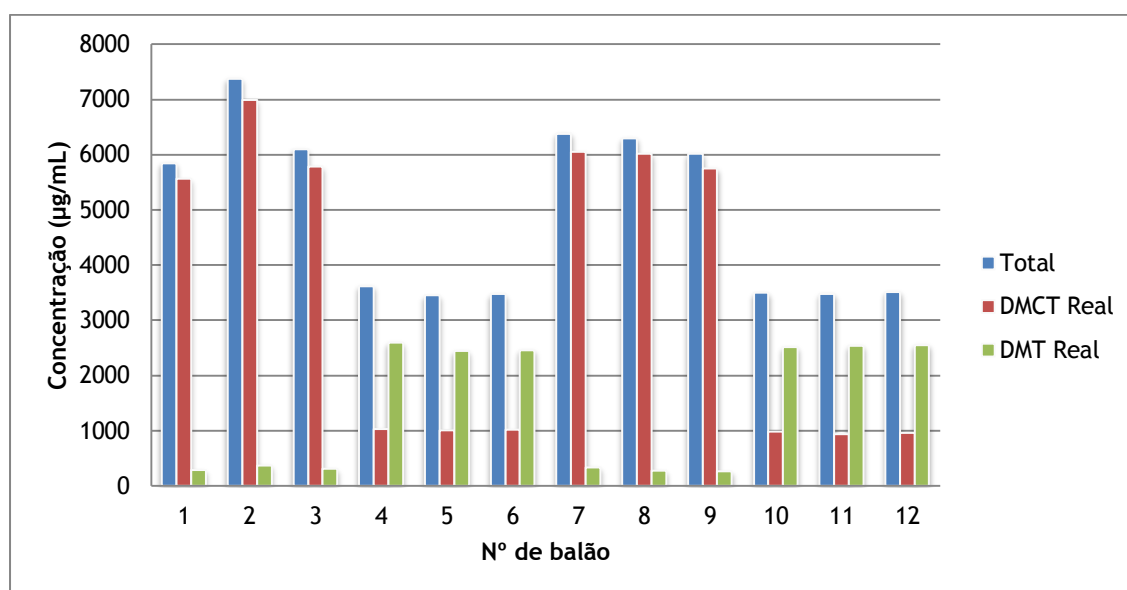


Gráfico 1 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) ao longo da experiência 1.

No meio 708 ocorreu o que era esperado, maior produção de DMCT relativamente a DMT. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de desmetiltetraciclina em relação a desmetilclorotetraciclina.

Tabela 11 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 1.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3976	708	289	323	100,00%
		372		
	708/2	307	2496	773,26%
		2590		
3977	708	2438	290	100,00%
		2460		
	708/2	335	2533	872,59%
		273		
		262		
	2510			
	2538			
	2551			

Na experiência 1, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 773,26% na primeira suspensão, enquanto que na segunda aumentou para 872,59% (tabela 11). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de ser superior. Para se tornar um processo viável para a empresa, a concentração de desmetiltetraciclina teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL. Como este produto serve de matéria-prima para a síntese de outro antibiótico, só com valores semelhantes aos referidos seria rentável a sua utilização.

### 3.2. Experiência 2 - Estudo do efeito do Sal dipotássico 1,3,4-tiazol-2,5-ditiol ( $C_2K_2N_2S_3$ ) no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Nesta experiência foi adicionado ao meio fermentativo um inibidor do processo de cloração, denominado por sal dipotássico 1,3,4-tiazol-2,5-ditiol. Este é caracterizado por inibir a formação de iões cloro levando à produção de tetraciclina em vez de clortetraciclina (28).

O inibidor foi testado em quatro concentrações diferentes, 10, 20, 50 e 75 ppm, de modo a verificar se quando aumenta a concentração aumenta o efeito inibitório, levando à produção maioritária de desmetiltetraciclina.

As combinações de meios efetuadas nesta experiência estão descritas nas figuras 13 a 16, consoante a concentração de inibidor. Foram utilizadas várias suspensões, uma vez que cada ensaio foi realizado em dias diferentes, cujo pH e sedimento podem ser visualizados nas tabelas 12, 16, 20 e 24. Como a adição do inibidor é efetuada por balão, não há registo do pH do meio fermentativo 708/3 antes e após esterilização (tabelas 13, 17, 21 e 25).

- **Concentração de 10 ppm**

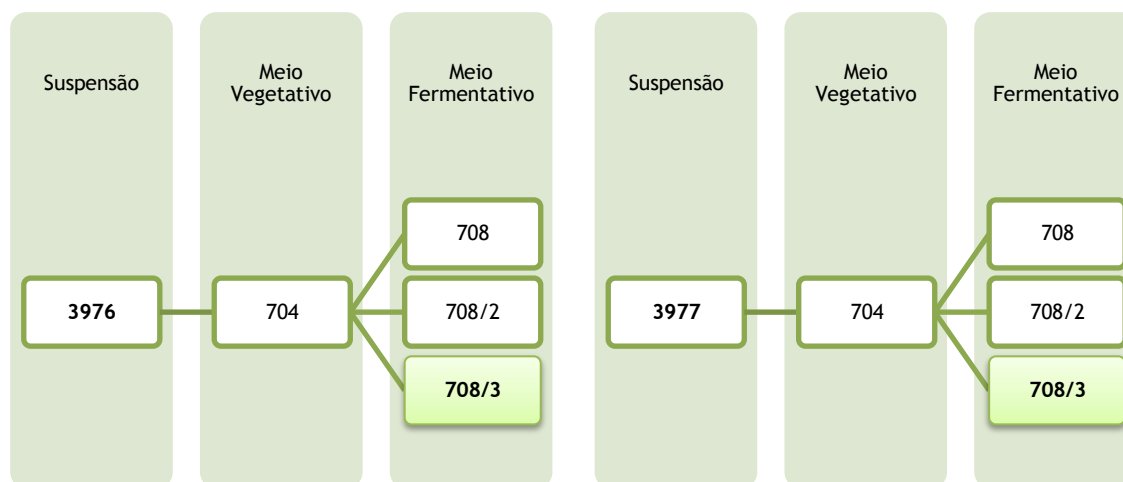


Figura 13 - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 10 ppm (experiência 2).

Tabela 12 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3976	6,02	8
3977	5,99	8

Tabela 13 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 10 ppm (experiência 2).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,37	5,69
708	6,30	6,91
708/2	6,34	7,03
708/3	-	-

Os resultados obtidos da experiência 2, para a concentração de 10 ppm, são apresentados na tabela 14. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/3, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de inibidor referente à concentração de 10 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 14 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 10 ppm, na experiência 2.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3976	708	1	5922	5557	95	308	289	5	5846	
		2	7217	6995	95	384	372	5	7366	
		3	6164	5785	95	328	307	5	6092	
	708/2	4	351	1029	28	2672	2590	72	3619	
		5	1111	1008	29	2686	2438	71	3447	
		6	1097	1013	29	2664	2460	71	3472	
		708/3 (10 ppm)	7	1038	942	29	2520	2287	71	3229
			8	1030	998	28	2692	2609	72	3607
			9	986	986	27	2626	2626	73	3612
3977	708	10	6549	6045	95	363	335	5	6380	
		11	6114	6020	96	278	273	4	6294	
		12	6332	5747	96	289	262	4	6010	
	708/2	13	998	983	28	2549	2510	72	3493	
		14	970	940	27	2619	2538	73	3479	
		15	992	962	27	2632	2551	73	3513	
		708/3 (10 ppm)	16	977	931	30	2274	2170	70	3101
			17	328	323	13	2259	2224	87	2547
			18	353	347	13	2461	2423	87	2770

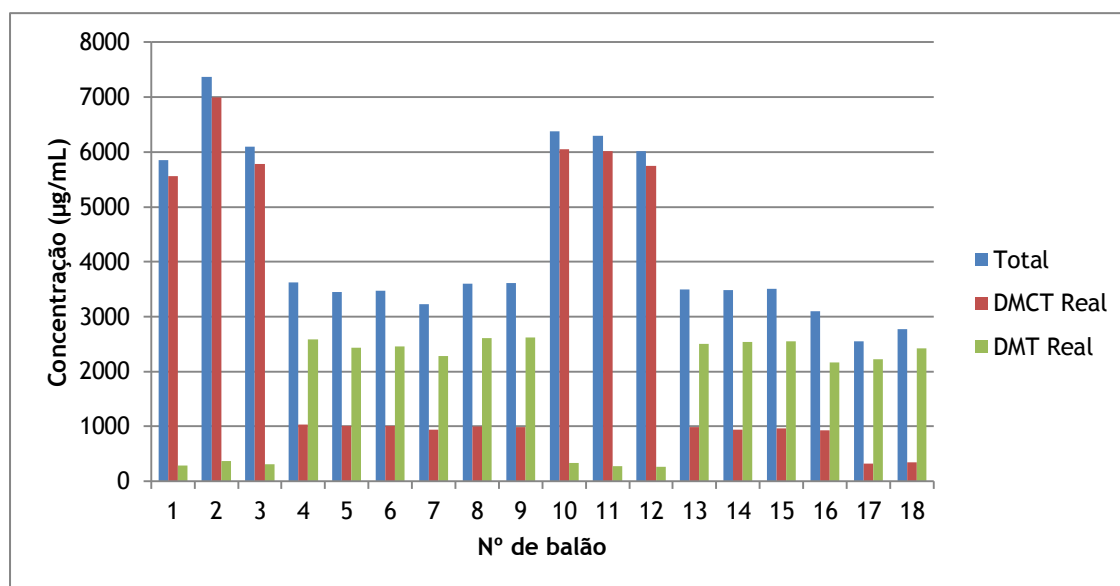


Gráfico 2 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 10 ppm, na experiência 2.

No meio 708 predominou a desmetilclorotetraciclina comparativamente à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em relação a DMCT. No meio 708/3, com a concentração de inibidor de 10 ppm, os resultados foram ligeiramente inferiores aos do meio 708/2.

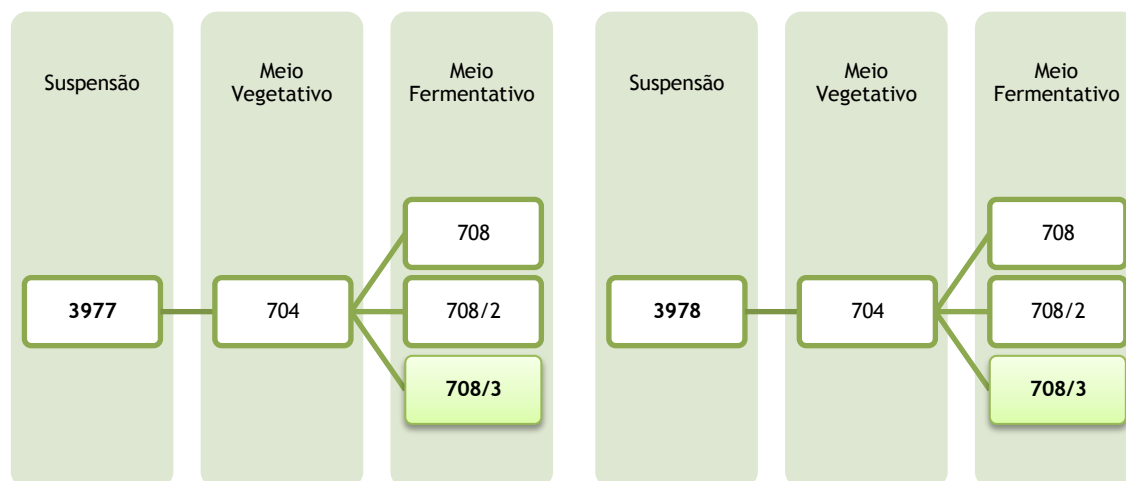
Tabela 15 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 10 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3976	708	289	323	100,00%
		372		
		307		
3976	708/2	2590	2496	773,26%
		2438		
		2460		
3976	708/3 (10 ppm)	2287	2507	776,84%
		2609		
		2626		
3977	708	335	290	100,00%
		273		
		262		

	2510		
<b>708/2</b>	2538	2533	872,59%
	2551		
	2170		
<b>708/3 (10 ppm)</b>	2224	2272	782,70%
	2423		

Na experiência 2, concentração de 10 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 773,26% no meio com a variação e de 776,84% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda aumentou para 872,59% no meio com a variação e manteve-se mais ou menos igual no meio com o inibidor, 782,70% (tabela 15). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 20 ppm**



**Figura 14** - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 20 ppm (experiência 2).

**Tabela 16** - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3977	6,27	5
3978	5,95	9

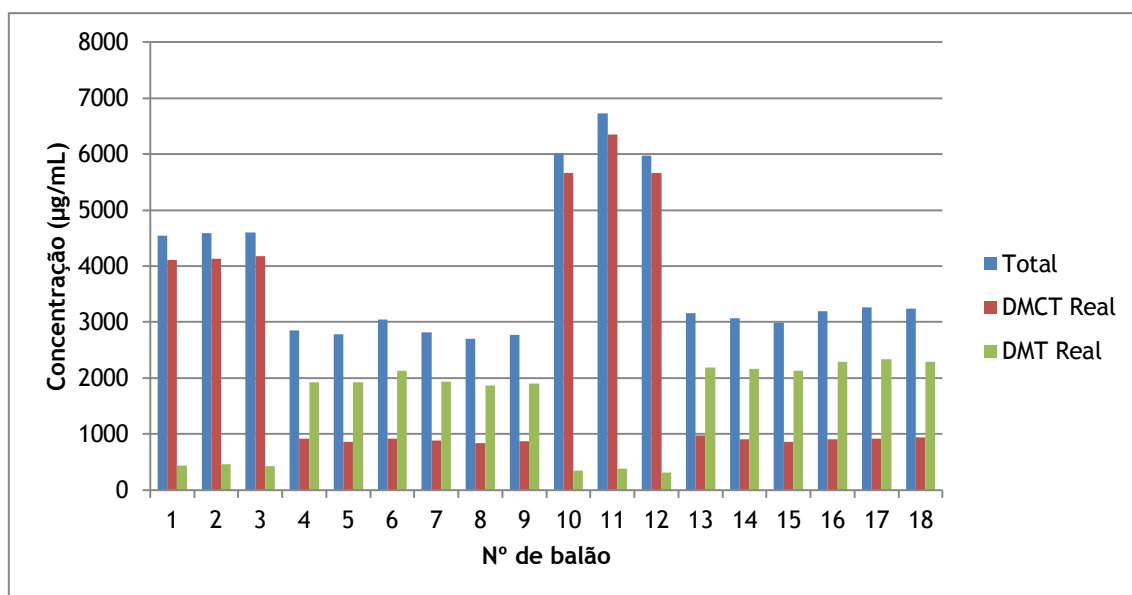
Tabela 17 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 20 ppm (experiência 2).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,35	6,03
708	6,32	7,06
708/2	6,38	7,01
708/3	-	-

Os resultados obtidos da experiência 2, para a concentração de 20 ppm, são apresentados na tabela 18. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/3, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de inibidor referente à concentração de 20 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 18 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 20 ppm, na experiência 2.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3977	708	1	4940	4104	90	528	439	10	4543	
		2	4888	4136	90	539	456	10	4592	
		3	5123	4177	91	518	422	9	4600	
	708/2	4	1130	921	32	2362	1926	68	2847	
		5	1035	860	31	2317	1925	69	2785	
		6	1069	921	30	2467	2125	70	3046	
		708/3 (20 ppm)	7	1023	881	31	2253	1941	69	2822
			8	993	840	31	2201	1862	69	2703
			9	995	873	31	2167	1900	69	2773
3978	708	10	7084	5667	94	437	350	6	6017	
		11	7366	6346	94	441	380	6	6726	
		12	6944	5662	95	376	307	5	5969	
	708/2	13	1148	971	31	2583	2186	69	3157	
		14	1050	905	29	2517	2168	71	3073	
		15	1042	866	29	2559	2126	71	2992	
		708/3 (20 ppm)	16	971	911	28	2438	2288	72	3199
			17	1032	921	28	2619	2337	72	3258
			18	1077	944	29	2616	2294	71	3238



**Gráfico 3** - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 20 ppm, na experiência 2.

No meio 708 predominou a desmetilclorotetraciclina comparativamente à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em relação a DMCT. No meio 708/3, com a concentração de inibidor de 20 ppm, os resultados foram um pouco superiores aos do meio 708/2.

**Tabela 19** - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 20 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3977	708	439	439	100,00%
		456		
		422		
3978	708/2	1926	1992	453,75%
		1925		
		2125		
		1941		
3978	708/3 (20 ppm)	1862	1901	433,05%
		1900		
		350		
		380		
3978	708	307	345	100,00%
		307		

	2186		
<b>708/2</b>	2168	2160	625,41%
	2126		
	2288		
<b>708/3 (20 ppm)</b>	2337	2306	667,77%
	2294		

Na experiência 2, concentração de 20 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 453,75% no meio com a variação e de 433,05% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda aumentou para 625,41% no meio com a variação e para 667,77% no meio com o inibidor (tabela 19). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 50 ppm**

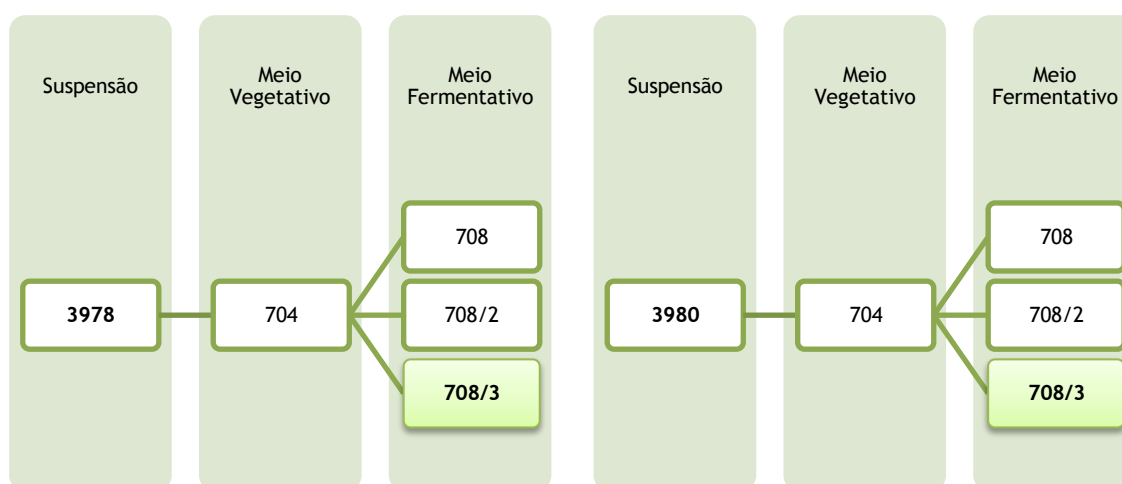


Figura 15 - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 50 ppm (experiência 2).

Tabela 20 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3978	6,43	6
3980	6,56	6

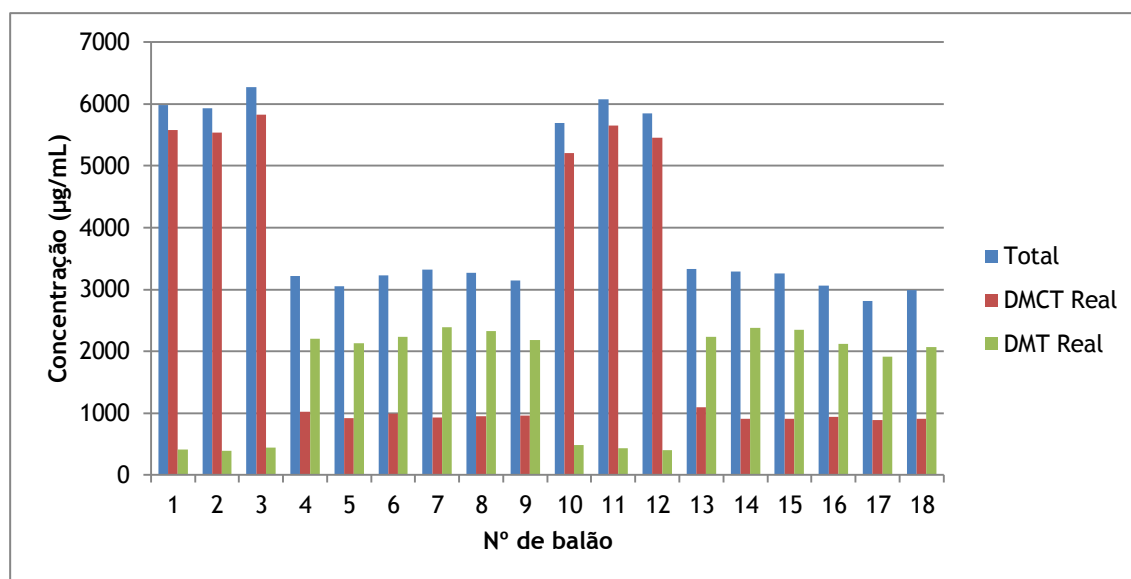
Tabela 21 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 50 ppm (experiência 2).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,24	6,17
708	6,30	6,93
708/2	6,39	6,92
708/3	-	-

Os resultados obtidos da experiência 2, para a concentração de 50 ppm, são apresentados na tabela 22. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/3, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de inibidor referente à concentração de 50 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 22 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 50 ppm, na experiência 2.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3978	708	1	6589	5575	93	487	412	7	5987	
		2	6668	5540	93	473	393	7	5933	
		3	7021	5833	93	535	444	7	6277	
	708/2	4	1225	1018	32	2647	2199	68	3217	
		5	1070	922	30	2472	2130	70	3052	
		6	1152	992	31	2592	2233	69	3226	
		708/3 (50 ppm)	7	1064	933	28	2722	2387	72	3320
			8	1062	948	29	2604	2324	71	3271
			9	1062	964	31	2402	2180	69	3144
3980	708	10	6157	5210	91	572	484	9	5694	
		11	6556	5648	93	503	433	7	6082	
		12	6215	5450	93	453	397	7	5847	
	708/2	13	1295	1096	33	2646	2239	67	3335	
		14	1054	908	28	2767	2384	72	3292	
		15	1058	912	28	2728	2350	72	3262	
		708/3 (50 ppm)	16	1075	943	31	2415	2118	69	3060
			17	1018	893	32	2186	1917	68	2810
			18	1022	912	31	2324	2074	69	2986



**Gráfico 4** - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 50 ppm, na experiência 2.

No meio 708 predominou a desmetilclorotetraciclina comparativamente à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em relação a DMCT. No meio 708/3, com a concentração de inibidor de 50 ppm, os resultados foram ligeiramente mais baixos aos do meio 708/2.

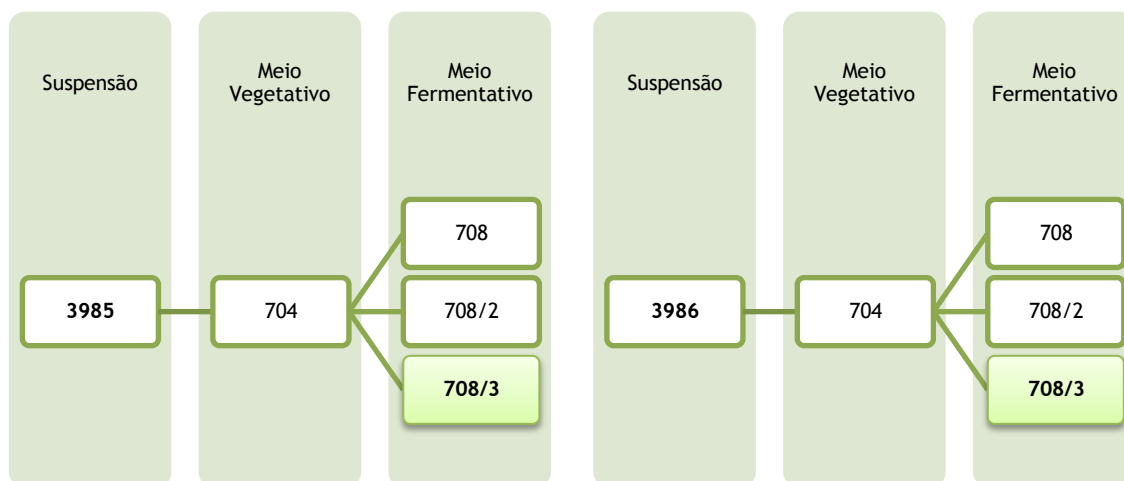
**Tabela 23** - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 50 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3978	708	412	416	100,00%
		393		
		444		
3978	708/2	2199	2187	525,16%
		2130		
		2233		
		2387		
		2324		
3980	708	2180	2297	551,49%
		484		
		433		
3980	708	397	438	100,00%
		397		

	2239		
<b>708/2</b>	2384	2324	530,43%
	2350		
	2118		
<b>708/3 (50 ppm)</b>	1917	2036	464,66%
	2074		

Na experiência 2, concentração de 50 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 525,16% no meio com a variação e de 551,49% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção foi equivalente no meio com a variação, 530,43%, e diminuiu para 464,66% no meio com o inibidor (tabela 23). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 75 ppm**



**Figura 16** - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 75 ppm (experiência 2).

**Tabela 24** - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 2).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3985	5,97	9
3986	6,02	8

Tabela 25 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 75 ppm (experiência 2).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,24	5,85
708	6,27	6,90
708/2	6,38	7,04
708/3	-	-

Os resultados obtidos da experiência 2, para a concentração de 75 ppm, são apresentados na tabela 26. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/3, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de inibidor referente à concentração de 75 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 26 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 75 ppm, na experiência 2.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3985	708	1	7611	6674	93	595	522	7	7196	
		2	7419	7191	94	513	497	6	7688	
		3	7436	6292	94	451	382	6	6674	
	708/2	4	1112	1009	31	2429	2205	69	3214	
		5	1075	976	29	2589	2350	71	3326	
		6	1087	987	30	2562	2326	70	3312	
		708/3 (75 ppm)	7	714	626	21	2711	2377	79	3003
			8	516	468	17	2488	2258	83	2727
			9	485	455	15	2778	2607	85	3062
3986	708	10	7343	6665	92	660	599	8	7264	
		11	7429	6629	93	542	484	7	7113	
		12	7324	6761	92	662	611	8	7372	
	708/2	13	1206	1020	31	2706	2290	69	3310	
		14	1150	973	31	2526	2137	69	3110	
		15	1206	983	31	2742	2236	69	3219	
		708/3 (75 ppm)	16	572	528	20	2283	2107	80	2635
			17	519	455	19	2162	1896	81	2351
			18	546	487	19	2260	2017	81	2504

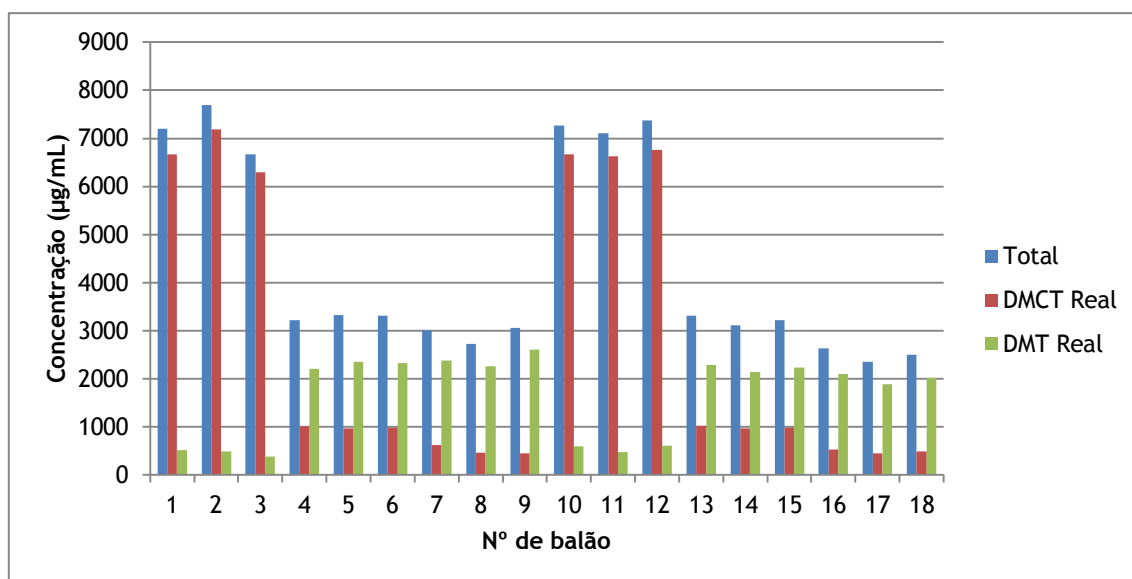


Gráfico 5 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 75 ppm, na experiência 2.

No meio 708 predominou a desmetilclorotetraciclina comparativamente à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em relação a DMCT. No meio 708/3, com a concentração de inibidor de 75 ppm, os resultados foram inferiores aos do meio 708/2.

Tabela 27 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 2, para a concentração de 75 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3985	708	522	467	100,00%
		497		
		382		
3985	708/2	2205	2293	491,24%
		2350		
		2326		
3985	708/3 (75 ppm)	2377	2414	517,12%
		2258		
		2607		
3986	708	599	565	100,00%
		484		
		611		
3986	708/2	2290	2221	393,37%
		2137		
		2236		

	2107		
708/3	1896	2007	355,41%
(75 ppm)	2017		

Na experiência 2, concentração de 75 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 491,24% no meio com a variação e de 517,12% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção diminuiu tanto no meio com a variação como no meio com o inibidor, 393,37% e 355,41% respectivamente (tabela 27). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

Em resumo, a média dos valores de produção de DMT apresentados para as concentrações de inibidor, 10, 20, 50 e 75 ppm, são de 779,77%, 550,41%, 508,08% e 436,27% respectivamente.

É de referir que o aumento da concentração de inibidor não implica um aumento na produção de DMT, o que se justifica com as percentagens acima descritas.

No entanto, estes são resultados bastante positivos uma vez que houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina aproximadamente 6 vezes superior ao de desmetilclorotetraciclina.

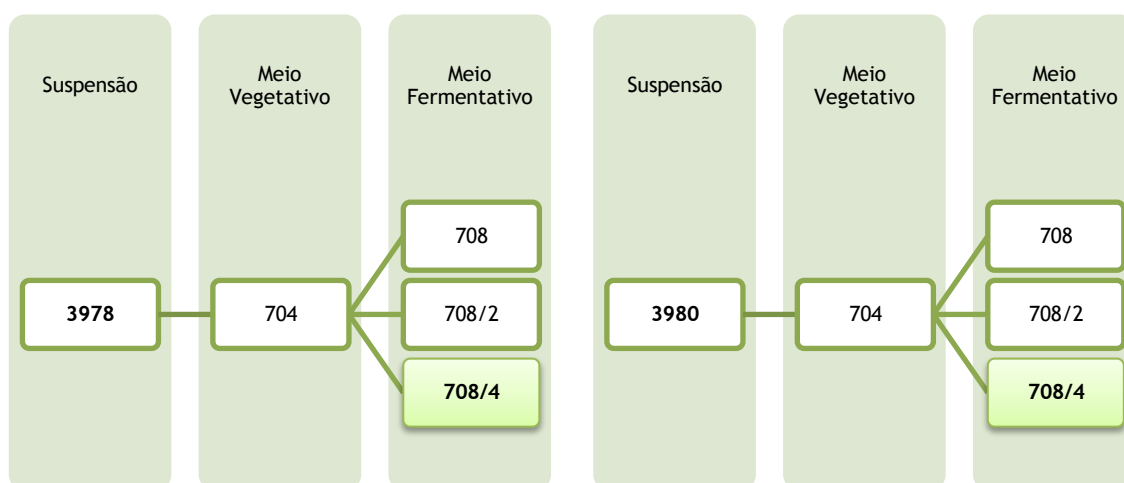
### 3.3. Experiência 3 - Estudo do efeito do Tiosulfato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Neste ensaio foi acrescentado ao meio fermentativo um inibidor do processo de cloração, denominado por Tiosulfato de sódio. Este é indicado para remover rapidamente os íons cloro de uma solução conduzindo à produção de tetraciclina em vez de clortetraciclina.

O tiosulfato foi testado em seis concentrações diferentes, 80, 150, 300, 450, 800 e 1500 ppm, de forma a investigar se aumentando a concentração de tiosulfato menor conseguimos reduzir a presença de íons cloreto no meio em suspensão.

As combinações de meios efetuadas nesta experiência estão descritas nas figuras 17 a 22, consoante a concentração de tiosulfato. Foram utilizadas várias suspensões, duas diferentes para cada concentração, uma vez que cada ensaio foi realizado em dias diferentes, cujo pH e sedimento são mostrados nas tabelas 28, 32, 36, 40, 44 e 48. Como a adição do tiosulfato é feita por balão, teve-se em conta o pH do meio fermentativo 708/4 antes de esterilização, não havendo registo do pH do após esterilização (tabelas 29, 33, 37, 41, 45 e 49).

- **Concentração de 80 ppm**



**Figura 17** - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 80 ppm (experiência 3).

Tabela 28 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3978	6,43	6
3980	6,56	6

Tabela 29 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 80 ppm (experiência 3).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,24	6,17
708	6,30	6,93
708/2	6,39	6,92
708/4	6,67	-

Os resultados obtidos da experiência 3, para a concentração de 80 ppm, são apresentados na tabela 30. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/4, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de tiosulfato referente à concentração de 80 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 30 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 80 ppm, na experiência 3.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3978	708	1	6589	5575	93	487	412	7	5987	
		2	6668	5540	93	473	393	7	5933	
		3	7021	5833	93	535	444	7	6277	
	708/2	4	1225	1018	32	2647	2199	68	3217	
		5	1070	922	30	2472	2130	70	3052	
		6	1152	992	31	2592	2233	69	3226	
		708/4	7	1091	923	30	2574	2178	70	3101
			8	1048	887	30	2491	2108	70	2995
			9	1040	944	29	2565	2328	71	3272
	3980	708	10	6157	5210	91	572	484	9	5694
			11	6556	5648	93	503	433	7	6082
			12	6215	5450	93	453	397	7	5847
708/2		13	1295	1096	33	2646	2239	67	3335	
		14	1054	908	28	2767	2384	72	3292	
		15	1058	912	28	2728	2350	72	3262	
		708/4	16	1033	858	27	2798	2324	73	3183
			17	1063	899	28	2733	2313	72	3212
			18	1039	895	28	2614	2252	72	3147

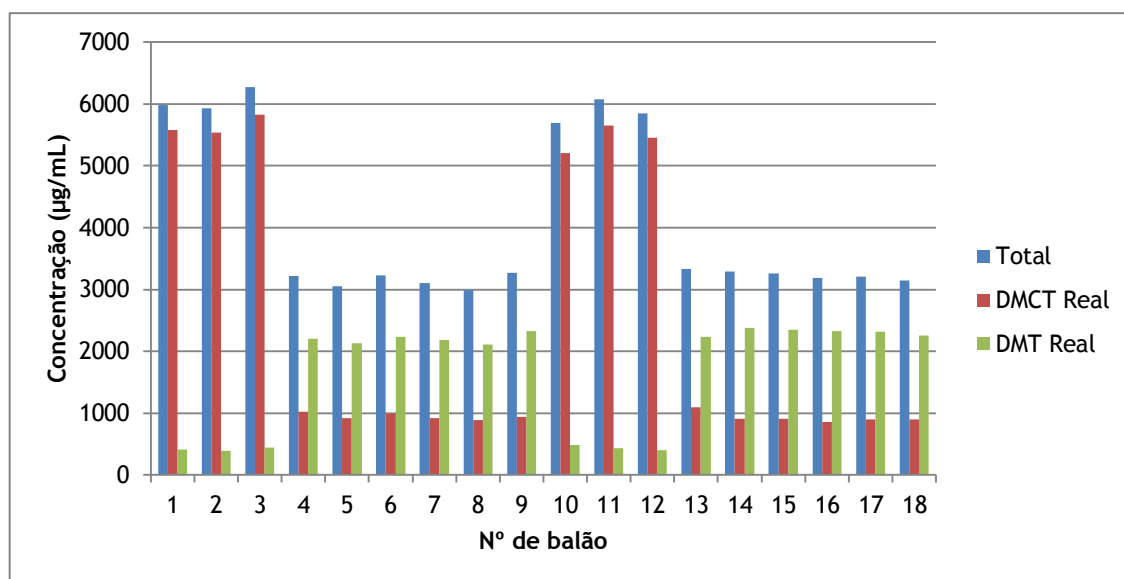


Gráfico 6 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 80 ppm, na experiência 3.

No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/4, com a concentração de tiosulfato de 80 ppm, os resultados são semelhantes aos do meio 708/2.

Tabela 31 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 80 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3978	708	412	416	100,00%
		393		
		444		
3978	708/2	2199	2187	525,16%
		2130		
		2233		
3980	708/4 (80 ppm)	2178	2205	529,33%
		2108		
		2328		
3980	708	484	438	100,00%
		433		
		397		

	2239		
<b>708/2</b>	2384	2324	530,43%
	2350		
<b>708/4 (80 ppm)</b>	2324	2296	524,04%
	2313		
	2252		

Na experiência 3, concentração de 80 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 525,16% no meio com a variação e de 529,33% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção manteve-se mais ou menos constante quer no meio com a variação quer no meio com o inibidor, 530,43% e 524,04% respetivamente (tabela 31). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 150 ppm**

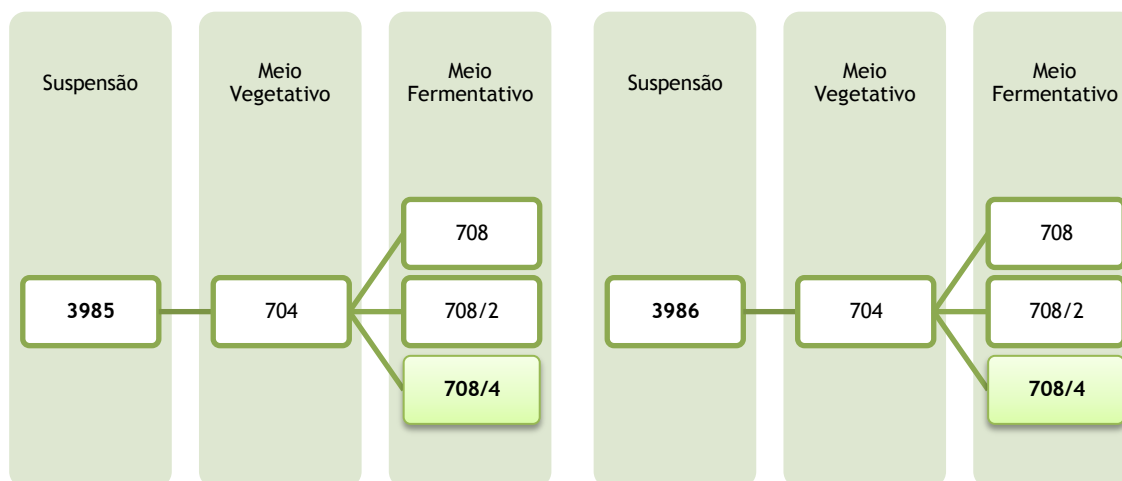


Figura 18 - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 150 ppm (experiência 3).

Tabela 32 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3985	6,16	7
3986	6,66	7

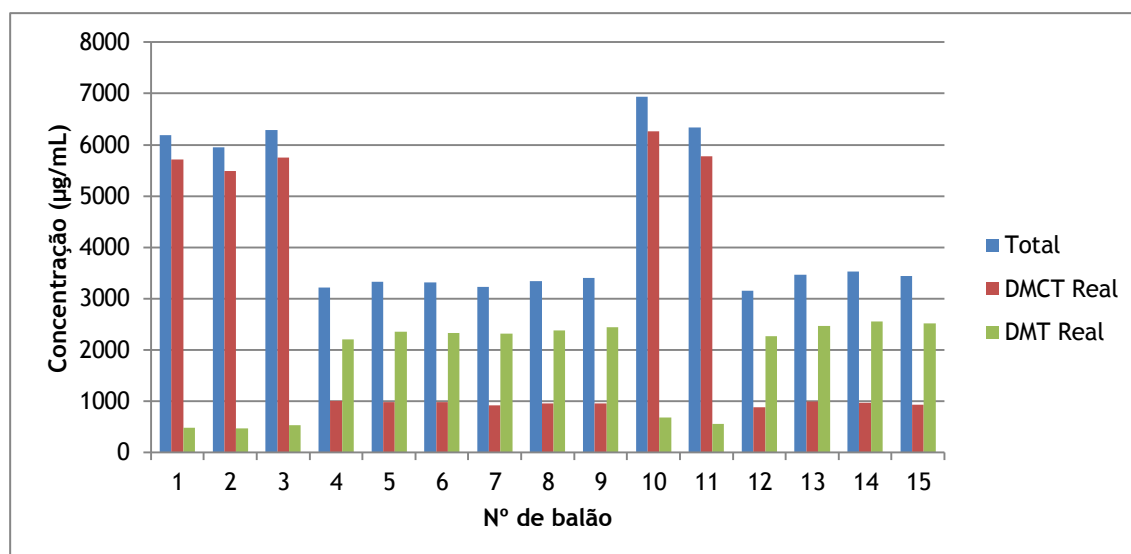
**Tabela 33** - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meio para a concentração de 150 ppm (experiência 3).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,27	5,88
708	6,37	6,75
708/2	6,41	6,89
708/4	6,82	-

Os resultados obtidos da experiência 3, para a concentração de 150 ppm, são apresentados na tabela 34. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/4, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de tiosulfato referente à concentração de 150 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

**Tabela 34** - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 150 ppm, na experiência 3.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3985	708	1	6289	5708	92	524	476	8	6184
		2	6480	5483	92	554	469	8	5952
		3	6450	5755	92	592	528	8	6284
	708/2 (150ppm)	4	1112	1009	31	2429	2205	69	3214
		5	1075	976	29	2589	2350	71	3326
		6	1087	987	30	2562	2326	70	3312
		7	1007	914	28	2554	2318	72	3232
		8	1058	960	29	2619	2377	71	3338
		9	1054	957	28	2692	2444	72	3400
3986	708	10	6899	6262	90	749	680	10	6942
		11	6588	5777	91	640	561	9	6338
	708/2 (150ppm)	12	959	885	28	2451	2262	72	3148
		13	1097	996	29	2715	2464	71	3460
		14	1065	967	27	2820	2560	73	3526
		15	1039	927	27	2817	2514	73	3441



**Gráfico 7** - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 150 ppm, na experiência 3.

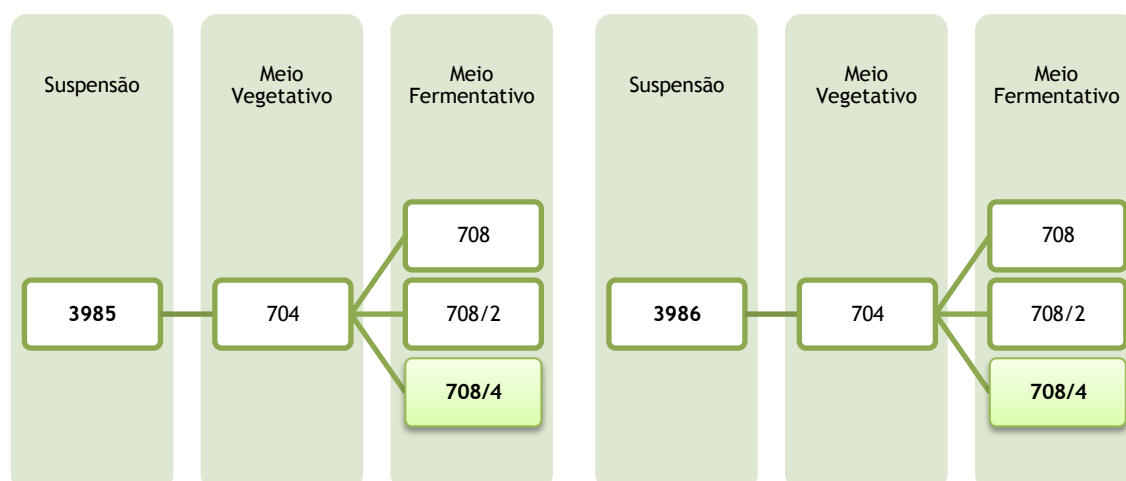
No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/4, com a concentração de tiosulfato de 150 ppm, os resultados são inferiores aos do meio 708/2.

**Tabela 35** - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 150 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
	708	476	491	100,00%
		469		
		528		
3985	708/2	2205	2293	467,21%
		2350		
		2326		
		2318		
	708/4 (150ppm)	2377	2380	484,77%
		2444		
		2444		
3986	708	680	621	100,00%
		561		
		2262		
		2464		
	708/4 (150ppm)	2560	2537	408,78%
		2514		

Na experiência 3, concentração de 150 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 467,21% no meio com a variação e de 484,77% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção diminuiu tanto no meio com a variação como no meio com o inibidor, 380,86% e 408,78% respectivamente (tabela 35). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 300 ppm**



**Figura 19** - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 300 ppm (experiência 3).

**Tabela 36** - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3985	6,16	7
3986	6,66	7

**Tabela 37** - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 300 ppm (experiência 3).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,27	5,88
708	6,37	6,75
708/2	6,41	6,89
708/4	6,87	-

Os resultados obtidos da experiência 3, para a concentração de 300 ppm, são apresentados na tabela 38. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/4, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de tiosulfato referente à concentração de 300 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 38 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 300 ppm, na experiência 3.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3985	708	1	6289	5708	92	524	476	8	6184	
		2	6480	5483	92	554	469	8	5952	
		3	6450	5755	92	592	528	8	6284	
	708/2 (300ppm)	4	1112	1009	31	2429	2205	69	3214	
		5	1075	976	29	2589	2350	71	3326	
		6	1087	987	30	2562	2326	70	3312	
		708/4 (300ppm)	7	1052	939	28	2658	2372	72	3310
			8	1117	997	29	2698	2407	71	3404
		9	1119	998	29	2696	2406	71	3404	
3986	708	10	6899	6262	90	749	680	10	6942	
		11	6588	5777	91	640	561	9	6338	
	708/2	12	959	885	28	2451	2262	72	3148	
		13	1097	996	29	2715	2464	71	3460	
	708/4 (300ppm)	14	1043	947	27	2767	2512	73	3458	
		15	1033	922	27	2825	2521	73	3443	

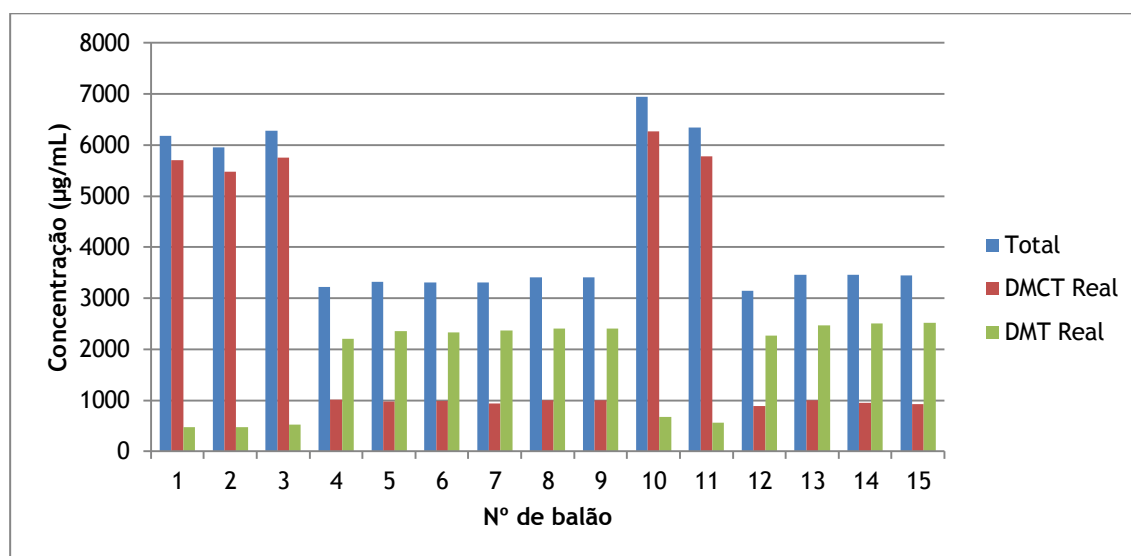


Gráfico 8 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 300 ppm, na experiência 3.

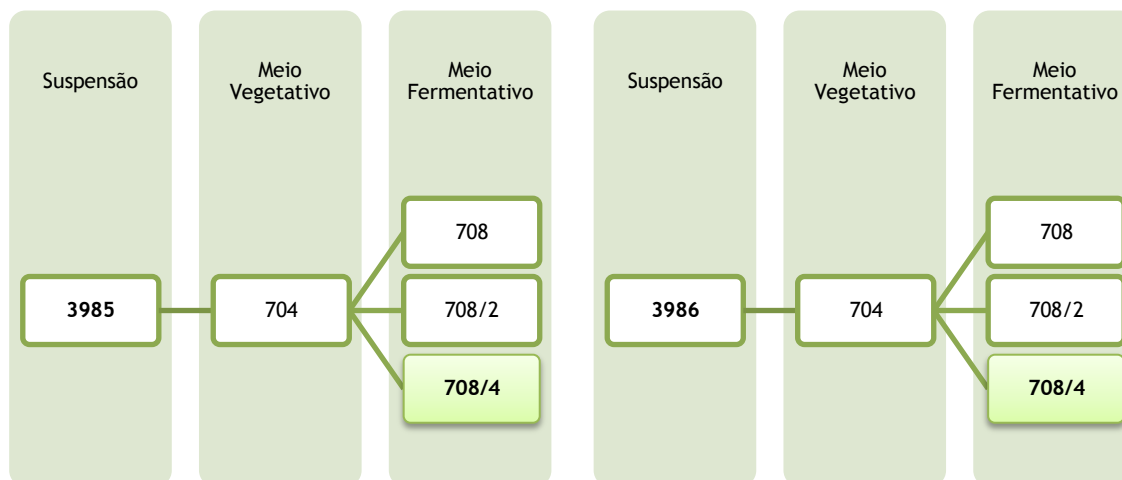
No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/4, com a concentração de tiosulfato de 300 ppm, os resultados são parecidos aos do meio 708/2.

**Tabela 39** - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 300 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3985	708	476	491	100,00%
		469		
		528		
3985	708/2	2205	2293	467,21%
		2350		
		2326		
3985	708/4 (300ppm)	2372	2395	487,89%
		2407		
		2406		
3986	708	680	621	100,00%
		561		
		2262		
3986	708/2	2464	2363	380,86%
		2512		
		2521		
3986	708/4 (300ppm)	2512	2516	405,48%
		2521		
		2521		

Na experiência 3, concentração de 300 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 467,21% no meio com a variação e de 487,89% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção diminuiu tanto no meio com a variação como no meio com o inibidor, 380,86% e 405,48% respetivamente (tabela 39). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 450 ppm**



**Figura 20** - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 450 ppm (experiência 3).

**Tabela 40** - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3985	6,16	7
3986	6,66	7

**Tabela 41** - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 450 ppm (experiência 3).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,27	5,88
708	6,37	6,75
708/2	6,41	6,89
708/4	6,81	-

Os resultados obtidos da experiência 3, para a concentração de 450 ppm, são apresentados na tabela 42. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/4, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de tiosulfato referente à concentração de 450 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 42 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 450 ppm, na experiência 3.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3985	708	1	6289	5708	92	524	476	8	6184
		2	6480	5483	92	554	469	8	5952
		3	6450	5755	92	592	528	8	6284
	708/2 (450ppm)	4	1112	1009	31	2429	2205	69	3214
		5	1075	976	29	2589	2350	71	3326
		6	1087	987	30	2562	2326	70	3312
		7	1029	934	28	2595	2355	72	3289
		8	1049	952	28	2696	2447	72	3399
		9	1038	942	28	2608	2367	72	3309
3986	708	10	6899	6262	90	749	680	10	6942
		11	6588	5777	91	640	561	9	6338
	708/2	12	959	885	28	2451	2262	72	3148
		13	1097	996	29	2715	2464	71	3460
	708/4 (450ppm)	14	1076	944	27	2849	2498	73	3442
		15	1101	965	27	2995	2626	73	3592

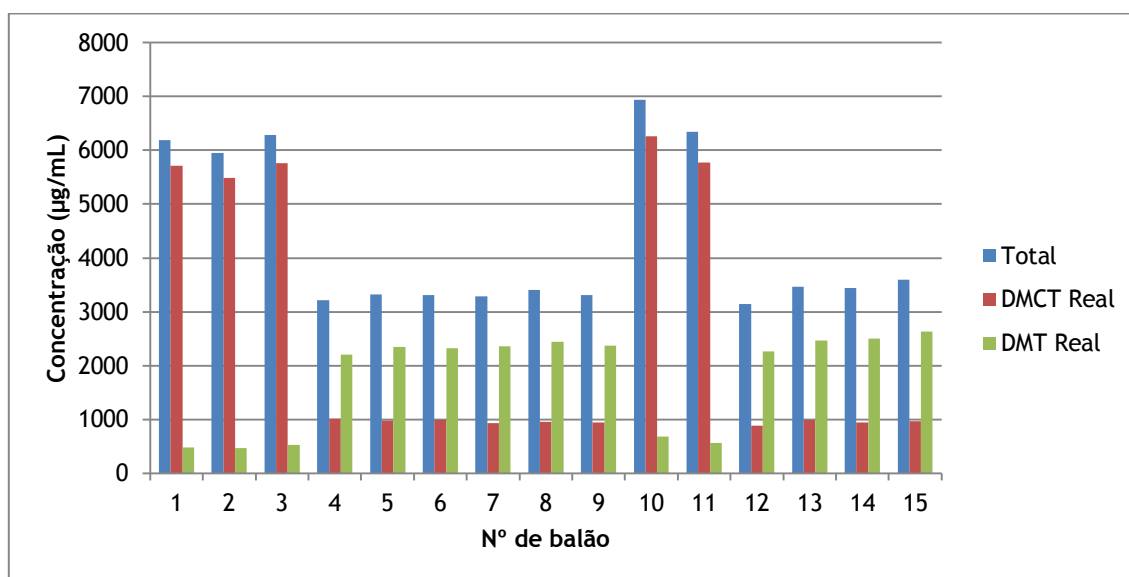


Gráfico 9 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 450 ppm, na experiência 3.

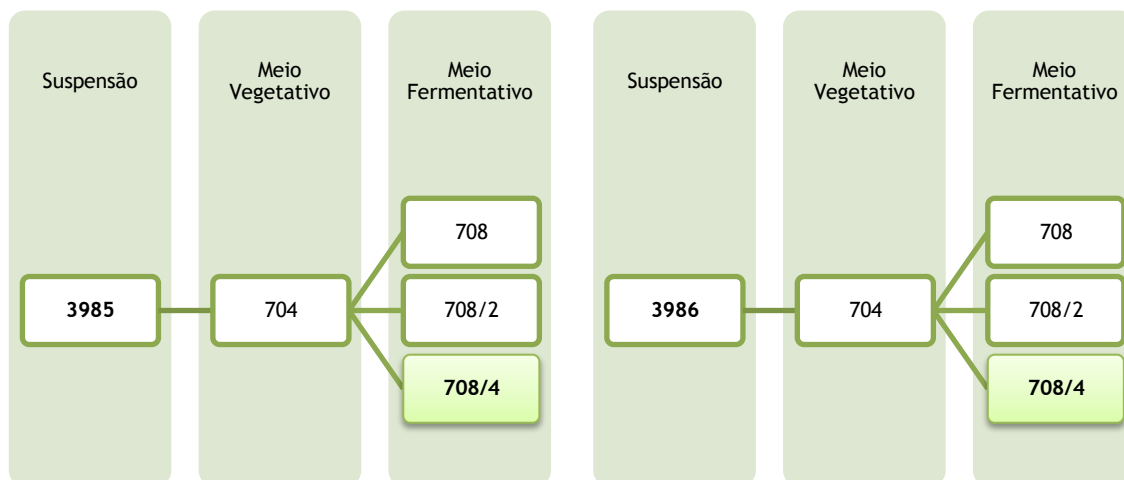
No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/4, com a concentração de tiosulfato de 450 ppm, os resultados são superiores aos do meio 708/2.

Tabela 43 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 450 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
	708	476	491	100,00%
		469		
		528		
3985	708/2	2205	2293	467,21%
		2350		
		2326		
		2355		
	708/4 (450ppm)	2447	2390	486,87%
		2367		
		2367		
3986	708	680	621	100,00%
		561		
	708/2	2262	2363	380,86%
		2464		
		2498		
708/4 (450ppm)	2626	2562	412,92%	
	2626			

Na experiência 3, concentração de 450 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 467,21% no meio com a variação e de 486,87% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção diminuiu para 380,86% no meio com a variação e aumentou para 412,92% no meio com o inibidor (tabela 43). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 800 ppm**



**Figura 21** - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 800 ppm (experiência 3).

**Tabela 44** - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3985	6,16	7
3986	6,66	7

**Tabela 45** - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 800 ppm (experiência 3).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,27	5,88
708	6,37	6,75
708/2	6,41	6,89
708/4	6,84	-

Os resultados obtidos da experiência 3, para a concentração de 800 ppm, são apresentados na tabela 46. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/4, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de tiosulfato referente à concentração de 800 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 46 - Registro dos resultados obtidos para a concentração de 800 ppm, na experiência 3.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3985	708	1	6289	5708	92	524	476	8	6184
		2	6480	5483	92	554	469	8	5952
		3	6450	5755	92	592	528	8	6284
	708/2 (800ppm)	4	1112	1009	31	2429	2205	69	3214
		5	1075	976	29	2589	2350	71	3326
		6	1087	987	30	2562	2326	70	3312
		7	976	901	28	2469	2279	72	3180
		8	1080	964	29	2651	2366	71	3329
		9	1002	925	28	2617	2416	72	3341
3986	708	10	6899	6262	90	749	680	10	6942
		11	6588	5777	91	640	561	9	6338
	708/2	12	959	885	28	2451	2262	72	3148
		13	1097	996	29	2715	2464	71	3460
	708/4 (800ppm)	14	1000	908	26	2789	2532	74	3439
		15	990	914	27	2628	2426	73	3340

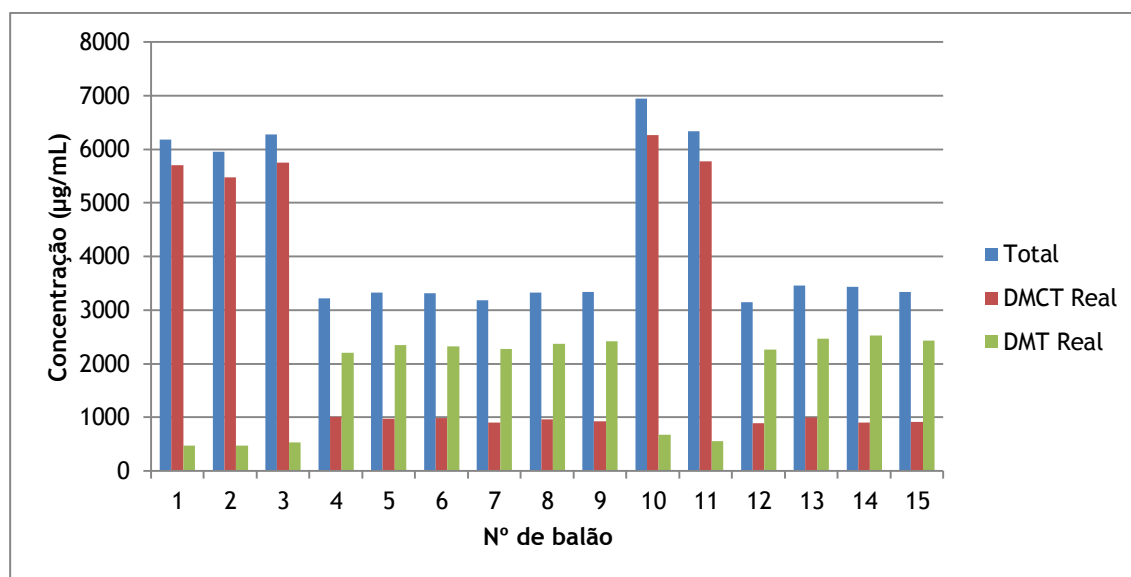


Gráfico 10 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 800 ppm, na experiência 3.

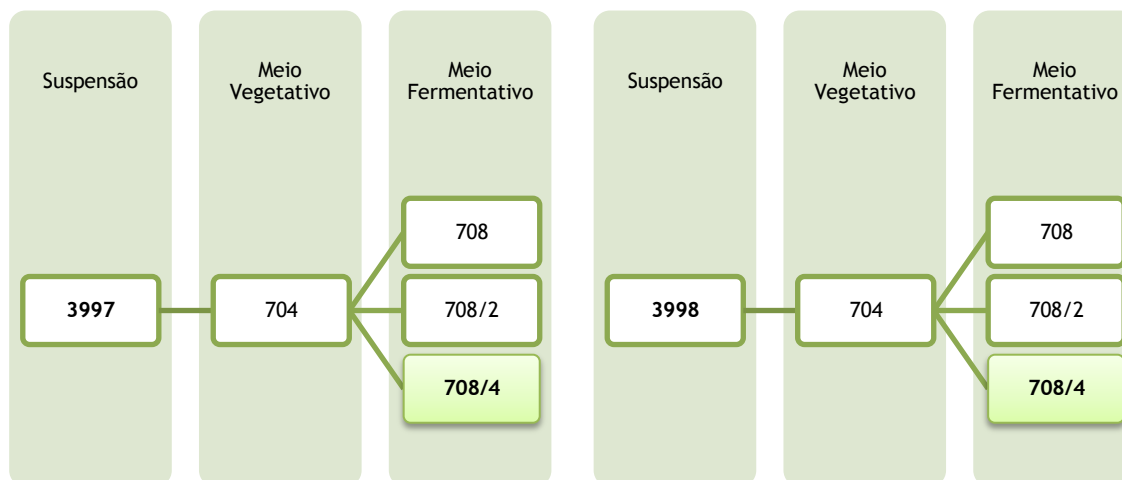
No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/4, com a concentração de tiosulfato de 800 ppm, os resultados são superiores aos do meio 708/2.

**Tabela 47** - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 800 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
	708	476	491	100,00%
		469		
		528		
3985	708/2	2205	2293	467,21%
		2350		
		2326		
	708/4 (800ppm)	2279	2353	479,43%
		2366		
		2416		
3986	708	680	621	100,00%
		561		
		2262		
	708/2	2464	2363	380,86%
		2532		
		2426		
	708/4 (800ppm)	2479	2479	399,44%
		2426		

Na experiência 3, concentração de 800 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 467,21% no meio com a variação e de 479,43% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção diminuiu quer no meio com a variação quer no meio com o inibidor, 380,86% e 399,44%, respetivamente (tabela 47). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

- **Concentração de 1500 ppm**



**Figura 22** - Diagramas representativos das combinações de meios para a concentração de 1500 ppm (experiência 3).

**Tabela 48** - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 3).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3997	5,99	7
3998	6,02	7

**Tabela 49** - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios para a concentração de 1500 ppm (experiência 3).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,27	5,73
708	6,32	6,84
708/2	6,36	6,88
708/4	6,54	-

Os resultados obtidos da experiência 3, para a concentração de 1500 ppm, são apresentados na tabela 50. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/4, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de tiosulfato referente à concentração de 1500 ppm. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 50 - Registo dos resultados obtidos para a concentração de 1500 ppm, na experiência 3.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3997	708	1	5860	5319	93	409	371	7	5690	
		2	6594	6188	92	545	511	8	6700	
		3	6317	5928	91	596	559	9	6488	
	708/2	4	965	891	29	2420	2234	71	3125	
		5	911	841	27	2477	2286	73	3127	
		6	958	899	28	2508	2354	72	3253	
		708/4	7	839	749	30	1952	1742	70	2490
			8	882	773	30	2049	1797	70	2570
		(1500ppm)	9	822	771	29	1992	1869	71	2641
3998	708	10	6641	5721	93	528	455	7	6176	
		11	6843	5790	93	529	448	7	6238	
		12	6266	5880	92	541	508	8	6388	
	708/2	13	1044	948	29	2595	2355	71	3303	
		14	956	897	28	2421	2272	72	3169	
		15	964	875	28	2460	2233	72	3108	
		708/4	16	863	757	28	2196	1926	72	2683
			17	893	797	31	2019	1802	69	2598
		(1500ppm)	18	921	808	28	2375	2083	72	2890

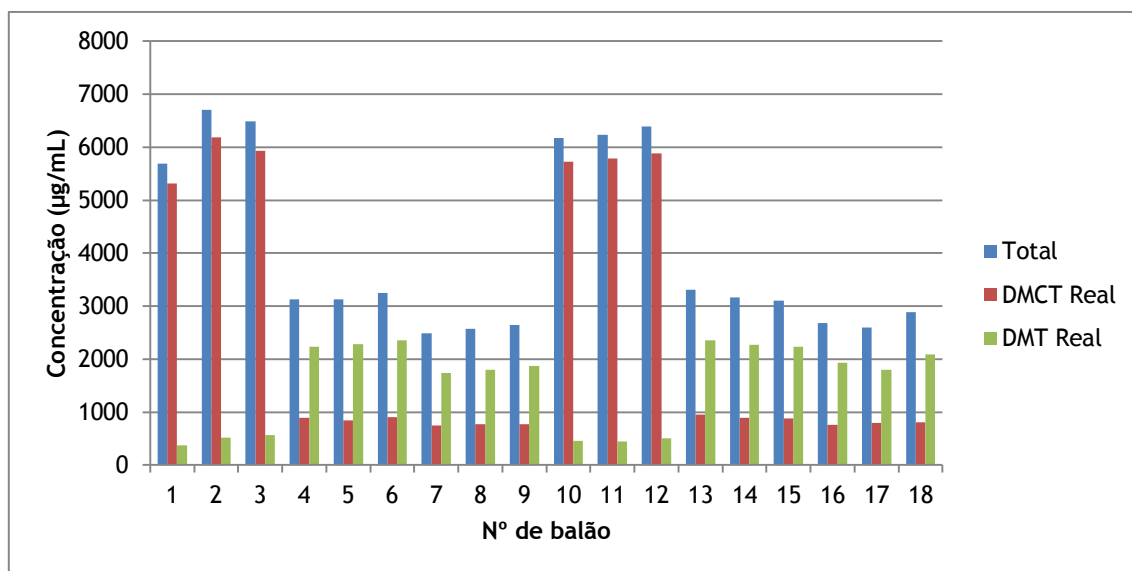


Gráfico 11 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul) para a concentração de 1500 ppm, na experiência 3.

No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/4, com a concentração de tiosulfato de 1500 ppm, os resultados são inferiores aos do meio 708/2.

**Tabela 51** - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 3, para a concentração de 1500 ppm.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3997	708	371	481	100,00%
		511		
	708/2	559	2291	476,69%
		2234		
		2286		
		2354		
708/4 (1500ppm)	1742	1803	375,03%	
	1797			
	1869			
	455			
3998	708	448	470	100,00%
		508		
	708/2	2355	2287	486,48%
		2272		
		2233		
		1926		
708/4 (1500ppm)	1802	1937	411,99%	
	2083			

Na experiência 3, concentração de 1500 ppm, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 476,69% no meio com a variação e de 375,03% no meio com o inibidor, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção aumentou tanto no meio com a variação como no meio com o inibidor, 486,48% e 411,99%, respetivamente (tabela 51). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

Em resumo, a média dos valores de produção de DMT apresentados para as concentrações de tiosulfato, 80, 150, 300, 450, 800 e 1500 ppm, são 526,69%, 446,78%, 446,69%, 449,90%, 439,44% e 393,51% respectivamente.

De um modo geral são valores bastante semelhantes em si, não apresentando variações significativas entre eles. Deste modo, o aumento da concentração de tiosulfato em solução não provoca o aumento de produção de DMT.

No entanto, estes são resultados bastante positivos uma vez que houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina aproximadamente 5 vezes superior ao de desmetilclorotetraciclina.

### 3.4. Experiência 4 - Estudo do efeito de Nutrafin Aqua + Plus no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Nesta experiência foi adicionado ao meio fermentativo um inibidor de cloração, denominado por Aqua + Plus. Este é adequado para neutralizar instantaneamente os íons cloro de uma solução.

O Aqua + plus é usado de acordo com as recomendações do fabricante (29). Deste modo, este reagente foi testado de duas formas diferentes, adicionando ao balão 3950 ou 7900 µL de Aqua + plus, para neutralizar uma solução de 30 mL, de forma a investigar se incrementando o volume de reagente adicionado promovemos o decréscimo de íons cloreto no meio.

As combinações de meios efetuadas nesta experiência estão descritas na figura 23. Foram utilizadas duas suspensões 3997 e 3998 cujo pH e sedimento são mostrados na tabela 52. O pH dos meios fermentativos (708, 708/2 e 708/5) foi equivalente, antes e após esterilização (tabela 53).

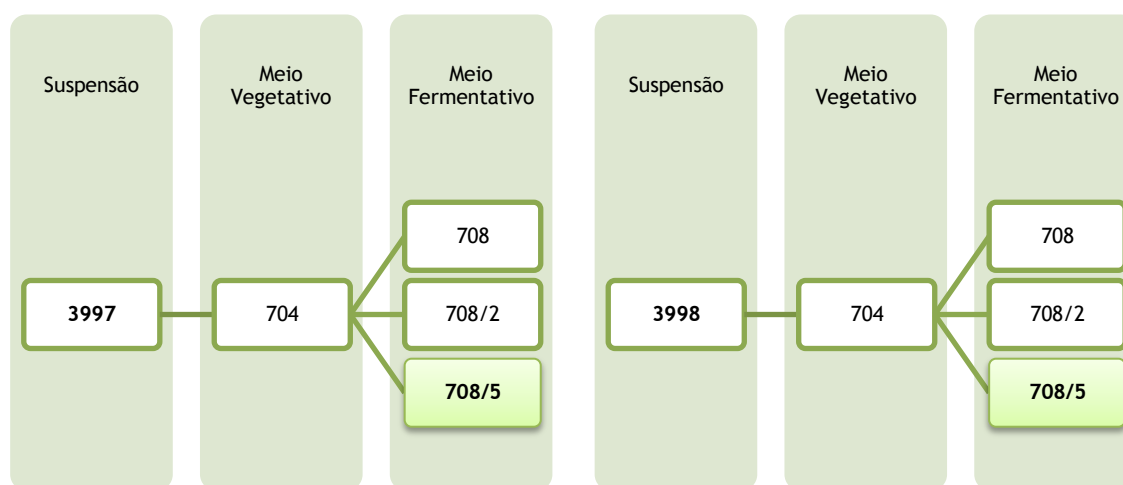


Figura 23 - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 4).

Tabela 52 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 4).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3997	5,99	7
3998	6,02	7

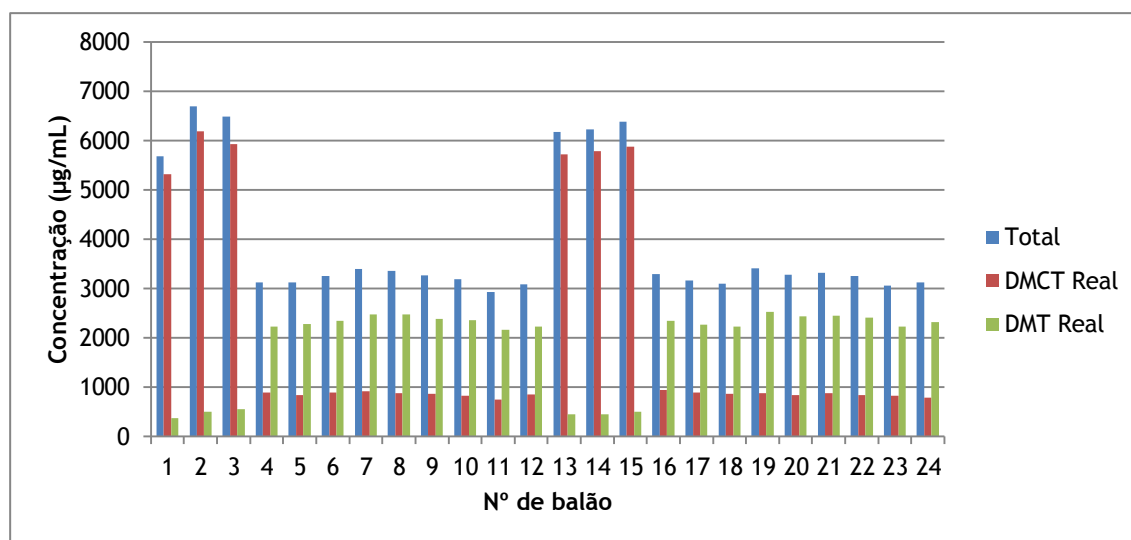
Tabela 53 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 4).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,27	5,73
708	6,32	6,84
708/2	6,36	6,88
708/5 (395 µL)	6,59	6,87
708/5 (790 µL)	6,62	6,96

Os resultados obtidos da experiência 4 são apresentados na tabela 54. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/5, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de Aqua + plus. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 54 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 4.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3997	708	1	5860	5319	93	409	371	7	5690
		2	6594	6188	92	545	511	8	6700
		3	6317	5928	91	596	559	9	6488
	708/2	4	965	891	29	2420	2234	71	3125
		5	911	841	27	2477	2286	73	3127
		6	958	899	28	2508	2354	72	3253
	708/5 (3950µL)	7	1051	922	27	2822	2475	73	3396
		8	973	883	26	2725	2473	74	3357
		9	994	872	27	2730	2394	73	3266
		10	970	836	26	2744	2364	74	3200
		11	879	757	26	2522	2173	74	2930
		12	976	856	28	2545	2232	72	3088
3998	708	13	6641	5721	93	528	455	7	6176
		14	6843	5790	93	529	448	7	6238
		15	6266	5880	92	541	508	8	6388
	708/2	16	1044	948	29	2595	2355	71	3303
		17	956	897	28	2421	2272	72	3169
		18	964	875	28	2460	2233	72	3108
	708/5 (3950µL)	19	989	882	26	2842	2536	74	3418
		20	948	846	26	2735	2440	74	3286
		21	1000	877	26	2796	2452	74	3329
		22	967	848	26	2754	2415	74	3263
		23	942	826	27	2551	2237	73	3063
		24	894	798	26	2606	2325	74	3123



**Gráfico 12** - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul), na experiência 4.

No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/5, os resultados são superiores aos do meio 708/2.

**Tabela 55** - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 4, para a adição de ambos os volumes de Aqua + plus.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
3997	708	371	481	100,00%
		511		
		559		
	708/2	2234	2291	476,69%
		2286		
		2354		
	708/5 (3950 µL)	2475	2447	509,15%
		2473		
		2394		
		2364		
708/5 (7900 µL)	2173	2256	469,38%	
	2232			
	455			
3998	708	448	470	100,00%
		448		
		508		

	2355		
<b>708/2</b>	2272	2287	486,48%
	2233		
<b>708/5</b>	2536		
<b>(3950 µL)</b>	2440	2476	526,75%
	2452		
<b>708/5</b>	2415		
<b>(7900 µL)</b>	2237	2326	494,78%
	2325		

Na experiência 4, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 476,69% no meio com a variação e de 509,15% e 469,38% no meio com o Aqua + plus (adição de 3850 µL e 7900 µL respectivamente) para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção aumentou tanto no meio com a variação como no meio com cada um volumes de Aqua + plus, 486,48%, 525,75% e 494,78%, respectivamente (tabela 55). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

### 3.5. Experiência 5 - Estudo do efeito de Corn Steep Liquor (CSL) no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Neste ensaio foi adicionado ao meio fermentativo Corn Steep Liquor. Este é considerado um importante constituinte de alguns meios de cultura pois é enriquecido com vários nutrientes além de ser uma excelente fonte de azoto, necessários para o desenvolvimento dos microrganismos (22) (30).

As combinações de meios efetuadas nesta experiência estão descritas na figura 24. Foram utilizadas duas suspensões 3997 e 3998 cujo pH e sedimento são mostrados na tabela 56. O pH dos meios fermentativos (708, 708/2 e 708/6) foi equivalente, antes e após esterilização (tabela 57).

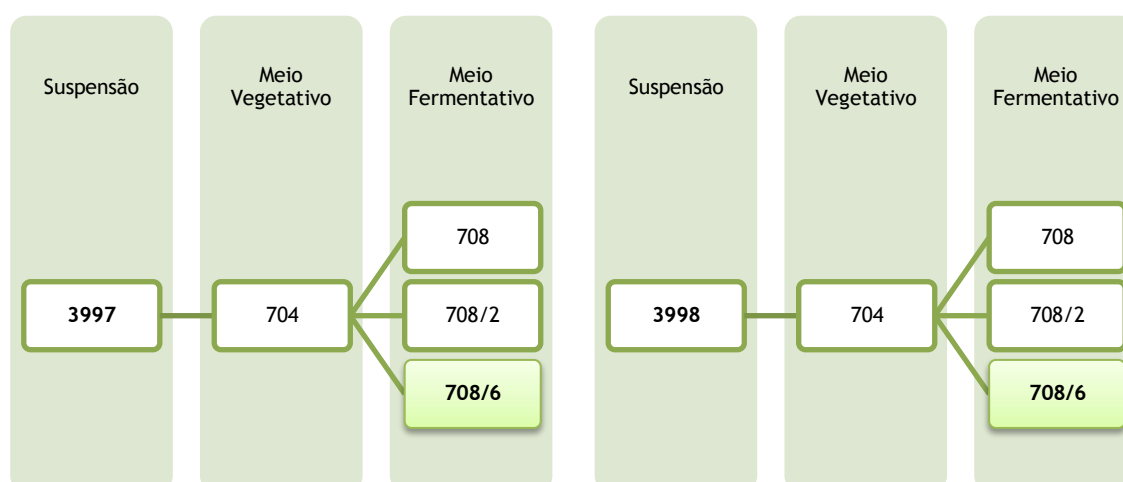


Figura 24 - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 5).

Tabela 56 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 5).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3997	6,08	7
3998	6,06	7

Tabela 57 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 5).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,22	5,86
708	6,33	6,86
708/2	6,40	6,94
708/6	5,80	6,39

Os resultados obtidos da experiência 5 são apresentados na tabela 58. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/6, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de CSL. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 58 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 5.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3997	708	1	6894	5939	92	567	488	8	6428
		2	7049	6181	92	615	539	8	6721
		3	6905	5949	92	562	484	8	6433
	708/2	4	1250	1096	33	2546	2233	67	3329
		5	1007	914	27	2660	2414	73	3329
		6	1061	881	28	2704	2246	72	3128
	708/6	7	1575	1236	46	1868	1466	54	2701
		8	1402	1251	45	1686	1504	55	2755
		9	1638	1310	46	1913	1530	54	2841
3998	708	10	7231	5896	92	596	486	8	6382
		11	7125	6358	93	540	482	7	6840
		12	6770	6145	93	510	463	7	6608
	708/2	13	1211	1025	32	2605	2204	68	3229
		14	1147	971	29	2759	2335	71	3305
		15	1084	951	29	2702	2369	71	3320
	708/6	16	1736	1416	46	2010	1639	54	3054
		17	1512	1396	46	1763	1627	54	3023
		18	1744	1395	47	2006	1605	53	3000

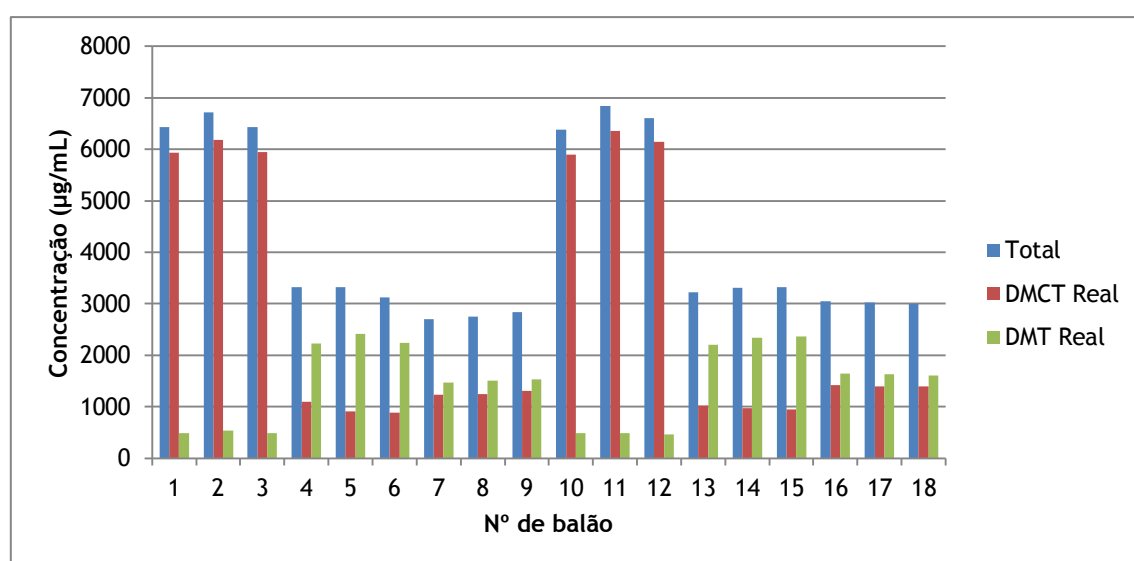


Gráfico 13 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul), na experiência 5.

No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/6, os resultados são inferiores aos do meio 708/2.

Tabela 59 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 5.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
	708	488	504	100,00%
		539		
		484		
3997	708/2	2233	2298	455,92%
		2414		
		2246		
	708/6	1466	1500	297,65%
		1504		
		1530		
	708	486	477	100,00%
		482		
		463		
3998	708/2	2204	2303	482,84%
		2335		
		2369		
	708/6	1639	1624	340,46%
		1627		
		1605		

Na experiência 5, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 455,92% no meio com a variação e de 297,65% no meio com o CSL, para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção aumentou tanto no meio com a variação como no meio com o inibidor, 482,84% e 340,42% respetivamente (tabela 59). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

### 3.6. Experiência 6 - Estudo do efeito do Citrato Trissódico dihidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Nesta experiência foi adicionado ao meio fermentativo Citrato trissódico dihidratado. Este reagente foi utilizado para verificar se exerceria um efeito tamponizante no meio de cultura.

As combinações de meios efetuadas nesta experiência estão descritas na figura 25. Foram utilizadas duas suspensões 3997 e 3998 cujo pH e sedimento são mostrados na tabela 60. O pH dos meios fermentativos (708, 708/2, 708/8) foi equivalente, antes e após esterilização (tabela 61).

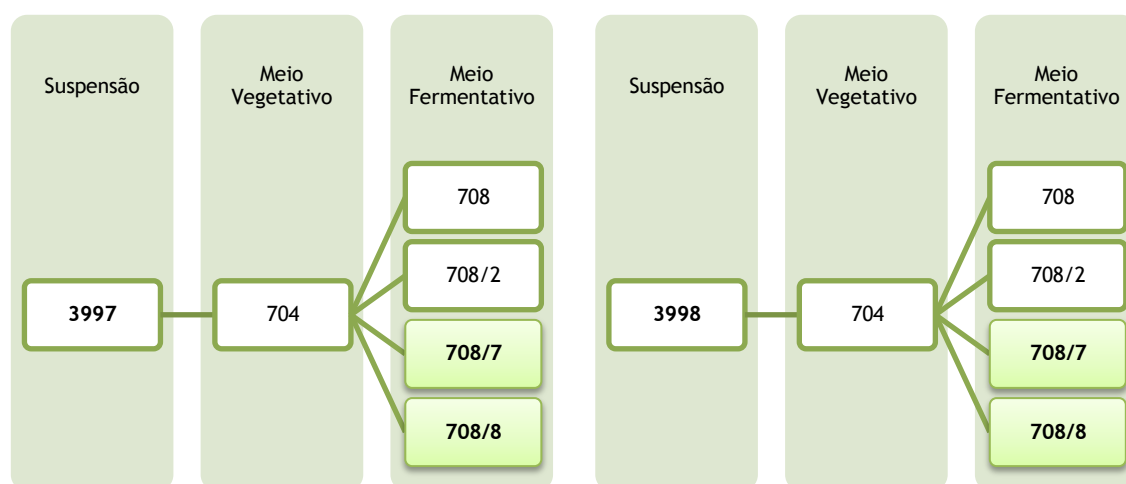


Figura 25 - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 6).

Tabela 60 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 6).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3997	6,08	7
3998	6,06	7

Tabela 61 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 6).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,22	5,86
708	6,33	6,86
708/2	6,40	6,94
708/7	6,83	7,23
708/8	6,72	7,05

Os resultados obtidos da experiência 6 são apresentados na tabela 62. Foram testados quatro meios fermentativos, 708, 708/2, 708/7 e 708/8, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro e quarto a adição de CSL. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 62 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 6.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3997	708	1	6894	5939	92	567	488	8	6428
		2	7049	6181	92	615	539	8	6721
		3	6905	5949	92	562	484	8	6433
	708/2	4	1250	1096	33	2546	2233	67	3329
		5	1007	914	27	2660	2414	73	3329
		6	1061	881	28	2704	2246	72	3128
	708/7	7	1108	920	33	2256	1874	67	2795
		8	953	836	30	2263	1984	70	2820
		9	1013	873	31	2271	1957	69	2829
	708/8	10	1039	847	31	2276	1856	69	2703
		11	986	849	31	2239	1929	69	2778
		12	1019	831	30	2381	1941	70	2772
3998	708	13	7231	5896	92	596	486	8	6382
		14	7125	6358	93	540	482	7	6840
		15	6770	6145	93	510	463	7	6608
	708/2	16	1211	1025	32	2605	2204	68	3229
		17	1147	971	29	2759	2335	71	3305
		18	1084	951	29	2702	2369	71	3320
	708/7	19	1460	1235	33	2961	2505	67	3741
		20	1171	955	32	2507	2044	68	2999
		21	1197	958	33	2480	1984	67	2942
	708/8	22	1098	946	31	2402	2069	69	3015
		23	1094	976	31	2441	2178	69	3154
		24	1151	956	33	2349	1951	67	2908

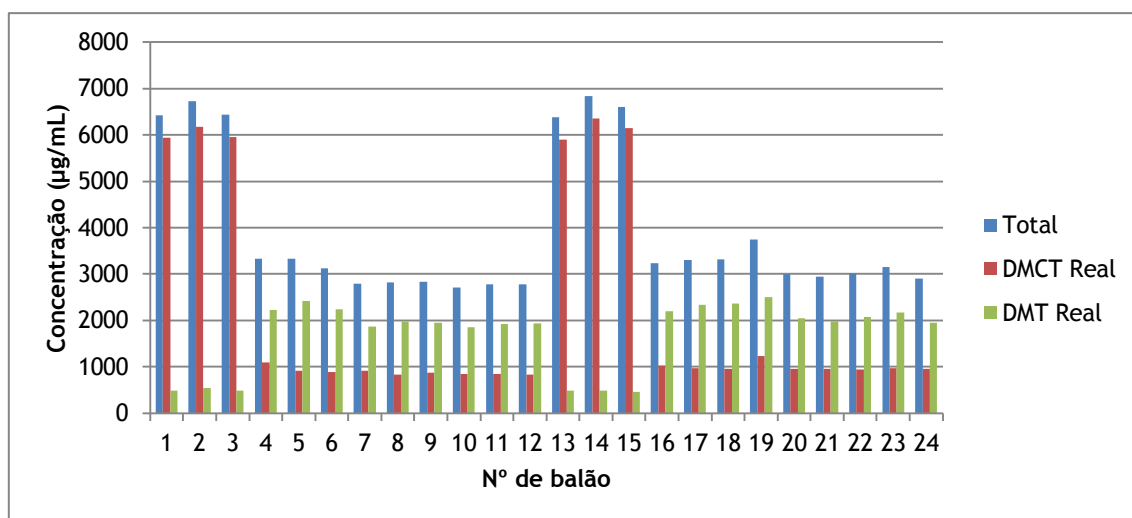


Gráfico 14 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul), na experiência 6.

No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. Tanto no meio 708/7 como no 708/8, os resultados são ligeiramente inferiores aos do meio 708/2.

Tabela 63 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 6.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
	708	488	504	100,00%
		539		
		484		
3997	708/2	2233	2298	455,92%
		2414		
		2246		
	708/7	1874	1938	384,61%
		1984		
		1957		
	708/8	1856	1909	378,72%
		1929		
		1941		
3998	708	486	477	100,00%
		482		
		463		
	708/2	2204	2303	482,84%
		2335		
		2369		

	2505		
<b>708/7</b>	2044	2178	456,66%
	1984		
	2069		
<b>708/8</b>	2178	2066	433,27%
	1951		

Na experiência 6, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 455,92% no meio com a variação e de 384,61% e 378,72% no meio com o citrato para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção aumentou tanto no meio com a variação como em ambos os meios com o citrato, 482,84%, 456,66% e 433,27% respectivamente (tabela 63). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

### 3.7. Experiência 7 - Estudo do efeito de uma solução de Micronutrientes no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Neste ensaio foi adicionado ao meio fermentativo uma solução de micronutrientes. Como o próprio nome indica é constituída por vários nutrientes que ajudam a enriquecer o meio, podendo contribuir para aumentar a produção de antibiótico. Esta solução é constituída por  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  e água destilada q.b. A sua função é fornecer ao microrganismo outros nutrientes que não estão presentes na constituição do meio base, que podem favorecer o seu crescimento e desenvolvimento (22).

As combinações de meios efetuadas nesta experiência estão descritas na figura 26. Foram utilizadas duas suspensões 3997 e 3998 cujo pH e sedimento são mostrados na tabela 64. O pH dos meios fermentativos (708, 708/2 e 708/9) foi equivalente, antes e após esterilização (tabela 65).

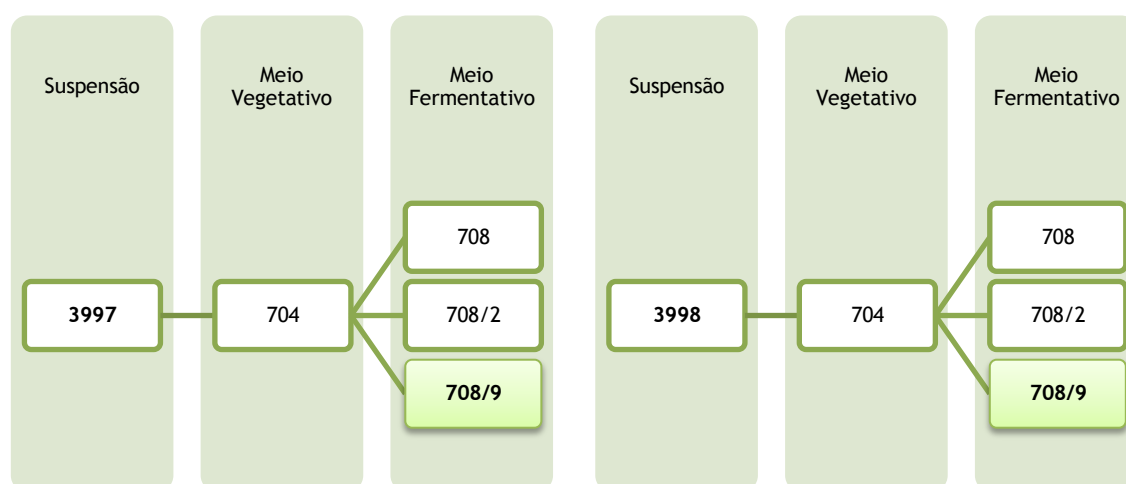


Figura 26 - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 7).

Tabela 64 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 7).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3997	6,08	7
3998	6,06	7

Tabela 65 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 7).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,22	5,86
708	6,33	6,86
708/2	6,40	6,94
708/9	6,35	6,80

Os resultados obtidos da experiência 7 são apresentados na tabela 66. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/9, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição da solução de micronutrientes. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 66 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 7.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>
3997	708	1	6894	5939	92	567	488	8	6428
		2	7049	6181	92	615	539	8	6721
		3	6905	5949	92	562	484	8	6433
	708/2	4	1250	1096	33	2546	2233	67	3329
		5	1007	914	27	2660	2414	73	3329
		6	1061	881	28	2704	2246	72	3128
	708/9	7	1103	899	29	2663	2171	71	3071
		8	996	904	27	2700	2451	73	3355
		9	1127	954	28	2854	2415	72	3369
3998	708	10	7231	5896	92	596	486	8	6382
		11	7125	6358	93	540	482	7	6840
		12	6770	6145	93	510	463	7	6608
	708/2	13	1211	1025	32	2605	2204	68	3229
		14	1147	971	29	2759	2335	71	3305
		15	1084	951	29	2702	2369	71	3320
	708/9	16	1197	1031	30	2765	2382	70	3413
		17	1201	979	30	2800	2283	70	3262
		18	1195	1011	30	2855	2416	70	3427

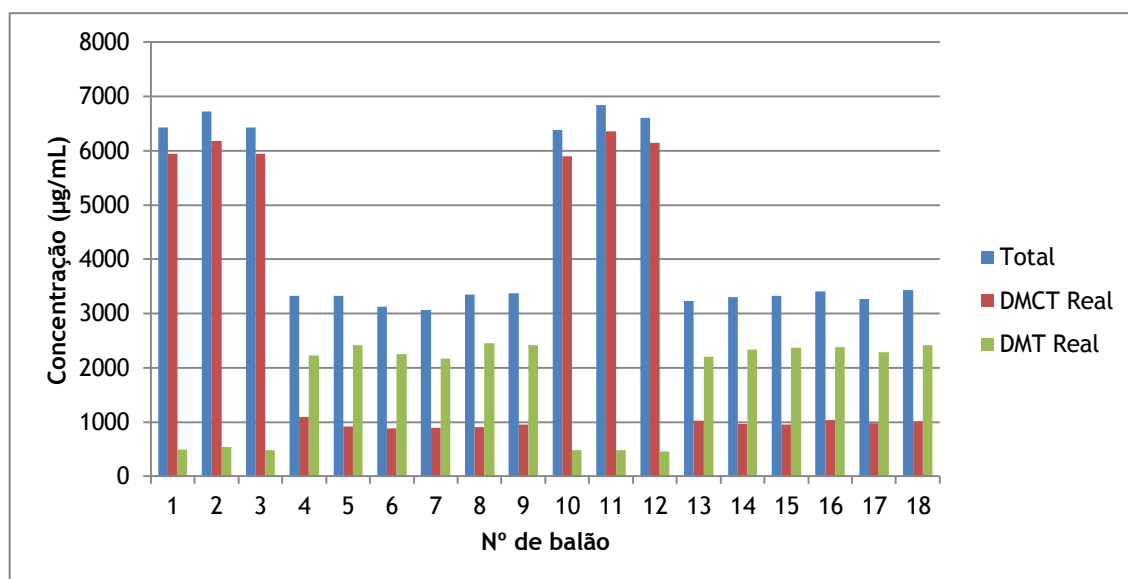


Gráfico 15 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul), na experiência 7.

No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/9, os resultados são superiores aos do meio 708/2.

Tabela 67 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 7.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
	708	488	504	100,00%
		539		
		484		
3997	708/2	2233	2298	455,92%
		2414		
		2246		
	708/9	2171	2346	465,42%
		2451		
		2415		
3998	708	486	477	100,00%
		482		
		463		
	708/2	2204	2303	482,84%
		2335		
		2369		

	2382		
708/9	2283	2360	494,92%
	2416		

Na experiência 7, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 455,92% no meio com a variação e de 465,42% no meio com a solução de micronutrientes para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção aumentou tanto no meio com a variação como no meio com a solução, 482,84% e 494,92% respectivamente (tabela 67). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

### 3.8. Experiência 8 - Estudo do efeito do Tiocianato de Benzilo (BTC) no meio fermentativo de *S. aureofaciens*

Neste ensaio foi adicionado ao meio fermentativo um indutor de produção, denominado por Tiocianato de benzilo. A sua adição ao meio contribui para aumentar a produção de antibiótico (22).

As combinações de meios efetuadas nesta experiência estão descritas na figura 27. Foram utilizadas duas suspensões 3997 e 3998 cujo pH e sedimento são mostrados na tabela 68. O pH dos meios fermentativos (708, 708/2 e 708/10) foi equivalente, antes e após esterilização (tabela 69).

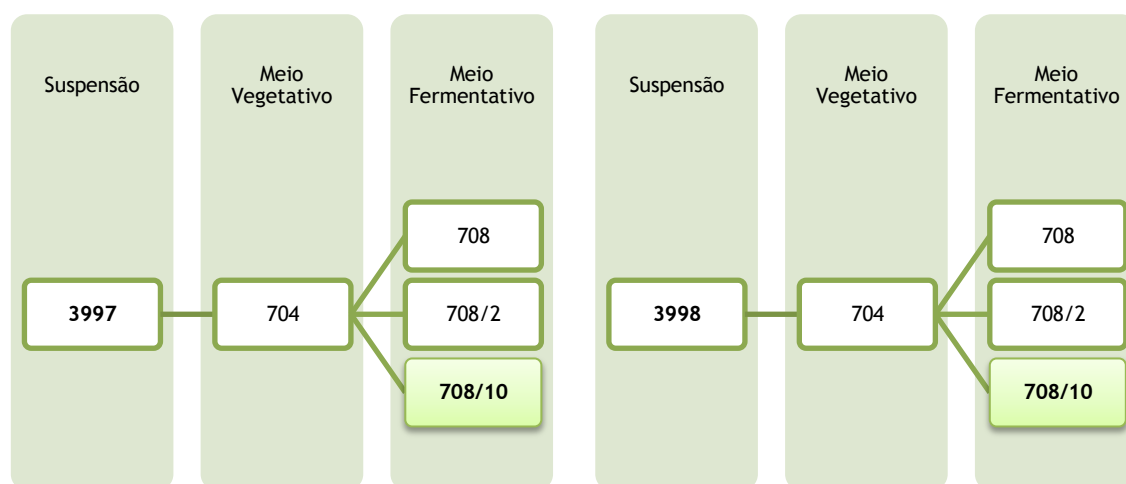


Figura 27 - Diagramas representativos das combinações de meios (experiência 8).

Tabela 68 - Registo do pH e da % de sedimentação da fase vegetativa (experiência 8).

Suspensão	pH	Sedimento (%)
3997	6,08	7
3998	6,06	7

Tabela 69 - Registo do pH tal e qual e depois de esterilizado dos meios (experiência 8).

Meio	pH T.Q.	pH Dep. Est.
704	5,22	5,86
708	6,33	6,86
708/2	6,40	6,94
708/8	5,80	6,39

Os resultados obtidos da experiência 8 são apresentados na tabela 70. Foram testados três meios fermentativos, 708, 708/2 e 708/10, sendo o primeiro o controlo, o segundo a variação com sulfato de amónio e o terceiro a adição de BTC. A constituição de ambos está descrita anteriormente (secção Materiais e Métodos).

Tabela 70 - Registo dos resultados obtidos, na experiência 8.

Suspensão	Meio	Número de Balão	HPLC DMCT (µg/mL)	DMCT real (µg/mL) <sup>(1)</sup>	DMCT real (%) <sup>(2)</sup>	HPLC DMT (µg/mL)	DMT real (µg/mL) <sup>(3)</sup>	DMT real (%) <sup>(4)</sup>	HPLC total (µg/mL) <sup>(5)</sup>	
3997	708	1	6894	5939	92	567	488	8	6428	
		2	7049	6181	92	615	539	8	6721	
		3	6905	5949	92	562	484	8	6433	
	708/2	4	1250	1096	33	2546	2233	67	3329	
		5	1007	914	27	2660	2414	73	3329	
		6	1061	881	28	2704	2246	72	3128	
		7	991	884	26	2856	2548	74	3433	
		708/10	8	907	837	25	2791	2576	75	3414
			9	1107	937	26	3221	2725	74	3662
3998	708	10	7231	5896	92	596	486	8	6382	
		11	7125	6358	93	540	482	7	6840	
		12	6770	6145	93	510	463	7	6608	
	708/2	13	1211	1025	32	2605	2204	68	3229	
		14	1147	971	29	2759	2335	71	3305	
		15	1084	951	29	2702	2369	71	3320	
		16	1177	942	27	3247	2598	73	3539	
		708/10	17	1125	952	27	3069	2597	73	3549
			18	1177	942	27	3153	2522	73	3464

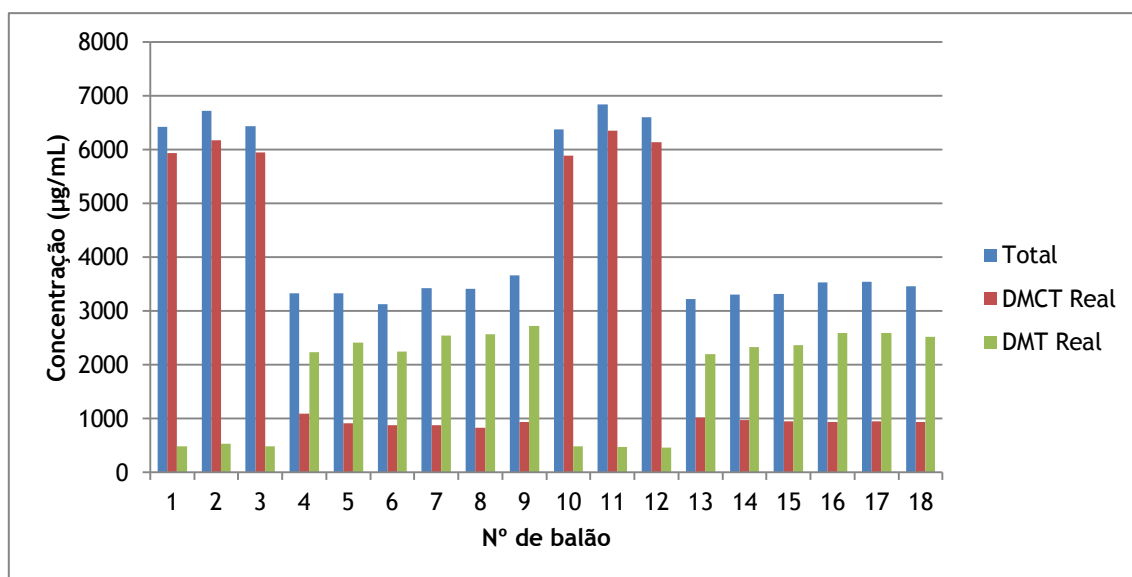


Gráfico 16 - Representação gráfica da quantidade real de DMT produzida (verde), da quantidade real de DMCT produzida (vermelho) e da quantidade total produzida (azul), na experiência 8.

No meio 708 existe maior produção de desmetilclorotetraciclina em relação à desmetiltetraciclina. No meio 708/2 verificou-se inversão do perfil de metabolitos ocorrendo um aumento na concentração de DMT em comparação com a DMCT. No meio 708/10, os resultados são superiores aos do meio 708/2.

Tabela 71 - Registo da % de produção de DMT obtida ao longo da experiência 8.

Suspensão	Meio	DMT real (µg/mL)	Média DMT real (µg/mL)	% Produção DMT real
	708	488	504	100,00%
		539		
		484		
3997	708/2	2233	2298	455,92%
		2414		
		2246		
	708/10	2548	2617	519,20%
		2576		
		2725		
3998	708	486	477	100,00%
		482		
		463		
	708/2	2204	2303	482,84%
		2335		
		2369		

	2598		
708/10	2597	2572	539,36%
	2522		

Na experiência 8, houve um aumento de produção de desmetiltetraciclina de 455,92% no meio com a variação e de 519,20% no meio com o BTC para a primeira suspensão, enquanto que na segunda a produção aumentou tanto no meio com a variação como no meio com a solução, 482,84% e 539,36% respectivamente (tabela 71). Apesar de estes resultados serem satisfatórios, não são viáveis para utilizar a nível industrial pois a concentração de DMT teria de atingir entre 6000 e 8000 µg/mL, para se tornar um processo rentável para a empresa.

## Capítulo 4

### 4. Conclusão

O presente trabalho consistiu na otimização de um meio de cultura para a produção de desmetiltetraciclina por via fermentativa, usando uma estirpe de *Streptomyces aureofaciens*, originalmente produtora de desmetilclorotetraciclina.

A principal diferença entre a desmetilclorotetraciclina e a desmetiltetraciclina consiste na presença de íons cloro, logo o principal foco desta dissertação foi a remoção e/ou inibição desses mesmos íons no meio fermentativo.

De acordo com as necessidades de cada microrganismo, é necessário que o meio de cultura tenha os nutrientes necessários ao seu crescimento e desenvolvimento. A constituição dos meios tem elevada importância no processo fermentativo, influenciando o desenvolvimento da cultura, a produção dos metabolitos bem como a sua quantidade e pureza.

Deste modo, foram usados meios de cultura complexos constituídos por várias fontes de carbono e azoto e suplementados com micronutrientes, que em conjunto com o controlo de temperatura, pH e agitação, permitiram otimizar o processo.

No meio fermentativo já existente foram testadas as várias alterações, tais como a adição de sulfato de amónio, de sal dipotássico 1,3,4-tiazol-2,5-ditiol, de tiosulfato de sódio, de aqua + plus, de corn steep liquor, de citrato trissódico dihidratado, da solução de micronutrientes e de tiocianato de benzilo. Cada um destes reagentes foi testado separadamente, tendo como controlo o meio fermentativo inicial, de modo a verificar qual o seu efeito na produção da desmetiltetraciclina. O uso de diferentes suspensões fez com que cada experiência tivesse de ser analisada individualmente.

A primeira experiência, onde ocorreu a troca de cloreto de amónio por sulfato de amónio, foi crucial no decorrer do trabalho pois verificou-se uma inversão do perfil de metabolitos, ou seja, aumentou a produção de desmetiltetraciclina face a desmetilclorotetraciclina. Em média, houve um aumento significativo de 822,93% na quantidade de DMT produzida em relação ao controlo.

Sendo assim, todos os meios de cultura usados nas experiências realizadas posteriormente partilharam o fato de terem sulfato de amónio na sua constituição em conjunto com o

reagente a analisar, pois o objetivo seguinte foi aumentar a concentração de DMT para níveis ainda mais superiores aos já atingidos.

Na segunda experiência foi experimentado o sal dipotássico 1,3,4-tiazol-2,5-ditiol em quatro concentrações distintas, 10, 20, 50 e 75 ppm. Em todas as concentrações, ocorreu uma inversão no perfil dos antibióticos favorecendo a desmetiltetraciclina. Em média, a quantidade de DMT alcançada para cada concentração deste inibidor foi de 779,77%, 550,41%, 508,08% e 436,27% respetivamente. Com estes valores, concluiu-se que o aumento da concentração de inibidor não implica um aumento na produção de DMT, o que se justifica com as percentagens acima descritas. O uso das diferentes suspensões em cada concentração também pode ter influenciado estes resultados, uma vez que o pH e o volume micelar diferem em cada suspensão.

Seguidamente, na terceira experiência foi testado o tiosulfato de sódio em cinco concentrações diferentes, 80, 150, 300, 450, 800 e 1500 ppm, verificando-se também um aumento considerável na produção de desmetiltetraciclina. Em média, a quantidade de DMT atingida para cada concentração foi de 526,69%, 446,78%, 446,69%, 449,90%, 439,44% e 393,51% respetivamente. As percentagens obtidas apresentam-se de uma forma bastante linear, logo verificou-se que o aumento da concentração de tiosulfato não induz um aumento na produção desta tetraciclina.

Em relação à quarta experiência foi experimentado o aqua + plus através de duas quantidades distintas. Para ambas, a média da quantidade produzida de DMT foi de 517,95% e 482,08% respetivamente, onde se identificou claramente a inversão de perfil das tetraciclinas.

Na quinta experiência pretendeu-se enriquecer ainda mais o meio ao adicionar corn steep liquor. Em média, ocorreu um aumento de 319,06% na produção de desmetiltetraciclina relativamente ao controlo. Este resultado foi parcialmente inferior aos anteriores pois poderá ter ocorrido um aumento excessivo de fonte de azoto no meio, visto que o corn steep é bastante rico em compostos azotados, o que prejudicou o desenvolvimento do microrganismo, diminuindo assim a produção de DMT.

Consequentemente, na sexta experiência foi testado o citrato trissódico dihidratado de duas maneiras diferentes, a primeira num meio sem o sulfato de amónio e a segunda em conjunto com o sulfato de amónio. Em ambos os casos, destacou-se o aumento da concentração de DMT. Em média, a quantidade produzida desta tetraciclina foi de 420,64% para o primeiro caso e 406,00% para o segundo caso. Dado a semelhança entre os valores apresentados concluiu-se que só o citrato trissódico no meio também faz inverter o perfil dos metabolitos não precisando da adição de sulfato de sódio para o conseguir.

A sétima experiência, em que foi adicionada a solução de micronutrientes, teve o intuito de acrescentar outros nutrientes que não estão presentes na constituição do meio base que possam ajudar no desenvolvimento do microrganismo. Em média, obteve-se um aumento de 480,17% na produção de desmetiltetraciclina.

Por fim, na última experiência foi usado o tiocianato de benzilo para potenciar a produção de antibiótico. Em média, houve um aumento de 529,28% na produção de DMT comparativamente ao controlo.

Em conclusão, todos os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, uma vez que em todas as experiências ocorreu inversão do perfil dos antibióticos, levando a um aumento considerável da produção de desmetiltetraciclina.

No entanto, para utilização a nível industrial, estes valores não são viáveis, pois a quantidade de DMT produzida pelo microrganismo teria de ser muito mais elevada. A concentração pretendida estaria entre 6000 e 8000 µg/mL. Uma vez que a desmetiltetraciclina é usada como matéria-prima para a síntese de um antibiótico de grande interesse para a empresa, só com valores semelhantes aos referidos seria rentável e economicamente favorável a sua utilização.

Para testar a capacidade de produção do microrganismo e compreender se os níveis de produção de desmetiltetraciclina podem ser iguais aos de desmetilclorotetraciclina foi efetuada uma experiência em que ao meio de cultura com sulfato de amónio foi adicionado desmetiltetraciclina em pó, após 72h de fermentação, até completar a concentração atingida pela desmetilclorotetraciclina. No final do tempo de fermentação, o microrganismo conseguiu alcançar quantidade de DMT semelhante à DMCT. Deste modo, concluiu-se que o microrganismo consegue atingir níveis muito elevados de DMCT como de DMT.

Finalizando, de um modo geral, a média de produção de desmetiltetraciclina atingiu os 500,00%, ou seja, aproximadamente 5 vezes superior à produção de desmetilclorotetraciclina, tornando estes resultados bastante promissores.



## Capítulo 5

### 5. Perspetivas Futuras

Visto que em cada experiência se obteve um resultado satisfatório, outra abordagem poderia ser a combinação de algumas destas experiências, para se tentar obter uma maior produção de desmetiltetraciclina.

Outra sugestão consiste na produção de desmetiltetraciclina através de um meio no qual os iões sejam reduzidos por um processo chamado eletrodialise. Neste processo é aplicado uma corrente elétrica que promove a separação dos iões de uma solução, através de um dispositivo que contém dois compartimentos divididos por uma membrana de troca aniónica ou catiónica. Um compartimento é cheio com o meio de cultura e o outro com água desionizada. Os iões migram através da membrana, do meio para a água.

Após a eletrodialise, poderá ser feita uma adição controlada de iões necessários ao processo fermentativo, excluindo os iões cloreto, para evitar a formação de desmetilclorotetraciclina.

Outra ideia, seria a realização do desenho de experiências, organizando os melhores inputs (que esta dissertação já apresenta), analisando as suas sinergias em combinação de forma a incrementar o output.



## Capítulo 6

### 6. Bibliografia

1. **Sapadin A. N., Fleischmajer R.** Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *Journal Am Acad Dermatol.* February 2006, Vol. 54.
2. **Thakur D., Bora T. C., Bordoloi G. N., Mazumdar S.** Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal de Mycologie Médicale.* June 4, 2009, Vol. 19, pp. 161-167.
3. **Atta H. M.** Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society.* December 9, 2011.
4. **Brooks M. S., Burdock T. J., Ghaly A. E., Dave D.** Changes in Cell Structure, Morphology and Activity of *Streptomyces venezuelae* during the Growth, Shocking and Jadomycin Production Stages. *Microbial & Biochemical Technology.* April 25, 2012, Vol. 4, pp. 063-075.
5. **Fuoco D.** Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs. *Antibiotics.* June 12, 2012, Vol. 1, pp. 1-13.
6. **Pickens L. B., Tang Y.** Decoding and engineering tetracycline biosynthesis. *Metabolic Engineering.* October 22, 2008, Vol. 11, pp. 69-75.
7. **Chopra I., Roberts M.** Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology.* June 2001, Vol. 65.
8. **Guarddon M., Miranda J. M., Rodríguez J. A., Vásquez B. I., Cepeda A., Franco C. M.** Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of tetA and tetB bacterial tetracycline resistance genes in food. *International Journal of Food Microbiology.* February 21, 2011, Vol. 146, pp. 284-289.
9. **Pereira-Maia E. C., Silva P. P., Almeida W. B., Santos H. F., Marcial B. L., Ruggiero R., Guerra W.** Tetraciclina e Glicilciclina: uma visão geral. *Quim. Nova.* February 22, 2010, Vol. 33, pp. 700-706.

10. Chopra I. Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology*. 2001, Vol. 1, pp. 464-469.
11. D'Agostino P., Ferlazzo V., Milano S., Rosa M., Bella G., Caruso R., Barbera C., Grimaudo S., Tolomeo M., Feo S., Cillari E. Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines by the inhibition of nitric oxide and interleukin-12 synthesis in J774 cell line. *International Immunopharmacology*. May 4, 2001, Vol. 1, pp. 1765-1776.
12. Monk E., Shalita A., Siegel D. M. Clinical applications of non-antimicrobial tetracyclines in dermatology. *Pharmacological Research*. 2011, Vol. 63, pp. 130-145.
13. Sandler C., Nurmi K., Lindstedt K. A., Sorsa T., Golub L. M., Kovanen P. T., Eklund K. K. Chemically modified tetracyclines induce apoptosis in cultured mast cells. *International Immunopharmacology*. April 19, 2005, Vol. 5, pp. 1611-1621.
14. Bettany J. T., Peet N. M., Wolowacz R. G., Skerry T. M., Grabowski P. S. Tetracyclines Induce Apoptosis in Osteoclasts. *Bone*. July de 2000, Vol. 27, pp. 75-80.
15. Fife R. S., Sledge G. W., Sissons S., Zerler B. Effects of tetracyclines on angiogenesis in vitro. *Cancer Letters*. January 6, 2000, Vol. 153, pp. 75-78.
16. Jain N., Jain G. K., Ahmad F. J., Khar R. K. Validated stability-indicating densitometric thin-layer chromatography: Application to stress degradation studies of minocycline. *Analytica Chimica Acta*. August 19, 2007, Vol. 599, pp. 302-309.
17. Blum D., Chtarto A., Tenenbaum L., Brotchi J., Levivier M. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*. September 30, 2004, Vol. 17, pp. 359-366.
18. Garrido-Mesa A., Zarzuelo A., Gálvez J. What is behind the non-antibiotic properties of minocycline? *Pharmacological Research*. October 9, 2012, Vol. 67, pp. 18-30.
19. Homsí S., Federico F., Croci N., Palmier B., Plotkine M., Marchand-Leroux C., Jafarian-Tehrani M. Minocycline effects on cerebral edema: Relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Research*. July 23, 2009, Vol. 1291, pp. 122-132.
20. Pourgholami M. H., Ataie-Kachoie P., Badar S., Morris D. L. Minocycline inhibits malignant ascites of ovarian cancer through targeting multiple signaling pathways. *Gynecologic Oncology*. December 26, 2012, Vol. 129, pp. 113-119.

21. Morão A., Alves A. M. B., Cardoso J. P. Ultrafiltration of demethylchlortetracycline industrial fermentation broths. *Separation and Purification Technology*. 2001, Vols. 22-23, pp. 459-466.
22. Dados cedidos pela empresa AtralCipan.
23. Ryan M. J. Strain for the production of 6-demethyltetracycline, method for producing the strain and vector for use in the method. *United States Patent 5,965,429*. October 12, 1999.
24. Virgilio A., Hengeller C. Process of the manufacture of 6-demethyltetracycline. *United States Patent Office 3,070,514*. December 25, 1962.
25. Mercer C. K., Wilkin G. D. Production of 6-demethyltetracycline. *United States Patent 3,639,214*. February 1, 1972.
26. Olano C., Lombo F., Méndez C., Salas J. A. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. July 15, 2008, Vol. 10, pp. 281-292.
27. Li Y. M., Schepdael A. V., Roets E., Hoogmartens J. Analysis of demeclocycline by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. January 25, 1996, Vol. 740, pp. 119-123.
28. Goodman J. J., Manuet N. Y. Fermentation of tetracycline. *United States Patent Office 3,037,916*. 5 de June de 1962.
29. Costa A. Composition with plant additives and treatment method for reducing stress levels in fish. *United States Patent 5,942,232*. August 24, 1999.
30. Xiao X., Hou Y., Liu Y., Zhao H., Dong L., Du J., Wang Y., Bai G., Luo G. Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOF MS and HPLC. *Talanta*. 4 de January de 2013, pp. 344-348.