

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E XATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OPERAÇÃO ÓTIMA DE REATOR PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
AMPICILINA COM CRISTALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DOS PRODUTOS**

Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro

SÃO CARLOS

2007

**OPERAÇÃO ÓTIMA DE REATOR PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
AMPICILINA COM CRISTALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DOS PRODUTOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E XATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OPERAÇÃO ÓTIMA DE REATOR PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE
AMPICILINA COM CRISTALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DOS PRODUTOS**

Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

SÃO CARLOS

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R484oo

Ribeiro, Marcelo Perencin de Arruda.

Operação ótima de reator para síntese enzimática de ampicilina com cristalização simultânea dos produtos / Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

199 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Biotecnologia - processos. 2. Ampicilina. 3. Síntese enzimática. 4. Controle ótimo. 5. Análise por injeção de fluxo. 6. Batelada alimentada. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCELO PERECIN DE ARRUDA RIBEIRO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 05 DE MARÇO DE 2007.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano
Orientador, PPG-EQ/UFSCar



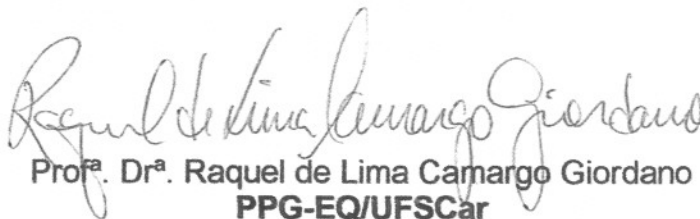
Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento
DEQ/EPUSP



Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite
ICADS/UFBa



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
FEQ/UNICAMP



Prof.^a Dr.^a Raquel de Lima Camargo Giordano
PPG-EQ/UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais e meus irmãos,
pelo apoio e incentivo durante todos esses anos.

À minha esposa e aos meus dois filhos,
pela paciência e compreensão pelos dias ausentes.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Roberto de Campos Giordano por ter sido um grande exemplo profissional e pessoal. Por sua amizade e paciência e pela orientação durante todos esses anos. À Raquel de Lima de Campos Giordano, pelas sugestões, críticas e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor José Maurício Pinto por sua acolhida e pela oportunidade de trabalhar junto à sua equipe no *Othmer Department of Chemical and Biological Sciences and Engineering*, da *Polytechnic University*, em Nova Iorque.

Aos amigos-consultores que compartilham de meu interesse pela simulação: Charles, João, Gilson, Antônio e Thiago pelas discussões que tanto contribuíram para este trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, pesquisadores dos laboratórios de Simulação, Tecnologia Enzimática, Bioseparações, Controle de Processos e Kyatera pela amizade, ajuda, conselhos e conversas que foram muito importantes nestes longos anos de trabalho e estudo.

À minha família, cujo apoio foi essencial para a conclusão deste projeto.

Aos órgãos de fomento FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro sem o qual a execução deste trabalho não seria possível.

Resumo

A produção industrial de penicilinas semi-sintéticas é conduzida sob condições extremas de temperatura, demanda solventes organoclorados em seu processo e gera uma grande quantidade de resíduos não recicláveis. As crescentes preocupações governamentais em relação ao meio ambiente e a criação de leis de proteção ambiental nas últimas décadas vêm colocando esses processos sob críticas e incentivando a busca de rotas alternativas mais “limpas”. A síntese enzimática desses antibióticos, usando penicilina G acilase (PGA) como biocatalisador, pode ser efetuada em condições amenas de temperatura e pH e vem sendo estudada como alternativa à rota atualmente empregada, mas o maior obstáculo para a substituição da rota química pela enzimática ainda é o baixo rendimento desta última. O uso de um reator enzimático semi-contínuo com um meio aquoso-precipitado é uma abordagem promissora em termos de eficiência. Contudo, ainda é necessário otimizar sua operação para que a rota enzimática seja economicamente competitiva.

Esta tese enfoca vários aspectos da síntese enzimática de ampicilina. Avançou-se na compreensão do mecanismo de reação, em pontos ainda não consensuais na literatura – em especial com respeito ao papel do núcleo beta-lactâmico durante a etapa de formação do intermediário acil-enzima, com importantes conseqüências para a operação industrial do reator.

A difusão nos poros do biocatalisador e sua influência sobre o perfil de pH nesse micro-ambiente foram avaliadas por meio de simulações computacionais. Os resultados indicam resistências difusivas apreciáveis no interior do biocatalisador, suficientes para gerar perfis significativos de pH. A complexidade desse processo como um todo levou a que se utilizassem modelos cinéticos mecanísticos simplificados ou empíricos.

Por meio de técnicas de otimização dinâmica (controle ótimo), perfis de alimentação de reagentes foram obtidos. Para isso, um modelo simplificado do reator enzimático semi-contínuo integrado, com cristalização dos produtos (desejado e indesejado), foi utilizado. Respostas obtidas usando técnicas diferentes de otimização dinâmica resultaram, qualitativamente, em uma mesma heurística ótima para a operação do reator.

Com a utilização de modelos simplificados, funções de alimentação obtidas teoricamente com algoritmos de controle ótimo em malha aberta poderão desviar-se das funções reais necessárias para manter os perfis de concentração no reator otimizado. Além disso, perturbações nas variáveis de entrada poderão levar o sistema a percorrer trajetórias diferentes. Assim, o monitoramento da reação em tempo real é imprescindível em um reator piloto ou industrial. Neste contexto, foi desenvolvido um procedimento de análise em fluxo incorporando técnicas de multicalibração. O procedimento proposto apresentou bons resultados na quantificação dos componentes de interesse, mostrando-se como método adequado para o monitoramento em tempo real do reator, principalmente, quando feita a reconciliação dos dados obtidos a partir dos balanços de massa.

Ensaio de síntese de ampicilina, utilizando biocatalisador imobilizado (Recordatti, Itália) foram realizados com o objetivo de melhorar alguns modelos cinéticos simplificados.

Os modelos re-estimados foram inseridos em algoritmos de otimização, resultando em trajetórias que seguem a mesma heurística obtida anteriormente. Entretanto, duas corridas de validação da estratégia ótima, realizadas em reator semi-contínuo integrado, evidenciaram um distanciamento entre o modelo utilizado e o processo real. Esses desvios podem ser explicados pela extrapolação do modelo em termos da carga enzimática utilizada no reator.

Um modelo que leve em conta o efeito do pH sobre a cinética parece ser importante para permitir o ajuste fino da seletividade e produtividade do reator industrial.

Abstract

Nowadays, industrial production of semi-synthetic penicillins requires low temperatures, organochloride solvents and yields a great amount of non-recyclable wastes. During the last decades, concerns about environmental impacts have increased, as well as the environmental legislation restrictions. Thus, the pursuit of cleaner routes has been encouraged. Enzymatic synthesis of these antibiotics, using penicillin G acylase (PGA) as biocatalyst, may be carried out at mild temperatures and pH, and is an “environmental-friendly” route, alternative to the chemical synthesis. However, the low yields of the enzymatic process are still a drawback for their industrial implementation. An enzymatic semi-batch reactor using aqueous-precipitated medium is a promising approach to improve process efficiency. Yet, finding the optimal operation condition of the reactor is still a challenge, in order to make the enzymatic route economically competitive.

This thesis addresses this issue, focusing on several aspects of the enzymatic synthesis of ampicillin. The comprehension of the reaction mechanism, still not a consensus in the literature, was improved – especially with respect to the role of the beta-lactam nucleus during the formation of the acyl-enzyme intermediate, which has important consequences on the reactor operation.

Diffusion in the biocatalyst pores and its influence on the pH profile within this micro-environment were assessed through computer simulations. Results indicate considerable diffusion resistances within the biocatalyst, yielding important pH profiles. The process complexity led to the use of simplified mechanistic or empirical kinetic models.

Applying dynamic optimization (optimal control) techniques, feed profiles for the reactants were obtained. A simplified model for the integrated semi-batch reactor for

enzymatic synthesis of ampicillin with product crystallization was used for this purpose. Different techniques of dynamic optimization provided qualitatively the same optimum heuristics for the process operation.

Since simplified models were used in optimal open-loop control algorithms, theoretical feed policies may diverge from those that would be needed to maintain the track of the concentration profiles of the optimized reactor. Moreover, disturbances in the input variables might lead the system to a different course. Thus, on-line monitoring is essential in pilot plants or industrial reactors. Multivariate calibration using UV spectra was the basis for the development of a system of analysis via flow injection (FIA), with good results.

Ampicillin synthesis assays using an industrial biocatalyst (Recordatti, Italy) were run in order to improve some simplified kinetic models.

The re-estimated models were inserted in optimization algorithms, providing trajectories in accordance with the same heuristics previously obtained. Experimental results obtained after two runs in the integrated semi-continuous reactor put into evidence a mismatch between model responses and the real process. This difference may be explained by the extrapolation of the kinetic model with respect to the enzymatic reactor load. On the other side, using a biocatalyst wrapped with a secondary inert matrix might alter the micro-environment of the enzyme, especially with respect to pH.

Using a model that takes into account the effect of pH on the kinetics seems to be important to allow the fine-tuning of the industrial reactor selectivity and productivity

Lista de Figuras

- Figura 1 Estrutura molecular dos antibióticos β -lactâmicos exemplificada por dois antibióticos naturais (de cima para baixo) penicilina G (ou benzilpenicilina) e cefalosporina C. Em destaque, o anel β -lactâmico.....24
- Figura 2 Família das penicilinas. 6-APA: ácido 6-amino penicilânico.....25
- Figura 3 Esquema da síntese termodinamicamente controlada de ampicilina a partir da D-(-)-fenilglicina (FG) e do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Segundo a literatura, o grupo amino do 6-APA e o grupo carboxílico da FG devem estar neutros para que ocorra a síntese (Diender *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996a, Margolin *et al.*, 1980).28
- Figura 4 Síntese cineticamente controlada de ampicilina. EMFG, éster metílico de D-(-)-fenilglicina; 6-APA, ácido 6-amino penicilânico; FG, D-(-)-fenilglicina; PGA, penicilina G acilase.....29
- Figura 5 Ação catalítica da penicilina acilase (hidrólise de penicilina G) segundo Duggleby *et al.*, 1995: o mecanismo mostra o papel da molécula ponte (água) que atuaria como uma base virtual, e do grupo α -amino que aumentaria a nucleofilicidade da Serina β 1. A desacilação do complexo acil-enzima ocorre por ataque nucleofílico de uma molécula de água (passo 4 do mecanismo). Ligações em negrito indicam a cadeia principal da enzima.....31
- Figura 6 Efeito do pH na seletividade, A, e nas velocidades iniciais de síntese de ampicilina (Ampicillin synthesis) e hidrólise de éster metílico de D-(-)-fenilglicina (PGME hydrolysis), B. Condições: concentrações de enzima, de 6-APA e de EMFG, 3 UI/ml, 50 mM e 150 mM, respectivamente; 25°C [Gráficos retirados de Ospina *et al.*, 1996a].37
- Figura 7 Esquema do passo intermediário da hidrólise da Penicilina G. A figura mostra a interação da Arg α 145 com o grupo carboxílico do anel tiazolidina segundo sugerido por Alkema *et al.*, 2000. Ligações em negrito indicam a cadeia principal da enzima.....39
- Figura 8 Esquema do mecanismo de síntese de penicilinas semi-sintéticas. EH = enzima livre, AB = derivado do doador acil (por exemplo, EMFG no caso da ampicilina), NH = núcleo β -lactâmico (6-APA), AN = antibiótico, AOH = doador acil (FG, no caso da ampicilina), EA = complexo acil-enzima, EA••NH

	= complexo acil-enzima-núcleo, BH = metanol (no caso de se utilizar um derivado éster). Ligações não covalentes são denotadas por ••. Em destaque, passos considerados consenso na literatura.	44
Figura 9	Mecanismo proposto por Ospina <i>et al.</i> , 1996a, para a síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos, seguindo o mecanismo de hidrólise de Duggleby <i>et al.</i> , 1995. Neste caso o substrato é um éster ou amida e o ataque nucleófilo se deve ao grupo amino do núcleo.	46
Figura 10	Esquema simplificado para a síntese de ampicilina. A caixa cinza indica um mecanismo qualquer onde o complexo acil-enzima está envolvido. EH = enzima livre, AB = derivado do doador acil, NH = núcleo β -lactâmico (6-APA), AN = antibiótico, AOH = doador acil, EA = complexo acil-enzima, BH = metanol.	50
Figura 11	Mecanismo da síntese enzimática de ampicilina proposto por Youshko e Svedas, 2000b. EH = enzima livre; AB = EMFG; EA = complexo acil-enzima; AOH = FG; NH = 6-APA; EAN; complexo acil-enzima-núcleo; AN = ampicilina; EH-AB e EH-NA = complexos intermediários.	55
Figura 12	Simulação das velocidades iniciais para síntese de ampicilina utilizando biocatalisador de PGA imobilizada em gel de agarose. Concentração de 6-APA (C_{NH}) de 50mM. v_{AN} = velocidade de síntese, v_{FG} = velocidade de hidrólise e S/H = seletividade. Símbolos indicam locais onde as velocidades foram calculadas e linhas, sua interpolação linear.	64
Figura 13	Simulação das velocidades iniciais para síntese de ampicilina assumindo biocatalisador de PGA imobilizada em gel de agarose. $C_{NH} = 50\text{mM}$. Condições iniciais, C.I. a = Equação 11, C.I. b = Equação 14. v_{AN} = velocidade de síntese, v_{FG} = velocidade de hidrólise e S/H = seletividade. Símbolos indicam locais onde as velocidades foram calculadas e linhas, sua interpolação linear.	65
Figura 14	Simulação do fator de efetividade no início da síntese de ampicilina assumindo biocatalisador de PGA imobilizada em gel de agarose. $C_{NH} = 50\text{mM}$. Condições iniciais, C.I. a = Equação 11, C.I. b = Equação 14. v_{AN} = velocidade de síntese, v_{FG} = velocidade de hidrólise e S/H = seletividade. Símbolos indicam locais onde as velocidades foram calculadas e linhas, sua interpolação linear.	66
Figura 15	Variação da velocidade inicial de hidrólise inespecífica de EMFG em função de sua concentração, 25°C, pH 6,5. Concentrações de 6-APA: 25 mM (\circ), 100 mM (∇) e 200 mM (\diamond). (—) Equação 15.	67
Figura 16	Variação da velocidade inicial de formação de ampicilina (dividida pela carga enzimática E_0). Concentrações de EMFG: 10 mM (\blacksquare), 30 mM (\circ), 50 mM (\blacktriangle), 100 mM (∇), 200 mM (\blacklozenge) e 400 mM (\square). 25°C e pH 6,5.	69

Figura 17	Varição da velocidade inicial de formação de fenilglicina (dividida pela carga enzimática E_0). Concentrações de EMFG: 10 mM (■), 30 mM (○), 50 mM (▲), 100 mM (∇), 200 mM (◆) e 400 mM (□). 25°C e pH 6,5.	69
Figura 18	Varição da velocidade inicial (enzimática) de formação fenilglicina (dividida pela carga enzimática E_0). Concentrações de 6-APA: 10 mM (■), 25 mM (○), 50 mM (▲), 100 mM (∇) e 200 mM (◇). 25°C e pH 6.5. Barras de erro: desvio padrão estimado por triplicatas.	70
Figura 19	Razão entre as velocidade iniciais de síntese e hidrólise em função da concentração de éster. Concentração de 6-APA: 10 mM (■) e 25 mM (○). Síntese enzimática de ampicilina a 25°C e pH 6,5. Barras de erro: d.p. estimado de triplicatas.	72
Figura 20	Razão entre as constantes de velocidades aparentes de desacilação, $(k_H/k_S)_{ap} = (H/S) \cdot C_{NH}$. em função da concentração de EMFG. Concentrações de 6-APA: 10 mM (■) e 25 mM (○). pH 6.5 e 25°C. Ajuste ilustrativo da Equação 4 (.....).....	72
Figura 21	Varição da fração molar das diferentes espécies eletricamente carregadas da ampicilina em solução <i>versus</i> pH. Curvas construídas a partir da Equação 21. Valores de $pK_{a,ap}$, a 25°C, retirados da Tabela 2. (—) cátion, (--) íon dipolar, (---) ânion.	78
Figura 22	Simulação dos perfis de pH (A) e da concentração de EMFG (B) no interior do biocatalisador com baixa carga enzimática (18 UI/ml _{gel}). $R_p = 2,0 \times 10^{-4}$ m.	84
Figura 23	Simulação dos perfis de concentração no seio do reator e o perfil de concentração do EMFG no interior do biocatalisador com alta carga enzimática (90 UI/ml _{gel}). $R_p = 2,0 \times 10^{-4}$ m.	85
Figura 24	Simulação do perfil de pH no interior de biocatalisador de PGA imobilizado em gel de agarose com alta carga enzimática (90 UI/ml _{gel}). A) sem tampão. B) com concentração de 1 mol.litro ⁻¹ de um tampão hipotético com $pKa = 6,5$. Curvas de nível indicam diferença de 4 minutos de reação.	86
Figura 25	Esquema do reator semi-contínuo integrado proposto para a síntese enzimática industrial de ampicilina.	94
Figura 26	Esquema da abordagem seqüencial na otimização dinâmica. v é o vetor dos parâmetros de u	108
Figura 27	Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo simplificado (sem variação de volume). Esquerda: perfis de alimentação ótima obtidos, E . Direita: simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante.	111

Figura 28	Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo simplificado (sem variação de volume). Simulação dos perfis de conversão e seletividade obtidos utilizando perfil de alimentação ótima obtida.	111
Figura 29	Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo complexo. Esquerda: perfis de alimentação ótima obtidos, \underline{F} , e volume do reator, V . Direita: simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante.	113
Figura 30	Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo complexo. Simulação dos perfis de conversão e seletividade obtidos utilizando perfil de alimentação ótima obtida.	113
Figura 31	Resultados de controle ótimo obtidos utilizando abordagem seqüencial e modelo complexo. Esquerda: perfis de alimentação ótima obtidos, \underline{F} , e volume do reator, V . Direita: simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante.	114
Figura 32	Resultados de controle ótimo obtidos utilizando abordagem seqüencial e modelo complexo. Simulação dos perfis de conversão e seletividade obtidos utilizando perfil de alimentação ótima obtida.	114
Figura 33	Função objetivo (Equação 59) e restrições terminais para as diversas abordagens em função do tempo de processamento.	115
Figura 34	Esquema de Automação do Reator de Síntese Enzimática de Ampicilina Implementado.	122
Figura 35	Esquema do sistema de amostragem proposto para o reator automatizado de síntese enzimática de ampicilina. $V-i$, $i=1,2,3$, denotam válvulas solenóides de três vias. A letra N indica a entrada/saída normal da válvula e a letra A indica a entrada/saída quando a válvula está acionada. $B-i$, $i=1,2,3$, denotam bombas peristálticas com controle digital liga/desliga. B-1 permanece sempre ligada.	123
Figura 36	Esquema geométrico de um passo do algoritmo de projeção sucessiva, SPA.	131
Figura 37	A) Região cuja absorbância não ultrapassa 1,5 a.u. (uma aproximação da região linear onde é válida a lei de Lambert-Beer) para cada componente puro como função da concentração e comprimento de onda. Legenda: ampicilina (/); 6-APA (\); FG (-); EMFG, (). B) Espectro característico de cada componente.	136
Figura 38	Espectros de amostras provenientes do procedimento fatorial utilizadas na calibração multicomponente (ampicilina, 6-APA, fenilglicina e EMFG). À direita, o espectro das absorbâncias e à esquerda a primeira derivada do espectro UV em relação a λ	137

Figura 39	Resultados obtidos na validação cruzada dos modelos de calibração multicomponente para a ampicilina. Os gráficos mostram a raiz quadrada do erro quadrado médio (<i>root-mean-square error</i> , <i>RMSE</i> , Equação 86) de ajuste (---) e validação (—) em função do número de regressores. Os valores de <i>RMSE</i> apresentados nos gráficos são adimensionais. Isto é, estão divididos pela concentração máxima usada para ampicilina. As setas mostram o mínimo do erro de validação. pH 6,5.	139
Figura 40	Resultados obtidos para os dados de teste na predição de concentrações utilizando SPA, PCR e PLS. Barras de erro mostram o RMSE de validação. pH 6,5.	141
Figura 41	Predição de espectros de absorvâncias a partir do ajuste feito utilizando o método CLS. Linhas contínuas indicam espectros experimentais e dados discretos indicam espectro calculado. Barras de erro definidas pelo RMSEV obtido para cada comprimento de onda.	142
Figura 42	Desempenho teórico do sistema de análise por injeção em fluxo utilizando multicalibração. Barras de erro (RMSEV) indicam a estimativa na precisão do valor predito pela multicalibração. Diluição teórica ≈ 1000 . A) resultado teórico da multicalibração. B) resultado teórico da multicalibração utilizando informações (restrições de igualdade) adicionais de balanços de massa.	143
Figura 43	Espectro de absorvância entre 230 e 280 nm para diferentes valores de pH. Concentração de tampão fosfato, 50mM. Soluções de 3mM de Éster metílico de fenilglicina (A) e fenilglicina (B). Primeira (C) e segunda (D) derivadas do espectro em relação ao comprimento de onda, λ	147
Figura 44	Fração molar de espécies carregadas de EMFG e FG em relação ao pH. Cálculos realizados a partir da Equação 21, supondo solução ideal, e valores de pKa dados pela Tabela 1.	148
Figura 45	Espectros utilizados na calibração multicomponente pH5,5. À esquerda, o espectro das absorvâncias e à direita, a primeira derivada do espectro UV em relação a λ	149
Figura 46	Resultados obtidos na validação cruzada dos modelos de calibração multicomponente para a Ampicilina. Os gráficos mostram a raiz quadrada do erro quadrado médio (<i>root-mean-square error</i> , <i>RMSE</i> , Equação 86) de ajuste (---) e validação (—) em função do número de regressores. Os erros estão em relação a concentrações normalizadas entre 0 e 1.	150
Figura 47	Predição de amostras de teste (não utilizadas na validação cruzada) utilizando melhores modelos de cada componente (SPA, PCR, PLS). As barras de erros mostram os valores de RMSEV (estimativa do desvio padrão do erro) obtidos na validação cruzada os quais indicam um limite de confiabilidade na predição.	152

Figura 48	Resultados das análises das concentrações de ensaio de síntese enzimática de ampicilina. Preto: análise em espectrofotômetro por <i>multicalibração</i> , onde as barras de erros correspondem ao RMSE de validação cruzada. Vermelho: análise em <i>HPLC</i> na saída do <i>espectrofotômetro</i> ; Verde: análise em <i>HPLC</i> de amostras retiradas do <i>reator</i> . As barras de erro das análises feitas em <i>HPLC</i> correspondem à propagação teórica do erro na obtenção das curvas de calibração do <i>HPLC</i>	156
Figura 49	Espectros UV obtidos pelas varredura em espectrofotômetro das amostragens automatizadas. O gráfico à esquerda apresenta todos os espectros obtidos no ensaio de síntese de ampicilina, inclusive a linha de base (próxima ao zero de absorbância). À direita, o gráfico mostra quatro varreduras de duas amostras: uma a 5 minutos de reação e a 217 minutos de reação.....	157
Figura 50	Resultados de ensaios em batelada de síntese enzimática de ampicilina (25°C, pH 6,5) utilizando biocatalisador industrial (PGA imobilizada Recordatti). Os parâmetros de cada experimento (1, 2..., 7) estão presentes na Tabela 18. As linhas desenhadas entre os pontos experimentais indicam a tendência do gráfico, onde é validado o balanço de massa dos componentes.	162
Figura 51	Avaliação do modelo pseudo-homogêneo de síntese enzimática de ampicilina utilizando modelo cinético simplificado proposto por Ferreira <i>et al.</i> , 2000. Os parâmetros de cada experimento (1, 2..., 7) estão presentes na Tabela 18.....	165
Figura 52	Avaliação do modelo pseudo-homogêneo de síntese enzimática de ampicilina utilizando modelo cinético simplificado proposto por Youshko e Svedas, 2000b. Para termo de conversão, $\alpha_{Enz} = 4,0 \times 10^{-9} \text{ mol}_{enz} \cdot \text{UI}^{-1}$. Os parâmetros de cada experimento (1, 2..., 7) estão presentes na Tabela 18.	166
Figura 53	Resultado do ajuste dos parâmetros cinéticos aparentes do modelo cinético proposto por Ferreira <i>et al.</i> , 2000, admitindo modelo de reator pseudo-homogêneo. Os parâmetros de cada experimento (1, 2..., 7) estão presentes na Tabela 18.	167
Figura 54	Resultado do ajuste dos parâmetros cinéticos aparentes do modelo cinético proposto por Youshko e Svedas, 2000b, admitindo modelo de reator pseudo-homogêneo. Os parâmetros de cada experimento (1, 2..., 7) estão presentes na Tabela 18.....	168
Figura 55	Resultado do ajuste de redes neurais para modelar as cinéticas aparentes da síntese enzimática de ampicilina, admitindo modelo de reator pseudo-homogêneo. Os parâmetros de cada experimento (1, 2..., 7) estão presentes na Tabela 18.	171
Figura 56	Resultado da predição do modelo empírico (redes neurais) para o ensaio 7, presente na Tabela 18, quando a concentração inicial de EMFG é reduzida de 20 (---) para 2,5 mM (—).	172

Figura 57	Resultado do ajuste dos parâmetros cinéticos aparentes do modelo cinético proposto por Ferreira <i>et al.</i> , 2000, admitindo modelo de reator pseudo-homogêneo. Utilizou-se dos dados dos experimentos 5, 6 e 7 (Tabela 18) para o ajuste dos parâmetros. Experimento 8 e 3 não foram utilizados nos ajustes.	173
Figura 58	Seletividade ($v_{\text{síntese}}/v_{\text{hidrólise}}$) calculada utilizando modelo simplificado proposto por Ferreira <i>et al.</i> , 2000, com parâmetros ajustados por meio de ensaios utilizando biocatalisador industrial (Recordatti) e concentrações de 6-APA maiores que as de EMFG, como descrito na seção 6.3. A) Início da reação (ausência de produtos). B) fase 2 – produtos cristalizados (supondo limites de solubilidade dos componentes puros).	176
Figura 59	Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente. 1) simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante 2) perfis de alimentação ótima obtidos, <i>E</i> . 3) volume do reator, <i>V</i> . A) $C_{\text{EMFG}}(0) = 0,01$ M. B) $C_{\text{EMFG}}(0) = 0,10$ M.	178
Figura 60	Resultados simulados para a síntese de ampicilina com alimentação de reagentes em pulsos. 1) simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação dada 2) perfil de alimentação em pulso de EMFG e 3) de 6-APA. 4) volume do reator, <i>V</i> . A) $C_{\text{EMFG}}(0) = 0,01$ M. B) $C_{\text{EMFG}}(0) = 0,10$ M.	180
Figura 61	Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado semi-contínuo com alimentação de reagentes em pulsos. $C_{\text{EMFG}}(0) = 0,01$ M. 1) perfis de concentrações obtidos, onde as concentrações totais de ampicilina e fenilglicina foram estimadas pelo balanço de massa. 2) comparação entre perfis preditos pelo modelo, a partir da alimentação dada e perfis obtidos experimentalmente 3) volume predito, volume obtido experimentalmente e volume caso não houvesse a retirada de amostras. 4 – 7) comparação entre concentrações na fase solúvel obtidas através de análise de HPLC e espectrofotômetro via multicalibração. 8) perfil predito pelo modelo utilizando solubilidade das substâncias puras, ou seja, 25 mM, para ampicilina, (A —) e utilizando 60 mM como solubilidade da ampicilina (B ---).	184
Figura 62	Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado semi-contínuo com alimentação de reagentes em pulsos. $C_{\text{EMFG}}(0) = 0,10$ M. 1) perfis de concentrações obtidos, onde as concentrações totais de ampicilina e fenilglicina foram estimadas pelo balanço de massa. 2) comparação entre perfis preditos pelo modelo, a partir da alimentação dada e perfis obtidos experimentalmente 3) volume predito,	

volume obtido experimentalmente e volume caso não houvesse a retirada de amostras. 4) perfil de
alimentação ótima calculada e experimental. 185

Lista de Tabelas

Tabela 1	Constantes de dissociação em água pura a 25°C.....	35
Tabela 2	Constante de dissociação da ampicilina em água, Hou e Poole, 1969.....	36
Tabela 3	Índices de desempenho da SCC de penicilinas semi-sintéticas (exemplificado para ampicilina) em função do tempo de reação.	41
Tabela 4	Valores de constantes utilizados na simulação de síntese enzimática de ampicilina. Constantes cinéticas ajustadas a pH 6,5 e 25°C por Ferreira <i>et al.</i> , 2000. Constantes de difusão molecular em água obtidas por Ferreira <i>et al.</i> , 1999.	61
Tabela 5	Valores de constantes utilizados na simulação: coeficiente molecular de difusão em água (D); coeficiente de difusividade efetiva (De) para PGA imobilizada em gel de agarose com alta carga enzimática (90 UI/ml _{gel}) (Ferreira <i>et al.</i> , 1999); e constantes de dissociação (pKa).	82
Tabela 6	Classificação de esquemas numéricos para otimização dinâmica (Srinivasan <i>et al.</i> , 2003).....	91
Tabela 7	Parâmetros e condições iniciais usadas na otimização do modelo de reator simplificado (sem variação de volume) usando a abordagem do gradiente. Solubilidade para solução aquosa de um componente, retirada de Vieira, 2003.	109
Tabela 8	Parâmetros e condições iniciais usadas na otimização da síntese de ampicilina seguindo a estratégia do gradiente.	112
Tabela 9	Nomenclatura utilizada no esquema de automação do reator de síntese enzimática de ampicilina (Figura 34).	120
Tabela 10	Esquema das etapas do sistema de amostragem. Válvulas ($V-i$) e Bombas ($B-i$) referentes à Figura 35. N indica estado normal da válvula e A, seu estado acionado. F indica o estado fechado (ou desligado) da bomba e A, seu estado acionado (ou ligado).	124
Tabela 11	Limites de concentração utilizados na multicalibração (pH 6,5).	137
Tabela 12	Valor mínimo de $RMSEV$ (Equação 86) obtido na validação cruzada de cada modelo e o número de regressores utilizados. Sobrescrito ⁽⁰⁾ indica o uso do espectro de absorbância e ⁽¹⁾ sua derivada. pH 6,5.	140
Tabela 13	Raiz quadrada do erro quadrado médio de teste ($RMSET$). pH 6,5.	141

Tabela 14	RMSE (raiz quadrada do erro quadrado médio) calculado para cada componente (em concentração) entre o valor predito e o valor real de concentração utilizando e sem utilizar informações de Balanço de Massa (B.M.). B.M.1 indica o erro encontrado no cálculo do Balanço de Massa 1 ou no valor de \underline{c}_i^0 (equação 64). Idem para o B.M.2	146
Tabela 15	Limites de concentração utilizados na multicalibração utilizando (pH 5,5)	149
Tabela 16	Valor mínimo de RMSEV obtido na validação cruzada de cada modelo e o número de regressores utilizados. Sobrescrito ⁽⁰⁾ indica o uso do espectro de absorbância e ⁽¹⁾ sua derivada. pH 5,5	151
Tabela 17	Raiz quadrada do erro quadrado médio de teste (<i>RMSET</i>). pH 5,5 . Sobrescrito ⁽⁰⁾ indica a utilização do espectro UV e ⁽¹⁾ a derivada do espectro.	152
Tabela 18	Características dos diferentes ensaios de síntese de ampicilina realizados em reator de bancada a 25°C e pH 6,5, utilizando biocatalisador industrial de PGA imobilizada (Recordatti).	161
Tabela 19	Parâmetros e condições iniciais usadas na otimização do modelo de reator simplificado usando a abordagem do gradiente.	177
Tabela 20	Resultados obtidos na otimização dinâmica para as variáveis representativas do processo. A) $C_{EMFG}(0) = 0,01$ M. B) $C_{EMFG}(0) = 0,10$ M.	179

Sumário

	p.
1	Introdução..... 24
1.1	Antibióticos β-lactâmicos..... 24
1.2	Síntese de antibióticos β-lactâmicos semi-sintéticos 27
1.2.1	Síntese enzimática termodinamicamente controlada 28
1.2.2	Síntese enzimática cineticamente controlada..... 29
1.3	Biocatalisador 30
1.3.1	Penicilina G acilase 30
1.3.2	Enzima imobilizada 32
1.4	Fatores importantes na síntese enzimática 34
1.4.1	Efeito do pH 34
1.4.2	Efeito da Temperatura 37
1.4.3	Efeito da força iônica 38
1.4.4	Efeito do uso de co-solventes 40
1.5	Otimização do processo de síntese de penicilinas semi-sintéticas 41
1.6	Motivação..... 42
1.7	Objetivo..... 43
2	Síntese Cineticamente Controlada: Mecanismos de Reação..... 44
2.1	Formação do complexo acil-enzima 45
2.2	Formação do complexo acil-enzima-núcleo 50
2.3	Efeitos inibitórios do doador acil 51
2.4	Hidrólise do complexo acil-enzima-núcleo..... 52

2.5	Formação do complexo enzima-núcleo	53
2.6	Modelos cinéticos da SCC de ampicilina	54
2.6.1	Modelo Simplificado 1 (MS1):.....	55
2.6.2	Modelo Simplificado 2 (MS2):.....	56
2.7	Procedimento: simulações e ensaios experimentais.....	57
2.7.1	Simulação da influência da difusão intra-biocatalisador na razão S/H.....	58
2.7.2	Procedimento experimental.....	62
2.8	Discussão dos resultados obtidos.....	63
2.8.1	Simulação da influência da difusão intra-biocatalisador na razão S/H.....	63
2.8.2	Ensaio de velocidades iniciais	66
3	Influência da difusão intra-catalisador no perfil de pH.....	75
3.1	Modelos para cálculo do pH.....	76
3.1.1	Dissociação dos componentes da síntese enzimática de ampicilina.....	76
3.1.2	Balço de cargas e o cálculo do pH	78
3.2	Ensaio computacionais.....	80
3.3	Discussão dos resultados obtidos.....	83
4	Otimização Dinâmica	88
4.1	Métodos Diretos	91
4.2	Métodos Indiretos	92
4.3	Ensaio de otimização dinâmica.....	93
4.3.1	Modelo simplificado de reator integrado.....	94
4.3.2	Formulação do problema de controle ótimo	103
4.3.3	Abordagens Consideradas para a Resolução do Problema de Controle Ótimo	
	104	
4.3.4	Ferramentas computacionais utilizadas.....	108

4.4	Discussão dos resultados obtidos.....	109
4.4.1	Estratégia do Gradiente.....	109
4.4.2	Estratégia Seqüencial.....	113
5	Automação do Reator Integrado.....	118
5.1	Análise por Injeção em Fluxo (<i>Flow Injection Analysis</i> , FIA).....	119
5.2	Esquema de Automação	120
5.2.1	Sistema de amostragem e análise de concentrações das espécies de interesse	123
5.3	Multicalibração.....	125
5.3.1	Espectrofotometria UV-Vis	126
5.3.2	Modelos para Multicalibração em Espectrofotômetro.....	127
5.4	Procedimento experimental: Multicalibração	133
5.4.1	Materiais e métodos utilizados	133
5.4.2	Análise da multicalibração	134
5.5	Discussão dos resultados obtidos na multicalibração.....	135
5.5.1	Análise de soluções aquosas monocomponente.....	135
5.5.2	Análise multicomponente (pH 6,5).....	137
5.5.3	Estimativa teórica do desempenho da multicalibração em reator de ampicilina. 142	
5.5.4	Análise de espectros de FG e EMFG em diferentes pHs	146
5.5.5	Análise multicomponente (pH 5,5).....	149
5.6	Validação do sistema de amostragem automatizada	153
5.6.1	Materiais e métodos utilizados	153
5.6.2	Resultados da validação e discussões	155
6	Ensaio Cinéticos	160
6.1	Procedimento experimental: síntese de ampicilina	160

6.2	Resultados dos ensaios cinéticos.....	161
6.2.1	Avaliação de modelos para a representação da síntese enzimática de ampicilina.	164
6.3	Reajuste dos modelos cinéticos.....	167
7	Síntese Enzimática de Ampicilina em Reator Semi-Contínuo Integrado.....	175
7.1	Otimização utilizando modelo reajustado.	175
7.2	Ensaio experimentais:	181
7.2.1	Síntese de ampicilina.....	181
7.2.2	Amostragem do reator.....	181
7.2.3	Quantificação dos analitos de interesse.....	182
7.3	Resultados obtidos	182
8	Conclusões.....	188
9	Referências Bibliográficas.....	192

1 Introdução

1.1 Antibióticos β -lactâmicos

Antibióticos β -lactâmicos são uma classe de agentes bactericidas cujas moléculas apresentam um núcleo básico comum, o núcleo β -lactâmico (Figura 1), que é o responsável pela ação antimicrobiana. Nesta classe de antibióticos se encontram as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e os carbapenens.

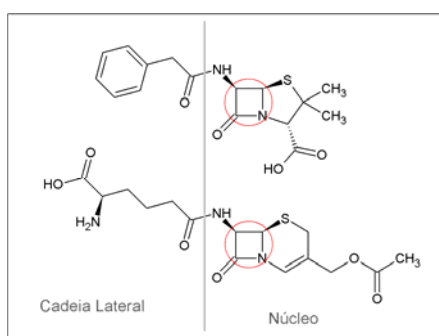


Figura 1 Estrutura molecular dos antibióticos β -lactâmicos exemplificada por dois antibióticos naturais (de cima para baixo) penicilina G (ou benzilpenicilina) e cefalosporina C. Em destaque, o anel β -lactâmico.

Os antibióticos β -lactâmicos são dos mais importantes clinicamente, além de serem utilizados na medicina veterinária. Seu volume comercializado, em meados da década de 90, correspondia a 3/5 da produção mundial de antibióticos (Ghosh *et al.*, 1996).

Embora vários pesquisadores já tivessem observado o efeito inibitório que certos bolores causavam no crescimento de bactérias, a descoberta da penicilina é atribuída ao escocês Alexander Fleming, em 1928. Fleming, em seu laboratório em Londres, conseguiu identificar um fungo do gênero *Penicillium* capaz de inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus*. À substância inibidora, deu o nome de “penicillin” (penicilina) e, embora tenha demonstrado que a substância podia curar infecção de olhos e não era tóxica, Fleming a via

principalmente como um anti-séptico natural. Foi em 1939 que Howard W. Florey e Ernst B. Chain purificaram a penicilina e demonstraram indubitavelmente seu valor terapêutico (Polderman-Tijmes, 2004).

As penicilinas são antibióticos caracterizados pela presença de um anel tiazolidina fundido ao anel β -lactâmico ao qual se liga à cadeia lateral. Alterações químicas ou metabólicas nesses núcleos podem ocasionar na inativação do antibiótico (Gonçalves, 2001a).

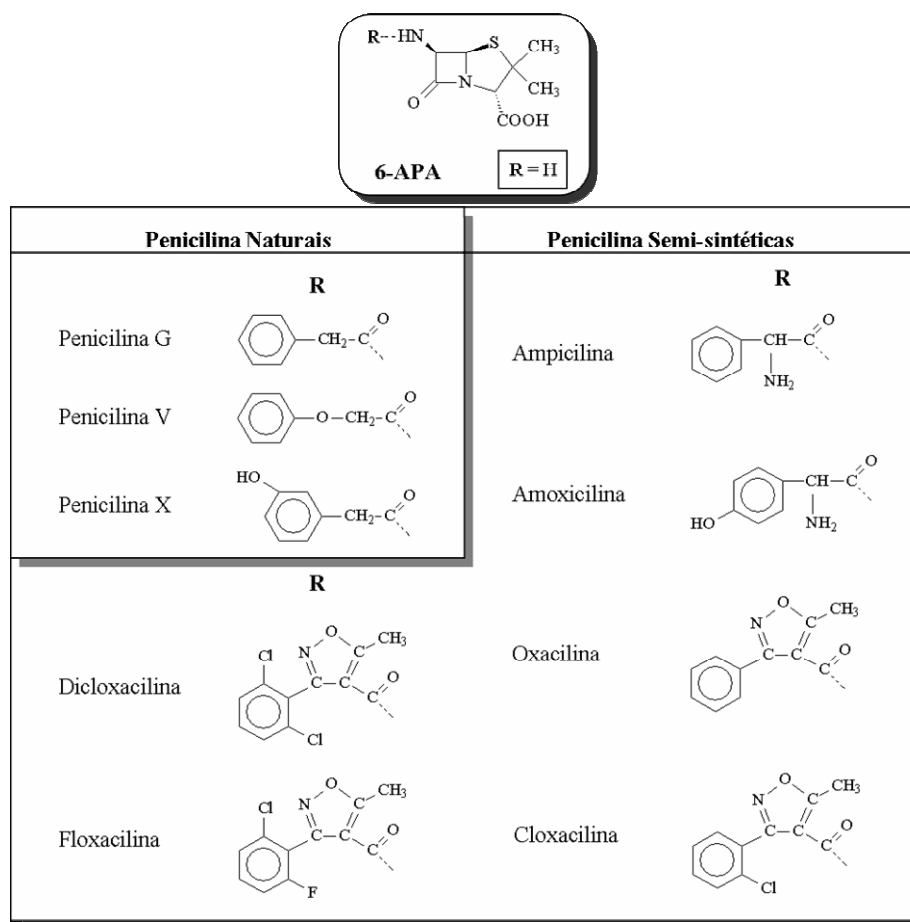


Figura 2 Família das penicilinas. 6-APA: ácido 6-amino penicilânico.

A penicilina G (benzilpenicilina) é a única penicilina natural (i.e., produzida por microorganismo) no mercado atualmente. Sua baixa atividade contra bactérias Gram-negativas e sua instabilidade em meio ácido, o que impossibilita sua administração oral, eram obstáculos que foram superados pelo aparecimento dos antibióticos semi-sintéticos. A penicilina G, contudo, ainda é utilizada clinicamente quando se deseja um rápido efeito ou

quando há necessidade de altas concentrações de antibiótico no plasma sanguíneo (*Gonçalves, 2001a*).

A quebra da ligação amida da penicilina G pode ser realizada industrialmente por catálise enzimática e separa o núcleo da cadeia lateral (Figura 1). Partindo do núcleo, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), e condensando-o a diversas cadeias laterais diferentes é possível a síntese de penicilinas semi-sintéticas (Figura 2), não encontradas na natureza e com diferentes características das naturais, entre elas: maior espectro de ação antimicrobiana; maior facilidade de sua absorção pelo organismo; e resistência ao suco gástrico o que possibilita sua ingestão. A importância dos antibióticos semi-sintéticos tem crescido desde então. Passando de 4000 ton./ano em 1970 para 45000 ton./ano em 2000 (Bruggink e Roy, 2001). Apenas a comercialização de amoxicilina como droga formulada movimentou US\$ 2200 milhões, em 1994 (Diender *et al.*, 1998).

A ampicilina é um dos antibióticos mais amplamente utilizados com uma produção anual de 5600 toneladas (dados de 1986). Ela tem a vantagem, em relação às penicilinas naturais, de possuir uma alta solubilidade em água, uma alta taxa de absorção quando administrada oralmente e alta estabilidade em pH ácido. Além disso, tem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, principalmente quando administrada concomitantemente com o ácido clavulânico. Este inibe as β -lactamases produzidas como mecanismo de defesa por microorganismos resistentes (Ospina *et al.*, 1996a).

Os antibióticos β -lactâmicos agem interferindo na síntese da parede celular da bactéria. O antibiótico se liga irreversivelmente às enzimas (transpeptidases e cboxipeptidases) responsáveis pela formação das ligações cruzadas na cadeia peptidoglicana (componente da parede celular bacteriana) inativando-as e fragilizando a parede celular da bactéria. A célula, conseqüentemente, morre devido à alta pressão osmótica interna (Polderman-Tijmes, 2004, Lehninger, 1989).

1.2 Síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos

A produção industrial de penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas começou durante as décadas de 1960 e 1970 (Beecham patenteou a ampicilina em 1961 e a amoxicilina em 1972; Lilly, a cefalexina em 1970; BMS, cefadroxil em 1977). Esses processos químicos convencionais demandam baixas temperaturas (-30°C), solventes organoclorados, proteção/desproteção de grupos laterais, e geram uma grande quantidade de resíduos não recicláveis (Ospina *et al.*, 1996a). As crescentes preocupações governamentais em relação ao meio ambiente e a criação de leis de proteção ambiental nas últimas décadas vêm colocando esses processos sob críticas e incentivando a busca de rotas alternativas mais “limpas”. De fato, esse fator tem levado à gradativa transferência dessas plantas para países como China e Índia, que ainda têm regulação ambiental menos restritiva.

Cole, 1969, concebeu a troca da síntese química pela síntese enzimática, trabalhando em meio aquoso preferencialmente e em condições fisiológicas. Desde então, o interesse pela síntese enzimática tem aumentado e a rota enzimática tem sido vista como uma alternativa “ambientalmente-amigável”. Contudo, a ineficiência do processo enzimático em relação ao processo químico atual se torna o principal obstáculo na implementação industrial dessa rota. De fato, até onde se sabe, há apenas uma planta utilizando-se de rota enzimática para a produção de cefalosporina semi-sintética atualmente (Wegman *et al.*, 2001).

Antibióticos semi-sintéticos resultam da condensação de uma cadeia lateral modificada (o doador acil) ao núcleo β -lactâmico. A produção industrial desses núcleos se dá via hidrólise enzimática de penicilinas ou cefalosporinas naturais. No caso da penicilina, a penicilina G é geralmente empregada, provendo o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Como catalisador, a penicilina G acilase (PGA) (EC 3.5.1.11) imobilizada em suportes insolúveis é normalmente utilizada.

1.2.1 Síntese enzimática termodinamicamente controlada

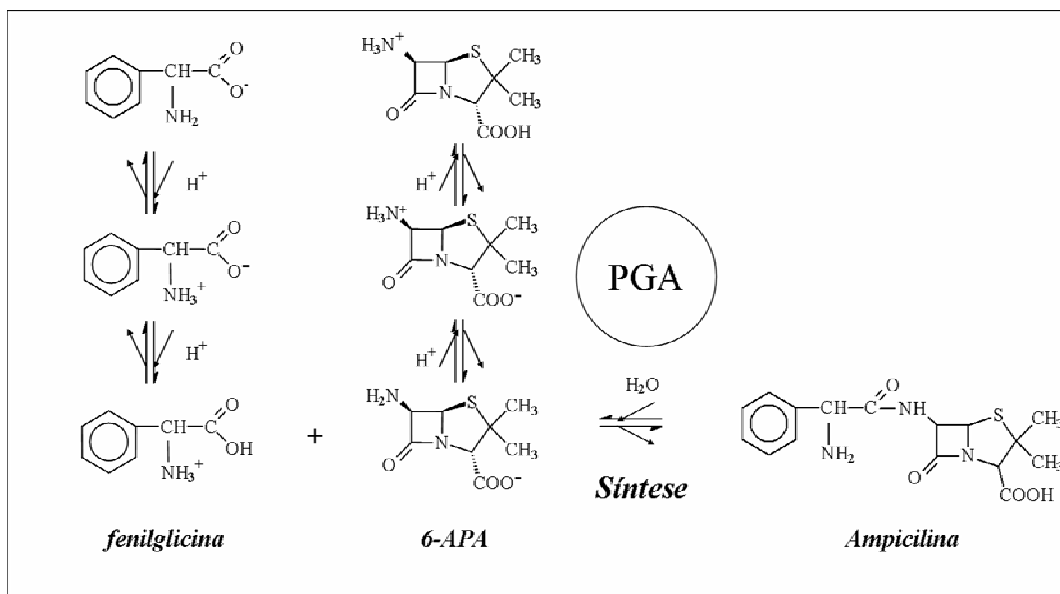


Figura 3 Esquema da síntese termodinamicamente controlada de ampicilina a partir da D-(-)-fenilglicina (FG) e do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Segundo a literatura, o grupo amino do 6-APA e o grupo carboxílico da FG devem estar neutros para que ocorra a síntese (Diender *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996a, Margolin *et al.*, 1980).

Dois abordagens enzimáticas vêm sendo estudadas para a síntese de antibióticos β -lactâmicos. A primeira e a mais simples, é a condensação direta do núcleo do antibiótico (6-APA no caso das penicilinas) com o doador acil (Figura 3), por exemplo: D-(-)-fenilglicina (FG) e D-(-)-p-hidroxi-fenilglicina (pOH-FG), para ampicilina e amoxicilina respectivamente. Esta estratégia é chamada de síntese termodinamicamente controlada (STC), pois o rendimento depende do equilíbrio termodinâmico entre reagentes e produto. Na STC o grupo amino do núcleo e o grupo carboxílico do doador acil devem estar descarregados (Diender *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996a, Margolin *et al.*, 1980), i.e., no caso da ampicilina o grupo amino do 6-APA deve estar na forma neutra e a fenilglicina, por sua vez, deve apresentar o grupo carboxílico neutro (vide Figura 3). Esta configuração não ocorre na faixa operacional da enzima (pH 6-8). Nesta faixa, a fenilglicina ($pK_{a1} = 2,2$, vide Tabela 1) estará com menos de 0,2% do grupo carboxílico protonado. A baixa solubilidade do doador acil (FG, por exemplo) é outro fator que limita o deslocamento do equilíbrio em direção à síntese

(Ospina *et al.*, 1996a). Por outro lado, co-solventes podem ser utilizados para diminuir a atividade da água e aumentar o pK_{a1} aparente do doador acil (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1991). Contudo, a utilização de um co-solvente pode reduzir a estabilidade da enzima tornando-se num outro obstáculo da síntese termodinamicamente controlada.

1.2.2 Síntese enzimática cineticamente controlada

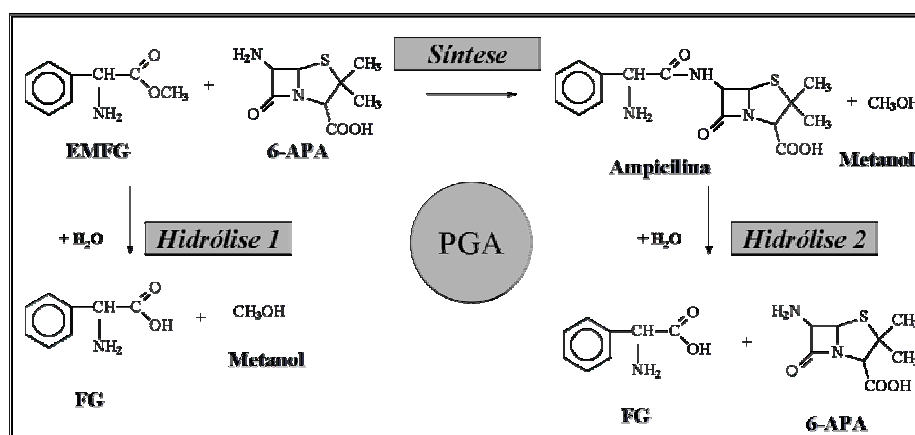


Figura 4 Síntese cineticamente controlada de ampicilina. EMFG, éster metílico de D-(-)-fenilglicina; 6-APA, ácido 6-amino penicilânico; FG, D-(-)-fenilglicina; PGA, penicilina G acilase.

A síntese enzimática cineticamente controlada (SCC) de antibióticos semi-sintéticos é a mais popular na literatura científica e a mais factível para a produção de penicilinas semi-sintéticas. Esta estratégia requer o uso de um derivado ativado do doador acil, como um éster ou amida (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996). Desta forma, contorna-se a necessidade do grupo carboxílico neutro. O rendimento é dado pelo balanço de três diferentes reações, todas catalisadas pela mesma enzima (Figura 4): a síntese do antibiótico (atividade transferase ou de síntese), a hidrólise do derivado do doador acil (atividade hidrolase – esterase ou amidase), e a hidrólise do antibiótico que é previamente sintetizado (atividade amidase).

Na rota cineticamente controlada o antibiótico formado, sendo produto intermediário, é quase completamente hidrolisado pela PGA sob condições de equilíbrio termodinâmico. No entanto, ao cessar a reação antes que a velocidade de hidrólise do

antibiótico recém formado seja maior que a velocidade de síntese, a concentração do antibiótico pode ser maior que o determinado pelo equilíbrio termodinâmico, conseguindo-se, assim, um máximo transiente. Isto torna a síntese cineticamente controlada a mais promissora das rotas enzimáticas para a produção de penicilinas semi-sintéticas.

Em contraste com a estratégia termodinamicamente controlada, na SCC, qualquer modificação no derivado da enzima, na fonte da enzima (inúmeros microrganismos a expressam), no tipo de imobilização ou nas condições de reação pode acarretar uma variação nas velocidades de reação e, por conseguinte, uma alteração do rendimento máximo (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996).

Portanto, uma análise cuidadosa das propriedades da enzima, do substrato ativado e do sistema (pH, temperatura, força iônica, presença de solventes orgânicos) deve ser realizada para a compreensão e utilização dessa rota de síntese.

1.3 Biocatalisador

1.3.1 Penicilina G acilase

Penicilina G acilase (PGA) é uma importante enzima na indústria farmacêutica, sendo o segundo biocatalisador mais utilizado mundialmente na forma imobilizada. Estima-se que entre 10 a 30 toneladas de PGA imobilizada são usadas em todo o mundo em diferentes preparações biocatalíticas (Ospina *et al.*, 1996b). A PGA tem sido utilizada há 20 anos na produção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), principal insumo da síntese das penicilinas semi-sintéticas (Calleri *et al.*, 2004). A Penicilina G acilase é também conhecida como penicilina amidase, penicilina amidohidrolase e penicilina aciltransferase.

Embora vários microrganismos sintetizem a PGA (bactérias, fungos e leveduras) com diferentes especificidades pelos substratos, a mais amplamente utilizada e

estudada é a PGA de *Escherichia coli* ATCC 11105 (EC 3.5.1.11). A enzima catalisa a hidrólise da ligação amida linear nas moléculas de penicilina G, produzindo o núcleo β -lactâmico, 6-APA, e o ácido fenilacético (AFA). Seu papel *in vivo* ainda não foi totalmente elucidado embora se sugira que a PGA esteja envolvida na degradação de compostos fenilacetilados para a geração de ácido fenilacético, o qual pode ser usado como fonte de carbono (Done *et al.*, 1998).

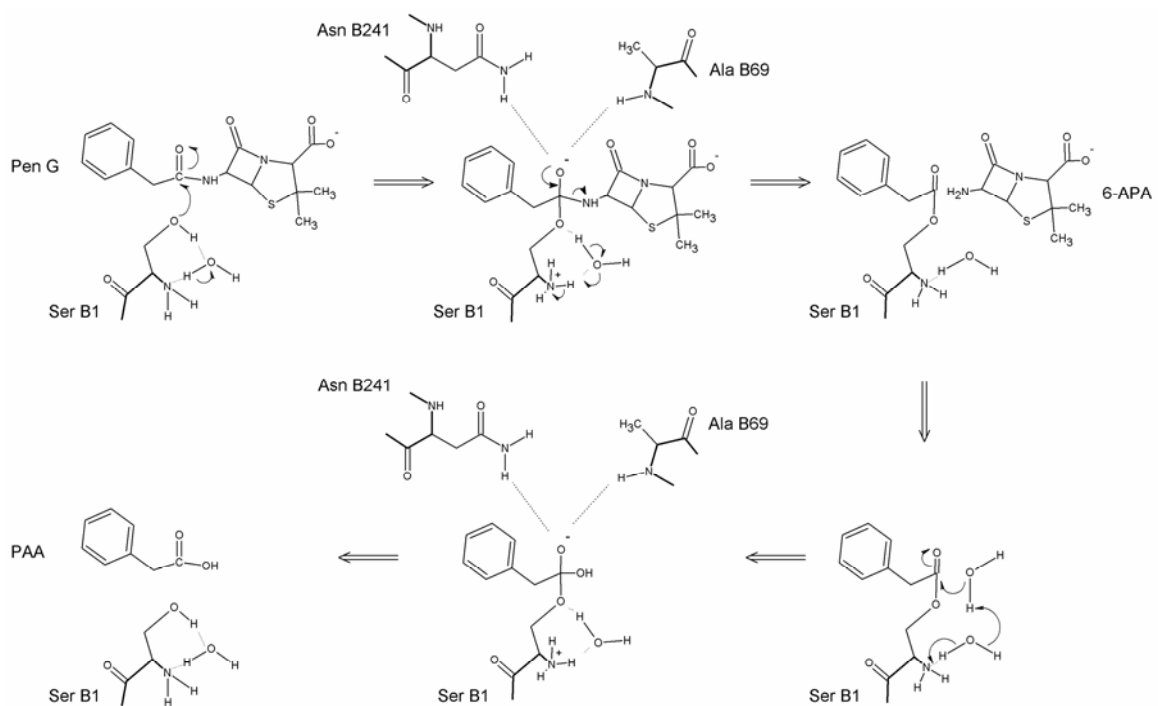


Figura 5 Ação catalítica da penicilina acilase (hidrólise de penicilina G) segundo Duggleby *et al.*, 1995: o mecanismo mostra o papel da molécula ponte (água) que atuaria como uma base virtual, e do grupo α -amino que aumentaria a nucleofilicidade da Serina β 1. A desacilação do complexo acil-enzima ocorre por ataque nucleofílico de uma molécula de água (passo 4 do mecanismo). Ligações em negrito indicam a cadeia principal da enzima.

A estrutura da PGA de *Escherichia coli* ATCC 11105 consiste em um heterodímero, com a subunidade menor (designada α) com 209 aminoácidos e 20kDa, e a maior (designada β) com 557 aminoácidos e 70kDa (Bock *et al.*, 1983, Bruns *et al.*, 1985). As duas subunidades estão estreitamente ligadas embora não haja uma ligação covalente entre elas. O sítio ativo, rodeado por resíduos de ambas as subunidades, permanece no fundo de

uma depressão cônica. A subunidade α é provavelmente a responsável pelo reconhecimento do substrato específico para a enzima, ou seja, reconhece a cadeia lateral do substrato. A subunidade β é a responsável pela atividade catalítica (Bock *et al.*, 1983).

O mecanismo de atuação da PGA é complexo. Duggleby *et al.*, 1995, propõem um mecanismo para a hidrólise da penicilina G apresentada na Figura 5. A enzima promove um ataque nucleofílico ao carbono carbonil de ligações amida ou éster. Nesse aspecto, é similar às serinas proteases. No entanto, ao invés de uma tríade catalítica, características dessas proteases, a PGA tem apenas um aminoácido como centro catalítico: o resíduo da Serina β_1 , com a nucleofilicidade de seu $O\gamma$ intensificada pelo grupo α -amino da serina terminal (Duggleby *et al.*, 1995). Desta forma, a enzima, pode ser classificada como uma hidrolase N-terminal (Done *et al.*, 1998).

Embora a PGA seja usada como hidrolase na produção de 6-APA e AFA a partir da penicilina G (pH ótimo ~ 8), ao manter o pH em valores baixos, ela também catalisa a reação inversa (PGA tem atividade entre os pHs 6,0 e 8,5). Além disso, a PGA pode também se ligar a outras penicilinas como a ampicilina e amoxicilina produzindo D-(-)-fenilglicina (FG) e D-(-)-p-hidroxi-fenilglicina (pOH-FG)¹ respectivamente, e o 6-APA. Contudo, como o pKa do grupo carboxílico da FG (e da pOH-FG) é consideravelmente mais baixo que o pKa do AFA (vide Tabela 1), a reação inversa, no caso das penicilinas semi-sintéticas é reduzida substancialmente (Seção 1.2.1).

1.3.2 Enzima imobilizada

A utilização de enzimas como catalisadores em sínteses químicas, está bem estabelecida e reações enzimáticas são usadas na produção de produtos agroquímicos, de

¹ A forma isomérica da cadeia lateral é importante para a atividade do antibiótico, contudo sua especificação será omitida nas seções seguintes. Portanto, a D-(-)-fenilglicina (o mesmo que R-(-)-fenilglicina) será referenciada apenas por *fenilglicina* ou *FG*. E a D-(-)-p-hidroxi-fenilglicina (o mesmo que R-(-)-p-hidroxi-fenilglicina) será referenciada por *p-hidroxi-fenilglicina* ou *pOH-FG*.

química fina e farmacêuticos. O uso da catálise enzimática em processos químicos pode ser vantajoso em certos processos por contornar a necessidade de solventes ou precursores ambientalmente nocivos e assim reduzir os custos de recuperação de solventes e de tratamento de resíduos. Além disso, as reações podem ser feitas em condições amenas, o que reduz a geração de produtos laterais, levando a um aumento no rendimento. No entanto, a aplicação de enzimas livres em processos biocatalíticos apresenta desvantagens importantes.

A solubilidade da enzima ao meio reacional dificulta sua separação dos produtos e, portanto, sua reutilização. Devido ao alto custo da enzima purificada, o descarte da enzima tornaria o processo extremamente oneroso. Outro fator importante é a baixa estabilidade da enzima em condições de reação. As enzimas são proteínas e sua atividade catalítica depende da integridade de sua estrutura protéica. Enzimas livres têm em geral estabilidade em regiões restritas de pH, temperatura, força iônica e concentrações de co-solventes, o que pode restringir sua aplicação industrial.

As desvantagens acima têm sido contornadas pela imobilização de enzimas. A principal vantagem das técnicas de imobilização de enzimas é que elas permitem que a reação ocorra em catálise heterogênea, o que facilita a separação do biocatalisador (Calleri *et al.*, 2004). A imobilização da enzima contribui também para sua estabilização em meios aquoso-solvente (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1991), aumentando também seu intervalo de estabilidade em relação à temperatura e ao pH (Kazan *et al.*, 1996).

A inativação de uma enzima geralmente começa com uma mudança conformacional que finalmente promove sua inativação irreversível. Por isso, a maioria das estratégias de estabilização de proteínas está focada na prevenção de sua primeira distorção tridimensional (Lopez-Gallego *et al.*, 2005). Várias técnicas de imobilização, convencionais e não-convencionais, são encontradas na literatura para a imobilização de penicilina G acilase (Lopez-Gallego *et al.*, 2005, Cao *et al.*, 2001, Giordano *et al.*, 2006). Biocatalisadores de

PGA imobilizada estão disponíveis comercialmente por diversas empresas (Ospina *et al.*, 1992).

Várias abordagens utilizando biocatalisadores comerciais, que objetivam facilitar a separação do catalisador dos cristais em um reator integrado, têm sido sugeridas em patentes. Giordano *et al.*, 2003, propõe a utilização de uma segunda matriz (de gel de pectina ou alginato) para proteger a integridade física do biocatalisador e aumentar o tamanho das partículas, facilitando a separação dos cristais do biocatalisador.

1.4 Fatores importantes na síntese enzimática

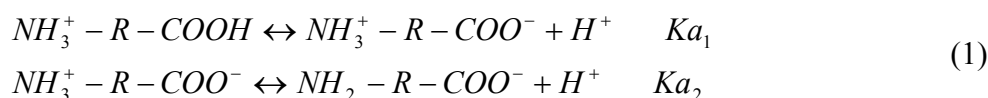
Embora duas rotas de síntese enzimática existam para os antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos, para as penicilinas semi-sintéticas apenas a síntese cineticamente controlada (SCC) parece ser possível, principalmente quando se leva em conta o escalonamento para a produção em escala industrial. Os principais fatores que afetam a SCC são comentados nas subseções seguintes.

1.4.1 Efeito do pH

O pH é um dos fatores que maior influência tem sobre a síntese de penicilinas semi-sintéticas. Sua influência tem sido estudada por vários autores (Spiess *et al.*, 1999, Gonçalves, 2001a, Diender *et al.*, 2000, Diender *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996a, Schroen *et al.*, 1999, Hou e Poole, 1969). O pH do meio pode alterar a dissociação dos reagentes e produtos e sua solubilidade. Exerce efeito ainda, sobre o estado de ionização do sítio ativo da enzima, o que afeta sua atividade catalítica.

Os reagentes e produtos na SCC de penicilinas semi-sintéticas são eletrólitos fracos. Ampicilina, amoxicilina, 6-APA, FG e pOH-FG apresentam grupos amino e

carboxílico. Estes compostos se apresentam em solução aquosa essencialmente como *zwiterions* (íons dipolares) quando em pH igual a seu ponto isoelétrico (pI) (Hou e Poole, 1969). Dependendo do pH no meio reacional, estes compostos podem se apresentar tanto na forma *zwiteriônica* quanto nas formas aniônica e catiônica. A formação de diferentes espécies iônicas dos aminoácidos está esquematizada a seguir:



Ka_1 e Ka_2 são as constantes de equilíbrio (ou constantes de dissociação) definidas como:

$$\begin{aligned} Ka_1 &= \frac{a(NH_3^+ RCOO^-) a(H^+)}{a(NH_3^+ RCOOH)} \\ Ka_2 &= \frac{a(NH_2 RCOO^-) a(H^+)}{a(NH_3^+ RCOO^-)} \end{aligned} \quad (2)$$

onde a denota a atividade do composto entre parêntesis.

Valores das constantes de dissociação foram obtidos experimentalmente por vários autores tanto em solução aquosa, quanto como constantes aparentes em mistura de água com um co-solvente orgânico (metanol, butanodiol, glicerol) (Diender *et al.*, 1998). As Tabelas 1 e 2 apresentam alguns valores de pKa encontrados na literatura.

Tabela 1 Constantes de dissociação em água pura a 25°C

6-APA		EMFG	AFA	FG		pOH-FG		Amoxicilina		
pKa1	pKa2	pKa	pKa	pKa1	pKa2	pKa1	pKa2	pKa1	pKa2	
*	2,50	4,90	-	4,30	-	-	2,20	9,20	2,90	7,40
**	2,60	5,40	-	-	-	-	1,96	9,02	2,63	7,16
***	-	4,6	7,0	4,30	2,20	9,30	-	-	-	-

* Diender *et al.*, 1998; ** Rudolph *et al.*, 1999; *** Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996.

Quanto à solubilidade de produtos e substratos, sua dependência do pH se deve à alta estabilidade dos componentes quando estão na forma *zwiteriônica* (Hou e Poole, 1969)

conferindo-lhes menor solubilidade quando o valor do pH for próximo do ponto isoelétrico do componente.

Tabela 2 Constante de dissociação da ampicilina em água, Hou e Poole, 1969.

T (°C)	$pKa1$	$pKa2$
5	2,62	-
10	-	7,67
15	2,63	-
20	-	7,39
25	2,66	7,24
30	2,67	-
35	2,68	6,96
45	2,73	6,72

A dissociação dos componentes é muito importante em síntese enzimática. Para que ocorra o ataque nucleofílico do 6-APA ao complexo acil-enzima, seu grupo amino deve estar desprotonado (Margolin *et al.*, 1980), i.e., o núcleo deve estar como espécie aniônica.

O pH afeta também a atividade catalítica da enzima. De acordo com o mecanismo proposto por Duggleby *et al.*, 1995, o grupo amino da serina N-terminal tem papel na atividade catalítica da enzima (Figura 5). Este grupo, com pKa entre 6,8 e 7,9, necessita estar desprotonado para que possa se ligar à molécula de água adjacente, por meio de ligação de hidrogênio (ponte de hidrogênio). Esta hipótese é consistente considerando que o pH ótimo para a hidrólise da penicilina G é 8,2 (Duggleby *et al.*, 1995).

Os gráficos da Figura 6, obtidos por Ospina *et al.*, 1996a, resumem as principais influências do pH na SCC de penicilinas semi-sintéticas: atividade enzimática e seletividade da enzima na formação do antibiótico (razão entre as velocidades de síntese do antibiótico e hidrólise do derivado do doador acil, S/H). A Figura 6B mostra que ambas as velocidades iniciais, de síntese de ampicilina e hidrólise de EMFG, decrescem com pH,

refletindo claramente a queda da atividade enzimática em valores baixos de pH. Entretanto, a velocidade de hidrólise decresce mais que a de síntese, elevando a seletividade da enzima, como pode ser verificado na Figura 6A. Estes fatores indicam, para SCC de ampicilina, uma região ótima de pH, entre 6 e 7, onde há um compromisso entre a atividade enzimática (relacionada diretamente à produtividade do antibiótico) e a seletividade (relacionada à perda de substrato em uma reação paralela).

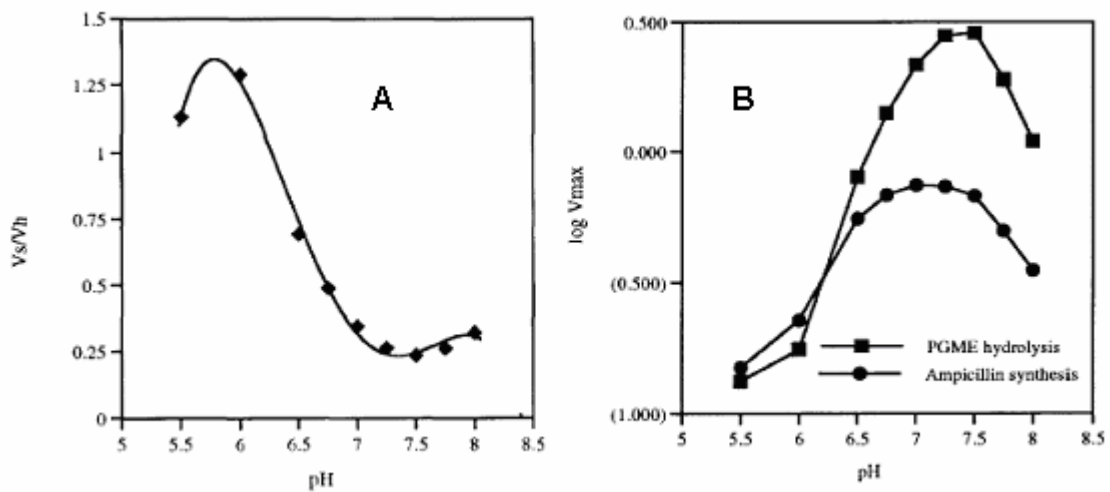


Figura 6 Efeito do pH na seletividade, A, e nas velocidades iniciais de síntese de ampicilina (Ampicillin synthesis) e hidrólise de éster metílico de D-(-)-fenilglicina (PGME hydrolysis), B. Condições: concentrações de enzima, de 6-APA e de EMFG, 3 UI/ml, 50 mM e 150 mM, respectivamente; 25°C [Gráficos retirados de Ospina *et al.*, 1996a].

1.4.2 Efeito da Temperatura

As velocidades de reação, tanto de síntese como de hidrólise, aumentam com a temperatura. No entanto, a razão entre as velocidades não permanece constante com a variação da temperatura. Por isso, no caso da SCC de penicilinas semi-sintéticas, o efeito da temperatura é de difícil predição. A temperatura tem efeito também sobre as constantes de dissociação (pK_a) dos componentes, assim como sobre sua estabilidade e solubilidade.

Outro fator importante é a desnaturação da enzima. Enzimas são moléculas protéicas complexas e sua atividade catalítica se deve a uma estrutura terciária altamente ordenada e exata que justapõe grupos de resíduos de aminoácidos específicos. A estrutura

terciária de uma enzima se conserva por um grande número de ligações fracas, não covalentes. Em outras palavras, uma molécula de enzima é uma estrutura frágil. O aumento de temperatura pode levar à quebra dessas ligações desnaturando a enzima.

Outros fatores que contribuem para sua estabilização com a temperatura são: pH; força iônica; presença ou não de ligantes (a ligação de substratos à enzima pode aumentar sua estabilidade).

Segundo a literatura, a atividade da PGA tende a aumentar com a temperatura. Travascio *et al.*, 2002, estudando o efeito da temperatura (de 15 a 70°C) na síntese enzimática de cefalexina observaram uma atividade máxima da PGA a 50°C. No entanto, o aumento da temperatura diminui a estabilidade enzimática e a seletividade. Gonçalves *et al.*, 1998, estudaram as velocidades de éster metílico de D-(-)-p-hidroxi-fenilglicina (EMHFG) e de amoxicilina para duas temperaturas (4°C e 25°C). As velocidades de ambas as reações decresceram com a redução da temperatura. Embora a seletividade a baixa temperatura tenha aumentado, a produtividade e rendimento do éster sofreram um grande decréscimo a 4°C. Ferreira *et al.*, 2004b, obtiverem resultados semelhantes para a ampicilina. Estudando em um intervalo de temperatura de 20 a 40°C, Kasche, 1986, observou que o rendimento de 6-APA decaí com a temperatura na síntese de ampicilina utilizando PGA de *E. coli*.

1.4.3 Efeito da força iônica

Em reações entre íons com cargas diferentes é esperado que as constantes aparentes de dissociação cresçam e as velocidades de reação decresçam com o aumento da força iônica, devido à maior estabilidade dos íons. Resultados presentes na literatura vêm mostrando o efeito da força iônica na síntese de penicilinas semi-sintéticas.

Na SCC de penicilinas semi-sintéticas, um dos efeitos indesejáveis com o aumento da força iônica é a neutralização dos (prováveis) íons responsáveis pela ligação do 6-APA ao sítio ativo da enzima. A Figura 7 mostra uma possível interação (a partir de duas

moléculas de água) entre o núcleo β -lactâmico e o resíduo Arg α 145 ao final da α -hélice da enzima. Embora este esquema tenha sido sugerido a partir de dados cristalográficos da hidrólise da penicilina G (Alkema *et al.*, 2000), é provável que, na síntese de penicilinas semi-sintéticas, a ligação entre o grupo carboxílico do 6-APA à enzima e a formação do complexo enzima-núcleo se realize da mesma forma.

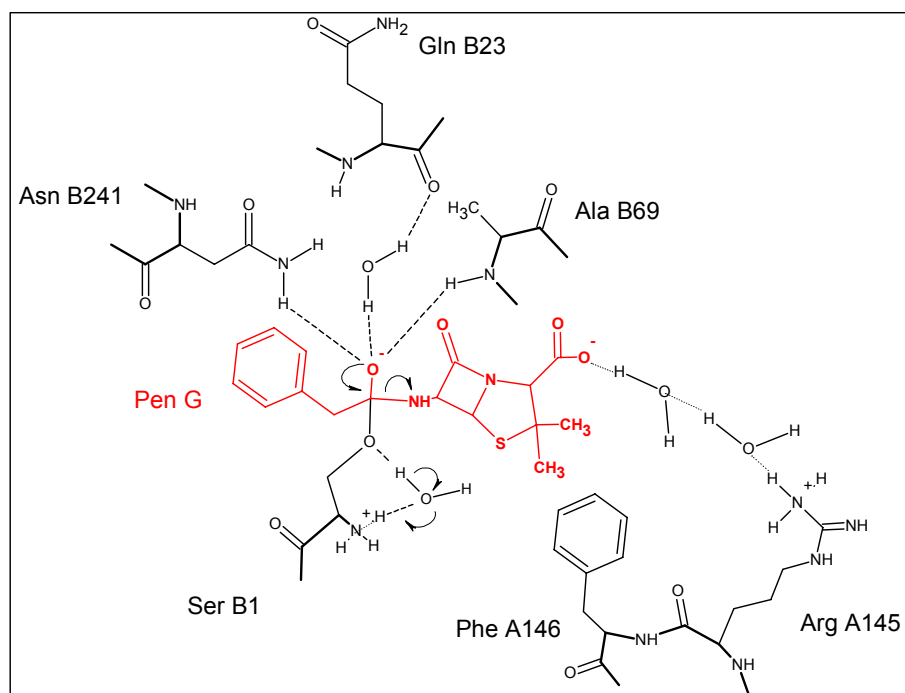


Figura 7 Esquema do passo intermediário da hidrólise da Penicilina G. A figura mostra a interação da Arg α 145 com o grupo carboxílico do anel tiazolidina segundo sugerido por Alkema *et al.*, 2000. Ligações em negrito indicam a cadeia principal da enzima.

Kim e Lee, 1996, observaram que a velocidade de síntese de ampicilina usando penicilina acilase de *E. coli* sofre influência direta da força iônica da solução: o aumento da força iônica provoca uma diminuição da velocidade de reação. Este resultado indica que existe uma interação eletrostática específica entre o sítio ativo da enzima e compostos iônicos.

Portanto, o uso de íons que não estão diretamente relacionados à síntese deve ser minimizado quando reações entre íons de cargas opostas estão envolvidas (Kasche, 1986, Kasche *et al.*, 1984). No entanto, o controle de pH em reator, em escala industrial, é geralmente feito pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) – ou outra base inorgânica forte –

em combinação com um tampão, normalmente fosfato de potássio. Isto pode levar ao aumento da força iônica do meio reacional podendo inibir a síntese e encarecer os processos de purificação subseqüentes.

1.4.4 Efeito do uso de co-solventes

Embora seja imprescindível a utilização de co-solventes para diminuir a atividade da água e deslocar o equilíbrio para a formação do antibiótico na síntese termodinamicamente controlada, na SCC de penicilinas semi-sintéticas a utilização de co-solventes não é estritamente necessária. Vários autores estudaram a influência do metanol na SCC (Ospina *et al.*, 1996b, Kim e Lee, 1996, Gonçalves *et al.*, 2003, Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998, Kasche, 1985). Resultados mostram que um máximo na seletividade pode ser alcançado quando utilizado 40% de metanol em volume (Ospina *et al.*, 1996b, Kim e Lee, 1996, Kasche, 1985). Argumenta-se que a razão para esse aumento na seletividade seja o aumento da reação inversa da Hidrólise 1 da Figura 4, devido à alta concentração de metanol. Contudo, embora o metanol pareça ser um inibidor não competitivo na hidrólise do éster, a síntese do EMFG (ou EMHFG) não tem sido possível a partir de FG (ou pOH-FG) e metanol (Ospina *et al.*, 1996b, Gonçalves *et al.*, 2003). Um fato interessante foi observado por Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998, ao estudar a influência cruzada do pH e concentração de metanol na seletividade. Fernandez-Lafuente *et al.* observaram que a influência da concentração do metanol na seletividade é aditiva ao do pH. Isto é, a curva da razão entre as velocidades iniciais de síntese e hidrólise (S/H) em função do pH é simplesmente transladada para cima com a adição do metanol. Os autores propõem que enquanto o pH controla a adsorção do nucleófilo (6-APA), o metanol aumenta a razão entre a síntese e hidrólise. Apesar do aumento na seletividade, o aumento na concentração do metanol reduz a atividade enzimática (Ospina *et al.*, 1996b, Gonçalves *et al.*, 2003, Kim e Lee, 1996). Esta queda na

atividade pode estar relacionada a mudanças conformacionais da enzima pela queda da constante dielétrica do meio.

1.5 Otimização do processo de síntese de penicilinas semi-sintéticas

A otimização do processo de síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas é necessária para viabilizar a implementação desta rota em escala industrial. No caso da síntese cineticamente controlada, SCC, recai-se em problema de otimização de reações série-paralelo, onde o ponto de máxima seletividade em antibiótico deve ser buscado para operação do reator, mas levando-se em conta também, produtividade, rendimento do derivado do doador acil (por exemplo, EMFG, no caso da ampicilina) e conversão de 6-APA. Além disso, a SCC envolve um complexo entrecruzamento de vários fenômenos, o que torna sua otimização complexa e laboriosa. Todos os fatores que afetam a síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas interferem nas variáveis representativas do processo como um todo (Tabela 3): conversão de 6-APA, produtividade de antibiótico, seletividade e rendimento de éster.

Tabela 3 Índices de desempenho da SCC de penicilinas semi-sintéticas (exemplificado para ampicilina) em função do tempo de reação.

Conversão de 6-APA (6-APA consumido / 6-APA adicionado ao reator)	$X_{6-APA}(t) = \frac{C_{amp}(t)}{C_{6-APA}(t) + C_{amp}(t)}$
Produtividade (concentração de antibiótico / tempo de reação)	$P(t) = \frac{C_{amp}(t)}{t}$
Seletividade (concentração de antibiótico / concentração doador acil hidrolisado)	$S(t) = \frac{C_{amp}(t)}{C_{FG}(t)}$
Rendimento do derivado do doador acil (concentração de antibiótico / concentração de éster ou amida adicionada)	$X_{EMFG}(t) = \frac{C_{amp}(t)}{C_{EMFG}(t) + C_{FG}(t) + C_{amp}(t)}$

Entre as várias abordagens que vêm sendo propostas para otimizar, a síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos, a utilização de enzimas imobilizadas em um reator semi-contínuo integrado, onde produtos se cristalizam no decorrer do processo (Schroen *et al.*, 2002, Youshko *et al.*, 2000a, 2001, 2002b, Ferreira, 2004a) se destaca entre as abordagens mais promissoras. A enzima imobilizada reduz perdas de biocatalisador. O antibiótico cristalizado não é hidrolisado o que aumenta a seletividade da reação. Altas concentrações de produtos no reator facilitam operações de separação a jusante do processo. E por fim, o uso de reator semi-contínuo permite o controle da concentração de substratos o que pode inibir a formação do produto indesejado. Esta estratégia foi adotada por Ferreira, 2004a, para síntese de ampicilina, obtendo altas seletividade e conversão. Contudo, a abordagem empírica que vem sendo utilizada para melhorar o desempenho deste reator enzimático deve ser substituída por métodos sistemáticos de otimização na busca de máxima seletividade e rendimentos.

1.6 Motivação

O Brasil importa hoje integralmente os princípios ativos dos antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cefalexina, cefadroxil, dentre vários outros), com crescente participação de países como China e Índia como fornecedores. As importações brasileiras de ampicilina e amoxicilina juntas foram de 46, 76 e 72 milhões de dólares nos anos de 2004, 2005 e 2006¹.

De uma forma ampla, as importações de farmoquímicos passaram de US\$ 750 milhões em 1990 para US\$ 1,8 bilhão em 2000, sendo que a exportação deste setor passou de

¹ Dados da SECEX, Secretaria de Comércio Exterior – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>).

US\$ 186 milhões para US\$ 270 milhões, no mesmo período. Em 1998, o saldo negativo da balança comercial de fármacos chegou a 26% do déficit total da balança comercial brasileira (Magalhães *et al.*, 2003).

Conseqüentemente, esse setor se coloca atualmente como prioritário na política industrial nacional e percebe-se interesse em uma inflexão nesse quadro, com a indústria instalada no Brasil não se atendo apenas à formulação e envasamento dos fármacos. É de todo interesse para o país, entretanto, que uma retomada da produção nacional desses medicamentos se baseie em tecnologias limpas, dentro do escopo da química verde. A questão da viabilidade econômica da rota enzimática de produção de antibióticos torna-se então estratégica.

1.7 Objetivo

Este trabalho se insere em uma linha de pesquisa atualmente em andamento no DEQ/UFSCar, que objetiva estudar a produção de antibióticos semi-sintéticos pela rota enzimática. Esse é um extenso programa de pesquisa e inclui: o desenvolvimento de diferentes catalisadores (produção e purificação da enzima penicilina G acilase (PGA), incluindo o monitoramento e controle da fermentação); o estudo da cinética enzimática e do transporte de massa na síntese de antibióticos; a purificação do produto; a síntese e avaliação, em nível preliminar, da viabilidade econômica do processo.

O escopo deste doutorado é contribuir para esse objetivo: avançando no estudo e compreensão da síntese enzimática cineticamente controlada de penicilinas semi-sintéticas abordando, mais especificamente, a síntese de ampicilina; desenvolvendo modelos matemáticos de reator de síntese enzimática de ampicilina com cristalização de produtos; e utilizando esses modelos em algoritmos de otimização de processo.

2 Síntese Cineticamente Controlada: Mecanismos de Reação.

Para a utilização de técnicas avançadas de otimização dinâmica, com o intuito de tornar a síntese enzimática competitiva industrialmente, um modelo do processo e com isso, um modelo cinético se torna necessário. Conseqüentemente, o estudo do mecanismo reacional é um fator chave no entendimento do processo.

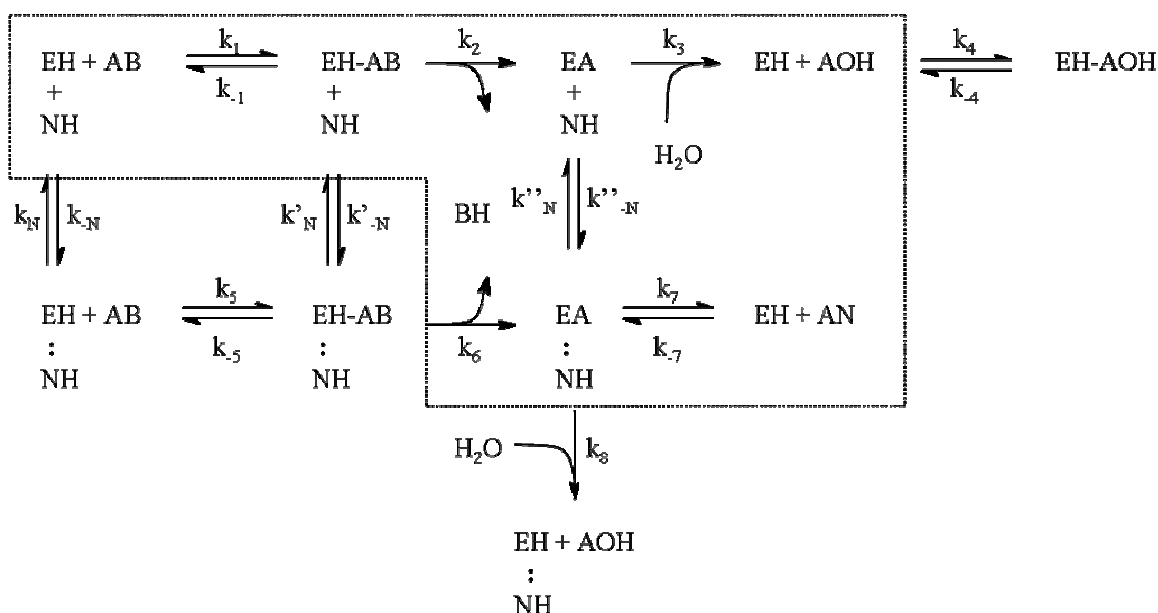


Figura 8 Esquema do mecanismo de síntese de penicilinas semi-sintéticas. EH = enzima livre, AB = derivado do doador acil (por exemplo, EMFG no caso da ampicilina), NH = núcleo β -lactâmico (6-APA), AN = antibiótico, AOH = doador acil (FG, no caso da ampicilina), EA = complexo acil-enzima, EA••NH = complexo acil-enzima-núcleo, BH = metanol (no caso de se utilizar um derivado éster). Ligações não covalentes são denotadas por ••. Em destaque, passos considerados consenso na literatura.

Como já mencionado anteriormente, o processo de síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos utiliza-se de uma enzima já consolidada em processo industrial: a produção do núcleo β -lactâmico (6-APA) através da hidrólise da benzilpenicilina (penicilina G). A importância industrial desta enzima contribuiu para que sua forma (mecanismo) de atuação fosse extensivamente estudada. E, embora a hidrólise da penicilina G não seja exatamente a reação inversa da de síntese (observe que a hidrólise da penicilina G é similar à

Hidrólise 2 da Figura 4, que não é exatamente a reação inversa na síntese cineticamente controlada), ambas as reações passam por um intermediário comum: o complexo acil-enzima (EA). Com isso, muitos aspectos na literatura principalmente no que diz respeito ao mecanismo de acilação da enzima (a formação do complexo acil-enzima) são consensuais entre os autores e vêm sendo estudados há algum tempo. Entretanto, vários aspectos referentes ao mecanismo de desacilação das reações de síntese ainda permanecem obscuros. Análises cristalográficas de Raios-X utilizando enzimas selvagens e mutantes e vários tipos de complexos enzimáticos, assim como análise de dados cinéticos, têm sido utilizados para estudar os vários aspectos mecanísticos da síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos.

A Figura 8 mostra um mecanismo onde a maioria dos passos propostos na literatura é levada em consideração, embora a influência do metanol (BH) como inibidor não competitivo não esteja sendo considerada no mecanismo acima.

2.1 Formação do complexo acil-enzima

Duggleby *et al.*, 1995, apresentaram a primeira estrutura de PGA de *E. coli* com resolução de 1,9 Å, da enzima complexada com ácido fenilacético (AFA) (2,5 Å), a cadeia lateral de penicilina G, e fenilmetilsulfonil fluoreto (FMSF), o qual liga covalentemente à Serina β 1 e emula um intermediário tetraédrico hemiacetal. Os autores propuseram que o intermediário acil-enzima é formado depois do ataque nucleofílico do O_{γ} , situado a uma posição favorável (2,9 Å) do carbono carbonil (passos 1 e 2 da Figura 5) com uma molécula de água atuando como uma base virtual. O oxianion resultante seria estabilizado pelo N_{δ} da Asn β 241, pelo grupo amino da cadeia principal da Ala β 69 e do Gln β 23. Mais tarde, Alkema *et al.*, 2000, propuseram que o oxigênio da Gln β 23 faria uma ponte

de hidrogênio, via uma molécula de água, com o oxigênio carbonil do AFA, como esquematizado na Figura 7.

Ospina *et al.*, 1996a, propõe um mecanismo para a síntese de ampicilina baseado no mecanismo da hidrólise da penicilina G (por Duggleby *et al.*, 1995) onde o ataque nucleofílico da água é substituída pelo ataque do núcleo β -lactâmico, 6-APA (Figura 9). Embora esteja em discussão o fato da enzima formar o complexo com o grupo α -amino do derivado da fenilglicina (éster ou amida) carregado ou não, a formação do complexo acil-enzima é consenso tanto para a síntese quanto para a hidrólise de antibióticos e derivados da cadeia lateral.

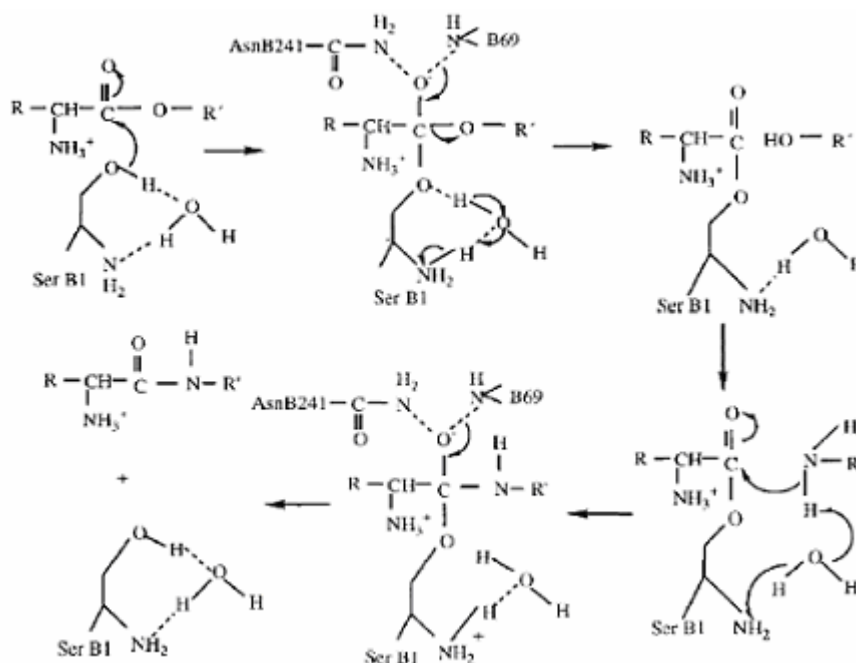


Figura 9 Mecanismo proposto por Ospina *et al.*, 1996a, para a síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos, seguindo o mecanismo de hidrólise de Duggleby *et al.*, 1995. Neste caso o substrato é um éster ou amida e o ataque nucleófilo se deve ao grupo amino do núcleo.

O mecanismo da Figura 9, que propõe que moléculas livres de 6-APA promoveriam um ataque nucleófilo ao acil-enzima exatamente da mesma forma que a água, durante a reação de hidrólise, ainda é um ponto em aberto e vem sendo discutido na literatura. Na verdade, os autores não apresentam dados cristalográficos na presença de 6-APA (ou de outro núcleo), propondo o mecanismo da Figura 9 por analogia.

A análise cristalográfica direta do complexo “enzima-(núcleo β -lactâmico)” é uma tarefa difícil. A solubilidade do núcleo e a da enzima são similares, tornando sua co-cristalização desfavorável. Portanto, embora vários artigos mostrem a estrutura cristalina da enzima complexada com ligantes de cadeias laterais, nenhum dado está disponível para o complexo enzima-(núcleo β -lactâmico).

Para contornar este problema, é possível saturar cristais de um mutante inativo (obtido através de mutagênese sítio-dirigida) com solução de penicilina G (por exemplo), ou uma enzima selvagem (ou alguma mutante) com um substrato modificado inerte. Esta abordagem provê algumas idéias concernentes ao mecanismo de reação sendo sempre, contudo, pistas indiretas. Isto é, elas devem ser sempre complementadas com ensaios cinéticos, o qual adiciona informações essenciais à análise.

Done *et al.*, 1998, verificaram mudanças conformacionais depois de ligar derivados de fenilacetamida e de ácido fenilacético em PGA de *E. coli*. Foi observado que os ligantes poderiam ser separados em dois subgrupos em relação à conformação resultante dos resíduos nos complexos enzimáticos. No primeiro subgrupo (constituído basicamente pelos ligantes: ácido fenilacético, fenol e ácido p-hidroxi-fenilacético), as ligações não alteravam a conformação da estrutura nativa da enzima e os grupos carboxílicos destas moléculas permaneciam dentro da bolsa de ligação. No segundo subgrupo, os ligantes (ácido m-nitro-fenilacético, ácido 3,4-di-hidroxi-fenilacético, ácido 2,5-di-hidroxi-fenilacético e ácido p-nitro-fenilacético) induziram uma mudança na conformação nativa da enzima, isto é, os resíduos Arg α 145 e Phe α 146 moveram-se em direção ao solvente em uma configuração aberta. Estes dois resíduos estão posicionados ao final de uma α -hélice com 16 aminoácidos (α 131- α 146), a qual praticamente não é afetada pelo movimento desses dois resíduos. Além disso, apesar dos resíduos Asn β 241, Ala β 69 e Ser β 1 permanecerem praticamente inalterados em sua conformação, o grupo carboxílico dos ligantes do segundo subconjunto

estavam mais distanciados da Ser β 1. Os autores mostraram resultados cinéticos que sustentavam tais dados cristalográficos: os ligantes do subconjunto 1 tinham as constantes de inibição uma ordem de magnitude menor que as constantes da subconjunto 2. Isto é, os ligantes que não alteravam a estrutura nativa da enzima se ligavam melhor à enzima. Embora Done *et al.* não tenham trabalhado com derivados de fenilglicina, de maior importância para a síntese de antibióticos, a observação do movimento dos resíduos Arg α 145 e Phe α 146, tem implicações importantes na ligação do 6-APA na formação do complexo enzima-núcleo.

Alkema *et al.*, 2000, promoveram mutagênese sítio-dirigida da PGA de *E. coli*. Cristais saturados com penicilina G tiveram sua estrutura analisada. Quando o resíduo Arg β 214 foi trocado por uma alanina (β N241A) a enzima mutante se tornou inativa, confirmando o papel essencial da Arg β 214 na estabilização do oxianion do complexo acil-enzima. Nenhuma mudança estrutural relevante foi observada no sítio ativo deste mutante, quando comparada à enzima selvagem. Segundo os autores, a penicilina G induz a Arg α 145 e Phe α 146 a assumirem uma configuração aberta, similar à observada por Done *et al.*, 1998, para o segundo subconjunto de ligantes. A Arg α 145 se volta 8Å em direção ao solvente, mas ainda interage com o grupo carboxílico do núcleo (veja Figura 7) via duas pontes de moléculas de água. A ligação do grupo amino da Arg α 145 pode confirmar a hipótese de Kasche *et al.*, 1984, que um resíduo carregado positivamente poderia existir no sítio de ligação do núcleo. No entanto, tal hipótese estava associada à queda da velocidade de síntese (em relação à hidrólise) com o aumento do pH acima de 6,5 (vide Figura 6). O grupo amino do resíduo deveria ter pKa próximo a 6 o que diminuiria a quantidade de grupos carregados ao aumentar o pH acima desse valor. Entretanto, o pKa do grupo amino em questão (grupo amino do Arg α 145) tem valor próximo a 12 e portanto, sempre estará carregado na região de atividade da enzima. Portanto, o efeito do pH na seletividade parece ainda não estar esclarecido. Alkema *et al.* também mostraram ensaios cinéticos de síntese de penicilinas (de fenilacetamida e 6-APA)

com outros mutantes (substituindo Phe α 146), e melhor seletividade foi obtida substituindo esse aminoácido por uma leucina (α F146L). Em suma, Arg α 145, Phe α 146 e Phe β 71 formariam o sítio de ligação para o núcleo β -lactâmico. A enzima nativa não teria este sítio na conformação espacial correta, o qual, por sua vez, seria induzido pelo ligante.

Alkema *et al.*, 2002, focaram também a PGA de *E. coli*, modificando os resíduos Phe α 146, Phe β 24 e Phe β 57 (em acordo com Done *et al.*, 1998, os autores apontaram que há uma fenilalanina e não um triptofano na posição β 57, em desacordo com Duggleby *et al.*, 1995). Os substituintes foram Tyr, Trp, Ala e Leu (todos hidrofóbicos). Dessa forma, a interação entre ambos os anéis aromático da cadeia lateral (com a Phe β 24) e tiazolidina do núcleo (com a Phe α 146) foi modificada. Os autores observaram que a Phe β 57, localizada no fundo da depressão hidrofóbica, pode ser importante para preservar a estrutura do sítio. Uma série de ensaios cinéticos foi feita, a 30°C e pH 7. Hidrólise de NIPAB (ácido 6-nitro-3-fenilacetamida benzóico) e síntese de ampicilina foram realizadas. O efeito das mutações na seletividade de síntese foi muito menor que na hidrólise do NIPAB. Maiores valores de S/H foram obtidos para a mutante β F24A, usando o éster como cadeia lateral precursora (a acilação da PGA com β F24A foi reduzida com a amida, mas não com o éster). Deve ser enfatizado que a ligação do 6-APA provavelmente não foi significativamente alterada pelas mutações.

McVey *et al.*, 2001, apresentaram dados cristalográficos de alta resolução (1,3 Å) usando duas abordagens: enzima selvagem saturada em sulfóxido de penicilina G (um substrato quase não hidrolisável); e mutante inativa β N241A saturada em penicilina G. Este trabalho reafirma que interações não-polares, ligadas a modificações conformacionais, são os principais fatores quando a enzima interage com os ligantes. A flexibilidade da Phe α 146, Arg α 145 e Phe β 71, interagindo com o anel tiazolidina, é apontada como essencial para a ligação do núcleo. Um aspecto interessante é que a Phe α 146 e Phe β 71 estão em dois laços (*loops*)

que contribuem para a coordenação do íon cálcio. O cálcio conformaria o sítio catalítico somente na região periplasmática da *E. coli*, onde sua concentração é mais alta (Brannigan *et al.*, 2000).

2.2 Formação do complexo acil-enzima-núcleo

A formação de um complexo intermediário acil-enzima-núcleo antes do ataque nucleofílico ao complexo acil-enzima e formação do antibiótico é um ponto mecanístico importante e foi verificado através de dados cinéticos por diversos autores (Kasche *et al.*, 1984, Gonçalves *et al.*, 2002, entre outros). Indicações de uma ligação não covalente do núcleo com a enzima têm sido apontadas também por resultados cristalográficos (Alkema *et al.*, 2000, McVey *et al.*, 2001, Alkema *et al.*, 2002) como descrito na seção anterior (2.1).

Kasche *et al.*, 1984, propõe um teste para verificar se o nucleófilo se liga à enzima antes da desacilação. A Figura 10 ilustra um esquema simplificado de síntese e hidrólise. A caixa cinza indica algum mecanismo onde o complexo acil-enzima está envolvido.

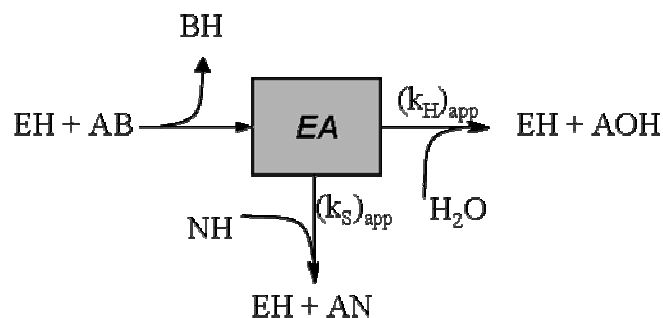


Figura 10 Esquema simplificado para a síntese de ampicilina. A caixa cinza indica um mecanismo qualquer onde o complexo acil-enzima está envolvido. EH = enzima livre, AB = derivado do doador acil, NH = núcleo β -lactâmico (6-APA), AN = antibiótico, AOH = doador acil, EA = complexo acil-enzima, BH = metanol.

A partir da Figura 10, as velocidades de síntese e hidrólise (v_{AN} e v_{AOH}) podem ser quantificadas em termos de constantes cinéticas aparentes, isto é:

$$\begin{aligned} v_{AN} &= (k_S)_{ap} C_{NH} C_{EA} \\ v_{AOH} &= (k'_H)_{ap} C_{H_2O} C_{EA} \end{aligned} \quad (3)$$

Na equação acima, C_{NH} , C_{EA} e C_{H_2O} são as concentrações do núcleo β -lactâmico, do complexo acil-enzima e da água, respectivamente. $(k_S)_{ap}$ e $(k'_H)_{ap}$ são constantes cinéticas aparentes. Incorporando a concentração de água em uma nova constante $(k_H)_{ap} = (k'_H)_{ap} C_{H_2O}$, a razão entre as constantes aparentes de desacilação se torna:

$$\left(\frac{k_H}{k_S} \right)_{ap} = C_{NH} \frac{v_{AOH}}{v_{AN}} \quad (4)$$

Portanto, se houver um ataque direto do núcleo ao complexo acil-enzima (sem passar por um complexo intermediário acil-enzima-núcleo), o lado direito da Equação 4 deve ser sempre constante. No entanto, resultados experimentais obtidos por Kasche *et al.*, 1984, Kasche, 1986, e Gonçalves *et al.*, 2002, mostraram uma variação linear da razão entre as constantes aparentes de desacilação – $(k_H/k_S)_{ap}$ – em relação à concentração de 6-APA. Isto indica que o ataque do núcleo não é direto e que há a formação de um intermediário onde está presente o complexo acil-enzima e o núcleo.

2.3 Efeitos inibitórios do doador acil

Entre os pontos onde não há consenso entre os autores está a inibição do doador acil nas reações de síntese e hidrólises. Gonçalves *et al.*, 2003, estudaram os efeitos inibitórios de reagentes e produtos na síntese cineticamente controlada de amoxicilina catalisada por PGA de *E. coli* imobilizada de forma multipontual em gel de agarose. Segundo

os autores, pOH-FG é inibidor competitivo nas hidrólises de éster metílico de p-hidroxi-fenilglicina e de antibiótico. De acordo com esse resultado a reação 4 ocorreria ($k_4, k_{-4} \neq 0$, Figura 8), isto é, o doador acil poderia se ligar à enzima, embora o complexo formado, EH-AOH, não possa caminhar para as rotas de síntese do antibiótico ou do éster, pois a reação 3 é irreversível. A irreversibilidade dessa reação se deve à forma *zwiteriônica* da pOH-FG, que, com o grupo carboxílico carregado negativamente, não poderia sofrer um ataque nucleofílico. Alkema *et al.*, 2004, ao contrário, não observou efeito inibitório da forma *zwiteriônica* da FG na hidrólise enzimática do NIPGB (ácido D-2-nitro-5-(fenilglicil)amino benzóico). Os autores sugerem que uma carga positiva na posição C α previne o ligante de se ligar a um sítio apolar. Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996, estudaram o efeito do pH na síntese de ampicilina e também foi sugerido que a baixa afinidade com a enzima de derivados da fenilglicina se devia ao grupo amino carregado na posição C α . Ospina *et al.*, 1996a, ao contrário, variando o pH de 5,5 a 8,5, concluiu que apesar de V_{max} da hidrólise do EMFG ser dependente do pH, K_m se mostrou independente. Tal fato sugere que a presença ou não de carga não altera a afinidade enzimática com o substrato (pK_a do EMFG $\approx 7,0$).

2.4 Hidrólise do complexo acil-enzima-núcleo

A hidrólise do complexo acil-enzima-núcleo é outra questão que não está completamente esclarecida (reação 8, Figura 8). Kasche *et al.*, 1984, apresentaram dados experimentais nos quais a velocidade de hidrólise do EMFG não tende a zero com o aumento da concentração do 6-APA, até uma concentração de 100mM de 6-APA. Baseado nesta evidência, os autores concluem que o complexo acil-enzima-núcleo pode também ser hidrolisado pela água. Segundo Youshko e Svedas, 2000b, a reação 8 (Figura 8) produz a enzima (EH) e o núcleo (NH) não ligados e o doador acil (AOH) e não um complexo enzima

núcleo (EH••NH). Um esquema do mecanismo proposto pelos autores está presente na Figura 11 (página 55).

2.5 Formação do complexo enzima-núcleo

A questão chave concernente ao passo de desacilação nas reações de síntese é o mecanismo do ataque nucleofílico do núcleo β -lactâmico à enzima, em competição com a água (reações 5 e 6 da Figura 8). Em suma, se o complexo acil-enzima pode se formar com a presença do núcleo anteriormente ligado à enzima ou não.

Para que haja alguma síntese apreciável, uma (ou ambas) das hipóteses deve(m) ocorrer:

- a) o grande número de moléculas de água no solvente seria compensado pela significativa diferença nas constantes cinéticas de desacilação (núcleo *versus* água) durante este passo; as serinas-proteases, quando reações de hidrólise e transpeptidação (ou síntese) ocorrem simultaneamente, podem apresentar esta característica (Adler-Nissen, 1986);
- b) uma ligação prévia e/ou facilitada do núcleo β -lactâmico à enzima permitiria o núcleo vencer a competição pela água.

Gonçalves *et al.*, 2000, estudando a síntese de amoxicilina a partir de éster metílico de p-hidroxi-fenilglicina e 6-APA, observaram que as velocidades de síntese e hidrólise decrescem com a queda do pH de 7,0 para 6,0, mas que a seletividade (S/H) aumenta com a queda do pH. Este resultado está de acordo com Duggleby *et al.*, 1995, e Ospina *et al.*, 1996a, para ampicilina (vide seção 1.4.1). A influência da saturação prévia da PGA com o 6-APA para a síntese de amoxicilina foi também testada por Gonçalves *et al.*, 2001a. Nenhuma diferença drástica foi detectada entre as seletividades em pH 7,0, mas a pH 6,0, a seletividade aumentou quando o 6-APA era previamente ligado à PGA. Para valores baixos de pH, como

um menor número de grupos amino neutros estão disponíveis na Ser β 1, a importância da ligação do núcleo à PGA se tornaria relevante.

Como já apontado, análises diretas de raios-X de cristais de proteínas saturados com o núcleo β -lactâmico é uma difícil tarefa e portanto, a elucidação de vários aspectos mecanísticos terá que recair em ensaios cinéticos.

2.6 Modelos cinéticos da SCC de ampicilina

Vários modelos cinéticos baseados nos mecanismos de reação vêm sendo propostos na literatura. Há, no entanto, duas vertentes principais que divergem principalmente sobre a ligação do núcleo (6-APA) à enzima. A primeira admite que todos os intermediários acil-enzima são formados antes da adsorção do 6-APA à enzima (Youshko *et al.*, 2000b, 2002a, 2003, Schroen *et al.*, 2001). Youshko e Svedas, 2000b, apresentam resultados (pH 6,3, 25°C, $C_{6-APA}=50\text{mM}$ e C_{EMFG} entre 25 e 275mM) que indicam que a razão entre as velocidades iniciais de síntese e hidrólise (S/H) independem da concentração do doador acil. Portanto, segundo os autores, tanto a síntese quanto a hidrólise devem ocorrer por meio da formação de um complexo acil-enzima comum.

Em uma segunda abordagem se assume que o complexo acil-enzima pode ser formado antes ou depois da adsorção do 6-APA, mas apenas no segundo caso o antibiótico seria sintetizado (Gonçalves *et al.*, 2002, Gonçalves *et al.*, 2003, Ferreira *et al.*, 2000). A razão desta hipótese, como enunciado anteriormente, se deve à alta concentração de água que direcionaria a reação para a hidrólise se o núcleo não estiver previamente posicionado para o ataque nucleofílico.

2.6.1 Modelo Simplificado 1 (MS1):

A Figura 11 mostra um modelo mínimo proposto por Youshko e Svedas, 2000b, para a síntese enzimática de ampicilina. Este modelo mostra um possível exemplo da primeira abordagem.

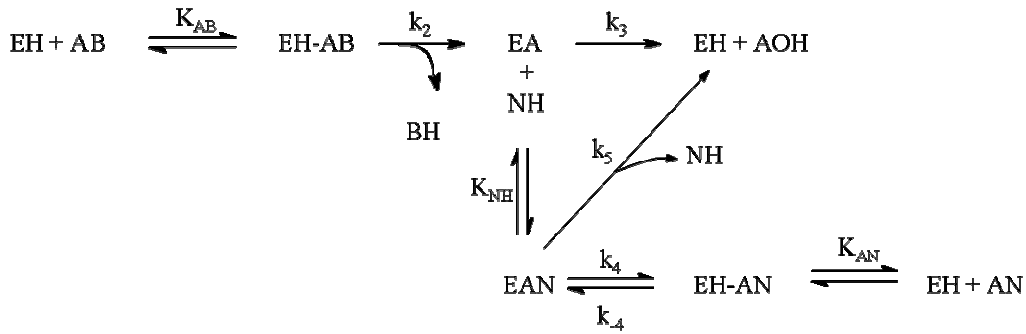


Figura 11 Mecanismo da síntese enzimática de ampicilina proposto por Youshko e Svedas, 2000b. EH = enzima livre; AB = EMFG; EA = complexo acil-enzima; AOH = FG; NH = 6-APA; EAN; complexo acil-enzima-núcleo; AN = ampicilina; EH-AB e EH-NA = complexos intermediários.

Seguindo o MS1 (com 8 parâmetros), as velocidades de formação de ampicilina (v_{AN}) e fenilglicina (v_{AOH}) seriam:

$$v_{AN} = C_E \left[\frac{k_2 k_4 C_{NH} C_{AB}}{K_{AB} (k_3 K_{NH} + k_4 C_{NH} + k_5 C_{NH})} - \frac{k_{-4} C_{AN} (k_3 K_{NH} + k_5 C_{NH})}{K_{AN} (k_3 K_{NH} + k_4 C_{NH} + k_5 C_{NH})} \right]$$

$$v_{AOH} = C_E (k_3 K_{NH} + k_5 C_{NH}) \left[\frac{k_2 C_{AB}}{K_{AB} (k_3 K_{NH} + k_4 C_{NH} + k_5 C_{NH})} + \frac{k_{-4} C_{AN}}{K_{AN} (k_3 K_{NH} + k_4 C_{NH} + k_5 C_{NH})} \right]$$

$$C_E = C_{E0} \left/ \left[1 + \frac{C_{AB}}{K_{AB}} + \frac{C_{AN}}{K_{AN}} + \frac{k_2 C_{AB} (K_{NH} + C_{NH})}{K_{AB} (k_3 K_{NH} + k_4 C_{NH} + k_5 C_{NH})} + \frac{k_{-4} C_{AN} (K_{NH} + C_{NH})}{K_{AN} (k_3 K_{NH} + k_4 C_{NH} + k_5 C_{NH})} \right] \right.$$

(5)

onde C_E e C_{E0} são as concentrações de enzima livre e inicial respectivamente (dadas em mol.litro⁻¹). A razão entre as velocidades de síntese e hidrólise, S/H, inicial (concentração de produtos igual a zero) seguindo este modelo (Equação 5) depende apenas da concentração do 6-APA se mantidos pH e temperatura constantes.

$$\left(\frac{v_{AN}}{v_{AOH}} \right)_{inicial} = \frac{k_4 C_{NH}}{k_3 K_{NH} + k_5 C_{NH}} \quad (6)$$

2.6.2 Modelo Simplificado 2 (MS2):

Um possível exemplo da segunda abordagem é proposto por Gonçalves *et al.*, 2002, Gonçalves *et al.*, 2003. Os autores propõem um modelo simplificado para a síntese de amoxicilina que inclui um “termo de partição”, o produto $T_{max} \cdot X$ ($0 \leq T_{max} \leq 1$). O parâmetro T_{max} quantificaria a quantidade do complexo acil-enzima-6-APA (EH••NH) que estaria direcionada à rota sintética. Conseqüentemente, $1-T_{max}$ é a fração de EH••NH que seguiria a rota hidrolítica. Além disso, todo o complexo acil-enzima (EA) que não estivesse ligado ao 6-APA (NH) anteriormente, sofreria um ataque nucleofílico da água. O modelo ainda assume que a velocidade de formação do complexo EA não seria afetada pela presença do 6-APA adsorvido no complexo. Assume também, que há inibição pelos produtos. Este modelo simplificado (MS2) tem 10 parâmetros e é um modelo semi-empírico, pois suas equações não resultam de reações elementares. Seguindo o MS2 as equações para a velocidade de formação do complexo acil-enzima (desaparecimento de éster, R_{EA}), formação síntese de amoxicilina (R_S) e hidrólise do antibiótico (Hidrólise 2, Figura 4, R_{H2}) são:

$$\begin{aligned} R_{EA} &= C_{E0} \frac{k_{cat1} C_{AB}}{K_{m1} \left(1 + \frac{C_{AN}}{k_{AN}} + \frac{C_{AOH}}{k_{AOH}} \right) + C_{AB}} \\ R_S &= C_{E0} \frac{k_{cat1} C_{AB}}{K_{m1} \left(1 + \frac{C_{AN}}{k_{AN}} + \frac{C_{AOH}}{k_{AOH}} \right) + C_{AB}} T_{max} X \\ R_{H2} &= C_{E0} \frac{k_{cat2} C_{AN}}{K_{m2} \left(1 + \frac{C_{AB}}{k_{AB}} + \frac{C_{NH}}{k_{NH}} + \frac{C_{AOH}}{k_{AOH}} \right) + C_{AN}} \end{aligned} \quad (7)$$

onde $X = \frac{C_{NH}}{K_{EN} + C_{NH}}$ descreve a saturação da enzima pelo 6-APA. R_k é a velocidade da reação k dada em $\text{mol.litro}^{-1}.\text{min}^{-1}$. C_{E0} é a atividade enzimática no reator por volume de reator dado em UI.litro^{-1} . 1 UI (unidade internacional) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa $1\mu\text{mol}$ de penicilina G por minuto em pH 8 e a 37°C .

Seguindo o MS2, a razão entre as velocidades de síntese e hidrólise, S/H, inicial (Equação 8) também depende apenas da concentração do 6-APA se mantidos pH e temperatura constantes.

$$\left(\frac{S}{H}\right)_{inicial} = \left(\frac{v_S}{v_{AB} - v_S}\right)_{inicial} = \frac{T_{\max} C_{NH}}{K_{EN} + (1 - T_{\max}) \cdot C_{NH}} \quad (8)$$

Vale a pena notar que se a razão entre as velocidades S/H obtidas para ambos os modelos (equações 6 e 8) for substituída na Equação 4, a razão entre as constantes aparentes de desacilação, $(k_H/k_S)_{ap}$, utilizando ambos os modelos, dependerão linearmente da concentração de 6-APA. Isso está de acordo com os dados experimentais obtidos por Kasche *et al.*, 1984, Kasche, 1986, e Gonçalves *et al.*, 2002 (até 100 mM)

2.7 Procedimento: simulações e ensaios experimentais

Para elucidar alguns dos aspectos mecanísticos e verificar o papel do derivado do doador acil (EMFG) na razão S/H inicial foram realizados ensaios de velocidades iniciais de SCC de ampicilina para um grande intervalo de concentrações de reagentes. Primeiramente, contudo, fez-se uma análise teórica para verificar se os resultados a serem obtidos poderiam ser camuflados por problemas difusivos em biocatalisador de enzima imobilizada. Outro cuidado tomado foi a utilização de um reator em paralelo rodando em ensaios em branco (sem enzima). Utilizou-se deste procedimento para verificar se a hidrólise

inespecífica do EMFG (hidrólise na presença de água havendo ou não a enzima como catalisador), não tendo relação mecanística, poderia afetar os resultados e conclusões obtidos.

2.7.1 Simulação da influência da difusão intra-biocatalisador na razão S/H.

Devido ao alto custo da enzima purificada, é sempre conveniente utilizar enzimas imobilizadas ao invés de solúveis em reações enzimáticas. Assim, não há grande perda de biocatalisador. Por isso, biocatalisadores de PGA imobilizada em gel de agarose com baixa carga enzimática vem sendo utilizado em diversos ensaios cinéticos. Segundo Ferreira *et al.*, 1999, efeitos difusivos no interior de partículas de PGA imobilizada em gel de agarose com carga de até 30UI/g são desprezíveis. Assim, é válido admitir que o reator se comporta como se todo o catalisador estivesse homogeneamente distribuído em seu interior. A utilização desta hipótese de reator pseudo-homogêneo, contudo, deve ser verificada para que não se incorra em erros de análise do ensaio de seletividade em questão. Tal verificação se deu a partir de simulações teóricas.

Modelo cinético

O modelo cinético utilizado para a simulação foi semelhante ao MS2 diferenciando-se apenas pela ausência de inibição por FG. Os parâmetros foram ajustados por Ferreira *et al.*, 2000, para a síntese enzimática de ampicilina a pH 6,5 e 25°C. As equações para a velocidade de formação do complexo acil-enzima (desaparecimento de éster, R_{EA}), síntese de ampicilina (R_S) e hidrólise do antibiótico (Hidrólise 2, Figura 4, R_{H2}) são:

$$\begin{aligned}
R_{EA} &= \frac{k_{cat1} C_{AB}}{K_{m1} \left(1 + \frac{C_{AN}}{k_{AN}} \right) + C_{AB}} \\
R_S &= \frac{k_{cat1} C_{AB}}{K_{m1} \left(1 + \frac{C_{AN}}{k_{AN}} \right) + C_{AB}} T_{max} X \\
R_{H2} &= \frac{k_{cat2} C_{AN}}{K_{m2} \left(1 + \frac{C_{AB}}{k_{AB}} \right) + C_{AN}}
\end{aligned} \tag{9}$$

onde $X = \frac{C_{NH}}{K_{EN} + C_{NH}}$ descreve a saturação da enzima pelo 6-APA. R_k é a velocidade da reação k dada em $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{UI}^{-1}$. As unidades das velocidades de reação na Equação 9 diferem das unidades utilizadas na Equação 7 pois, por conveniência, foram divididas pela concentração enzimática. Embora o modelo acima seja diferente do MS2, a razão S/H continua idêntica ao obtido para aquele modelo (Equação 8).

Modelo reativo-difusivo

O modelo reativo-difusivo se baseia no utilizado por Gonçalves *et al.*, 1997. Considera-se aqui um reator isotérmico, operado em batelada e perfeitamente agitado. A resistência ao transporte de massa externamente ao catalisador é desprezada. Supõe-se ainda, que a enzima esteja uniformemente imobilizada nos poros do gel.

A resolução do modelo possibilita conhecer a concentração dos componentes em função do raio do biocatalisador e no seio do reator, assim como, seu perfil ao longo do tempo. A Equação 10 descreve o balanço de massa do componente i na superfície externa do biocatalisador esférico e sua condição inicial.

$$\left. \frac{\partial C_{iS}}{\partial t} = \frac{\partial C_i}{\partial t} \right|_{\xi=1} = - \frac{3}{R_p^2} \frac{(1-\varepsilon_r)}{\varepsilon_r} \varepsilon_g D_{ei} \left. \frac{\partial C_i}{\partial \xi} \right|_{\xi=1} \quad t=0, \quad C_i(t) = C_{i0} \tag{10}$$

onde C_i é a concentração do componente i (função do raio adimensional e do tempo), C_{iS} é a concentração do componente i na superfície do biocatalisador, C_{i0} é concentração inicial do componente i , R_p é o raio das partículas, ε_r é a porosidade do reator, ε_g é a porosidade do gel, De_i é a difusividade efetivada do componente i e ξ é o raio adimensional (r/R_p). Com a resistência difusiva do filme externo à partícula desprezada, a concentração de um componente no seio do reator é admitida igual à concentração na superfície do biocatalisador (C_{iS}). Esta hipótese foi verificada ser plausível para o biocatalisador em questão, em um reator bem agitado (Ferreira *et al.*, 1999).

A Equação 11 representa o balanço de massa do componente i no interior do gel e condições de contorno. Supõe-se que a difusão nos poros do biocatalisador é satisfatoriamente representada pela lei de Fick, utilizando efetividades efetivas constantes para cada componente.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \frac{1}{R_p^2} \frac{D_{e_i}}{\xi^2} \frac{\partial}{\partial \xi} \left(\xi^2 \frac{\partial C_i}{\partial \xi} \right) + \frac{v_i At_{cat}}{\varepsilon_g} \quad (11)$$

$$C.C. \begin{cases} t = 0 & C_i(t) = 0 \\ \xi = 0 & \left. \frac{\partial C_i}{\partial \xi} \right|_{\xi=0} = 0 \\ \xi = 1 & C_i(\xi) = C_{iS} \end{cases}$$

At_{cat} é a atividade do biocatalisador em UI.(litro gel)⁻¹. v_i é a velocidade de reação do componente i dada a seguir: velocidade de reação do EMFG (v_{AB}), da ampicilina (v_{AN}), do 6-APA (v_{NH}) e da FG (v_{AOH}).

$$\begin{aligned} v_{AB} &= -R_{EA} \\ v_{NH} &= R_{H2} - R_S \\ v_{AN} &= -v_{NH} \\ v_{AOH} &= -v_{AB} - v_{AN} \end{aligned} \quad (12)$$

Os valores utilizados na simulação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Valores de constantes utilizados na simulação de síntese enzimática de ampicilina. Constantes cinéticas ajustadas a pH 6,5 e 25°C por Ferreira *et al.*, 2000. Constantes de difusão molecular em água obtidas por Ferreira *et al.*, 1999.

$R_p = 0.02 \text{ cm}$	$\varepsilon_g = 0,919$
$k_{cat1} = 0,75 \text{ mM/min}$	$k_{cat2} = 0,14 \text{ mM/min}$
$K_{m1} = 155,4 \text{ mM}$	$K_{m2} = 11,47 \text{ mM}$
$k_{AN} = 0,68 \text{ mM}$	$k_{AB} = 16,18 \text{ mM}$
$K_{EN} = 30,75 \text{ mM}$	$T_{max} = 1,0$
<i>Componente</i>	$D \times (s/cm^2)$
<i>EMFG</i>	$6,5 \times 10^{-6}$
<i>Ampicilina</i>	$4,3 \times 10^{-6}$
<i>6-APA</i>	$6,2 \times 10^{-6}$

Devido à baixa carga enzimática no biocatalisador e a alta porosidade do gel, a difusividade efetiva foi aproximada pelo coeficiente de difusão molecular de cada componente em água, Tabela 4. Esta hipótese embora superestime a difusão nos poros, se baseia na redução da difusividade efetiva numa interação molécula-poro e pode ser estimada pela equação abaixo (Spiess *et al.*, 1999):

$$D_e \varepsilon_g = D_{eff} = \frac{\varepsilon_g}{\tau} \left(1 - \frac{r_{molécula}}{r_{poro}} \right)^4 D \quad (13)$$

Na equação acima, τ é a tortuosidade, D o coeficiente de difusão molecular, D_{eff} é a difusividade efetiva definida pelo autor e D_e a difusividade efetiva definida neste trabalho. A hipótese que se assume aqui é que o raio da molécula é muito menor que o do poro e a tortuosidade tende à unidade. Por conseguinte, D_e se aproxima de D . Esta hipótese é razoável para a matriz em questão por possuir poros com valores altos de raio médio.

Resolução do sistema de equações diferenciais parciais

O sistema de equações diferenciais parciais (10 e 11) foi resolvido por método das linhas (Pinto e Lage, 2001) implementando em FORTRAN. As equações foram discretizadas em relação à ξ por diferenças finitas e integradas no tempo como um problema de valor inicial (PVI) utilizando o algoritmo de Runge-Kutta-Gill de 4ª e 5ª ordem com passo variado (Press *et al.*, 2002). Utilizou-se 41 pontos de discretização. A variação do erro máximo da razão S/H (41 pontos) foi de -10^{-5} por ponto adicionado o que foi considerado ter suficiente precisão para a análise.

2.7.2 Procedimento experimental

Síntese de Ampicilina

Ensaio em batelada foram realizados a 25°C e pH 6,5 em reator encamisado de 20 ml e agitado por meio de agitador magnético. Foram usados de 0,1 a 1,0 ml de solução em estoque de enzima (em forma solúvel) cuja atividade era de 630 UI/ml. Todos os reagentes se apresentavam solubilizados no reator. O tempo de ensaio e a concentração de enzima no reator foram ajustados de tal forma que a hipótese de velocidade inicial fosse válida (curvas de concentração *versus* tempo tinham comportamento linear). Amostras foram coletadas a cada 3 minutos e diluídas em fase móvel (pH 3,5), cessando a reação. Um reator rodando em paralelo, em ensaios em branco (sem enzima) com 2 ml da solução inicial de reagentes foi utilizado para avaliar a hidrólise inespecífica do EMFG. Esta é uma reação paralela, não relacionada ao mecanismo enzimático, cuja velocidade foi subtraída da velocidade “total” de hidrólise obtida nos ensaios enzimáticos.

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. Éster metílico de R-(-)-fenilglicina, EMFG (Aldrich), 6-APA (Winlab), ampicilina (Winlab), R-(-)-fenilglicina, FG

(Aldrich). Solução estoque de enzima, penicilina G acilase de *Escherichia coli* recombinante (EC 3.5.1.11), doada por Antibióticos S/A (Espanha).

Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática da solução de enzimas foi determinada pelo método colorimétrico PDAB (para-dimetil-amino-benzaldeído) (Balasingham *et al.*, 1972). A atividade enzimática é medida em UI (unidade internacional), onde 1 UI é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de penicilina G por minuto em pH 8 a 37°C.

Quantificação dos analitos de interesse

Concentrações de EMFG, FG, 6-APA e ampicilina foram determinadas usando cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography, HPLC*). A fase móvel utilizada foi desenvolvida por Ferreira, 2004a. Cromatógrafo Waters: coluna Nova-Pk C18 60 Å, 4 μ m, 3.9×150 mm, 1,0 ml/min de fase móvel contendo 35% de acetonitrila, 2% de SDS, tampão fosfato 15 mM, pH 3, 25°C. Análise por espectrofotometria UV em $\lambda = 225$ nm.

2.8 Discussão dos resultados obtidos

2.8.1 Simulação da influência da difusão intra-biocatalisador na razão S/H.

Resultados obtidos na simulação das velocidades iniciais utilizando concentração de 50 mM de 6-APA (Figura 12) mostram que a razão entre as velocidades iniciais de síntese e hidrólise (S/H) decresce mesmo que, a partir das equações cinéticas usadas, ela deva ser constante com a variação da concentração do EMFG cujo valor, para 50 mM de 6-APA, seria de 1,63 (Equação 8). Embora a queda teórica da S/H em relação ao EMFG seja inferior a 10%, o desvio sistemático nas velocidades aparentes de reação

utilizando enzimas imobilizadas pode acarretar em uma má interpretação dos resultados da razão S/H.

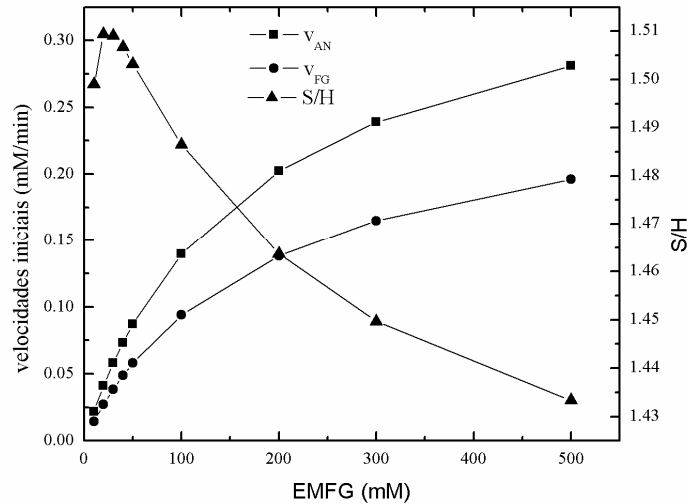


Figura 12 Simulação das velocidades iniciais para síntese de ampicilina utilizando biocatalisador de PGA imobilizada em gel de agarose. Concentração de 6-APA (C_{NH}) de 50mM. v_{AN} = velocidade de síntese, v_{FG} = velocidade de hidrólise e S/H = seletividade. Símbolos indicam locais onde as velocidades foram calculadas e linhas, sua interpolação linear.

É importante notar que um pequeno erro na velocidade de hidrólise (denominador de S/H) pode acarretar num grande desvio na razão S/H. Observe que resultados consideravelmente diferentes podem ser encontrados no cálculo teórico apenas modificando as considerações iniciais do modelo. Ao alterar a condição inicial do balanço de massa no interior do catalisador (Equação 11) pela condição abaixo:

$$t = 0 \quad C_i(t) = C_{i0} \quad (14)$$

Com a modificação da condição inicial, o resultado da razão S/H é acrescido em aproximadamente 5%, Figura 13. A pequena variação nas velocidades iniciais é o suficiente para alterar substancialmente a razão entre elas e por isso dados experimentais dessa natureza tendem a ter altos desvios padrões.

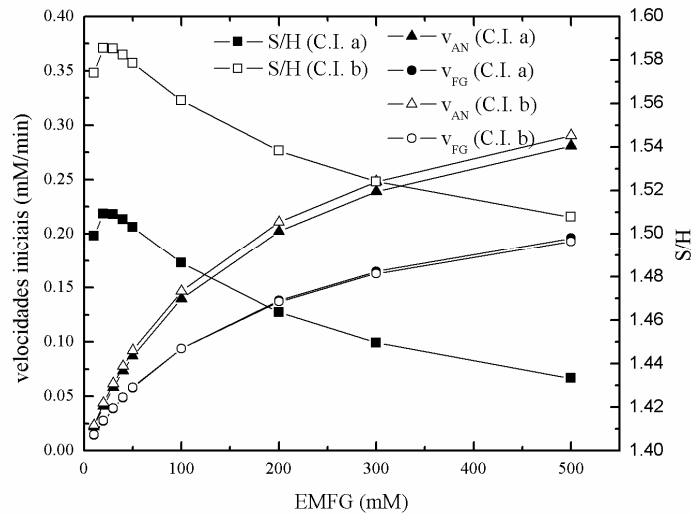


Figura 13 Simulação das velocidades iniciais para síntese de ampicilina assumindo biocatalisador de PGA imobilizada em gel de agarose. $C_{NH} = 50\text{mM}$. Condições iniciais, C.I. a = Equação 11, C.I. b = Equação 14. v_{AN} = velocidade de síntese, v_{FG} = velocidade de hidrólise e S/H = seletividade. Símbolos indicam locais onde as velocidades foram calculadas e linhas, sua interpolação linear.

A Figura 14 mostra o resultado da simulação do fator de efetividade, η , em função do tempo de reação para três concentrações iniciais de EMFG, 10 mM, 50 mM e 500 mM. Mostra, também, o η calculado para uma concentração de EMFG de 50mM utilizando a condição inicial b (Equação 14). O fator de efetividade, η , é definido como a razão entre a velocidade real da reação global e a velocidade de reação que resultaria se todo o catalisador fosse exposto à concentração da superfície externa, C_{iS} . Observa-se que, a partir do modelo utilizado, η teria valor muito próximo à unidade logo nos primeiros minutos de reação para ambas as condições iniciais propostas. Isto indica que, segundo o modelo, a síntese enzimática de ampicilina, utilizando este tipo de biocatalisador, não possui apreciável resistência ao transporte de massa interna à partícula. Portanto, o efeito difusivo pode ser desprezado na predição do perfil de concentrações em função do tempo na síntese enzimática de ampicilina o que está de acordo com Ferreira *et al.*, 1999. No entanto, a utilização de enzima imobilizada em experimentos para predição da influência do EMFG na razão S/H pode ser mal interpretada devido a esses efeitos difusivos, que, apesar de serem pequenos,

podem afetar a razão entre as velocidades de reação. Por esta razão optou-se em utilizar enzima livre para os ensaios de seletividade.

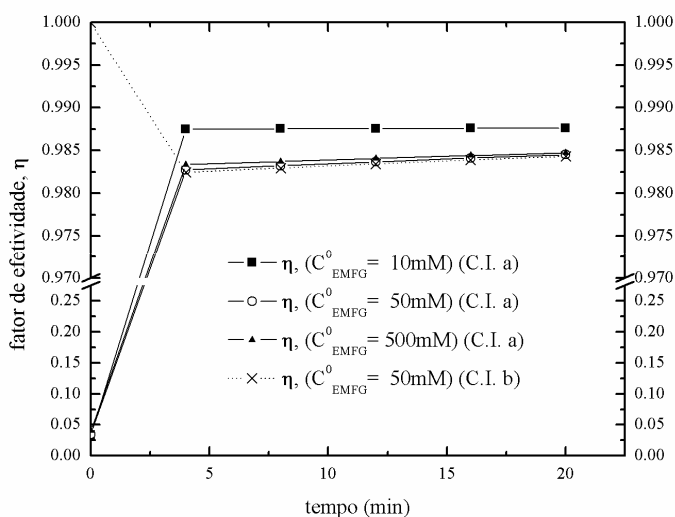


Figura 14 Simulação do fator de efetividade no início da síntese de ampicilina assumindo biocatalisador de PGA imobilizada em gel de agarose. $C_{NH} = 50\text{mM}$. Condições iniciais, C.I. a = Equação 11, C.I. b = Equação 14. v_{AN} = velocidade de síntese, v_{FG} = velocidade de hidrólise e S/H = seletividade. Símbolos indicam locais onde as velocidades foram calculadas e linhas, sua interpolação linear.

2.8.2 Ensaios de velocidades iniciais

Hidrólise inespecífica do EMFG

A hidrólise inespecífica do éster metílico de fenilglicina, embora pequena, deve ser considerada para uma precisa avaliação das razões entre as velocidades de síntese e hidrólise, S/H. Como discutido anteriormente, uma pequena diferença nas velocidades de reação pode acarretar grandes diferenças no resultado de S/H. A Figura 15 mostra o resultado de ensaios em branco, isto é, na ausência de enzimas, a 25°C e pH 6,5 para diversas concentrações de 6-APA. Como não foi observada nenhuma correlação entre a hidrólise inespecífica e a concentração de 6-APA (dentro do intervalo do erro experimental), um mesmo modelo empírico para a velocidade inespecífica foi ajustado para os dados obtidos. O modelo ajustado abaixo em função da concentração do EMFG (em mM) é dado em $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$

$$v_{inosp} = 3,9 \times 10^{-4} C_{AB} - 1,33 \times 10^{-6} C_{AB}^2 + 3,3 \times 10^{-9} C_{AB}^3 \quad (15)$$

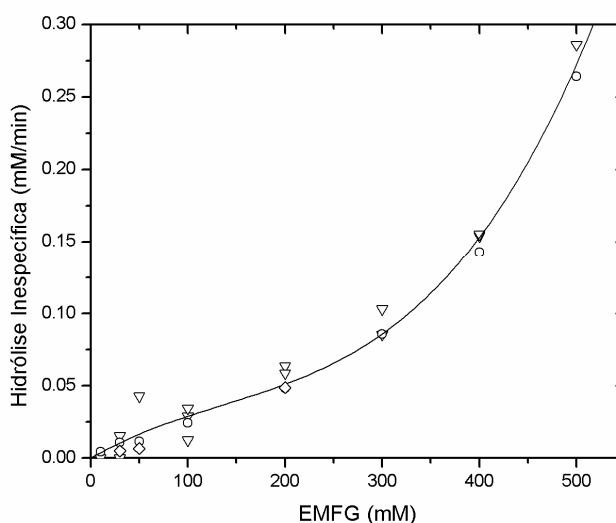


Figura 15 Variação da velocidade inicial de hidrólise inespecífica de EMFG em função de sua concentração, 25°C, pH 6,5. Concentrações de 6-APA: 25 mM (○), 100 mM (▽) e 200 mM (◇). (—) Equação 15.

A “hidrólise enzimática” de EMFG foi calculada a partir deste ponto como a velocidade de hidrólise “total” (medida) obtida nos ensaios enzimáticos menos a velocidade inespecífica, predita pela correlação da Equação 15.

Avaliação da Seletividade

Experimentos cinéticos de velocidades iniciais foram realizados para verificar a tendência da seletividade, S/H, em um grande intervalo de concentrações de substratos. Figuras 16, 17 e 18 mostram a variação da velocidade de produção de ampicilina, v_{AN} , em função da concentração do núcleo, e da concentração de FG, v_{AOH} , em função das concentrações de 6-APA e éster, respectivamente. O efeito inibitório do 6-APA é evidente tanto na síntese do antibiótico quanto na hidrólise do éster. Ambas as reações decrescem com o aumento da concentração de 6-APA. Contudo, como v_{AOH} decresce mais rapidamente que v_{AN} , a seletividade decresce com C_{NH} (vide Figura 19). Estes resultados estão de acordo com resultados experimentais presentes na literatura (Ospina *et al.*, 1996a, Kasche *et al.*, 1984, Gonçalves *et al.*, 2002).

Gonçalves *et al.*, 2002, estudando a síntese de amoxicilina, apresentaram resultados mostrando um efeito de ativação e inibição do 6-APA na velocidade enzimática global ($v_{AN} + v_{FG}$, ou velocidade de formação do complexo acil-enzima). Os autores mostram que, com baixas concentrações de 6-APA (até 10 mM), a velocidade global aumenta (efeito de ativação) quando comparada com a velocidade global na ausência de 6-APA, i.e., na hidrólise do éster na ausência de 6-APA. Quando a concentração de 6-APA aumenta, seu efeito inibitório é evidenciado em de acordo com os resultados aqui obtidos.

Os gráficos das figuras 16 e 17 não apresentam dados na ausência de 6-APA e, portanto, não é possível evidenciar o comportamento descrito por Gonçalves *et al.*, 2002, para concentrações de 6-APA abaixo de 10 mM. Embora se saiba que a velocidade de síntese de ampicilina seja nula na ausência do núcleo, não se tem a variação da velocidade de hidrólise na ausência do 6-APA para verificar a velocidade global.

A partir da Figura 18, observa-se que com o aumento na concentração de 6-APA (a partir de 100 mM), a hidrólise enzimática do EMFG, tende a zero. Este não é o comportamento apresentado na literatura. Kasche *et al.*, 1984, apresentaram dados experimentais no qual a velocidade de hidrólise não tende a zero quando a concentração do 6-APA foi aumentada (pelo menos até 100mM e usando apenas uma concentração de EMFG, 10mM). Baseados nesta evidência, os autores concluíram que o complexo acil-enzima-núcleo poderia sofrer um ataque nucleofílico da água (reação 8 da Figura 8). É importante enfatizar, no entanto, que os autores não levaram em conta a hidrólise inespecífica do éster, o que reduziria a velocidade de hidrólise enzimática real. O efeito observado do 6-APA na hidrólise enzimática de EMFG demonstra um comportamento de inibição como descrito para a amoxicilina por Gonçalves *et al.*, 2002. Isto é uma forte indicação de que o complexo acil-enzima-núcleo não pode ser atacado pela água, isto é, a reação 8 parece não ocorrer.

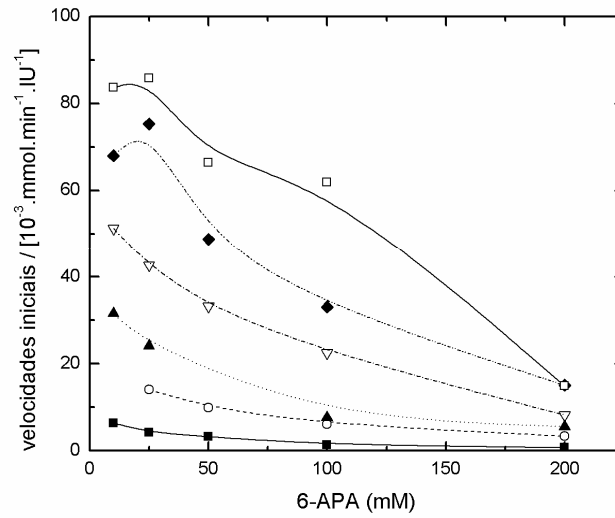


Figura 16 Variação da velocidade inicial de formação de ampicilina (dividida pela carga enzimática E_0). Concentrações de EMFG: 10 mM (■), 30 mM (○), 50 mM (▲), 100 mM (▽), 200 mM (◆) e 400 mM (□). 25°C e pH 6,5.

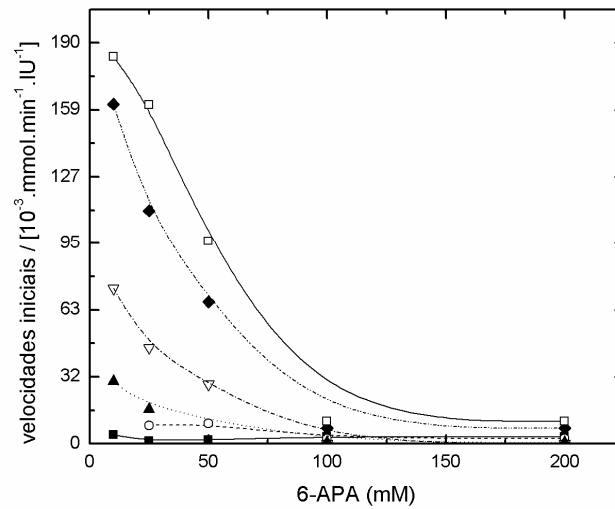


Figura 17 Variação da velocidade inicial de formação de fenilglicina (dividida pela carga enzimática E_0). Concentrações de EMFG: 10 mM (■), 30 mM (○), 50 mM (▲), 100 mM (▽), 200 mM (◆) e 400 mM (□). 25°C e pH 6,5.

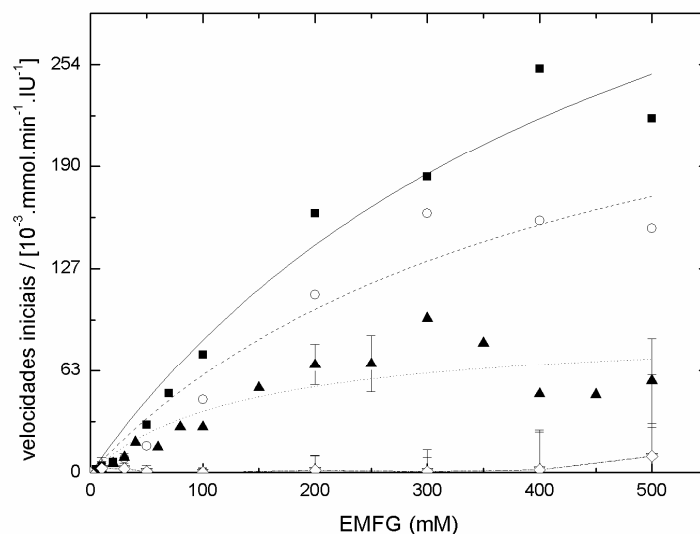


Figura 18 Variação da velocidade inicial (enzimática) de formação de fenilglicina (dividida pela carga enzimática E_0). Concentrações de 6-APA: 10 mM (■), 25 mM (○), 50 mM (▲), 100 mM (▽) e 200 mM (◇). 25°C e pH 6.5. Barras de erro: desvio padrão estimado por triplicatas.

A Figura 19 mostra uma queda na razão S/H com o aumento na concentração de éster. Este comportamento (em desacordo com Youshko e Svedas, 2000b) ainda não foi apresentado na literatura e indica que a formação do complexo acil-enzima pode ocorrer com o núcleo já adsorvido à enzima. Apenas duas concentrações de 6-APA estão demonstradas na Figura 19 (10 e 25mM). Como a velocidade de hidrólise enzimática tende a zero com o aumento na concentração do núcleo, a razão S/H tende a infinito, dispersando demasiadamente os pontos no gráfico.

Youshko *et al.*, 2003, estudando a ligação do núcleo ao centro ativo da PGA, testaram vários modelos e compararam com dados experimentais (obtidos para concentração de 6-APA até 60 mM). Segundo os autores, embora um modelo completo como o da Figura 8 possa ajustar-se aos dados experimentais, um modelo mais simples também poderia. O modelo que melhor representou seus dados foi assumindo que o 6-APA agiria como inibidor não-competitivo na formação do complexo acil-enzima. Isto é, reações N^o 5 e 6 não são levadas em consideração. Nossos dados, ao contrário, não poderiam ser explicados por um

modelo tão simples. Uma dependência da S/H em função da concentração do EMFG, apenas aparece quando as reações 5 e 6 da Figura 8 são levadas em consideração. Isto é, k_5 , k_{-5} e k_6 não podem ser desprezados. Simplificações do mecanismo global assumindo inibição não-competitiva do 6-APA na formação do complexo acil-enzima ($k_6 = 0$), ou inibição competitiva do 6-APA na ligação do EMFG à enzima ($k_5 = k_{-5} = 0$), todas apresentariam a razão S/H independente da concentração do EMFG.

Utilizando todos os passos do mecanismo da Figura 8, obtém-se a seguinte equação para a razão entre as velocidade iniciais de síntese e hidrólise (S/H)

$$(S/H)_{C_{AN}=0} = \frac{C_{NH} (P_1 + P_2 C_{AB} + P_3 C_{NH} + P_4 C_{AB} C_{NH} + P_5 C_{NH}^2)}{P_6 + P_7 C_{AB} + P_8 C_{NH} + P_9 C_{NH}^2 + P_{10} C_{NH}^3 + P_{11} C_{AB} C_{NH} + P_{12} C_{NH}^2 C_{AB}} \quad (16)$$

onde P_i ($i = 1, 2, \dots, 12$) são agrupamentos de constantes cinéticas.

Para se chegar à Equação 16, foi empregada a abordagem de estado estacionário de Briggs-Haldane (Schulz, 1994). Portanto, nenhum passo intermediário foi assumido estar em equilíbrio. Embora todo o mecanismo tenha sido utilizado, a omissão das reações 8 e 4 não alterariam o resultado dessa equação.

Ajustar todos os parâmetros de uma equação complexa como a Equação 16 seria um problema quase intratável e está fora de nosso escopo. Contudo, pode-se apresentar uma estrutura mínima do mecanismo cinético que recaia em uma equação de velocidade consistente com os dados experimentais obtidos. Um ajuste ilustrativo do modelo completo (baseado na Figura 8) da razão entre as constantes aparentes de desacilação, $(k_H/k_S)_{ap}$, Equação 4, em relação à concentração do éster, está demonstrado na Figura 20. Os parâmetros se mostraram altamente correlacionados, como esperado, e seus valores não serão apresentados, mas o ponto importante é que apenas um modelo “completo” poderia explicar qualitativamente nossas observações (Ribeiro *et al.*, 2005a).

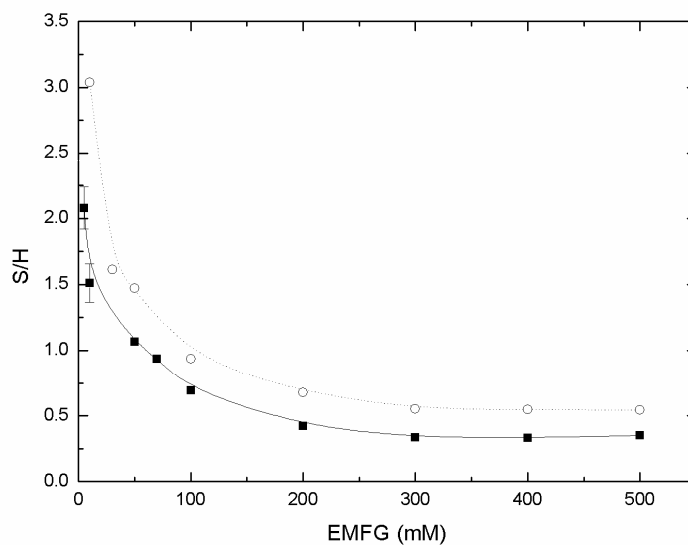


Figura 19 Razão entre as velocidade iniciais de síntese e hidrólise em função da concentração de éster. Concentração de 6-APA: 10 mM (■) e 25 mM (○). Síntese enzimática de ampicilina a 25°C e pH 6,5. Barras de erro: d.p. estimado de triplicatas.

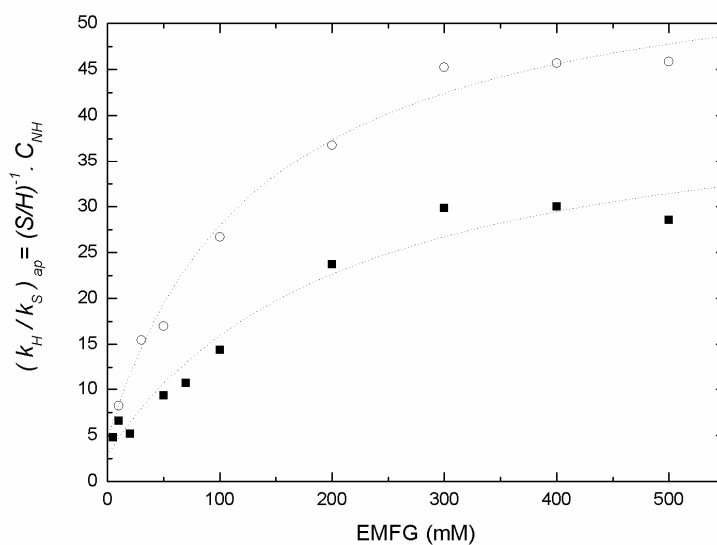


Figura 20 Razão entre as constantes de velocidades aparentes de desacilação, $(k_H/k_S)_{ap} = (H/S) \cdot C_{NH}$, em função da concentração de EMFG. Concentrações de 6-APA: 10 mM (■) e 25 mM (○). pH 6.5 e 25°C. Ajuste ilustrativo da Equação 4 (....).

Nota-se que a hipótese de que o complexo acil-enzima deva se formar antes da ligação do núcleo β -lactâmico à enzima na síntese do antibiótico não explica os dados experimentais obtidos. De fato, qualquer mecanismo ao qual não sejam incorporados os

passos 5 e 6 da Figura 8 apresentará ambas as razões, S/H e $(k_H/k_S)_{ap}$, independentes da concentração do derivado do doador acil (EMFG).

Por fim, algumas hipóteses podem ser feitas sobre o mecanismo de reação.

- 1) A ligação do 6-APA à enzima livre é possível (conforme resultados cinéticos obtidos neste trabalho e por outros autores, Youshko e Svedas, 2000b, Youshko *et al.*, 2003, Gonçalves *et al.*, 2002), embora não haja dados cristalográficos comprovando tal fato. Isto implica em uma movimentação dos resíduos Arg α 145 e Phe α 146 mesmo na ausência de ligantes de derivados do ácido fenilacético.
- 2) A formação do complexo enzima-núcleo a partir do movimento dos resíduos Arg α 145 e Phe α 146 não altera o centro catalítico da enzima. Não impede completamente a entrada de certos ligantes como o derivado do doador acil (EMFG) embora dificulte estericamente sua passagem ao centro ativo, diminuindo assim as velocidades de reação. Entretanto, pode impedir a entrada de ligantes maiores tais como o antibiótico recém formado, explicando o fato do 6-APA ser um inibidor competitivo na hidrólise do antibiótico como verificado por Gonçalves *et al.*, 2003.
- 3) O complexo acil-enzima-núcleo não pode ser hidrolisado. Isso pode indicar que a molécula de água, a qual provoca o ataque nucleofílico ao complexo acil-enzima, se ligue ao mesmo resíduo que o 6-APA. Ou seja, o ataque pode ser feito por uma das moléculas de água que, por pontes de hidrogênio, se liga à Arg α 145 e ao grupo carboxílico carregado do anel tiazolidina do núcleo β -lactâmico (vide Figura 7).

Por fim, esses resultados mostram que altas concentrações de 6-APA e baixas de EMFG aumentam a seletividade da enzima em direção à síntese. Esta informação é muito útil na definição de uma estratégia de início de operação (*start-up*) em um reator tipo batelada-alimentada. Entretanto, altas concentrações de 6-APA também inibem a velocidade

de síntese de antibiótico. Portanto, a concentração ótima de substratos no início do reator virá de um compromisso entre seletividade e produtividade.

3 Influência da difusão intra-catalisador no perfil de pH

O pH é um dos fatores de maior influência na síntese cineticamente controlada de penicilinas semi-sintéticas. O pH tem efeito sobre a dissociação dos reagentes e produtos, assim como sobre sua solubilidade. Exerce efeito, ainda, sobre o estado de ionização do sítio ativo da enzima, o que afeta sua atividade catalítica (vide seção 1.4.1).

Devido à diferença entre as constantes de dissociação de reagentes e produtos, bases e ácidos são gerados e consumidos no decorrer da reação de síntese de penicilinas semi-sintéticas. Em biocatálise heterogênea isto pode levar a um gradiente de pH devido aos fenômenos de reação e difusão dos reagentes e produtos dentro do biocatalisador. Como a cinética e o rendimento da reação dependem fortemente do pH, a difusão pode ter grande influência na síntese enzimática.

Spiess *et al.*, 1999, estudaram o efeito reativo-difusivo na hidrólise de penicilina G utilizando enzima imobilizada (EupergitC, EupergitC205L, com raio médio de 80 μm) e verificaram experimentalmente a formação de um gradiente de pH no interior do biocatalisador. Resultados obtidos pelos autores indicam uma queda média no pH de 1 a 2,5 pontos no interior do biocatalisador. Uma queda desta grandeza nas sínteses de penicilinas semi-sintéticas, que ocorre em pH mais baixo ($\sim 6,5$), poderia reduzir a atividade enzimática a zero, tornando as velocidades de reação difíceis de prever no interior do biocatalisador.

3.1 Modelos para cálculo do pH

3.1.1 Dissociação dos componentes da síntese enzimática de ampicilina

Como mencionado na seção 1.4.1, substratos e produtos envolvidos na síntese enzimática cineticamente controlada de ampicilina contêm pelo menos um hidrogênio dissociável. Fenilglicina, 6-APA e ampicilina têm grupos amino e carboxílico e assim, se apresentam em soluções aquosas como íons positivos (cátions), negativos (ânions) ou como íons com ambas as cargas (*zwitterion*), dependendo basicamente do pH, como mostra a Figura 21. EMFG tem um grupo amino apenas e pode estar presente na forma carregada positivamente ou na forma neutra. Como as reações de dissociação são muito rápidas, é possível considerar as várias espécies carregadas em equilíbrio. Neste caso, para as espécies que contêm grupos amino e ácido carboxílico, o equilíbrio pode ser expresso pela Equação 2, reescrita abaixo em termos de fração molar e coeficientes de atividade:

$$\begin{aligned}
 Ka_1 &= a_{H^+} \frac{x_{\pm}}{x_{+}} \cdot \frac{\gamma_{\pm}}{\gamma_{+}} \\
 Ka_2 &= a_{H^+} \frac{x_{-}}{x_{\pm}} \cdot \frac{\gamma_{-}}{\gamma_{\pm}}
 \end{aligned}
 \tag{17}$$

onde a_{H^+} é a atividade hidrogeniônica, x_{+} denota a fração molar da espécie química carregada positivamente em solução, e γ_{+} , seu coeficiente de atividade, e assim por diante.

O balanço de massa para um componente i em relação a suas espécies carregadas é:

$$x_i = x_{i\pm} + x_{i+} + x_{i-}
 \tag{18}$$

onde x_i é a fração molar de i em solução. Observe que $x_i = N_i/N_T$, onde N_i é o número de moles de i e N_T , o número de moles total presente em solução ($\sum N_i$). As Equações 17 e 18 podem também ser escritas em termos de concentração molar:

$$Ka_{1,i} = a_{H^+} \frac{C_{i\pm}}{C_{i+}} \cdot \frac{\gamma_{i\pm}}{\gamma_{i+}} \quad (19)$$

$$Ka_{2,i} = a_{H^+} \frac{C_{i-}}{C_{i\pm}} \cdot \frac{\gamma_{i-}}{\gamma_{i\pm}}$$

$$C_i = C_{i\pm} + C_{i+} + C_{i-} \quad (20)$$

onde C_i é a concentração do componente i e $C_i = x_i N_T / V$, sendo V o volume da solução.

Manipulando as Equações 19 e 20, a concentração de qualquer espécie carregada de um componente pode ser descrita em termos de pH, $pKa_{1,ap}$ e $pKa_{2,ap}$ e da concentração total do componente i em solução, C_i :

$$\begin{aligned} C_{i+} &= \frac{1}{10^{(2.pH - pK_{1,ap}^{(i)} - pK_{2,ap}^{(i)})} + 10^{(pH - pK_{1,ap}^{(i)})} + 1} C_i \\ C_{i-} &= \frac{10^{(2.pH - pK_{1,ap}^{(i)} - pK_{2,ap}^{(i)})}}{10^{(2.pH - pK_{1,ap}^{(i)} - pK_{2,ap}^{(i)})} + 10^{(pH - pK_{1,ap}^{(i)})} + 1} C_i \\ C_{i\pm} &= \frac{10^{(pH - pK_{1,ap}^{(i)})}}{10^{(2.pH - pK_{1,ap}^{(i)} - pK_{2,ap}^{(i)})} + 10^{(pH - pK_{1,ap}^{(i)})} + 1} C_i \end{aligned} \quad (21)$$

onde

$$\begin{aligned} pH &= -\log(a_{H^+}) \\ pKa_{1,ap}^{(i)} &= -\log\left(Ka_1^{(i)} \frac{\gamma_{+}}{\gamma_{\pm}}\right) \\ pKa_{2,ap}^{(i)} &= -\log\left(Ka_2^{(i)} \frac{\gamma_{\pm}}{\gamma_{-}}\right) \end{aligned} \quad (22)$$

Caso se assuma que a solução se comporta como uma solução ideal, os coeficientes de atividade tenderão à unidade, i.e., $\gamma \rightarrow 1$ e:

$$pKa_{ap} = pKa = -\log(Ka) \quad (23)$$

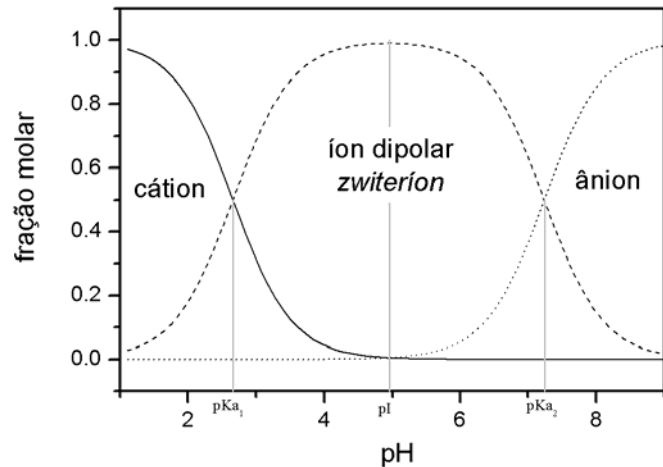


Figura 21 Variação da fração molar das diferentes espécies eletricamente carregadas da ampicilina em solução *versus* pH. Curvas construídas a partir da Equação 21. Valores de $pK_{a,ap}$, a 25°C, retirados da Tabela 2. (—) cátion, (---) íon dipolar, (---) ânion.

3.1.2 Balanço de cargas e o cálculo do pH

O balanço de cargas no reator de síntese enzimática de ampicilina se baseia na neutralidade elétrica de sua solução reacional. A incorporação desta equação no modelo do reator permite calcular o pH a partir das concentrações dos componentes presentes na síntese enzimática de ampicilina, sabendo-se a concentração de contra-íons de bases e ácidos fortes presentes na solução. Sendo o reator de síntese de ampicilina uma solução eletricamente neutra, o balanço de cargas deve ser verificado:

$$\sum_i z_i^+ . c_i^+ - \sum_i z_i^- . c_i^- = 0 \quad (24)$$

onde z_i^+ e z_i^- são os números de cargas por mol, positivamente e negativamente carregadas respectivamente da espécie, positiva ou negativa, do componente i . c_i^+ e c_i^- são as concentrações da espécie i positivamente e negativamente carregadas respectivamente. O cálculo da concentração de cada espécie carregada é feito supondo equilíbrio das reações de dissociação de cada componente como descrito na Seção 3.1.1.

Portanto, o balanço de cargas em um reator de síntese enzimática de ampicilina se torna:

$$\left(\sum_{i=1}^{nc} c_i^+ - \sum_{i=1}^{nc} c_i^- \right) + (c_{Na^+} - c_{Cl^-}) + (c_{H^+} - c_{OH^-}) = 0 \quad (25)$$

onde c_{H^+} é a concentração hidrogeniônica, c_{OH^-} a concentração de hidroxilas na solução reacional e nc é a número de componentes. Na^+ e Cl^- são contra-íons que vêm de bases e ácidos fortes adicionados à solução reacional para mantê-la em pH desejado ou contra-íons que estão inicialmente presentes nos reagentes. Observe-se que, se forem admitidos coeficientes de atividade iguais à unidade:



e,

$$\begin{aligned} pH &= -\log(c_{H^+}) \\ pK_w &= -\log(K_w) \end{aligned} \quad (27)$$

Considerando solução ideal ($\gamma = 1$) e substituindo as Equações 21, 26 e 27 em Equação 25, o balanço de cargas pode ser escrito em função da concentração total do componente i na fase aquosa, do pH e da soma das concentrações de contra-íons:

$$C_{Na^+} - C_{Cl^-} - \alpha_0(pH, pK_w) - \sum_{i=1}^{nc} \alpha_i(pH, pKa_1^{(i)}, pKa_2^{(i)}) \cdot C_i = 0 \quad (28)$$

ou, se considerar $C_{C.I.} = (C_{Na^+} - C_{Cl^-})$,

$$C_{C.I.} = \alpha_0(pH, pK_w) + \sum_{i=1}^{nc} \alpha_i(pH, pKa_1^{(i)}, pKa_2^{(i)}) \cdot C_i \quad (29)$$

α_k ($k = 0, 1, \dots, nc$) são funções de constantes de dissociação e do pH apenas.

Assim, se o pH for dado e as concentrações das espécies i ($i = 1, 2, \dots, nc$) forem conhecidas, a concentração referente à diferença entre cargas de contra-íon, $C_{C.I.}$, também o será, e poderá ser calculada diretamente por meio da Equação 29. Caso se tenha o valor de $C_{C.I.}$ e se queira

calcular o valor do pH, o cálculo não será direto e um algoritmo de resolução de equação algébrica não-linear deve ser utilizado.

Neste trabalho C_{Cl} será denominado, de forma simplificada, de concentração de contra-íons. Em reator de síntese de ampicilina, com o decorrer da reação, a principal variação desta variável com tempo ocorre devido apenas ao íon sódio, ou mais precisamente, à adição de hidróxido de sódio (NaOH) para o controle de pH. Entretanto, em um reator semi-contínuo, contra-íons de bases ou ácidos fortes podem ser introduzidos junto com os reagentes alimentados.

3.2 Ensaio computacionais

Para verificar um possível surgimento de gradiente de pH no decorrer da SCC de ampicilina ao utilizar biocatalisador de PGA imobilizado em matriz sólida, foram realizadas simulações em computador. O estudo baseou-se em dois biocatalisadores de PGA imobilizada em gel de agarose, um contendo baixa carga e outro alta carga de enzimas imobilizadas. A utilização destes dois tipos de catalisador se deve à presença de dados de difusividade efetiva para eles. Para o primeiro, como já proposto anteriormente (vide seção 2.7.1), a difusividade molecular em água pode ser utilizada. Contudo, em reatores industriais, a demanda de biocatalisadores com alta carga enzimática será inevitável a fim de aumentar o espaço útil do reator e a produtividade do processo.

Modelo para o cálculo do perfil de pH intra-partícula na SCC de ampicilina

A predição do perfil de pH em biocatalisador de PGA imobilizada em gel de agarose se deu a partir do perfil calculado de concentrações das diversas espécies presentes na síntese de ampicilina desprezando o efeito do pH na cinética. A partir deste perfil de concentrações, o perfil de pH foi calculado. Essa hipótese foi necessária em virtude de não se

dispor de dados de velocidade de reação a diferentes pHs, para essa enzima. Portanto, os resultados são qualitativos, apenas, mas servem para indicar tendências no comportamento do sistema. O modelo reativo-difusivo do reator e o modelo cinético utilizados foram similares ao utilizado na seção 2.7.1. Para o cálculo do perfil de pH, diversas hipóteses tiveram que ser adotadas visando a facilitar a resolução do problema matemático. Algumas dessas hipóteses seguem as propostas por Spiess *et al.*, 1999, para o cálculo do perfil de pH no interior de biocatalisadores de PGA imobilizada para a hidrólise de penicilina G. As principais simplificações foram:

- difusão dos componentes é descrita utilizando a lei de Fick, desprezando o potencial de difusão devido às cargas iônicas. Isto é, a difusividade efetiva de um componente i é a mesma para qualquer forma carregada que o componente assuma.

$$D_{e,i} = D_{e,i^{\pm}} = D_{e,i^{+}} = D_{e,i^{-}} \quad (30)$$

- assume-se neutralidade local da solução eletrolítica (Equação 29), o balanço de cargas de todos os componentes deve ser igual a zero em toda partícula:

$$C_{C.I.}(\xi, t) = \alpha_0(pH(\xi, t), pK_w) + \sum_{i=1}^{nc} \alpha_i(pH(\xi, t), pK_{a_1}^{(i)}, pK_{a_2}^{(i)}) \cdot C_i(\xi, t) \quad (31)$$

Outra hipótese necessária para o cálculo refere-se à difusividade de íons pequenos. No modelo utilizado, o controle de pH é feito por adição de hidróxido de sódio (NaOH) e se assume que a difusividade efetiva do íon sódio, Na^{+} (ou cloreto, Cl^{-}), é suficientemente alta para que o íon esteja uniformemente distribuído em relação ao raio do biocatalisador.

Os valores de constantes utilizados nos cálculos estão na Tabela 4 (página 61). Outros valores, não presentes nessa tabela, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Valores de constantes utilizados na simulação: coeficiente molecular de difusão em água (D); coeficiente de difusividade efetiva (De) para PGA imobilizada em gel de agarose com alta carga enzimática ($90 \text{ UI/ml}_{\text{gel}}$) (Ferreira *et al.*, 1999); e constantes de dissociação (pKa).

Componente	$D/(s/cm^2)$	$De/(s/cm^2)$	pKa_1	pKa_2
EMFG	$6,5 \times 10^{-6}$	$7,6 \times 10^{-8}$	7,0*	–
Ampicilina	$4,3 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-8}$	2,7**	7,2**
6-APA	$6,2 \times 10^{-6}$	$6,9 \times 10^{-8}$	2,5***	4,9***
FG	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-8}$	2,2*	9,3*

* Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996; ** Hou e Poole, 1969; *** Diender *et al.*, 1998.

Resolução dos perfis de concentração

O sistema de equações diferenciais parciais do modelo reativo-difusivo (Equações 10 e 11) foi resolvido por método das linhas (Pinto e Lage, 2001) implementando em FORTRAN. As equações foram discretizadas em relação a ξ por diferenças finitas e integradas no tempo como um problema de valor inicial (PVI) utilizando o algoritmo de Runge-Kutta-Gill de 4ª e 5ª ordem com passo variado (Press *et al.*, 2002). Com base em testes de precisão numérica, foram escolhidos 41 pontos de discretização quando utilizando dados de biocatalisador com baixa carga enzimática e 61 pontos para biocatalisador com alta carga enzimática.

Resolução do perfil de pH

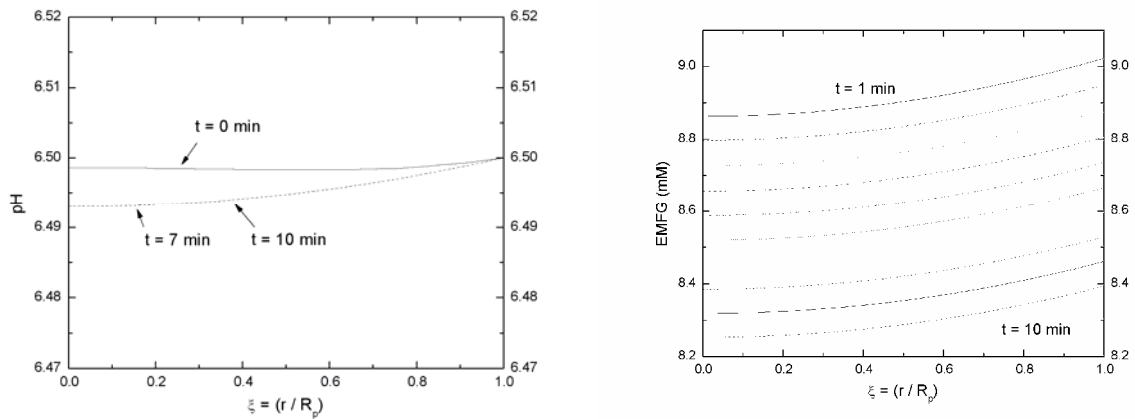
Para calcular a concentração de íons Na^+ no interior dos poros do biocatalisador, assumiu-se um controle ideal de pH no reator. Assim, usando as concentrações dos componentes da síntese calculadas no seio do reator (C_{is}) e resolvendo o balanço de cargas (Equação 31) para o reator, a concentração de base ($C_{C.I.}$) necessária para manter o pH no seio do reator a 6,5 foi calculada. Esta concentração é dada como constante dentro do catalisador (assumindo a difusividade de Na^+ suficientemente alta para se desprezar sua dinâmica de difusão nos poros).

Usando os perfis de concentração obtidos na solução do sistema reativo-difusivo e a concentração de contra-íon ($C_{C.I.}$), é possível calcular a concentração de pH no

interior da partícula resolvendo o balanço de cargas para cada ponto de discretização. Como não é possível isolar o pH para um lado da equação (Equação 31), o algoritmo *zbrent* (Press *et al.*, 2002) foi utilizado como método de resolução da equação não-linear resultante.

3.3 Discussão dos resultados obtidos

Resultados do cálculo do perfil teórico de pH no interior do biocatalisador com baixa carga enzimática (18UI/ml_{gel}) estão apresentados na Figura 22. Concentrações iniciais de 6-APA e EMFG utilizadas foram de 50 e 10 mM, respectivamente. Segundo o gráfico da Figura 22, apenas um pequeno decréscimo (menos que 0,01) do pH é esperado para este biocatalisador. Vale notar que, na Figura 21A, os perfis de pH correspondentes a 7 e 10 minutos são quase coincidentes o que sugere que o perfil não varie muito, mesmo com o passar do tempo de reação. Neste caso, portanto, o perfil de pH pode ser desprezado e seu valor assumido como constante. Assim, um modelo pseudo-homogêneo, onde se admite que a enzima esteja homogeneamente distribuída no reator, pode predizer o sistema reacional com certa precisão. Contudo, para aplicações industriais, um grande volume de biocatalisador seria necessário para aumentar a produtividade. Portanto, um biocatalisador com alta carga enzimática é preferível industrialmente. Além disso, altas concentrações de substratos, próximas ao limite de solubilidade, podem ser necessárias para aumentar rendimentos da síntese cineticamente controlada (Schroen *et al.*, 2002).



A

B

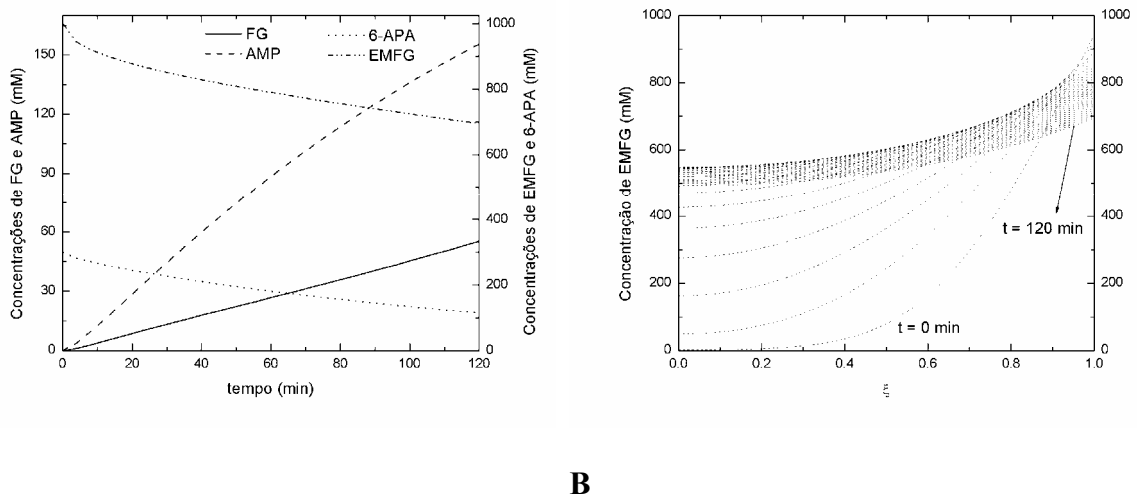
Figura 22 Simulação dos perfis de pH (A) e da concentração de EMFG (B) no interior do biocatalisador com baixa carga enzimática (18 UI/ml_{gel}). $R_p = 2,0 \times 10^{-4}$ m.

Simulação de síntese de ampicilina utilizando biocatalisador com alta carga enzimática (90UI/ml_{gel}) é mostrada na Figura 23. Nesta simulação, concentrações próximas do limites de solubilidade dos substratos foram utilizadas. Os baixos coeficientes de difusão para este biocatalisador geram uma importante mudança no perfil de concentrações dos componentes no interior das partículas, como é mostrado na Figura 23B para o EMFG. Segundo Ferreira *et al.*, 1999, em catalisadores com altas cargas enzimáticas, a resistência ao transporte de massa nos poros é agravada pelo efeito restritivo espacial das próprias moléculas de enzima. Conseqüentemente, as difusividades efetivas dentro de catalisadores com altas cargas são bem menores que as dos catalisadores com baixas cargas enzimáticas (Tabela 5).

Observa-se que o perfil de concentrações do substrato no interior da partícula altera-se bastante durante a reação, diferentemente do comportamento apresentado na Figura 22B. Perfis acentuados de concentração acabam por produzir perfis acentuados de pH, como se verifica na Figura 24A.

Valores baixos de pH (menores que 6) fazem a atividade enzimática – e conseqüentemente, a produtividade – cair drasticamente. Embora o pH aumente com o tempo de reação, ele leva alguns minutos para alcançar regiões de trabalho da enzima (pH entre 6 e 8). Como a cinética usada para o cálculo foi ajustada para um pH constante, a resposta do

modelo não pode ser utilizada como predição quantitativa. Em contraste, a baixa atividade enzimática, a baixos valores de pH, pode fazer com que a difusão seja mais rápida que a reação o que poderia causar uma redução no gradiente teórico de pH obtido. Mesmo assim, os resultados indicam um decréscimo de pH que poderia reduzir consistentemente a atividade enzimática aparente e a estabilidade da enzima. O uso de um tampão com pK_a próximo a 6,5 poderia contornar este problema. Observe que a utilização de 1 mol.litro⁻¹ de um tampão hipotético ($pK_a = 6,5$) reduz consideravelmente a queda de pH no interior da partícula, como pode ser visto na Figura 24. Contudo, a adição de tampão aumentaria ainda mais a força iônica do meio, o que poderia afetar a ainda mais síntese do antibiótico.



A

B

Figura 23 Simulação dos perfis de concentração no seio do reator e o perfil de concentração do EMFG no interior do biocatalisador com alta carga enzimática (90 UI/ml_{gel}). $R_p = 2,0 \times 10^{-4}$ m.

Portanto, verificou-se que biocatalisadores com baixas cargas enzimáticas apresentam, teoricamente, resistência difusiva baixa o que gera perfis pequenos de concentração. Estes perfis por sua vez não são grandes o suficiente para gerar gradientes de pH que afetem significativamente a síntese enzimática de ampicilina. Isto possibilita, para este catalisador, o uso de um modelo de reator pseudo-homogêneo, isto é, um modelo de reator onde toda a carga enzimática esteja distribuída homogêneamente em seu interior. No

caso de se utilizar esta hipótese no modelo um reator onde haja biocatalisador com alta carga enzimática, os resultados obtidos se basearão em cinéticas aparentes. As correspondentes velocidades de reação terão agrupados em seus parâmetros efeitos de transporte de massa, que se refletem em variações de pH intra-partícula, que por sua vez irão alterar as velocidades de reação.

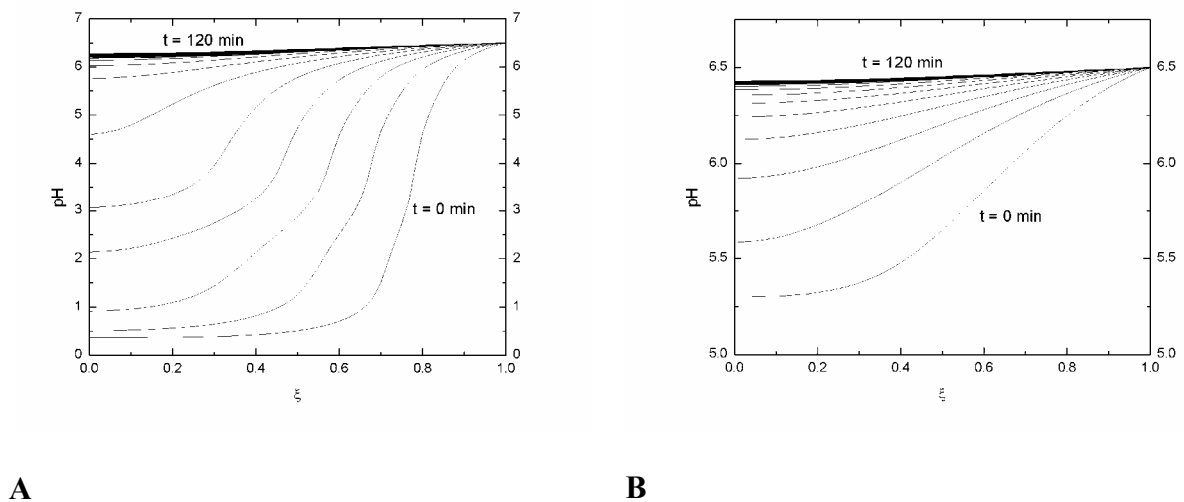


Figura 24 Simulação do perfil de pH no interior de biocatalisador de PGA imobilizado em gel de agarose com alta carga enzimática (90 UI/ml_{gel}). A) sem tampão. B) com concentração de 1 mol.litro⁻¹ de um tampão hipotético com $pK_a = 6,5$. Curvas de nível indicam diferença de 4 minutos de reação.

Por fim, os resultados indicam que um modelo que possa prever a síntese enzimática cineticamente controlada de ampicilina utilizando biocatalisador industrial (com alta carga enzimática) deve levar em conta os efeitos do pH na cinética. Entretanto, para se fazer isso de forma consistente, seria necessário ajustar cada uma das constantes cinéticas (k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} , ..., k_8 , k_{-8} , k_N , k_{-N} , ..., k''_N , k''_{-N} , vide mecanismo da Figura 8) em função do pH. Além disso, as velocidades de várias reações elementares dependem da concentração de certas espécies reativas de cada componente (6-APA com grupo amino neutro, por exemplo) e isto também deve ser levado em consideração em um modelo completo que leve em conta a dependência do pH. O ajuste de um modelo completo, no entanto, seria uma tarefa difícil, ou

mesmo intratável. O simples ajuste de toda cinética completa necessitaria um conjunto enorme de dados experimentais e, assim mesmo, prováveis problemas de correlação paramétrica apareceriam ao se tentar ajustar todos os parâmetros. Realizar o ajuste cinético para vários valores de pH e ajustar constantes cinéticas em função deste é impraticável. Portanto, um modelo para a síntese cineticamente controlada de ampicilina utilizando biocatalisador de PGA com alta carga enzimática deve combinar aspectos fenomenológicos com modelos empíricos, dêem função da disponibilidade de dados experimentais e da necessidade de extrapolação do modelo.

4 Otimização Dinâmica

A otimização de reatores tipo batelada-alimentada utilizando técnicas de otimização dinâmica tem atraído a atenção em anos recentes nas indústrias química, bioquímica e farmacêutica (Srinivasan *et al.*, 2003, Joly e Pinto, 2004, Sengupta e Modak, 2001). Reduções de custo, aumento na qualidade do produto, cumprimento de requisitos de segurança e regulamentações ambientais vêm direcionando as indústrias a otimizar suas operações.

A síntese enzimática cineticamente controlada de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos, como mencionado anteriormente, pode ocorrer em pH neutro e temperaturas moderadas sem a necessidade de solventes organoclorados. Isto faz dela uma alternativa promissora à síntese química atual em termos de redução em impactos ambientais. Contudo, baixos rendimentos ainda fazem desta, uma rota ineficiente frente à síntese química e, portanto, são grandes obstáculos na implantação da rota enzimática em escala industrial. A utilização de reator semi-contínuo integrado, onde produtos se cristalizam no decorrer da reação pode contornar vários efeitos indesejáveis presentes na síntese enzimática e vem se destacando como um processo promissor. Contudo, as abordagens *ad hoc* utilizadas para este caso devem ser substituídas por métodos sistemáticos na busca de máximos rendimentos e seletividades.

A otimização dinâmica permite o cálculo de políticas ótimas de operação para um processo (por exemplo, a melhor função de alimentação em um reator) que assegurem a maximização de um índice de desempenho pré-definido. Este, geralmente, é a produtividade, ou um índice econômico derivado do perfil de operação ou do estado final do processo, (Banga *et al.*, 2005).

Em processos onde reatores são operados em batelada (ou batelada alimentada) as variáveis de estado mudam com o decorrer da reação. Não há um estado estacionário, isto é, um valor fixo ótimo (*set-point*) no qual as variáveis-chave devem ser mantidas com o objetivo de otimizar a operação (Srinivasan *et al.*, 2003). Ao contrário, o principal objetivo nesses processos não é manter o estado em um valor fixo ótimo e sim, maximizar um critério de desempenho (função objetivo) durante e/ou no final do processo.

O problema de controle ótimo básico consiste em encontrar perfis das variáveis de controle (variáveis de decisão dinâmicas) $\underline{u}(t)$ ¹, valores de parâmetros de controle ou de projeto \underline{p} (variáveis de decisão estáticas), e possivelmente o tempo final de um processo, t_f que maximizem (ou minimizem) um funcional escalar de desempenho, J (função objetivo ou função custo, Ramirez, 1994). Geralmente, o problema é apresentado utilizando como modelo um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDO's) com valor inicial. Sua formulação pode ser posta da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \min_{\underline{u}(t), \underline{p}, t_f} J(\underline{u}, \underline{p}) &= \psi(\underline{x}(t_f), \underline{p}, t_f) \\ \text{s.a. : } \dot{\underline{x}} &= \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), \underline{p}, t), \quad \underline{x}(t_0) = \underline{x}_0 \\ \underline{g}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), \underline{p}, t) &= \underline{0} \\ \underline{S}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), \underline{p}) \leq \underline{0} \quad \underline{T}(\underline{x}(t_f)) &\leq \underline{0} \end{aligned} \tag{32}$$

onde J é um índice de desempenho (um valor escalar), \underline{x} , o vetor de variáveis de estado cujas condições iniciais, \underline{x}_0 , geralmente são conhecidas. \underline{g} é o vetor das restrições de igualdade sobre a trajetória. \underline{g} pode incorporar também equações algébricas de estado, caso haja alguma. \underline{S} é o vetor de restrições de desigualdade sobre a trajetória, e \underline{T} , o vetor de restrições de

¹ Letras e outros símbolos com um traço embaixo indicam vetores e com dois traços, matrizes.

desigualdades no estado final. O vetor \underline{S} compreende todo e qualquer limite (fronteiras) imposto sobre as variáveis de estado e de decisão. Por exemplo:

$$\underline{S} = \begin{bmatrix} \underline{x}_{\min} - \underline{x}(t) \\ \underline{x}(t) - \underline{x}_{\max} \\ \underline{u}_{\min} - \underline{u}(t) \\ \underline{u}(t) - \underline{u}_{\max} \end{bmatrix} \leq \underline{0} \quad (33)$$

onde os índices “max” e “min” correspondem aos limites máximos e mínimos destas variáveis.

Vale a pena notar que o funcional de desempenho, J (Equação 32), é muitas vezes definido com um termo integral como na equação abaixo:

$$J(\underline{u}, p) = \bar{\psi}(\underline{x}(t_f), p, t_f) + \int_{t_0}^{t_f} F(\underline{x}, \underline{u}, t) dt \quad (34)$$

onde F é um escalar. Mesmo que o termo integral seja necessário para a definição do funcional, o problema ainda pode ser reescrito e convertido na forma do problema original (Equação 32) adicionando-se ao sistema uma nova variável de estado $\dot{x}_{custo} = F(\underline{x}, \underline{u}, t)$, onde $x_{custo}(0) = 0$. Então, o custo terminal pode ser obtido da seguinte forma:

$$J(\underline{u}, p) = \bar{\psi}(\underline{x}(t_f), p, t_f) + x_{custo}(t_f) \quad (35)$$

O problema de controle ótimo, a partir de sua Formulação Direta (Equação 32) pode ser reformulado em outras duas maneiras utilizando: o Princípio do Mínimo de Pontryagin (PMP); e o Princípio de Optimalidade de Hamilton-Jacobi-Bellman (HJB). Segundo Srinivasan *et al.*, 2003, os métodos numéricos para a resolução do problema de controle ótimo podem ser classificados conforme são tratadas as variáveis de estado e de controle, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 Classificação de esquemas numéricos para otimização dinâmica (Srinivasan *et al.*, 2003)

Variáveis		Formulação do Problema		
		<i>Direta</i>	<i>PMP</i>	<i>HJB</i>
Estado Controle	<i>Parametrizadas</i> <i>Parametrizadas</i>	Abordagem simultânea	Variáveis adjuntas e de estado parametrizadas	Programação Dinâmica
Estado Controle	<i>Contínuas</i> <i>Parametrizadas</i>	Abordagem seqüencial	Método do gradiente	~
Estado Controle	<i>Contínuas</i> <i>Contínuas</i>	Abordagem da parametrização analítica	<i>Shooting Method</i>	~

4.1 Métodos Diretos

Métodos diretos de resolução de problemas de otimização dinâmica são os mais popularmente utilizados. Nestes métodos, o problema original de controle ótimo (Equação 32) é transformado em um problema de programação não-linear (PNL). Duas abordagens são comumente encontradas (Vassiliadis *et al.*, 1994): abordagem seqüencial, onde é feita a parametrização do vetor de controle (PVC); e a abordagem simultânea, onde ambos os vetores, de controle e de estado, são parametrizados, de tal forma que o problema de controle ótimo (Equação 32) é inteiramente expresso por um sistema de equações algébricas não-lineares. A idéia principal dos métodos diretos é transformar um problema de otimização dinâmica de dimensão infinita em problema de PNL de dimensão finita. Os métodos diretos são muito utilizados, pois são relativamente fáceis de implementar. Além disso, encontram-se na literatura (Edgar *et al.*, 2001) diversos algoritmos robustos para a resolução de problemas de PNL. Geralmente, a única desvantagem destes métodos recai na escolha do tipo de parametrização (freqüentemente escolhida pelo usuário) que pode definir o desempenho dos resultados da otimização.

4.2 Métodos Indiretos

Os métodos indiretos de resolução de problemas de otimização dinâmica são baseados na teoria clássica de controle ótimo, que emprega conceitos de cálculo variacional. Usando o Princípio do Mínimo (ou Máximo, de acordo com a formulação do problema) de Pontryagin, o problema apresentado em (32) é geralmente posto da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \min_{\underline{f}, \underline{u}(t)} \quad & H(t) = \underline{\lambda}^T \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t)) + \underline{\mu}^T \underline{S}(\underline{x}(t), \underline{u}(t)) \\ \text{s.a.} \quad & \underline{\dot{x}} = \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t)), \quad \underline{x}(0) = \underline{x}_0 \\ & \underline{\dot{x}} = -\frac{\partial H}{\partial \underline{x}}, \quad \underline{\lambda}^T(t_f) = \frac{\partial \psi}{\partial \underline{x}} \Big|_{t_f} + \underline{\xi}^T \left(\frac{\partial T}{\partial \underline{x}} \right) \Big|_{t_f} \end{aligned} \quad (36)$$

$$\underline{\mu}^T \underline{S}(\underline{x}(t), \underline{u}(t)) = 0 \quad \underline{\xi}^T \underline{T}(\underline{x}(t_f)) = 0$$

onde H é o *Hamiltoniano*; $\underline{\lambda}(t)$ é o vetor das variáveis adjuntas (também chamadas variáveis de co-estado) de dimensão n (multiplicadores dinâmicos de *Lagrange*); $\underline{\mu}(t)$ é o vetor dos multiplicadores de *Lagrange* para as restrições de trajetória de dimensão k ; $\underline{\xi}$ é o vetor dos multiplicadores de *Lagrange* para as restrições terminais de dimensão l . $\mu_j(t^*) > 0$ se, em t^* , a j -ésima restrição de trajetória estiver ativa; caso contrário, $\mu_j(t^*) = 0$. De forma análoga, $\xi_j > 0$ se a j -ésima restrição terminal estiver ativa, caso contrário, $\xi_j = 0$ (Srinivasan *et al.*, 2003).

A condição necessária para que $\underline{u}(t)$ seja ótimo é:

$$\frac{\partial H(t)}{\partial \underline{u}} = \underline{\lambda}^T \frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{u}} + \underline{\mu}^T \frac{\partial \underline{S}}{\partial \underline{u}} = \underline{0} \quad (37)$$

Para um tempo terminal (t_f) livre, a seguinte condição deve ser satisfeita (Ramirez, 1994):

$$H(t_f) = 0 \quad (38)$$

Se uma condição inicial $x_i(0)$ estiver livre, i.e., se ela também for uma variável de decisão, a seguinte condição deve ser cumprida para se alcançar um extremo do funcional de desempenho (Ramirez, 1994):

$$\lambda_i(0) = 0 \quad (39)$$

Se uma variável de estado estiver fixada no tempo final, ($x(t_f) = x_{if}$), então $\lambda_i(t_f)$ não é dada pela Equação 36. Como as condições de contorno para as variáveis de estado e variáveis adjuntas estão separadas (valor inicial para as variáveis de estado e condição final para as variáveis adjuntas, Equação 36), o problema de otimização recai na resolução de um problema de valor de contorno em dois pontos (*two-points boundary value problem*, TPBVP).

Embora muitos autores tenham utilizado a formulação PMP (Ramirez, 1994, Sengupta e Modak, 2001), esta abordagem é geralmente evitada, pois o TPBVP pode ser muito difícil de resolver, especialmente quando há restrições envolvendo variáveis de estado (Banga *et al.*, 2005). Além disso, o cálculo de derivadas analíticas se torna muito laborioso em modelos complexos.

4.3 Ensaios de otimização dinâmica

Algoritmos para a otimização dinâmica da SSC da ampicilina foram implementados. Para isso, um modelo simplificado do reator integrado foi proposto. Duas abordagens foram comparadas, uma utilizando a formulação direta e outra, a formulação indireta.

4.3.1 Modelo simplificado de reator integrado

A Figura 25 mostra um esquema de reator para a síntese enzimática de ampicilina. A enzima (PGA) é imobilizada em partículas (gel de agarose, por exemplo). Há duas correntes independentes de alimentação em estado sólido, correspondendo às alimentações de reagentes no reator. Outra corrente de alimentação, em estado líquido, adiciona hidróxido de sódio (NaOH) com o propósito de manter o pH em valor de *set-point* (6,5) o que ocasiona um aumento no volume do reator. A temperatura é também controlada (25°C) utilizando reator encamisado. Cristais são formados devido à baixa solubilidade dos produtos. Quando o volume do reator é completado, a reação pára e os produtos (cristais) são separados da fase aquosa e do biocatalisador, usando uma peneira no fundo do tanque reacional.

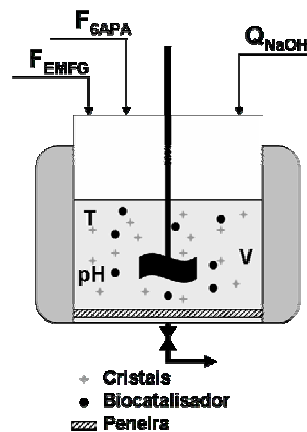


Figura 25 Esquema do reator semi-contínuo integrado proposto para a síntese enzimática industrial de ampicilina.

Ressalta-se aqui que, embora a alimentação de reagentes seja em estado sólido, há um aumento do volume da parte líquida do reator devido à vazão de NaOH (como ação de controle) necessária para manter o pH em valor ótimo de síntese (6,5). Com o decorrer da reação de síntese, a alimentação de solução de base é necessária para manter o pH constante, contudo, o aumento de volume devido a esse fator pode ser – de forma grosseira – desprezado. Entretanto, ao adicionar substratos em estado sólido o pH tende a cair

bruscamente e, portanto, uma alta vazão de base é necessária. A queda do pH se deve à adição do éster (EMFG) cujo reagente se encontra em forma cloridrato (i.e., apresenta uma molécula de cloreto de hidrogênio, HCl, para cada molécula de éster). Ao adicionar 6-APA (ponto isoelétrico, $pI \approx 3,5$) em estado sólido também é necessário a utilização de base para manter o pH a valor ótimo de síntese. Isso altera expressivamente o volume da solução e ocorre devido à existência de um limite máximo na concentração de hidróxido de sódio da corrente de controle. Uma alta concentração de hidróxido de sódio poderia alterar localmente o pH e inativar o biocatalisador. A variação no volume do reator é vista como uma desvantagem, pois a atividade absoluta de catalisador é constante no reator e, com o aumento no volume, a atividade enzimática por volume de reator é reduzida.

Observe que outra maneira de abordar o problema seria utilizar reagentes em solução aquosa ou em emulsões com pH já ajustadas ao pH do reator. Entretanto, a concentração dos substratos na corrente de alimentação deve ser alta para um eficaz controle de substratos no reator. A solução em alta concentração, principalmente a do éster metílico de D-(-)-fenilglicina (EMFG), ocasiona uma alta velocidade de degradação do reagente. Esse fato torna inviável manter o EMFG em solução de estoque enquanto não é alimentado. Uma estratégia para contornar essa degradação e aumentar a concentração de NaOH de controle de pH, reduzindo a variação do volume do reator, seria a utilização de um tanque anterior à alimentação onde os reagentes possam ser neutralizados em soluções concentradas logo antes de entrarem no reator. Essa estratégia, embora possa ser abordada para uma melhora de desempenho em um reator industrial, não será utilizada aqui devido à dificuldade de implantação.

Várias simplificações foram utilizadas no modelo do reator integrado com o objetivo de torná-lo mais facilmente tratável. Em suma, o modelo matemático para o reator

semi-contínuo integrado de síntese enzimática cineticamente controlada de ampicilina foi desenvolvido com base nas seguintes hipóteses:

- a) substratos alimentados em estado sólido;
- b) temperatura mantida constante;
- c) reação ocorre apenas na fase líquida;
- d) biocatalisador homogeneamente distribuído na fase líquida (i.e., resistências difusionais no interior e no exterior da partícula são desprezadas – hipótese de reator pseudo-homogêneo);
- e) pH mantido constante, controlado pela adição de solução de NaOH;
- f) cristalização ocorre instantaneamente assim que o limite de solubilidade de um componente é alcançado;
- g) dissociação de diferentes espécies carregadas de reagentes e produtos considerada em equilíbrio.

O modelo matemático se baseia principalmente nas leis de conservação de massa e na hipótese de neutralidade elétrica da solução reacional e é descrito a seguir.

Balço de Massa para os Componentes da Síntese Enzimática

$$\begin{aligned}
 \frac{dC_{EMFG}}{dt} &= \left(v_{EMFG}^{Enz}(\underline{C}^S) + F_{EMFG} - C_{EMFG} \frac{dV}{dt} \right) \frac{1}{V} + v_{EMFG}^{NEnz}(\underline{C}^S) \\
 \frac{dC_{6APA}}{dt} &= \left(v_{6APA}^{Enz}(\underline{C}^S) + F_{6APA} - C_{6APA} \frac{dV}{dt} \right) \frac{1}{V} \\
 \frac{dC_{Amp}}{dt} &= \left(v_{Amp}^{Enz}(\underline{C}^S) - C_{Amp} \frac{dV}{dt} \right) \frac{1}{V} \\
 \frac{dC_{FG}}{dt} &= \left(v_{FG}^{Enz}(\underline{C}^S) - C_{FG} \frac{dV}{dt} \right) \frac{1}{V} + v_{FG}^{NEnz}(\underline{C}^S) \\
 \text{com } C_i(0) &= C_{i0}
 \end{aligned} \tag{40}$$

Balanco Global de Massa

$$\frac{dV}{dt} = Q_{NaOH}, \quad V(0) = V_0 \quad (41)$$

Balanco de Massa de Contra-Íons

$$\frac{dC_{C.I.}}{dt} = \left(C_{C.I.}^0 Q_{NaOH} + \gamma_{EMFG} F_{EMFG} + \gamma_{6APA} F_{6APA} - C_{C.I.} \frac{dV}{dt} \right) \frac{1}{V} \quad (42)$$

$$C_{C.I.}(0) = C_{C.I.0}$$

Balanco de Cargas (Equação 28 reescrita)

$$f_{BC}(\underline{C}^S, pH) = -C_{C.I.} + \alpha_0(pH, pK_w) + \sum_{i=1}^{nc} \alpha_i(pH, pKa_1^{(i)}, pKa_2^{(i)}) \cdot C_i^S = 0 \quad (43)$$

Nas equações 40-43: C_i é a concentração molar do componente i (mol.l^{-1}); \underline{C}^S denota o vetor de concentração molar (mol.l^{-1}) de componentes na fase aquosa. t é o tempo de reação (min); V é o volume da fase líquida (l); F_i é a vazão molar de alimentação do componente i (mol.min^{-1}); v_i^{Enz} é a velocidade de reação enzimática de i (mol.min^{-1}) dada pela Equação 47; v_i^{NEnz} é a velocidade de reação não enzimática de i ($\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dada pela Equação 49; Q_{NaOH} é a vazão volumétrica (l.min^{-1}) de solução de NaOH (devido à ação de controle de pH); $C_{C.I.}^0$ é a concentração da solução de NaOH em Q_{NaOH} ; $C_{C.I.}$ é a diferença entre as concentrações de contra-íons positivos (advindos de uma base forte, Na^+) e negativos (advindos de um ácido forte, Cl^- , que pode ser utilizado para um ajuste fino no controle de pH) dados em mol.l^{-1} . Isto é, $C_{C.I.} = (C_{\text{Na}^+} - C_{\text{Cl}^-})$. γ_i é um parâmetro que representa a quantidade de contra-íon adicionado junto à corrente de alimentação F_i . Isto é:

$$[\gamma_i] = \frac{\text{moles de C.I. em } F_i}{\text{moles de } i \text{ em } F_i} \quad (44)$$

O balanço de cargas (Equação 43) aparece devido à hipótese de neutralidade do meio reacional (vide seção 3.1.2). Nesta equação, α_i é uma função das constantes de dissociação do componente i ($pKa_{1,i}$, $pKa_{2,i}$) e do pH. α_0 é uma função do pH e do pK_w (constante de dissociação da água). Como a reação ocorre em meio aquoso-precipitado a velocidade de reação depende apenas da concentração dos componentes em solução, \underline{C}^S . Seguindo a hipótese (f), C_i^S é calculado segundo a equação abaixo:

$$C_i^S(C_i, pH) = \begin{cases} C_i, & \text{se } C_i \leq C_i^*(pH) \\ C_i^*, & \text{se } C_i > C_i^*(pH) \end{cases} \quad (45)$$

onde $C_i^*(pH)$ é o limite de solubilidade da substância i em um determinado pH.

Ao se utilizar este tipo de abordagem, embora a função C_i^S seja contínua, sua derivada $\partial C_i^S / \partial C_i$ não o é no limite de solubilidade. Dificuldades no processo de otimização e de integração podem ser evitadas utilizando funções “suaves”. Vários métodos de “*smooth approximation*” podem ser encontrados na literatura. Neste trabalho, a função $\underline{C}^S = f(\underline{C})$ foi suavizada utilizando o método sugerido por Biegler *et al.*, 1997. Desta forma, a Equação 45 se torna:

$$C_i^S(pH) = \begin{cases} C_i^*(pH) - \frac{\varepsilon}{\exp(1)} \exp\left(\frac{C_i^*(pH) - C_i}{\varepsilon}\right), & \text{se } C_i \geq C_i^*(pH) - \varepsilon \\ C_i, & \text{se } C_i < C_i^*(pH) - \varepsilon \end{cases} \quad (46)$$

onde ε é o tamanho da região onde a função original é alterada a fim de suavizá-la.

Para as velocidades de reação, v_i^{Enz} , o modelo semi-empírico proposto por Ferreira *et al.*, 2000, foi utilizado (Equação 9). Seguindo este modelo, as velocidades para cada componente são:

$$\begin{aligned}
v_{EMFG}^{Enz} &= -At_{cat}V_{cat}R_{EA} \\
v_{6APA}^{Enz} &= At_{cat}V_{cat}(R_{H2} - R_S) \\
v_{Amp}^{Enz} &= -v_{6APA}^{Enz} \\
v_{FG}^{Enz} &= -v_{EMFG}^{Enz} - v_{Amp}^{Enz}
\end{aligned} \tag{47}$$

R é a velocidade de reação proposta por Ferreira *et al.*, 2000, para as reações de síntese e hidrólises dadas em mol.Ul⁻¹.min⁻¹. At_{cat} é a atividade do biocatalisador utilizado (Ul.cat⁻¹). V_{cat} é o volume de biocatalisador utilizado. As velocidades de reação, v^{Enz} são dadas, portanto, em mol.min⁻¹.

Modelo empírico da hidrólise inespecífica do éster metílico de fenilglicina

A hidrólise não enzimática, v^{NEnz} , presente na Equação 40, corresponde à hidrólise inespecífica do éster, que ocorre em solução aquosa independentemente da presença do biocatalisador. Um modelo empírico para a hidrólise inespecífica foi ajustado anteriormente (Equação 15, seção 2.8.2). Esta velocidade está reescrita abaixo, em mol.min⁻¹.l⁻¹:

$$v_{HI} = \theta_1.C_{EMFG}^S + \theta_2.C_{EMFG}^S{}^2 + \theta_3.C_{EMFG}^S{}^3 \tag{48}$$

Portanto:

$$\begin{aligned}
v_{EMFG}^{NEnz} &= -v_{HI} \\
v_{FG}^{NEnz} &= +v_{HI}
\end{aligned} \tag{49}$$

O modelo do reator descrito acima é um sistema de equações algébrico-diferenciais (EAD) e compreende 7 equações (Equações 40-43) que descrevem as 7 variáveis de estado: Concentração de EMFG, 6-APA, Amp, FG, e de contra-íon ($C_{C.I.}$), pH e volume do reator. As variáveis de controle (graus de liberdade) dinâmicas (dependentes do tempo) são: vazão molar de alimentação de EMFG ($F_{EMFG}(t)$), de 6-APA ($F_{6APA}(t)$) e a vazão volumétrica de base, $Q_{NaOH}(t)$. Todas as outras variáveis não especificadas são parâmetros estáticos (não variantes com o tempo) conhecidos ou a serem definidos.

Embora a utilização de um perfil ótimo de pH em função do tempo de reação possa propiciar melhores resultados da síntese, no sentido de melhores rendimentos e seletividade, tal abordagem ainda vem sendo tratada de forma heurística na literatura. Encontrar tal perfil ótimo requer modelos muito mais complexos, com a cinética dependente do pH e, com isso, a coleta de um enorme conjunto de dados experimentais. Portanto, a utilização de um pH constante é, no presente momento, o único procedimento factível. Dessa forma, impor que o pH é constante durante a reação e, conseqüentemente, uma ação ideal de controle de pH – como se assume na hipótese (e) – implica a determinação da concentração de contra-íon no reator. Isto é, se o pH for constante na Equação 43, C_{Cl} estará determinada para uma dada composição de reagentes e produtos no reator. Conseqüentemente, a variável de controle $Q_{NaOH}(t)$ estará definida e poderá ser calculada como descrito adiante.

Cálculo de Q_{NaOH} necessário para manter o pH constante.

Considerando o pH constante, ao derivar a Equação 43 em relação ao tempo obtém-se:

$$\frac{dC_{C.I.}}{dt} = \sum_{i=1}^4 \alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} \frac{dC_i}{dt} \quad (50)$$

onde, dC_i^S/dC_i pode ser obtido derivando a Equação 46

$$\frac{dC_i^S}{dC_i}(C_i) = \begin{cases} \exp\left(\frac{C_i^* - C_i}{\varepsilon} - 1\right), & \text{se } C_i \geq C_i^*(pH) - \varepsilon \\ 1, & \text{se } C_i < C_i^*(pH) - \varepsilon \end{cases} \quad (51)$$

Substituindo $C_{C.I.}$, $dC_{C.I.}/dt$ e dV/dt na Equação 42 pelas equações 43, 50 e 41, a Equação 42 se torna:

$$\sum_{i=1}^4 \alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} \frac{dC_i}{dt} = \left(C_{C.I.}^Q Q_{NaOH} + \sum_{i=1}^2 \gamma_i F_i - \left(\alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_i C_i \right) Q_{NaOH} \right) \frac{1}{V} \quad (52)$$

Substituindo as equações de estado, dC_i/dt , (Equação 40) na Equação 52, obtém-se:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^4 \alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} \left((v_i^{Enz} + F_i - C_i \cdot Q_{NaOH}) \frac{1}{V} + v_i^{NEnz} \right) = \\ = \left(C_{C.I.}^Q \cdot Q_{NaOH} + \sum_{i=1}^2 \gamma_i F_i - \left(\alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_i C_i \right) \cdot Q_{NaOH} \right) \frac{1}{V} \end{aligned} \quad (53)$$

Multiplicando ambos os lados da equação por V e manipulando a Equação acima:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^4 \alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} (v_i^{Enz} + v_i^{NEnz} \cdot V) + \sum_{i=1}^2 \alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} F_i - \sum_{i=1}^4 \alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} C_i \cdot Q_{NaOH} = \\ = C_{C.I.}^Q \cdot Q_{NaOH} + \sum_{i=1}^2 \gamma_i F_i - \left(\alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_i C_i \right) \cdot Q_{NaOH} \end{aligned} \quad (54)$$

Por fim, isolando Q_{NaOH} obtém-se:

$$Q_{NaOH} = \frac{\sum_{i=1}^4 \alpha_i (v_i^{Enz} + v_i^{NEnz} V) \frac{dC_i^S}{dC_i} + \sum_{i=1}^2 F_i \left(\alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} - \gamma_i \right)}{C_{C.I.}^Q - \alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_i \left(C_i \frac{dC_i^S}{dC_i} - C_i^S \right)} \quad (55)$$

Portanto, Q_{NaOH} é a vazão da solução de NaOH a concentração de $C_{C.I.}^Q > 0$, necessária para manter o pH constante durante o decorrer da reação se síntese enzimática de ampicilina. Obviamente, Q_{NaOH} deve ser uma vazão não-negativa. Esta restrição, contudo, não está imposta pela Equação 55. Contudo, é possível mostrar que o pH tende a cair conforme a reação avança. Isto é:

$$\sum_{i=1}^4 \alpha_i (v_i^{Enz} + v_i^{NEnz} V) \frac{dC_i^S}{dC_i} \geq 0 \quad (56)$$

Ademais, os cristais de EMFG alimentado no reator contêm 1 mol de cloreto de hidrogênio (HCl) para cada mol de EMFG como resultado de seu processo de fabricação (i.e., $\gamma_{EMFG} = -1$). Geralmente $\gamma_{6APA} = 0$, contudo, pode ser verificado que $\alpha_{6APA} > 0$. Assim, a pH 6,5 (atualmente utilizado como pH de processo):

$$\sum_{i=1}^2 F_i \left(\alpha_i \frac{dC_i^S}{dC_i} - \gamma_i \right) \geq 0 \quad (57)$$

Finalmente, para qualquer controle plausível de pH usando NaOH, a Equação 47 abaixo deve ser satisfeita:

$$C_{C.I.}^0 \gg \alpha_0 - \sum_{i=1}^4 \alpha_i \left(C_i \frac{dC_i^S}{dC_i} - C_i^S \right) \quad (58)$$

Portanto, em uma corrida do reator semi-contínuo de síntese enzimática de ampicilina, Q_{NaOH} , geralmente, é não negativo em $t \in [t_0, t_f]$. Entretanto, vale notar que quando algoritmos de controle ótimo são rodados, durante o procedimento de busca estratégias, diversas alimentações serão simuladas, o que poderá eventualmente resultar em valores negativos para o lado direito da Equação 55. Isto pode trazer problemas de demora de convergência do método de otimização, ou mesmo problemas na integração do sistema de equações para um perfil de alimentação específico.

Modelo do reator de síntese em pH constante

Assumindo pH constante, o sistema de equações algébrico-diferenciais (EAD) que descreve o reator posto pelas equações 40-43 é convertido em um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDO), descrito pelas equações 40-41, onde Q_{NaOH} é dado pela Equação 55. Vale notar que, se o sistema de equações estendido (as EDOs mais as EADs originais) é satisfeito pelas condições iniciais, não são esperados problemas de convergência ao utilizar um método numérico de resolução (Unger *et al.*, 1995). Isto é verdade neste caso. Como o pH é fixo, e seu valor é utilizado para calcular $C_{C.I.}$ a partir da Equação 43 antes da substituição em 42, a equação algébrica (43) será sempre satisfeita e a inicialização do sistema estendido será consistente.

Por conseguinte, as variáveis de estado no modelo do reator descrito pelo sistema de EDOs são: C_{EMFG} , C_{6-APA} , C_{Amp} , C_{FG} e o volume (V). As variáveis de controle

dependentes do tempo (graus de liberdade) são as vazões molares de alimentação de EMFG e 6-APA ($F_{EMFG}(t)$ e $F_{6APA}(t)$).

4.3.2 Formulação do problema de controle ótimo

Neste trabalho, o problema de controle ótimo é posto como se segue: *encontrar a política de alimentação de substratos, $F_{EMFG}(t)$ e $F_{6APA}(t)$, e Volume inicial (V_0) que maximiza o critério de desempenho*

$$J(\underline{u}) = \psi(\underline{x}(t_f)) = [c_1 X_{EMFG}^2 + c_2 X_{6APA}^2 + c_3 C_{6APA}^2]_{t_f} \quad (59)$$

sujeito ao sistema descrito Equações 40-41 (onde Q_{NaOH} é dado pela Equação 55) e às seguintes restrições terminais:

$$V(t_f) = V_f \quad (60)$$

e restrições de fronteiras:

$$\begin{aligned} F_{EMFG}(t) &\geq 0 \\ F_{6APA}(t) &\geq 0 \end{aligned} \quad (61)$$

A conversão de EMFG que segue a rota sintética e a conversão de 6-APA (segundo substrato) são dadas por:

$$\begin{aligned} X_{EMFG} &= \frac{C_{Amp}}{C_{Amp} + C_{FG} + C_{EMFG}} \\ X_{6APA} &= \frac{C_{Amp}}{C_{Amp} + C_{6APA}} \end{aligned} \quad (62)$$

A concentração final de 6-APA foi também adicionada ao funcional de desempenho, pois este substrato é o reagente mais oneroso e espera-se conversão total deste ao final da reação.

4.3.3 Abordagens Consideradas para a Resolução do Problema de Controle Ótimo

Método indireto – método do gradiente

Resolver o problema de controle ótimo utilizando a formulação baseada no PMP consiste em resolver as condições necessárias para optimalidade (Equações 36-37). Observe que o sistema de equações de estado expresso pelas equações 40-41 (e 55) pode ser reescrito de forma compacta, como se segue:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{\phi}(\underline{x}(t)) + \underline{\varphi}(\underline{x}(t))^T \underline{u}(t), \quad \underline{x}(0) = \underline{x}_0 \quad (63)$$

Sendo assim, as variáveis de controle aparecem linearmente tanto no sistema de equações de estado, $\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t))$ (Equação 63), quanto nas restrições de trajetória $\underline{S}(\underline{x}(t), \underline{u}(t))$, dadas pela Equação 61. Aplicando a condição necessária para $\underline{u}(t)$ ótimo (Equação 37):

$$\frac{\partial H(t)}{\partial \underline{u}} = \underline{\lambda}^T \underline{\varphi}(\underline{x}(t))^T + \underline{\mu}^T = \underline{0} \quad (64)$$

Este é um problema que tem solução analítica que pode resultar em um arco singular, em uma política de controle tipo bang-bang, ou na combinação dos dois (Srinivasan *et al.*, 2003). Embora o arco singular neste caso possa ser obtido depois de diferenciações e manipulações algébricas (Smets e van Impe, 2002), o cálculo analítico do sistema abordado neste trabalho seria muito trabalhoso. Além disso, a solução do TPVBP seria necessária a fim de encontrar os tempos de troca de política de controle entre arco singular e restrições para cada variável de controle.

A estratégia do gradiente pode ser considerada um bom compromisso entre cálculo analítico e numérico. Diferentemente à resolução analítica, esta estratégia não tenta encontrar um equação explícita para $\underline{u}(t) = \underline{g}(\underline{x}(t), \underline{\lambda}(t))$. Ao contrário, ela usa a informação de

$\partial H/\partial \underline{u}$ disponível pela Equação 64 para gerar uma direção de busca utilizando a expressão em um método de otimização baseado em gradiente.

Com o intuito de resolver o problema usando a estratégia do gradiente, derivadas parciais presentes na Equação 36 foram calculadas utilizando Maple[®]9. Seguindo as definições descritas pela Equação 32, a restrição terminal de igualdade (Equação 61) se torna:

$$\begin{aligned} T_1 &= V(t_f) - V_f \leq 0 \\ T_2 &= -V(t_f) + V_f \leq 0 \end{aligned} \quad (65)$$

Portanto, as condições finais para as variáveis adjuntas se tornam:

$$\underline{\lambda}'(tf) = \left. \frac{\partial \psi}{\partial \underline{x}} \right|_{tf} + \sum_{j=1}^l \xi_j \left(\left. \frac{\partial T_j}{\partial \underline{x}} \right|_{tf} \right) \quad (66)$$

ou

$$\underline{\lambda}'(tf) = \left. \frac{\partial \psi}{\partial \underline{x}} \right|_{tf} + 2 \sum_{j=1}^l \xi_j T_j(x(tf)) \cdot \left(\left. \frac{\partial T_j}{\partial \underline{x}} \right|_{tf} \right) \quad (67)$$

onde ξ_j é uma constante positiva dada. A soma é zero se a restrição estiver ativa, caso contrário, o termo depende da distância entre T_j e 0.

Algoritmo de resolução

O algoritmo utilizado para a resolução do problema de controle ótimo pelo método do gradiente seguiu os passos seguintes:

Passo 1. Escolhe-se uma política inicial de controle $\underline{u}(t) = \underline{u}^0(t)$.

Passo 2. Integra-se o sistema de equações das variáveis de estado (pelas equações Equação 40-41) das condições iniciais, \underline{x}_0 ao tempo final, tf . O perfil das variáveis de estado em relação ao tempo é guardado para utilizar na integração do sistema de co-estado.

Passo 3. Confere-se se as restrições terminais estão ativas e calcula-se o valor das variáveis adjuntas no tempo final (Equação 67).

Passo 4. Verifica-se convergência:

$$\begin{cases} (\psi_k - \psi_{k-1})^2 \leq tol_\psi \\ \int_{t_0}^{tf} (\Delta u_k^i(t))^2 dt \leq tol_{\Delta u} \end{cases} \quad (68)$$

Passo 5. Usando os perfis das variáveis de estado salvos (interpolados usando *spline* cúbicas), integra-se o sistema das variáveis adjuntas ($\underline{\lambda}(t)$, Equação 36) de tf a t_0 . O perfil das variáveis adjuntas em relação ao tempo é guardado para utilização na atualização do vetor de controle.

Passo 6. Atualiza-se o vetor de controle $\underline{u}(t)$ usando um método de gradiente amortecido¹.

$$\begin{aligned} \underline{u}_{k+1}(t) &= \underline{u}_k(t) + \Delta \underline{u}_k(t) \\ \Delta \underline{u}_k(t) &= \eta \cdot \left. \frac{\partial H(t)}{\partial \underline{u}} \right|_k + \beta \cdot \Delta \underline{u}_{k-1}(t) \end{aligned} \quad (69)$$

Passo 7. Repetem-se Passos 2-6 até convergência ser alcançada no Passo 4.

Para o caso onde x_{0i} não está fixo, $\lambda_i(0)$ deve ser zero (Equação 39). Para isso, utilizou-se de alguns passos do método de Newton-Raphson (Pinto e Lage, 2001) entre passos 2 e 3, isto é:

$$\underline{x}_0^{k+1} = \underline{x}_0^k + \left(\left. \frac{\partial \underline{\lambda}_0(\underline{x}_0)}{\partial \underline{x}_0} \right|_k \right)^T^{-1} (-\underline{\lambda}_0(\underline{x}_0)) \quad (70)$$

onde $\lambda_0(x_0)$ é calculado após integração das variáveis de estado, seguida por integração do tempo final ao tempo inicial do sistema de equações das variáveis adjuntas (passos 2 e 3 do algoritmo de resolução). Note-se que o cálculo da matriz Jacobiana em (Equação 70)

¹ O termo β é chamado momento e indica o quanto do passo da iteração k-1 é mantido na iteração k. A utilização de uma parte do passo anterior como uma forma de inércia presente no movimento das variáveis de decisão é uma abordagem simples de reduzir comportamentos de zigue-zague, comum aos métodos de gradiente puro.

demanda um grande esforço computacional, pois as derivadas devem ser aproximadas por diferenças e, para cada avaliação, pelo menos duas integrações devem ser realizadas.

Método direto – abordagem seqüencial

A estratégia seqüencial para resolver o problema de controle ótimo demanda a parametrização do vetor de controle (PVC)

$$\underline{u} = \underline{u}(\theta) \quad (71)$$

onde θ é um parâmetro de decisão independente do tempo. Nesta abordagem, o horizonte de tempo é dividido em um número de elementos e o controle é aproximado usando uma função pré-definida. Geralmente, as variáveis de controle são aproximadas por um tipo de polinômio com baixa ordem.

A vantagem desta abordagem é que, em contraste com os métodos diretos, não é necessária a diferenciação analítica das equações de estado e não há variáveis adjuntas a serem integradas. Além disso, algoritmos robustos e eficientes para a resolução de problemas de PNL que tratam restrições de igualdade e desigualdade estão disponíveis na literatura (Edgar *et al.*, 2001). Entretanto, este método demanda um alto esforço computacional. A otimização é realizada minimizando uma função custo definida pelas condições finais das variáveis de estado, as quais somente podem ser obtidas depois da resolução do sistema dinâmico por todo o horizonte de tempo.

A principal idéia por trás desta abordagem é parametrizar as variáveis de controle sobre o domínio do tempo. Na primeira iteração, o vetor θ é escolhido pelo usuário. Então, um algoritmo de resolução de sistemas de EADs ou EDOs é utilizado em um laço interior, o qual integra o sistema de variáveis de estado até o tempo final. Assim, o valor da função objetivo ($\psi(t_f)$) é disponibilizado para o algoritmo de resolução do problema de PNL. Por sua vez o algoritmo de PNL, em um laço externo, otimiza a função objetivo manipulando

os parâmetros (θ), e suprindo um novo valor para o vetor $\underline{u}(\theta)$ para o laço interno. O algoritmo está representado na Figura 26.

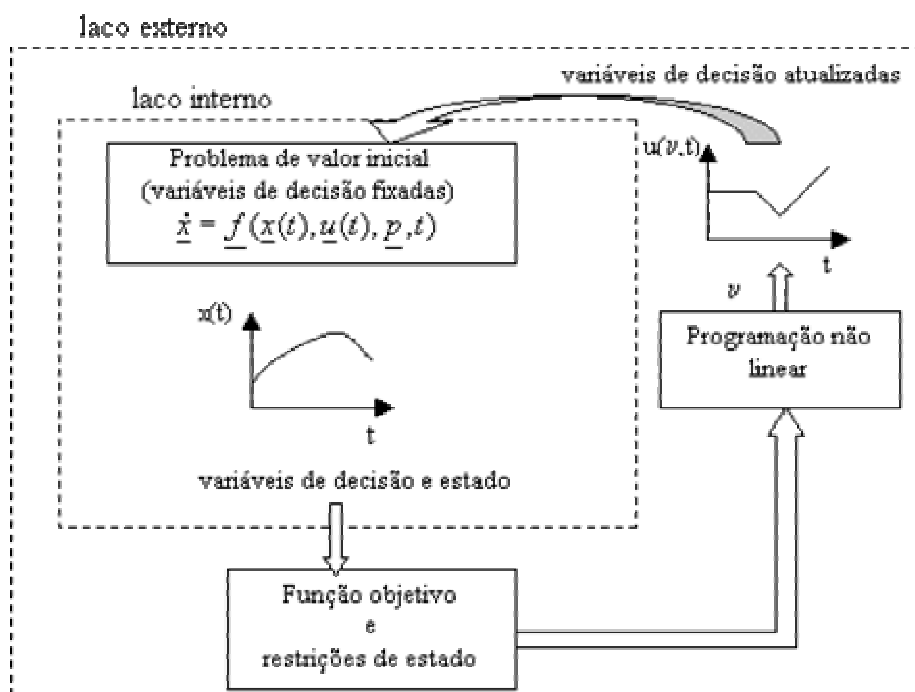


Figura 26 Esquema da abordagem sequencial na otimização dinâmica. v é o vetor dos parâmetros de \underline{u} .

4.3.4 Ferramentas computacionais utilizadas

Todos os cálculos foram implementados em Matlab7. Algoritmo *fmincon* (minimização de função com restrições) presente no Matlab7 foi utilizado no caso da estratégia sequencial. O problema é resolvido com algoritmo de programação quadrática sucessiva (successive quadratic programming, SQP) onde a Hessiana é atualizada em cada iteração a partir da fórmula BFGS (Edgar *et al.*, 2001).

Algumas manipulações algébricas e diferenciações analíticas foram feitas com ajuda do Maple9.

4.4 Discussão dos resultados obtidos

4.4.1 Estratégia do Gradiente

Análise preliminar de modelo de reator simplificado

Primeiramente, foi feita a otimização de um reator com modelo simplificado, no qual a adição de NaOH é desprezada, usando o método do gradiente. Neste caso, $dV/dt = 0$ substitui a Equação 41. O modelo cinético utilizado foi o proposto por Ferreira *et al.*, 2000. Em todas as simulações, assumiu-se síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.

Tabela 7 Parâmetros e condições iniciais usadas na otimização do modelo de reator simplificado (sem variação de volume) usando a abordagem do gradiente. Solubilidade para solução aquosa de um componente, retirada de Vieira, 2003.

<i>Parâmetros de Otimização</i>	<i>Atribuições iniciais e restrições</i>
$\eta = 1,0 \times 10^{-4}$	$\underline{u}(t) _{k=1} = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$
$\beta = 5,0 \times 10^{-5}$	$0 \leq \underline{u}(t) \leq 0,1 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$
<i>Condições iniciais e parâmetros de integração</i>	
$C_{EMFG}(0) = 0,0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$V(t) = 1 \text{ l}$
$C_{6APA}(0) = 0,3 \text{ mol l}^{-1}$	$E^0 = 100 \text{ UI (em todo o reator)}$
$t_f = 120 \text{ min}$	
<i>Limite de solubilidade para componente puro em solução</i>	
$EMFG = 1,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$Amp = 0,024 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$6\text{-APA} = 0,30 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$FG = 0,022 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

A Tabela 7 mostra os parâmetros e condições iniciais utilizadas nesta abordagem. Com o intuito de evitar altas taxas de hidrólise no começo da reação, o reator foi considerado ausente de EMFG em t_0 . 6-APA, ao contrário, inicia em seu limite e solubilidade a fim de maximizar a seletividade da enzima ($v_{Amp}^{Enz} / v_{FG}^{Enz}$). Vale notar que, se a hidrólise inespecífica fosse desprezível, o EMFG poderia começar em seu limite de solubilidade, como mostrado em trabalho realizado anteriormente (Ribeiro e Giordano, 2005b), sem a redução da

seletividade inicial. Figuras 27 e 28 mostram os resultados obtidos para esta abordagem de controle ótimo. Figura 28 mostra algumas características das variáveis de processo. X_{EMFG} e X_{6APA} (Equação 62) indicam a quantidade de substratos que são convertidos em antibiótico. Como Ampicilina e FG têm limites de solubilidade baixos (vide Tabela 7), a razão entre produtos desejável/não-desejável (C_{Amp}/C_{FG}) indica o quão onerosa será a operação de separação a jusante do processo.

Resultados para o modelo simplificado apresentaram bom desempenho do reator: alta conversão de 6-APA; e alta produtividade do reator ($P = 1,6 \text{ mol.l}^{-1} \times 1 \text{ l}^{-1} \div 100 \text{ UI} \div 2 \text{ h} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol.h}^{-1}.\text{UI}^{-1}$).

Resultados obtidos para os perfis de concentração de vazões de alimentação (Figura 27) mostram claramente 3 estágios distintos de uma operação ótima do reator. Em um primeiro estágio (inicial, aproximadamente $0 < t < 10 \text{ min}$), a saturação de ampicilina e fenilglicina é alcançada e a concentração de EMFG é aumentada a fim de aumentar a velocidade de síntese de ampicilina. Em um segundo estágio (intermediário, aproximadamente $10 < t < 90 \text{ min}$), concentrações de substratos e produtos na fase aquosa permanecem constantes (ou quase constante, no caso do EMFG). Assim, as velocidades de reação são mantidas constantes em um ponto de alta seletividade (síntese/hidrólise). Num terceiro estágio (estágio de finalização, aproximadamente $t > 90 \text{ min}$), a velocidade de alimentação de EMFG aumenta e a de 6-APA, reduz-se. Assim a concentração de 6-APA é reduzida abaixo do limite de solubilidade e, finalmente, esgotada, a fim de cumprir a função objetivo terminal (Equação 59). Note que a concentração de 6-APA permanece além de seu limite de solubilidade (= 300 mM aproximadamente) durante todo o primeiro e segundo estágios. Entretanto, não há razões para haver cristais de substratos no reator, pois eles não afetam a velocidade de reação. Na prática, concentrações de substratos não devem exceder, mas quando for o caso, devem ser controladas em seu limite de solubilidade.

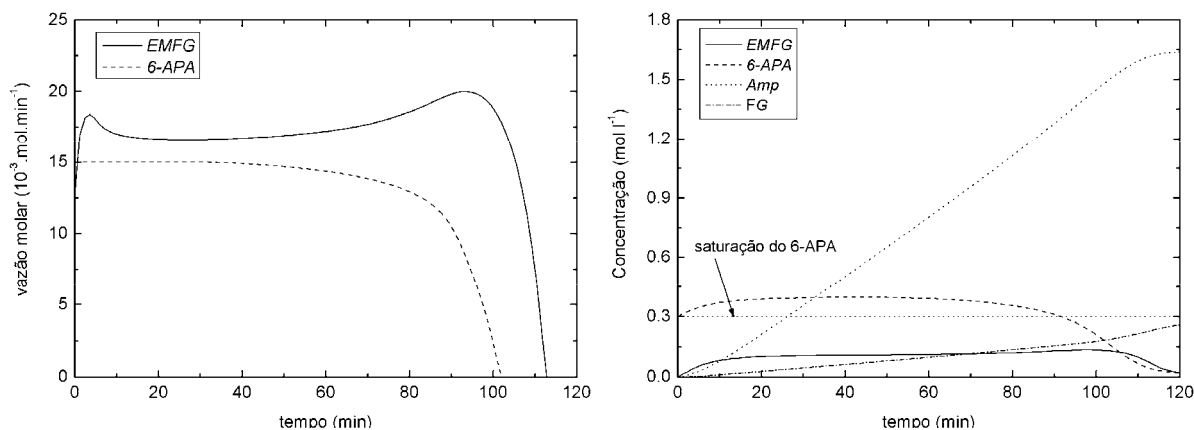


Figura 27 Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo simplificado (sem variação de volume). Esquerda: perfis de alimentação ótima obtidos, \underline{F} . Direita: simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante.

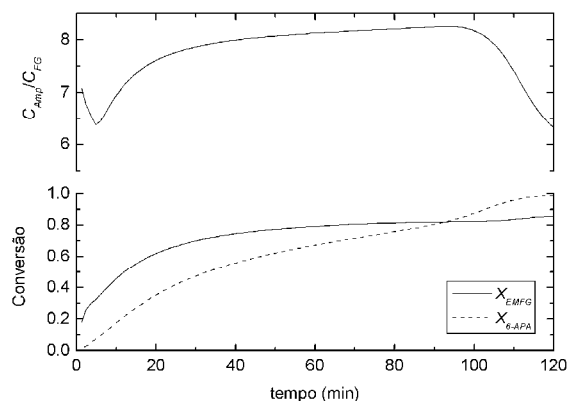


Figura 28 Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo simplificado (sem variação de volume). Simulação dos perfis de conversão e seletividade obtidos utilizando perfil de alimentação ótima obtida.

Resultado utilizando modelo do reator com variação de volume

Otimização a partir de um modelo mais complexo, com variação de volume (equações 40-41 e 55), foi levada a cabo utilizando a estratégia do gradiente. A maioria dos parâmetros de otimização e condições iniciais utilizados seguem os da Tabela 7. Parâmetros que diferem desta tabela, ou que não se aplicam ao primeiro caso, estão descritos na Tabela 8. Neste caso, como o volume no início da batelada não é fixado, $\lambda_5(0)$ deve ser zero (Equação 39). Em vista disso, duas iterações do método de Newton-Raphson (Equação 70) foram realizadas a cada dez iterações do algoritmo de otimização.

Tabela 8 Parâmetros e condições iniciais usadas na otimização da síntese de ampicilina seguindo a estratégia do gradiente.

<i>Parâmetros de Otimização</i>	<i>Atribuições iniciais e restrições</i>
$\xi_l = 10$	$V(0) _{k=1} = 0.1 \text{ l}$ $V(t_f) = 1 \text{ l}$
<i>Parâmetros do Modelo</i>	
$\gamma_{EMFG} = -1$ $C_{QCL} = 2 \text{ mol/l}$	$\gamma_{6APA} = 0$

As Figuras 29 e 30 mostram os resultados obtidos na otimização utilizando a estratégia do gradiente. Conversões de substratos (Figura 30) obtidas neste caso foram bem similares àquelas obtidas utilizando modelo simplificado (Figura 28). Entretanto, a razão C_{Amp}/C_{FG} ($= 5,9$) e a produtividade de ampicilina ($P = 1,3 \text{ mol.l}^{-1} \times 11^{-1} \div 100 \text{ UI} \div 2 \text{ h} = 6,5 \times 10^{-3} \text{ mol.h}^{-1} \cdot \text{UI}^{-1}$) tiveram valores menores em comparação com o primeiro caso. Contudo, o resultado obtido segue a mesma heurística encontrada no caso simplificado, onde três estágios estão claramente presentes. No primeiro e no segundo estágio, concentrações de 6-APA são mantidas em seu limite de solubilidade enquanto o EMFG é levado a uma concentração ótima onde a razão entre as velocidades de síntese e hidrólise é maximizada. No terceiro estágio, a alimentação de EMFG é aumentada a fim de reduzir a concentração de 6-APA até um mínimo. O volume inicial obtido foi 0,27 l e o volume final foi 1,00 l. Desta forma, foi cumprida a restrição terminal imposta (Equação 60).

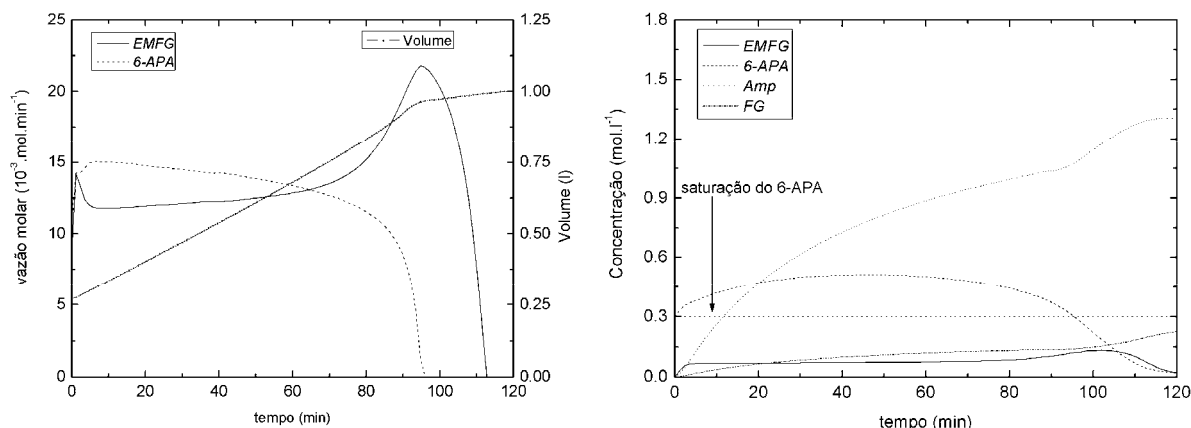


Figura 29 Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo complexo. Esquerda: perfis de alimentação ótima obtidos, F , e volume do reator, V . Direita: simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante.

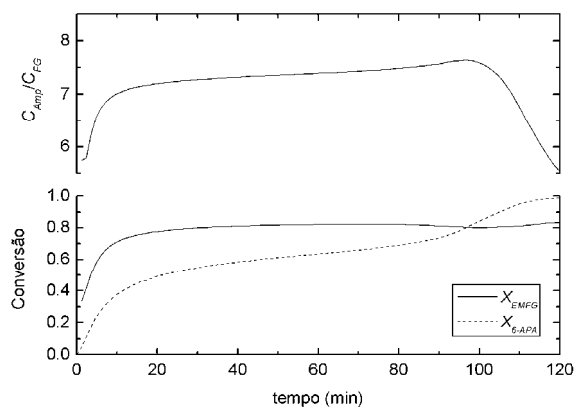


Figura 30 Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente e modelo complexo. Simulação dos perfis de conversão e seletividade obtidos utilizando perfil de alimentação ótima obtida.

4.4.2 Estratégia Sequencial

A abordagem seqüencial foi levada a cabo usando o modelo com variação de volume. O vetor de controle (vazões de alimentação) foi aproximado utilizando funções lineares, sendo $\underline{u}(t)$ dividido em pontos discretos (parâmetros θ a serem otimizados). Uma interpolação linear foi feita entre os pontos. As mesmas condições da estratégia do gradiente foram utilizadas aqui. Contudo, em contraste com o método do gradiente, o número de parâmetros de otimização aumenta substancialmente a complexidade do problema. Portanto, apenas alguns poucos pontos discretos (6 pontos) foram utilizados para cada alimentação.

Resultados obtidos pela abordagem seqüencial estão representados nas Figuras 31 e 32. A razão C_{Amp}/C_{FG} ($= 6,3$) e produtividade de ampicilina ($P = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol.h}^{-1} \cdot \text{UI}^{-1}$) obtidas para este caso tiveram valores mais altos e, assim, uma leve melhoria no desempenho foi obtida usando esta em comparação com a estratégia do gradiente. Embora a alimentação ótima obtida usando a abordagem seqüencial tenha sido bem distinta da obtida utilizando o método do gradiente, a mesma heurística pareceu se aplicar também a este caso. O volume inicial obtido neste caso, 0,11 l, também difere do obtido no caso do gradiente. Contudo, em ambos os casos, a restrição terminal é obedecida (volume final 1,00 l).

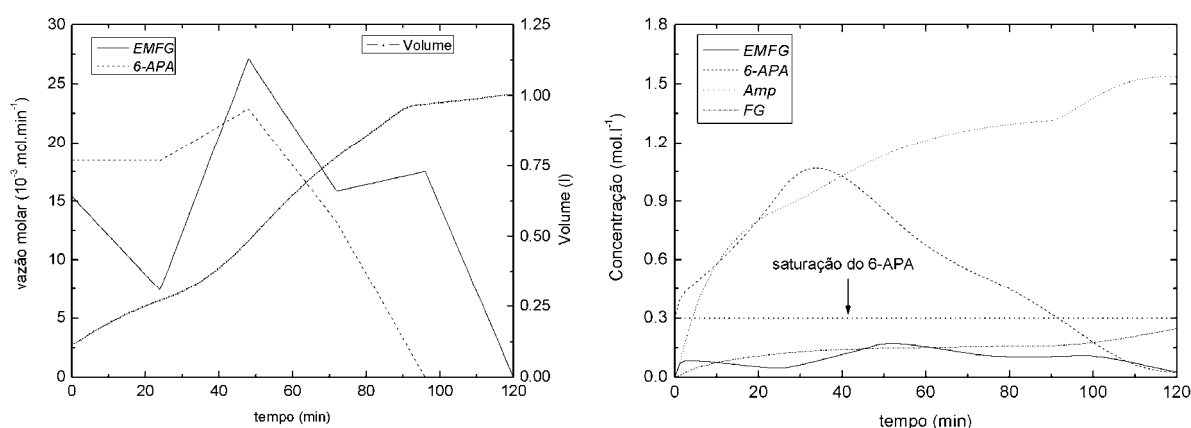


Figura 31 Resultados de controle ótimo obtidos utilizando abordagem seqüencial e modelo complexo. Esquerda: perfis de alimentação ótima obtidos, E , e volume do reator, V . Direita: simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante.

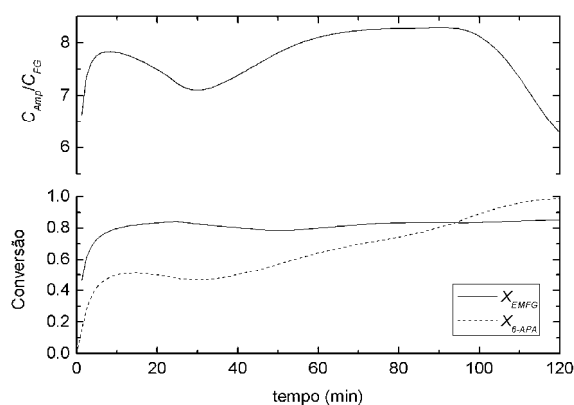


Figura 32 Resultados de controle ótimo obtidos utilizando abordagem seqüencial e modelo complexo. Simulação dos perfis de conversão e seletividade obtidos utilizando perfil de alimentação ótima obtida.

A Figura 33 mostra o comportamento da função objetivo e das restrições terminais para os diferentes procedimentos de otimização utilizados. Está claro que para todos os casos um mínimo local foi alcançado. Note-se que, para o método do gradiente implementado aqui, a função objetivo, ψ , assim como as restrições terminais, tende suave e diretamente para um ótimo local. Entretanto, um grande tempo de processamento é necessário para melhorar o desempenho do processo. Contudo, vale notar que restrições terminais e a utilização de uma condição inicial de variável de estado (V_0) como variável de decisão tornam o problema bem complexo. Apesar disso, tal problema foi resolvido utilizando algoritmos simples: algoritmo para resolver problema de sistemas de EDO com valor inicial; método de Newton; e gradiente descendente. É claro, um grande esforço computacional foi realizado previamente a fim de obter as derivadas analíticas das funções de estado.

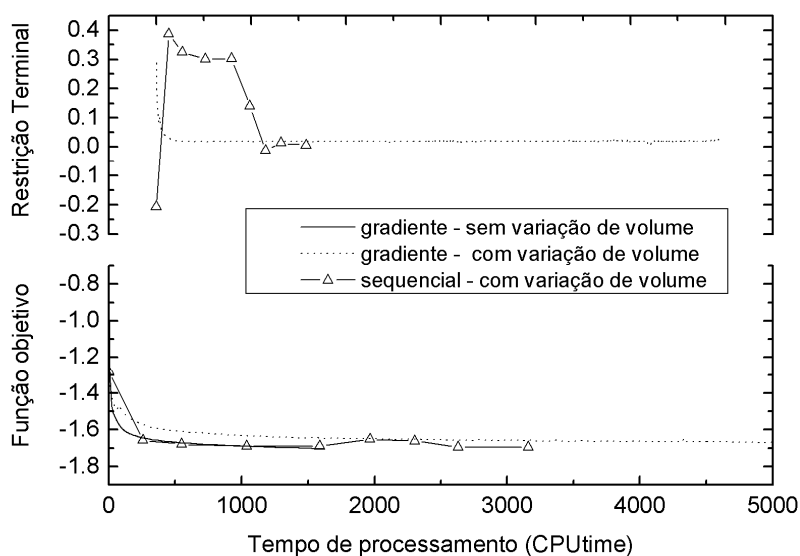


Figura 33 Função objetivo (Equação 59) e restrições terminais para as diversas abordagens em função do tempo de processamento.

Para os casos levados aqui em conta, o método sequencial gerou melhores resultados em termos de minimização da função objetivo e restrições terminais, ainda que se tenha utilizado apenas um número pequeno de parâmetros, θ , e um tipo simples de parametrização (funções lineares). Entretanto, o consumo de tempo computacional para essa

abordagem é altamente dependente do tipo de parametrização e da inicialização do algoritmo de otimização (Srinivasan *et al.*, 2003).

A otimização das concentrações iniciais de substratos (\underline{x}_0) não foi levada a cabo, pois as concentrações ótimas de substratos em t_0 são muito correlacionadas com a velocidade de alimentação inicial de substratos. Portanto, demandaria muito tempo computacional para encontrar ambos, $x_i(t_0)$ e $u_i(t_0)$, caso nenhuma outra restrição seja adicionada, como, por exemplo, uma máxima variação de $u(t)$ no início da reação, i.e., $|du/dt|_{t_0} < u_{\max}^0$. O tempo final é outra variável de decisão comum que foi fixada no presente trabalho. Para utilizar o tempo final como uma variável de decisão, algumas restrições referentes ao tempo da batelada devem ser incorporadas no modelo com o objetivo de tornar o tempo final uma variável com maior influência no resultado da otimização, como por exemplo a incorporação do tempo de descarga, limpeza e recarga do reator. Além disso, a alta viscosidade do meio aquoso-precipitado, que pode ser relacionada com concentração de cristais no reator, pode ser um parâmetro que limita o tempo final de reação.

Nota-se que, embora não tenha sido imposto que $Q_{NaOH}(t)$ seja um valor não-negativo (vide discussão sobre Equação 55, página 101), todos os resultados otimizados geraram vazões volumétricas não negativas (isto é, a adição de ácido não é necessária para o controle do pH). Portanto, embora possam ter sido simuladas reações onde o valor desta variável seja negativo, a convergência dos algoritmos de controle ótimo se deu em região factível.

Em suma, a resolução do problema de controle ótimo para o caso da síntese enzimática de ampicilina utilizando uma cinética simplificada resultou, para todos os métodos utilizados, em estratégias promissoras. Altas conversões de ambos os substratos podem ser obtidas, altos valores da razão C_{Amp}/C_{FG} e alta produtividade foram alcançados em todos os casos. Embora diferentes ótimos locais tenham sido alcançados para cada caso, a mesma

heurística de alimentação de substratos foi encontrada em todos os casos, mesmo para o caso mais simples, onde a variação do volume é desprezada.

Como técnicas de controle ótimo são altamente sensíveis aos modelos utilizados, buscar alimentações ótimas globais é possível apenas diante da posse do conhecimento completo do processo e de sua modelagem exata. Isto é praticamente impossível para o presente, caso onde muitos fatores estão envolvidos: cinética altamente não-linear; efeitos de difusão dentro e fora das partículas – os quais afetam os limites de solubilidade, atividade da enzima e atividade das diferentes espécies carregadas de cada substrato – como consequência de gradientes de concentração; e muitos outros fatores. Contudo, ter boas abordagens heurísticas pode ser uma ferramenta essencial para obter estratégias sub-ótimas. Estas estratégias permitem ter perfis viáveis para iniciar um refinamento do modelo e obter perfis ótimos mais precisos.

5 Automação do Reator Integrado

Como discutido nas seções anteriores, a complexidade da cinética e de todo o sistema da síntese enzimática cineticamente controlada de penicilinas semi-sintéticas em reator semi-contínuo integrado leva à utilização de modelos fenomenológicos simplificados ou modelos empíricos (ou a combinação de ambos) para a descrição desse sistema. A grande desvantagem da utilização desses modelos é a falta de confiabilidade quando utilizados para prever comportamento do sistema fora da região na qual o modelo foi ajustado. Isto é verdade principalmente para o aumento de escala. Quando o processo passa de um reator de bancada para uma unidade piloto, por exemplo, um modelo ajustado para o reator de bancada pode não levar em consideração alguns fenômenos que podem ocorrer em um reator maior. Além disso, o emprego de políticas de controle ótimo obtidas com modelos simplificados, em malha aberta (sem um sistema de controle) pode levar a resultados muito distintos do esperado. Esses fatores levam à necessidade de um sistema de análise do meio reacional em tempo compatível com o processo.

Além disso, a incorporação de um método analítico rápido que possa ser utilizado tanto em processo de bancada, piloto ou unidade industrial, provê dados que podem ser rapidamente comparados com modelos anteriores, validando-os ou não em diferentes escalas. Os dados podem ser utilizados para o monitoramento do reator e para a re-estimativa dos parâmetros do modelo, o que seguramente será necessário no decorrer do aumento de escala até a aplicação da síntese enzimática de ampicilina em reator industrial (1000 litros).

5.1 Análise por Injeção em Fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA)

Procedimentos analíticos empregando análise em fluxo têm sido propostos visando a mecanização de procedimentos analíticos, permitindo substituir com eficácia tarefas previamente executadas pelo analista e aumentar a quantidade de amostras que poderiam ser processadas por unidade de tempo (Leite *et al.*, 2004).

Em procedimentos empregando análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA), alíquotas de amostras são inseridas em uma solução carregadora que as transporta até o equipamento de detecção. Durante o transporte, a amostra pode receber reagentes, sofrer diluições e participar de etapas de separação e concentração. Há diversos exemplos na literatura de monitoramento de reação utilizando FIA (Ferreira, Trierweiler *et al.*, 2004; Inaba *et al.*, 2003).







A análise da composição no decorrer da síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas geralmente é feita utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (ou HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Embora seja um método preciso quantitativamente, para o acompanhamento de reações visando ao controle de processo o método apresenta algumas desvantagens: o tempo de análise (aproximadamente 20 minutos por amostra) não é compatível com a dinâmica do processo (de segundos a minutos); e o aumento da quantidade de amostras é acompanhado pelo aumento na quantidade de resíduos orgânicos gerados (fase móvel é constituída em 30% de acetonitrila). Neste caso, a utilização de um modelo de análise em fluxo, empregando um espectrofotômetro como detector, além de reduzir o tempo de análise, tornando os dados acessíveis mais rapidamente que os métodos clássicos de análise, também contribui para uma menor geração de resíduos orgânicos.

A utilização deste modelo de análise, associado às técnicas de multicalibração, ou calibração multivariada, pode permitir o monitoramento das diferentes espécies de interesse no processo de síntese.

5.2 Esquema de Automação

A Figura 34 mostra o esquema de automação proposto para um reator piloto de síntese enzimática de ampicilina. A nomenclatura utilizada nesta figura pode ser encontrada na Tabela 9. Os equipamentos apresentados podem ser divididos em quatro grupos. O primeiro é constituído pelo microcomputador controlador onde se encontram: uma placa de aquisição, DAQ (PCI6052, *National Instrument*); e uma placa de expansão para saída serial, RS232. Comporta este grupo um condicionador de sinais: Chassi e módulos SCXI da *National Instruments* (SCXI 1102, entrada analógica; SCXI 1124, saída analógica; SCXI 1180, módulo para conexão direta da placa DAQ). Este grupo é responsável pela aquisição, análise, tratamento de dados e controle de todo o processo.

Tabela 9 Nomenclatura utilizada no esquema de automação do reator de síntese enzimática de ampicilina (Figura 34).

	Sinais analógicos de entrada do chassi Sinais analógicos de saída do chassi Sinais digitais Comunicação serial por troca de caracteres em ASCII
	Bomba peristáltica (comunicação analógica)
	Bomba peristáltica (on/off)
	"Caixa de reles com Leds"
	Cubeta de fluxo
	Válvula solenóide

O segundo grupo de equipamentos é constituído pelo reator enzimático onde ocorre a síntese de ampicilina e pelos equipamentos já incorporados a ele (inversor de frequência e controle de temperatura do banho), que se comunicam com o microcomputador através de portas seriais (RS232). O terceiro grupo é constituído pelas bombas de alimentação, reservatórios de substratos, bombas de controle de pH e reservatórios de ácido e base. O quarto e último grupo é composto por sensores e equipamentos para procedimentos de análise. Entre eles a FIA, composta por bombas, válvulas solenóides que separam um volume fixo de amostra, reservatório de água para diluição da amostra e espectrofotômetro. Neste grupo estão, também, os sensores de temperatura e pH (eletrodo).

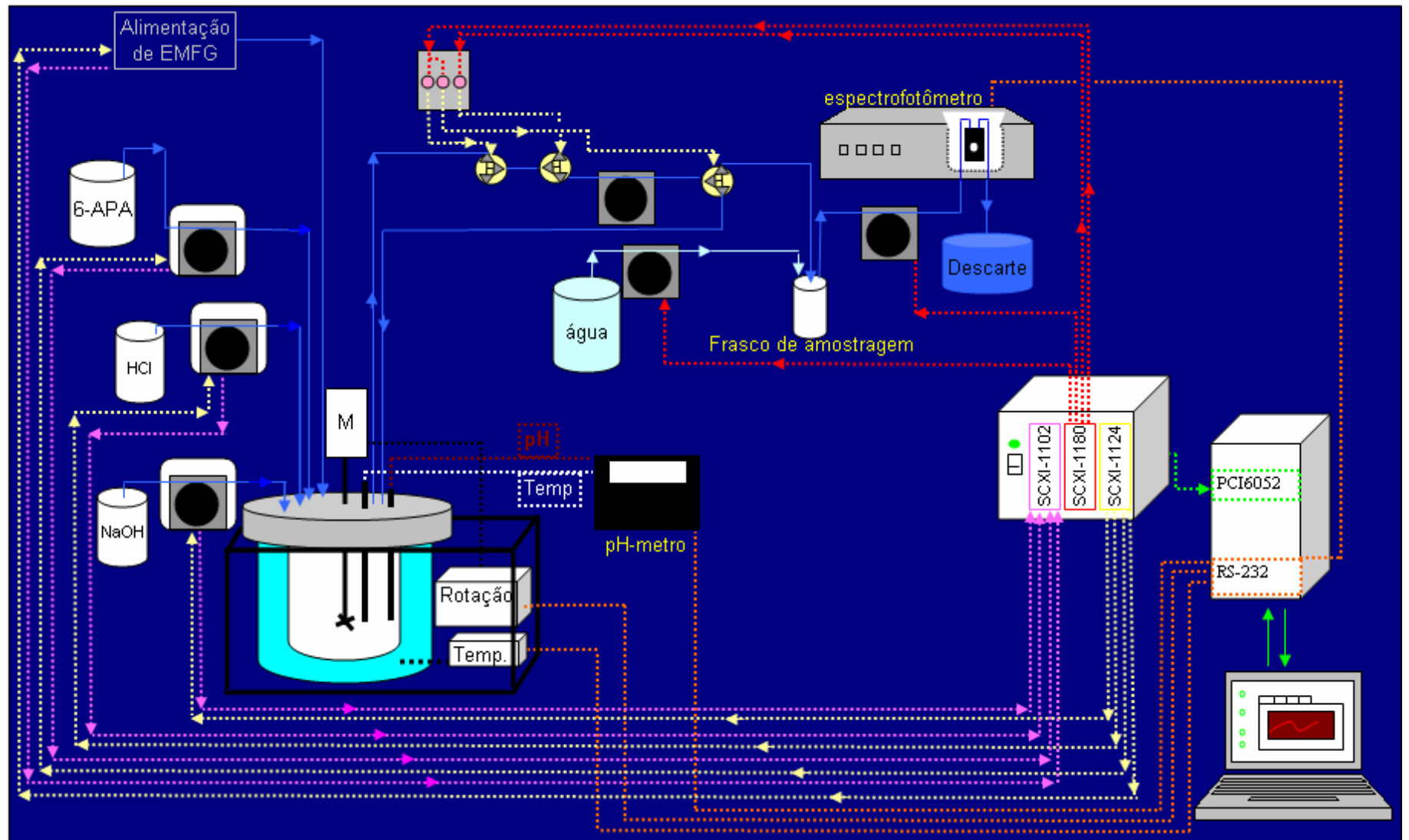


Figura 34 Esquema de Automação do Reator de Síntese Enzimática de Ampicilina Implementado.

5.2.1 Sistema de amostragem e análise de concentrações das espécies de interesse

Entre os vários sistemas utilizados na automação do reator, o de amostragem e análise é seguramente o mais complexo e será o único tratado aqui. Sua complexidade se deve à necessidade de vários equipamentos distintos, cujas ações são interdependentes.

O sistema de amostragem em fluxo e detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta é esquematizado na Figura 35, e é constituído por válvulas solenóides e bomba peristáltica (responsável pela dinâmica do procedimento de análise).

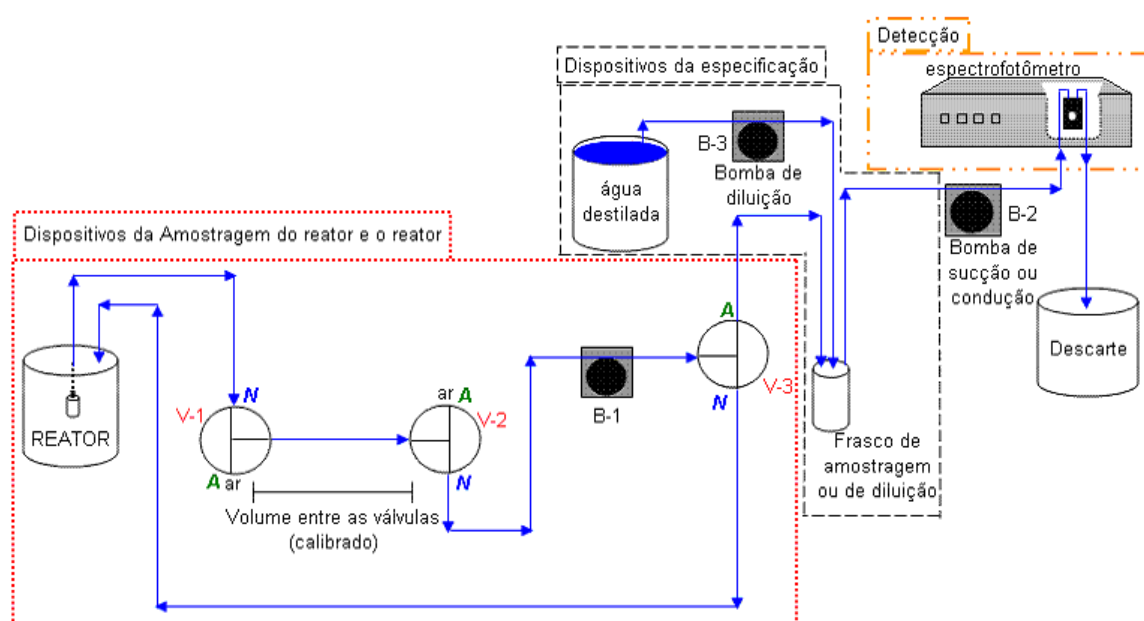


Figura 35 Esquema do sistema de amostragem proposto para o reator automatizado de síntese enzimática de ampicilina. V-i, $i=1,2,3$, denotam válvulas solenóides de três vias. A letra N indica a entrada/saída normal da válvula e a letra A indica a entrada/saída quando a válvula está acionada. B-i, $i=1,2,3$, denotam bombas peristálticas com controle digital liga/desliga. B-1 permanece sempre ligada.

O sistema de amostragem opera em seis etapas distintas, como indicado na Tabela 10. Quando não há amostragem (Etapa 1), a linha de amostragem é mantida em reciclo. Na amostragem (Etapa 2), o reciclo é cessado, a válvula V-2 é acionada e o espaço entre esta válvula e a V-3 é completado com ar. Quando toda linha entre as válvulas V-2 e V-

3 estiver vazia (tempo conhecido a partir de calibrações), as válvulas V-1 e V-3 são acionadas e a válvula V-2 colocada em posição normal, assim, o volume amostral (entre as válvulas V-1 e V-2) é então conduzido até o frasco de diluição (Etapa 3). Assim, apenas o volume (calibrado) que estiver entre as válvulas V-1 e V-2 irá para o frasco de diluição. Quando a alíquota de amostra alcançar o frasco de diluição, as válvulas solenóides voltam na posição de reciclo do reator. À amostra é adicionada solução de diluição (água ou tampão) até que a razão de diluição seja alcançada (Etapa 4). A solução do frasco de diluição permanece em constante agitação, por meio de agitador magnético. Quando a diluição é finalizada, a bomba B-3 é desligada e a B-2 ligada, e solução do frasco de diluição é conduzida ao espectrofotômetro (Etapa 5). O monitoramento de um comprimento de onda é realizado até que sua absorvância esteja constante. O fluxo, então é cessado, e o espectrofotômetro varre o espectro UV da amostra. Após o término da aquisição dos dados do espectrofotômetro, implementou-se uma etapa de limpeza do recipiente de diluição, com o intuito de minimizar possíveis contaminações nas análises subsequentes (Etapa 6). Ao final da lavagem, o sistema passa à Etapa 1, em espera até a próxima amostragem.

Tabela 10 Esquema das etapas do sistema de amostragem. Válvulas (*V-i*) e Bombas (*B-i*) referentes à Figura 35. **N** indica estado normal da válvula e **A**, seu estado acionado. **F** indica o estado fechado (ou desligado) da bomba e **A**, seu estado acionado (ou ligado).

<i>Etapa</i>	<i>V-1</i>	<i>V-2</i>	<i>V-3</i>	<i>B-1</i>	<i>B-2</i>	<i>B-3</i>
1 <i>Reciclo do reator</i>	N	N	N	A	F	F
2 <i>Esvaziamento da linha</i>	N	A	N	A	F	F
3 <i>Condução da amostra</i>	A	N	A	A	F	F
4 <i>Diluição da amostra</i>	N	N	N	A	F	A
5 <i>Condução da amostra ao espectro fotômetro</i>	N	N	N	A	A	F
6 <i>Lavagem do frasco e linha de condução</i>	N	N	N	A	A	A

É importante mencionar que um esquema onde um fluxo contínuo de amostra fosse conduzido até o espectrofotômetro poderia ser utilizado. Tal abordagem poderia simplificar o sistema de amostragem, evitando assim problemas de implementação comuns como erros de diluição e entrada de bolhas. Contudo, outros problemas seriam gerados. Por exemplo, uma abordagem seria adicionar constantemente (em vazão pré-estabelecida) amostras do reator no frasco de amostragem (Figura 35). A razão de diluição seria dada pela diferença de vazão das bombas B-1 e B-3. Uma vazão onde a amostra poderia ser assumida como contínua poderia afetar o desempenho do reator de bancada, pois uma alta porcentagem do volume reacional seria desperdiçada para a análise. Este obstáculo, contudo, poderá ser desprezível em reator industrial devido a seu alto volume reacional, podendo esta abordagem ser utilizado nesse caso. Outro exemplo seria manter um fluxo de água constante através do espectrofotômetro e em tempos determinados a amostragem ser realizada. Esta abordagem tem uma implicação importante no momento da detecção do espectro UV. A difusão axial da amostra durante o trajeto até o espectrofotômetro implica a adição de mais uma variável na multicalibração, o tempo. O detector deverá fazer varreduras contínuas de maneira que superfícies de espectro versus tempo sejam adquiridas. Utilizando esta abordagem, a calibração multicomponente se torna mais complexa, e deve ser feita já em fluxo.

5.3 Multicalibração

A aplicação de técnicas de quantificação simultânea de múltiplos analitos em uma mesma amostra através de métodos de calibração multicomponente (ou multicalibração) tem crescido rapidamente e ganhado popularidade. Uma de suas maiores vantagens é que geralmente nenhum procedimento de separação ou tratamento da amostra é necessário (Andrade *et al.*, 2003).

A maioria dos métodos utilizados de calibração multicomponente é baseada na lei de Lambert-Beer, isto é, na dependência linear entre a concentração de um analito e sua absorvância num determinado comprimento de onda específico. Os métodos de multicalibração mais utilizados são: inversa dos mínimos quadrados (*inverse least-squares*, ILS), também conhecido como regressão linear múltipla (*multiple linear-regression*, MLR), regressão de componentes principais (*principal component regression*, PCR) – análise de componentes principais (*principal component analysis*, PCA) seguida por um passo de regressão (Haaland e Thomas, 1988) – e mínimos quadrados parciais (*partial least-squares*, PLS) (Araújo *et al.*, 2001, Haaland e Thomas, 1988). O método de regressão múltipla, MLR, é o mais simples de aplicar e o mais fácil de interpretar. Entretanto, seu desempenho é fortemente dependente em uma boa escolha de variáveis espectrais. Araújo *et al.*, 2001, apresentam uma lista de métodos propostos na literatura para a seleção de variáveis para calibração multicomponente e propõe um algoritmo de projeção sucessiva (*successive projection algorithm*, SPA) como uma nova estratégia de seleção de variáveis.

5.3.1 Espectrofotometria UV-Vis

De modo simplificado, o espectrofotômetro é um conjunto emissor/sensor de luz capaz de quantificar a absorvância de uma amostra. Em análises por espectrofotometria podem-se identificar duas grandezas: transmitância e absorvância. A transmitância é definida por:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (72)$$

onde I é a intensidade de luz transmitida e I_0 , a incidente. Para a análise é necessário tomar uma amostra em “branco” como padrão, uma amostra bem definida, a partir da qual se considerará $T = 1$. A absorvância depende do caminho óptico (L), da do analito e de sua concentração na solução de análise (c), o que pode ser resumida pela lei de Lambert-Beer:

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot L \cdot c \quad (73)$$

onde ε é a absorvidade do analito (ou coeficiente de absorção molar). Deste modo, a absorvância (A) é relativa a uma substância conhecida (branco), padronizando-se como o marco zero de absorvância para as análises. Na análise, geralmente utiliza-se um caminho óptico constante, característico da cubeta empregada. Na maioria dos casos observa-se uma linearidade entre a resposta de absorvância e a concentração do analito, como previsto pela lei de Lambert-Beer. Entretanto, ela só é válida para certas faixas de concentração. A partir de uma determinada concentração (dependente do analito) ocorrem desvios da linearidade.

O coeficiente de absorção molar varia com o comprimento de onda da luz incidente, com a temperatura e o solvente da solução (já que o mesmo pode ter uma absorvância característica). Portanto, para o mesmo analito obtêm-se absorvâncias diversas, dependendo, por exemplo, do comprimento de onda utilizado. O comprimento de onda no qual um composto absorve mais intensidade luminosa é denominado λ máximo (λ_{\max}). Cada substância possui um λ_{\max} característico e para se obter uma maior sensibilidade e minimizar desvios da lei de Lambert-Beer as medidas analíticas são, geralmente, realizadas neste comprimento de onda.

5.3.2 Modelos para Multicalibração em Espectrofotômetro

Modelo dos Mínimos Quadrados Clássico (Classical Least Square - CLS)

Em notação matricial¹, o modelo a ser ajustado que deriva diretamente da formulação da lei de Lambert-Beer, onde m amostras de calibração, n comprimentos de onda discretos e l componentes são utilizados é:

$$\mathbf{A} = \mathbf{CK} + \mathbf{E}_A \quad (74)$$

¹ Matrizes aqui são denotadas por letras maiúsculas em negrito e vetores por letras minúsculas em negrito.

onde \mathbf{A} é uma matriz $m \times n$ da resposta do instrumento (espectro de calibração), \mathbf{C} é a matriz de concentrações dos componentes cuja dimensão é $m \times l$, \mathbf{K} é a matriz de parâmetros de dimensão $l \times n$ (produto da absortividade molar do componente puro pelo caminho óptico). \mathbf{E}_A é a matriz de dimensão $m \times n$ que denota os erros no espectro não ajustados pelo modelo. O melhor valor para a matriz \mathbf{K} (\mathbf{K}_{opt}) pode ser calculado reduzindo-se o erro quadrado médio através da clássica solução dos mínimos quadrados:

$$\mathbf{K}_{\text{opt}} = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{A} \quad (75)$$

onde as concentrações de uma amostra podem ser preditas (\mathbf{c}_{pred}) usando novamente a solução de mínimos quadrados:

$$\mathbf{c}_{\text{pred}} = \mathbf{a} \mathbf{K}_{\text{opt}}^T (\mathbf{K}_{\text{opt}} \mathbf{K}_{\text{opt}}^T)^{-1} \quad (76)$$

Observe que \mathbf{c}_{pred} e \mathbf{a} são vetores linha de dimensões $1 \times l$ e $1 \times n$ respectivamente. Este método é chamado de mínimos quadrados clássico (*classical least-squares*, CLS) e de acordo com Haaland e Thomas, 1988, sua maior desvantagem na predição de concentrações está na necessidade do conhecimento de todos os componentes químicos presentes (incluindo componentes interferentes) e a calibração destes na região espectral de interesse.

Modelo de Regressão Linear Múltipla (Multiple Linear Regression - MLR)

Uma maneira de melhorar a precisão da predição do vetor de concentrações é utilizar o modelo inverso da lei de Beer:

$$\mathbf{C} = \mathbf{A} \mathbf{P} + \mathbf{E}_C \quad (77)$$

onde \mathbf{P} é a matriz $n \times l$ de coeficientes a ser ajustada e \mathbf{E}_C é a matriz $m \times l$ que denota os erros de calibração não ajustados pelo modelo. Note que uma matriz \mathbf{P} ótima minimiza o erro das concentrações no passo de calibração e é mais preciso na predição de \mathbf{C} que o termo $\mathbf{K}_{\text{opt}}^T (\mathbf{K}_{\text{opt}} \mathbf{K}_{\text{opt}}^T)^{-1}$ (Equações 75 e 76). Este método é chamado de regressão linear múltipla

(*multiple linear regression*, MLR) e sua maior vantagem é que, se as colunas de \mathbf{E}_C forem independentes, a análise de cada analito pode ser feita separadamente como descrito abaixo:

$$\mathbf{c} = \mathbf{A}\mathbf{p} + \mathbf{e}_C \quad (78)$$

onde \mathbf{c} é o vetor $m \times 1$ com concentrações de apenas um componente e \mathbf{e}_C , o vetor de erro residual nos valores de concentração não ajustados pelo modelo. O vetor \mathbf{p} ($n \times 1$) pode ser otimizado utilizando mínimos quadrados durante o passo de calibração

$$\mathbf{p}_{\text{opt}} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{c} \quad (79)$$

e a concentração do componente de interesse é dada por:

$$\mathbf{c}_{\text{pred}} = \mathbf{a}\mathbf{p}_{\text{opt}} \quad (80)$$

Portanto, utilizando MLR, uma análise espectral quantitativa pode ser realizada, mesmo se a concentração de apenas um componente for conhecida na mistura de calibração. Entretanto, os componentes não incluídos na análise devem estar presentes e devem ser implicitamente modelados durante a calibração. A maior desvantagem deste método é que a matriz que deve ser invertida na $(\mathbf{A}^T \mathbf{A})$, Equação 79) tem dimensão $n \times n$; contudo, seu posto (*rank*) não excede m . Isto é, o número de comprimentos de onda utilizados na matriz \mathbf{A} não pode exceder o número de amostras utilizadas na calibração. Além disso, problemas de co-linearidades podem aparecer quando um grande número de comprimento de ondas é utilizado (mesmo que $n < m$) e então a matriz a ser invertida pode também estar mal condicionada. Com o objetivo de contornar este problema, muitas abordagens e técnicas têm sido utilizadas. Geralmente, essas abordagens podem ser arranjadas em dois grupos: aquelas que reduzem a singularidade de $\mathbf{A}^T \mathbf{A}$ ao selecionar comprimentos de onda (colunas de \mathbf{A}) específicos em vez de utilizar todo o espectro (Araújo *et al.*, 2001); e aquelas que tratam todo o espectro em um novo sistema de coordenadas (PCR e PLS) e então reduzem o número de entradas (geralmente chamadas variáveis latentes) do modelo.

Modelo linear a partir da primeira-derivada do espectro

Informações da primeira derivada do espectro em relação ao comprimento de onda em vez da utilização direta do espectro de absorbância podem ser utilizadas para melhorar o desempenho da multicalibração em alguns casos (Abbaspour e Mirzajani, 2005). Uma das vantagens do uso da derivada espectral é que uma translação na linha de base entre a calibração e a análise não altera o desempenho do modelo. A partir da Equação 74 o modelo de Lambert-Beer utilizando a primeira derivada se torna:

$$\mathbf{A}_\lambda = \mathbf{C}\mathbf{K}_\lambda + \mathbf{E}_{A\lambda} \quad (81)$$

onde a j -ésima coluna de \mathbf{A}_λ é definida como $[\partial A/\partial \lambda]_{\lambda_j}$ e \mathbf{K}_λ é a nova matriz de parâmetros.

Note que a Equação 81 pode ser derivada quantas vezes \mathbf{A} for diferenciável em λ . Seguindo os mesmos passos que foram utilizados na geração do modelo MLR, obtém-se:

$$\mathbf{c} = \mathbf{A}_\lambda \mathbf{u} + \mathbf{e}_C \quad (82)$$

Portanto, a Equação 82 é similar à Equação 78 e o vetor de parâmetros \mathbf{u} pode ser ajustado da mesma forma que \mathbf{p} na Equação 79.

Algoritmo de Projecção Sucessiva (SPA)

O algoritmo de projecção sucessiva (*successive projection algorithm*, SPA) é um método de seleção progressiva que consiste em selecionar ns colunas minimamente redundantes da matriz \mathbf{A} (Araújo *et al.*, 2001). Começando de uma coluna denotada por \mathbf{a}_0 , o método determina qual das colunas remanescentes tem a maior projecção no subespaço S_0 ortogonal a \mathbf{a}_0 (vide Figura 36). Portanto, se as colunas de \mathbf{A} forem normalizadas em vetores unitários, o SPA determina a coluna que tem o maior ângulo em relação a \mathbf{a}_0 . A coluna selecionada, denotada \mathbf{a}_1 , pode ser considerada como a que contém a maior quantidade de informação não incluída em \mathbf{a}_0 . Na próxima iteração, SPA se restringe ao subespaço S_0 , tomando \mathbf{a}_1 como a nova coluna de referência e repetindo o procedimento até que um valor escolhido (ns) de colunas tenha sido selecionado. Note que a cada iteração, uma dimensão do

subespaço de análise S_i é removido. Assim, após m iterações, os vetores colunas se reduzirão a pontos de dimensão zero (Dantas *et al.*, 2004). Portanto, o número de colunas ns não pode exceder o número m de amostras utilizadas na calibração.

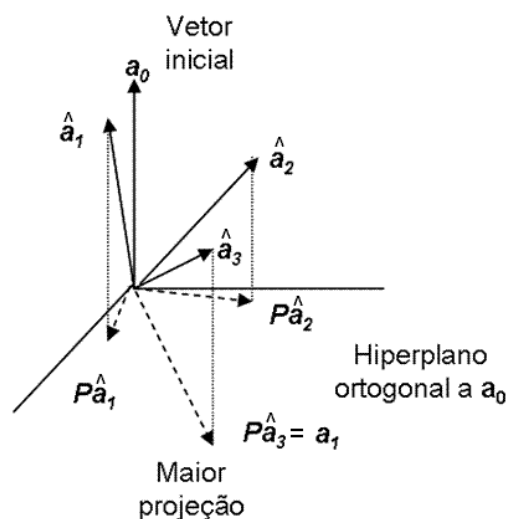


Figura 36 Esquema geométrico de um passo do algoritmo de projeção sucessiva, SPA.

Como mencionado anteriormente, SPA não altera a matriz de absorvâncias \mathbf{A} , mas seleciona ns comprimentos de onda pouco correlacionados (colunas de \mathbf{A}). Encontrar o melhor número de comprimentos de onda (ns) e a primeira coluna a ser utilizada neste procedimento (\mathbf{a}_0) pode não ser uma tarefa fácil. Uma estratégia a ser utilizada é variar a coluna inicial e o número ns , então comparar os resultados, por exemplo, utilizando a raiz quadrada da média do quadrado do erro de validação em um procedimento utilizando dados de ajuste e validação.

Regressão de componentes principais (*principal component regression*, PCR)

A análise de componentes principais (*principal component analysis* PCA) é uma técnica de redução de dimensionalidade e uma ferramenta para seleção não supervisionada de regressores que tornam possível abandonar entradas irrelevantes (Nelles, 2001). Ao usar PCA, a matriz \mathbf{A} é projetada em um novo conjunto de eixos de coordenadas ortogonais calculadas de tal forma que a variância dos dados seja maximizada ao longo destes

eixos. Então, as direções relacionadas às maiores variâncias (comportamento linear sistemático do conjunto de pontos) são usadas no modelo e as direções com as menores variâncias são descartadas (relacionadas a ruídos). Na regressão de componente principal, PCR, a matriz de projeção, \mathbf{B} , gerada pelo PCA é usada no lugar da matriz \mathbf{A} original

$$\mathbf{c} = \mathbf{B}\mathbf{v} + \mathbf{e}_C \quad (83)$$

onde \mathbf{v} é o vetor $ns \times 1$ de parâmetros. \mathbf{B} pode ser calculado por:

$$\mathbf{B} = \mathbf{A}\mathbf{Q} \quad (84)$$

onde \mathbf{Q} é a matriz $ns \times n$ ($ns < n$) cujas colunas são os primeiros ns autovetores associados aos ns maiores autovalores de \mathbf{A} . \mathbf{B} é a matriz $m \times ns$ da projeção de \mathbf{A} em \mathbf{Q} . Observe que, também neste método, o melhor número de regressores (entradas, ns) do modelo deve ser encontrado. Vale notar que se todos os n autovetores forem utilizados na matriz \mathbf{Q} , o modelo se reduz ao MLR sem seleção de entradas.

Mínimos quadrados parciais (*partial least squared, PLS*)

O método de mínimos quadrados parciais (PLS) é uma técnica recente que generaliza e combina características da análise de componentes principais (PCA) e regressão múltipla. Contudo, se diferencia do método PCR. Tanto o método SPA quanto o PCR têm a desvantagem de seu critério de relevância para cada entrada estar baseado nos dados de entrada (\mathbf{A}) apenas. Isto é, em alguns casos, estes métodos podem descartar entradas que são relevantes em relação aos dados de saída (\mathbf{C}) e importantes no desempenho do modelo. Em PLS, ambas as matrizes, \mathbf{C} e \mathbf{A} , são decompostas em um conjunto de eixos ortonormais onde a covariância é maximizada. Isto é:

$$\mathbf{t} = \mathbf{A}\mathbf{w} \quad (85)$$

$$\mathbf{u} = \mathbf{C}\mathbf{x}$$

onde, $\mathbf{w}^T\mathbf{w} = 1$, $\mathbf{t}^T\mathbf{t} = 1$ e $\mathbf{t}^T\mathbf{u}$ é maximizado.

5.4 Procedimento experimental: Multicalibração

Com o objetivo de obter informações iniciais sobre os espectros característicos de cada componente presente na síntese enzimática de ampicilina e estabelecer uma região propícia de trabalho (região de comprimentos de onda e concentrações), uma análise prévia da calibração de cada componente em solução foi realizada. Vários modelos (todos lineares) foram usados para o procedimento de multicalibração: SPA, PCR e PLS. Tanto o espectro de absorvância quanto sua primeira derivada em relação ao comprimento de onda foram utilizados como matriz de dados. Dois valores de pH foram utilizados. Primeiramente, por ser o pH de reação, escolheu-se o valor de 6,5 para a multicalibração. Contudo, para se obter uma maior diferença entre os espectros característicos do EMFG e da FG, foi avaliado pH 5,5 (vide seção 5.5.4).

5.4.1 Materiais e métodos utilizados

Espectrofotômetro UV-Vis Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) foi utilizado em todas as análises de varredura. Os dados de absorvância foram obtidos no intervalo entre 190 e 400 nm com 1 nm de resolução com cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico.

Éster metílico de fenilglicina, EMFG (Aldrich), 6-APA (Winlab), ampicilina (Winlab), fenilglicina, FG (Aldrich). Todos os reagentes são de grau analítico.

Os algoritmos para cálculos dos diferentes modelos foram implementados em Matlab[®] 6.5. SPA segue o procedimento proposto por Araújo *et al.*, 2001. Os cálculos da matriz de autovetores e o cálculo dos autovalores, para aplicação no PCR, foram realizados utilizando funções existentes no Matlab. O algoritmo PLS foi implementado seguindo o procedimento proposto por Haaland e Thomas, 1988.

Em multicalibração a pH 6,5, o ajuste do pH se deu com hidróxido de sódio. Em multicalibração utilizando pH 5,5, tampão fosfato, 0,1 M foi utilizado para a diluição das amostras.

5.4.2 Análise da multicalibração

Dois conjuntos de amostras foram utilizados na calibração multicomponente. O primeiro conjunto foi obtido por meio de um procedimento fatorial 2^4 (16 amostras) (Barros *et al.*, 2003), onde os níveis “-“ e “+” correspondem a um quarto do limite inferior e superior das concentrações dos componentes puros dentro da região linear respectivamente (vide Tabelas 11 e 15 nas páginas 137 e 149). O segundo conjunto de amostras (com 16 amostras) foi obtido com uma seleção aleatória de concentrações dentro da região linear. Assim, a quantidade de dados utilizados na multicalibração foi de 32 espectros em cada pH. A derivada do espectro em relação ao comprimento de onda foi obtida por meio de diferenças depois de aumentar o número de pontos de absorbância através de interpolação por *spline* cúbica.

Na análise computacional, as concentrações de cada analito foram normalizadas entre 0 e 1. A normalização utilizada no ajuste dos modelos se diferencia um pouco da utilizada na escolha dos comprimentos de onda pelo método SPA. Neste último, a normalização foi feita pela norma euclidiana, em que cada elemento da matriz de absorbâncias é dividido pela norma da coluna. A normalização da matriz absorbância (ou da primeira derivada do espectro) só foi utilizada na escolha dos regressores de SPA. A matriz utilizada na regressão não sofreu nenhuma alteração, isto é, a matriz **A** de dados está sempre em unidades de absorbância.

Do conjunto total de amostras, três aleatoriamente selecionadas não foram utilizadas no procedimento de ajuste. O conjunto restante de amostras foi utilizado em procedimento de validação cruzada, deixando uma amostra fora do ajuste de cada vez (*leave one out* – Nelles, 2001). Então, todos os modelos foram comparados utilizando a raiz

quadrada do erro quadrado médio da validação (*root-mean-square error of validation*, RMSEV) que é uma aproximação do desvio padrão do erro de validação e neste trabalho é definido para cada componente como:

$$RMSEV^{(i)} = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{k=1}^m (c_k^{(i)} - \hat{c}_k^{(i)})^2} \quad (86)$$

onde $c_k^{(i)}$ e $\hat{c}_k^{(i)}$ são os valores de referência e preditos das concentrações do analito i na k -ésima amostra de validação e m é o número de amostras usadas na validação-cruzada. Observe que o RMSEV é a definição do desvio padrão *populacional* aplicado ao erro de validação e utilizado aqui como uma aproximação do desvio padrão *amostral*.

5.5 Discussão dos resultados obtidos na multicalibração

5.5.1 Análise de soluções aquosas monocomponente.

Uma calibração prévia (em pH 6,5) foi construída para cada componente (AMP, 6-APA, FG e EMFG) e uma predição aproximada da região linear de cada componente foi obtida (Figura 37A). Embora o metanol seja produzido pela síntese enzimática de ampicilina ao utilizar um éster como derivado do doador acil e, portanto, está presente no meio reacional, sua absorvidade molar é muito baixa. Assim, o metanol não apresenta espectros de absorção dentro da faixa de região estudada. Uma análise prévia da calibração de cada componente mostrou algumas características do espectro:

- a) embora a absorvidade molar de todos os componentes de interesse aumente em menores valores de comprimentos de onda ($\lambda < 230$ nm), há grandes sobreposições de espectros nesta região.
- b) diferenças mais significativas entre os espectros estão presentes entre 240 e 270 nm.

b) baixa absorptividade pode ser notada para todos os componentes de interesse após 270 nm (Figura 37B).

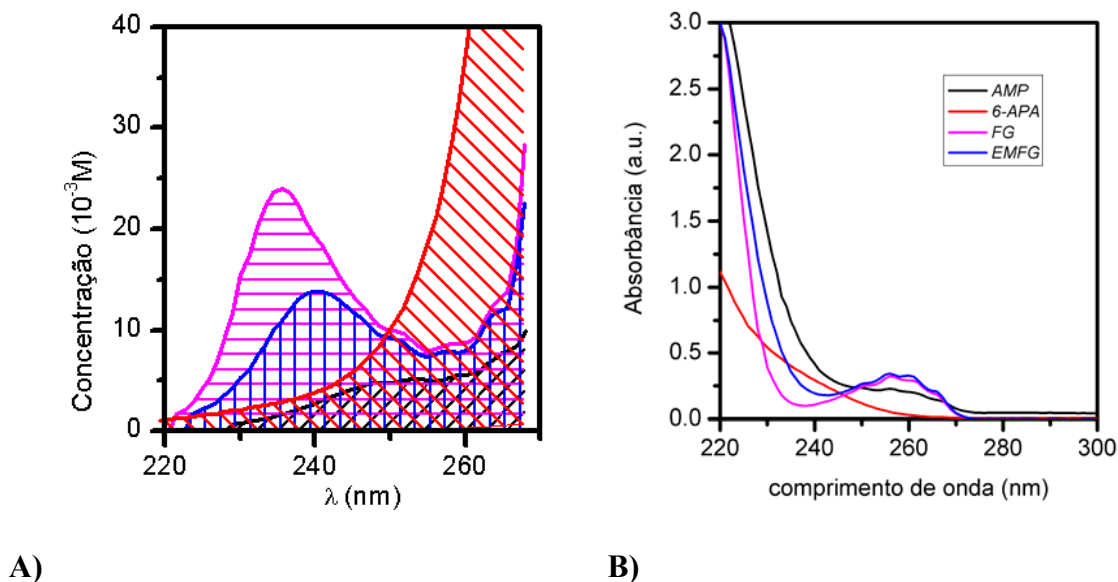


Figura 37 A) Região cuja absorbância não ultrapassa 1,5 a.u. (uma aproximação da região linear onde é válida a lei de Lambert-Beer) para cada componente puro como função da concentração e comprimento de onda. Legenda: ampicilina (/); 6-APA (\); FG (-); EMFG, (|). B) Espectro característico de cada componente.

Portanto, a região entre 240 a 270 nm foi escolhida como região de trabalho.

Embora a região seja pequena (31 comprimentos de onda discretos), o uso de comprimentos de onda abaixo de 240 nm implicaria uma grande redução nas concentrações dos analitos nas amostras. Isto é, uma grande diluição das amostras do reator deve ser realizada com o objetivo de manter a concentração dentro de um domínio linear de análise (Figura 37A). Note que quanto maior a área na Figura 37A, menor é a absorptividade molar do componente na região de comprimento de onda. Conseqüentemente, as baixas concentrações reduziram a sensibilidade da leitura dentro da região onde se apresenta maior diferença espectral (240-270nm). Contudo, como pode ser visto na Figura 37B, nota-se claramente que os espectros característicos da FG e do EMFG são muito similares dentro da região escolhida. Isto reflete a similaridade entre essas moléculas e torna a análise multicomponente desse sistema uma tarefa difícil.

Em termos de concentração, nestas condições estabelecidas (240 a 270 nm), a região linear está aproximadamente entre $0,7$ e $3,5 \times 10^{-3}$ M para ampicilina, $0,6$ e $3,0 \times 10^{-3}$ M para 6-APA e $1,6$ e $8,0 \times 10^{-3}$ M para FG e EMFG quando apenas componentes puros estão presentes. Estas concentrações foram levadas em conta no procedimento fatorial.

5.5.2 Análise multicomponente (pH 6,5).

SPA, PCR e PLS foram aplicados aos dados de absorbância e à sua derivada em relação ao comprimento de onda. Os espectros obtidos para as 32 amostras utilizadas estão apresentados na Figura 38. Os limites de concentração de cada componente, descrito na Tabela 11, foram escolhidos de tal forma que as absorbâncias estivessem na região linear do espectro. A Figura 38 mostra também a primeira derivação do espectro utilizado em regressão múltipla.

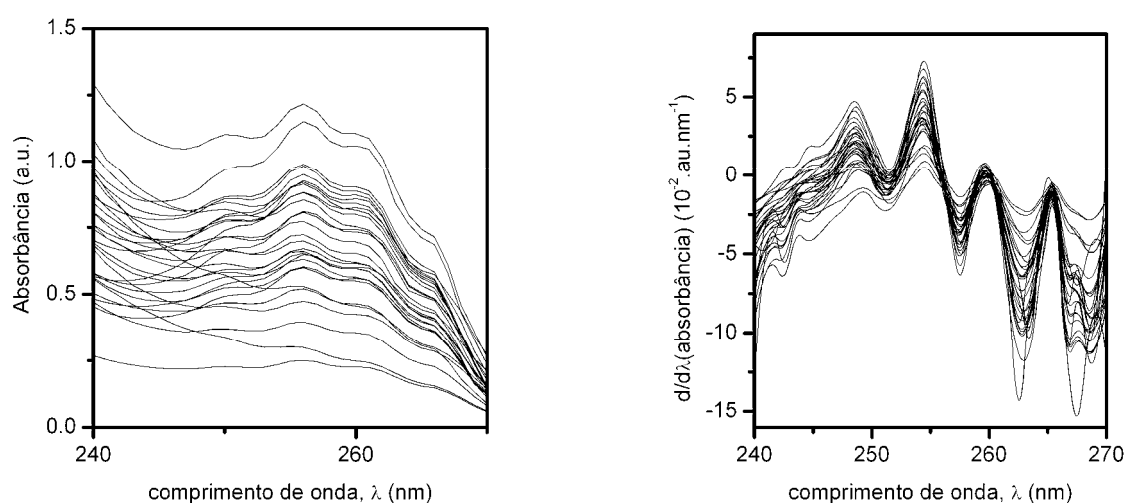


Figura 38 Espectros de amostras provenientes do procedimento fatorial utilizadas na calibração multicomponente (ampicilina, 6-APA, fênilglicina e EMFG). À direita, o espectro das absorbâncias e à esquerda a primeira derivada do espectro UV em relação a λ .

Tabela 11 Limites de concentração utilizados na multicalibração (pH 6,5).

<i>Limite</i>	<i>Concentração / 10⁻³M</i>			
	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>
<i>Superior</i>	0,875	0,75	2,0	2,0
<i>Inferior</i>	0,175	0,15	0,40	0,40

Ao invés de variar ambos, o comprimento inicial escolhido (\mathbf{a}_0) e o número de regressores (ns), e então aplicar o passo de regressão para todas as múltiplas escolhas em SPA, uma análise prévia de \mathbf{a}_0 foi feita. Variando \mathbf{a}_0 para todo o intervalo de comprimentos de onda, de 240 a 270nm, verificou-se que em todos os conjuntos de comprimentos de onda selecionados pelo algoritmo (ns de 4 a 31), o comprimento de onda correspondente a 270 nm esteve sempre presente. Então, a coluna referente a este comprimento de onda foi escolhida como a primeira coluna utilizada (\mathbf{a}_0) no SPA, economizando tempo de análise e esforço computacional. O mesmo ocorreu para a matriz da derivada do espectro mas, neste caso, o comprimento de onda resultante foi 260 nm.

A Figura 39 mostra os resultados obtidos para a ampicilina em validação cruzada utilizando o espectro de absorbância como entradas do modelo. Nos gráficos, as abscissas foram limitadas a 25 regressores em todos os métodos. Isto foi feito porque o mal condicionamento da matriz $\mathbf{A}^T\mathbf{A}$ aumenta muito o erro de validação quando o número de regressores se aproxima do número de ensaios utilizados.

Há uma pequena diferença na velocidade com que o RMSE de validação tende a seu mínimo para cada método. PCR usa regressores (entradas) que são combinações lineares dos dados. Como os primeiros regressores do PCR tendem a descrever a maior parte da variância dos dados, este método tende a ter melhores desempenhos que o SPA quando apenas algumas entradas são usadas (valores baixos de ns). PLS, por outro lado, usa combinações lineares não apenas para as absorbâncias, mas também para os dados de concentrações (saídas do modelo), o que aumenta ainda mais o desempenho do modelo quando o número de regressores, ns , é reduzido. Entretanto, apesar das diferenças no número ótimo de regressores, todos os modelos tiveram um desempenho similar na validação cruzada para todos os componentes, como mostra a Tabela 12.

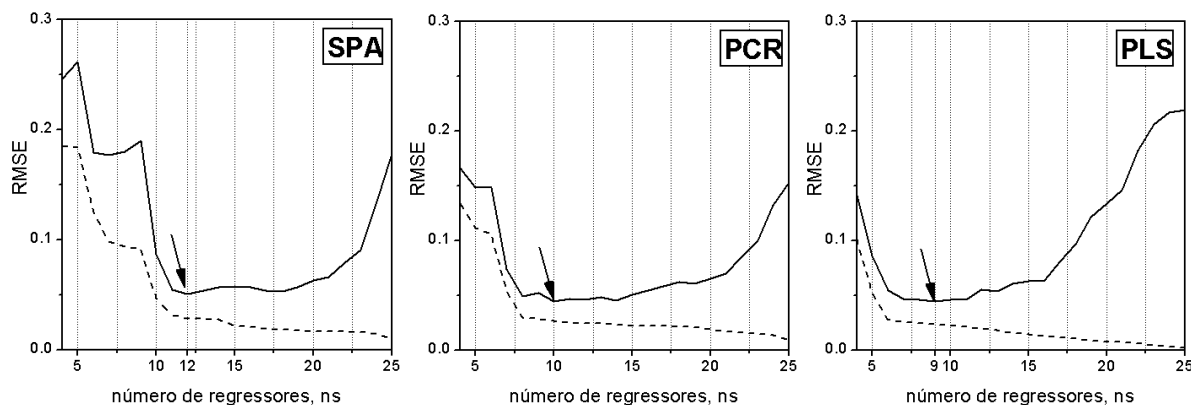


Figura 39 Resultados obtidos na validação cruzada dos modelos de calibração multicomponente para a ampicilina. Os gráficos mostram a raiz quadrada do erro quadrado médio (*root-mean-square error*, *RMSE*, Equação 86) de ajuste (---) e validação (—) em função do número de regressores. Os valores de *RMSE* apresentados nos gráficos são adimensionais. Isto é, estão divididos pela concentração máxima usada para ampicilina. As setas mostram o mínimo do erro de validação. pH 6,5.

Os resultados obtidos (Figura 39) mostram que as curvas de erro de ajuste e validação seguem um comportamento típico. Isto é, aumentando o número de regressores, o modelo se torna mais complexo (mais flexível) o que lhe permite descrever melhor o comportamento dos dados que estão sendo utilizados para o seu ajuste. Dessa forma, o erro do modelo em relação aos dados de ajuste tende a diminuir monotonicamente com o aumento do número de variáveis de entrada. Contudo, com o aumento dessa “flexibilidade”, o modelo tende a ajustar ruídos externos que não correspondem ao comportamento intrínseco do sistema. Isto leva a um sobre-ajuste (*overfitting*) dos dados. O erro de validação (erro do modelo frente a dados novos, não utilizados no ajuste de seus parâmetros) decresce até um mínimo e depois começa a subir, evidenciando que a redução do erro de ajuste (a partir deste ponto) não mais reduz o erro sistemático do modelo (comportamento) e sim a variância do ruído. O ponto de mínimo erro de validação, embora não indique o melhor modelo entre todos os possíveis, indica o melhor modelo para a classe estudada (modelo linear, por exemplo).

Os melhores resultados na validação cruzada, com erros em unidades de concentração, e o número de regressores para cada método, estão expostos na Tabela 12. A utilização da primeira derivada do espectro de absorvância não melhorou o desempenho de

predição do modelo em qualquer dos métodos abordados aqui. Isso se deve aos erros adicionados que resultam ao se aproximarem derivadas de absorbâncias por diferenças finitas. Entretanto, estes resultados foram obtidos usando espectros onde a linha de base foi bem controlada. Assim, se a linha de base (por alguma razão) for transladada, o desempenho do modelo utilizando dados de absorbância pode ser pior que o obtido para os modelos utilizando dados de derivada. Contudo, como um bom controle da linha de base não é muito difícil de se obter, este pode ser um melhor procedimento que utilizar um modelo com derivadas.

Tabela 12 Valor mínimo de $RMSEV$ (Equação 86) obtido na validação cruzada de cada modelo e o número de regressores utilizados. Sobrescrito ⁽⁰⁾ indica o uso do espectro de absorbância e ⁽¹⁾ sua derivada. pH 6,5.

<i>Modelo</i>	<i>RMSEV / 10⁻³ M</i>				<i>Número de regressores, ns</i>			
	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>
SPA⁽⁰⁾	0,045	0,026	0,055	0,093	12	18	16	16
PCR⁽⁰⁾	0,039	0,021	0,057	0,084	10	14	13	13
PLS⁽⁰⁾	0,039	0,025	0,056	0,087	09	12	09	09
SPA⁽¹⁾	0,073	0,069	0,204	0,118	09	20	09	14
PCR⁽¹⁾	0,057	0,040	0,190	0,101	14	21	22	12
PLS⁽¹⁾	0,049	0,035	0,176	0,104	14	16	08	10

A avaliação final de cada modelo foi feita na predição de amostras cujos dados não foram utilizados na validação cruzada. Como mostrado na Figura 40, comprova-se que a diferença no desempenho entre os métodos SPA, PCR e PLS é pouco relevante. Devido à utilização de apenas três dados de teste, o valor de RMSET (*root-mean-square error of test*) (Tabela 13) é uma estimativa pouco precisa do desvio padrão. Contudo ele não se distancia muito do valor de RMSEV obtido. Observe que, teoricamente, se o ruído da análise for um ruído branco (com probabilidade gaussiana e média zero), os desvios padrão do erro de teste e de validação, com o aumento do número de amostras, devem tender ao mesmo valor, o qual indicaria o desvio padrão do ruído. Isso acontece quando a classe do modelo utilizado é adequada e o modelo não é sub ou sobre-ajustado.

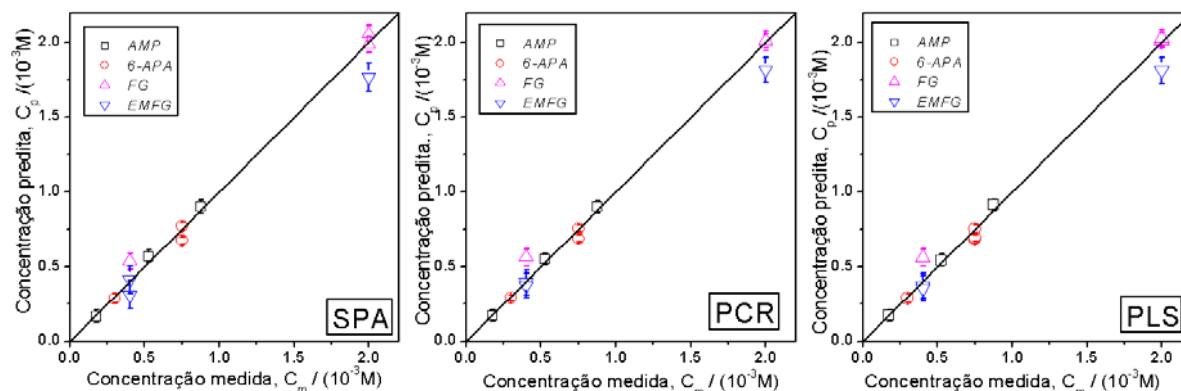


Figura 40 Resultados obtidos para os dados de teste na predição de concentrações utilizando SPA, PCR e PLS. Barras de erro mostram o RMSE de validação. pH 6,5.

Tabela 13 Raiz quadrada do erro quadrado médio de teste (*RMSET*). pH 6,5.

<i>Modelo</i>	<i>RMSET / 10⁻³M</i>			
	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>
SPA⁽⁰⁾	0,031	0,047	0,086	0,143
PCR⁽⁰⁾	0,021	0,038	0,095	0,107
PLS⁽⁰⁾	0,024	0,040	0,096	0,113

Portanto, os resultados mostram que todos os métodos abordados aqui proporcionam modelos com desempenhos semelhantes, que podem prever os dados de concentração, dentro de uma tolerância estimada. A ausência de um espectrofotômetro com *diode array* pode levar a utilização do método SPA, onde apenas alguns comprimentos de onda são utilizados em detrimento do PCR ou PLS, onde todo o espectro deve ser utilizado.

Embora o resultado da multicalibração tenha apresentado bons desempenhos, ao utilizá-la em processo (por meio de um sistema de injeção em fluxo), a diluição das amostras será necessária com o objetivo de manter o espectro de absorbância da amostra na região linear. Entretanto, com a diluição da amostra, concentrações baixas tenderão a ter maior erro associado, principalmente se a espécie já for pouco sensível à absorção de luz ultravioleta na região de interesse, como é o caso dos EMFG e FG.

5.5.3 Estimativa teórica do desempenho da multicalibração em reator de ampicilina.

Para estimar o desempenho teórico do sistema automatizado de análise utilizou-se um perfil de concentrações de síntese de ampicilina em reator semi-contínuo simulado com altas concentrações iniciais de éster e 6-APA. As concentrações de nove pontos discretos (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 minutos) foram retiradas da simulação. Para simular o perfil de absorção de cada amostra que seria retirada do reator ao longo do tempo, uma calibração utilizando o método clássico dos mínimos quadrados (CLS, Equação 74) a partir do modelo de Lambert-Beer foi realizada. Este é o melhor método para a predição do espectro, pois o erro no espectro e não na concentração é minimizado durante o ajuste. A Figura 41 mostra o resultado obtido na predição do espectro de três dados de teste (não utilizados na validação cruzada ou ajuste). As barras de erro são calculadas pela raiz quadrada média do quadrado do erro de validação (RMSEV) para cada comprimento de onda. Observe-se que, novamente, o valor do RMSEV é uma boa estimativa do grau de certeza do valor calculado.

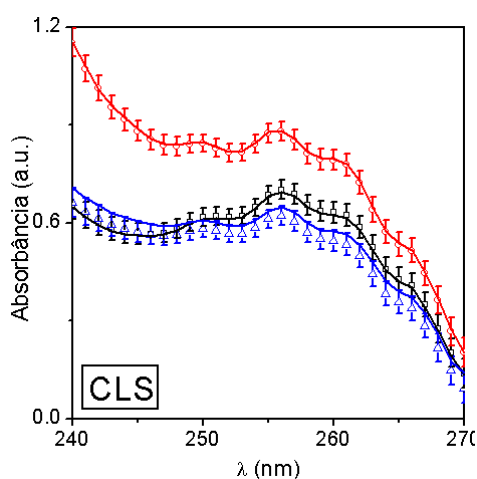


Figura 41 Predição de espectros de absorbâncias a partir do ajuste feito utilizando o método CLS. Linhas contínuas indicam espectros experimentais e dados discretos indicam espectro calculado. Barras de erro definidas pelo RMSEV obtido para cada comprimento de onda.

Utilizando o modelo ajustado pelo método CLS, foram gerados espectros com concentrações obtidas pela simulação da síntese de ampicilina (supondo diluição de ≈ 1000 vezes). Aos espectros simulados foi adicionado um ruído gaussiano com média zero e variância igual a $(RMSEV)^2$. A partir dos espectros simulados, utilizaram-se os melhores modelos (número de regressores) para cada componente do método PCR para prever as concentrações. O resultado, presente na Figura 42 (sem restrição), mostra uma estimativa do desempenho da multicalibração neste sistema.

Observa-se uma boa resposta do método de análise para a ampicilina e para o 6-APA. Contudo, para a FG e para o EMFG, o resultado, apesar de estar dentro do erro estimado, tem menor precisão. Observa-se ainda que os erros de predição da FG e do EMFG são claramente correlacionados, i.e., quando se obtém uma resposta de concentração predita acima da real para o EMFG, uma resposta abaixo da real é percebida para a FG e vice-versa. Isto se deve à grande semelhança dos espectros destes dois componentes, que refletem as semelhanças na estrutura de suas moléculas.

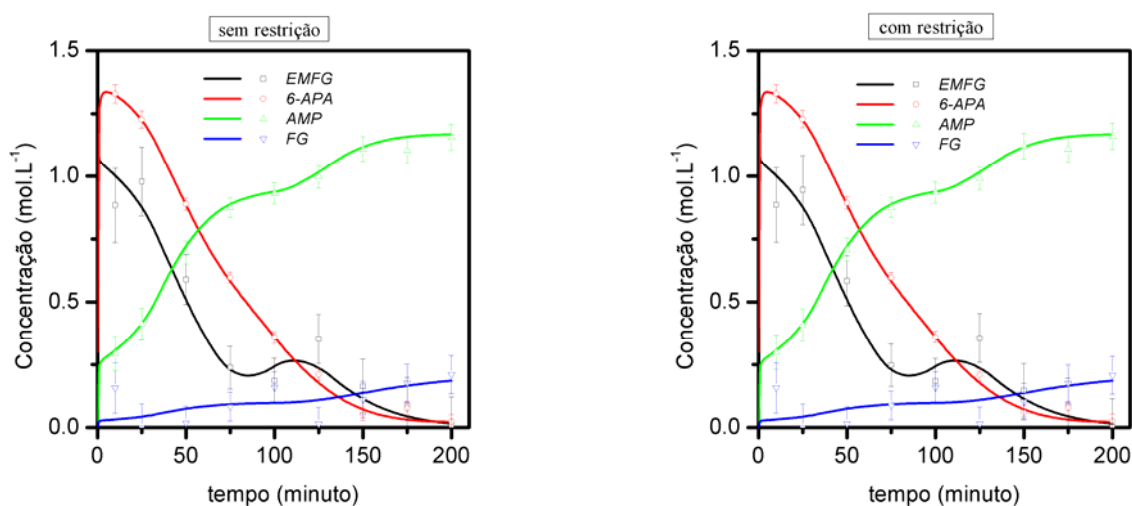


Figura 42 Desempenho teórico do sistema de análise por injeção em fluxo utilizando multicalibração. Barras de erro (RMSEV) indicam a estimativa na precisão do valor predito pela multicalibração. Diluição teórica ≈ 1000 . A) resultado teórico da multicalibração. B) resultado teórico da multicalibração utilizando informações (restrições de igualdade) adicionais de balanços de massa.

Informações de balanços de massa foram utilizadas com o intuito de aumentar a precisão das respostas das análises. Há duas equações de balanço de massa linearmente independentes a partir da reação global da síntese enzimática (cineticamente controlada) de ampicilina, que podem ser descritas como se segue:

$$\begin{aligned} N_{6-APA}^0 + \int_0^t F_{6-APA}(\tau) d\tau &= C_{APA}(t).V(t) + C_{AMP}(t).V(t) \\ N_{EMFG}^0 + \int_0^t F_{EMFG}(\tau) d\tau &= C_{EMFG}(t).V(t) + C_{FG}(t).V(t) + C_{AMP}(t).V(t) \end{aligned} \quad (87)$$

onde N_{EMFG}^0 e N_{6-APA}^0 são o números de moles presentes no início da reação de cada reagente e os termos integrais indicam os números de moles de reagentes adicionados na alimentação. Observe que o primeiro termo da Equação 87 é conhecido e facilmente integrado e pode ser denotado apenas como N_{EMFG}^0 e N_{6-APA}^0 , que significa a quantidade em número de moles de cada reagente adicionado no reator até o instante t . Dessa forma, as equações podem ser descritas matricialmente da seguinte forma:

$$\begin{bmatrix} \frac{N_{6-APA}^0(t)}{V(t)} \\ \frac{N_{EMFG}^0(t)}{V(t)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_{AMP}(t) \\ C_{6-APA}(t) \\ C_{FG}(t) \\ C_{EMFG}(t) \end{bmatrix} \quad (88)$$

ou, abreviadamente,

$$\underline{c}^0(t) = \underline{f}_{BM} \underline{c}(t) \quad (89)$$

Uma maneira de incorporar os balanços de massa à predição das concentrações seria utilizando-os como uma restrição de igualdade no cálculo das concentrações. Contudo, como também há um erro associado na predição de $\underline{c}^0(t)$, utilizou-se um método de mínimos quadrados ponderados (*weighted least squares*, WLS – Nelles, 2001). O problema proposto, a ser otimizado em cada análise, é:

$$\min_{\underline{c}} I(\underline{c}) = \left(\underline{f}_{BM} \underline{c} - \underline{c}^0 \right)^T \underline{\Omega}_{BM}^{-1} \left(\underline{f}_{BM} \underline{c} - \underline{c}^0 \right) + \underline{err}_{SR}^T \underline{\Omega}_{SR}^{-1} \underline{err}_{SR} \quad (90)$$

onde $\underline{\underline{\Omega}}_{BM}$ é a matriz diagonal das variâncias estimadas (ou admitidas) para o erro nos balanços de massa. Isto é:

$$diag(\underline{\underline{\Omega}}_{BM}) = [\sigma_{c_{6-APA}}^2 \quad \sigma_{c_{EMFG}}^2] \text{ e } diag(\underline{\underline{\Omega}}_{BM}^{-1}) = \left[\left(\sigma_{c_{6-APA}}^2 \right)^{-1} \left(\sigma_{c_{EMFG}}^2 \right)^{-1} \right] \quad (91)$$

O vetor \underline{err}_{SR} seria o erro (sem restrição) entre o valor predito pelo modelo de multicalibração (\underline{c}_{SR}) e valor real de concentração (\underline{c}), $\underline{err}_{SR} = [\underline{c}_{SR} - \underline{c}]$. $\underline{\underline{\Omega}}_{SR}$ é a matriz diagonal das variâncias dos erros estimada a partir dos valores de RMSEV obtidos na validação cruzada. O problema (Equação 90) é resolvido por mínimos quadrados clássico e sua solução é:

$$\underline{c} = \left(\underline{f}_{BM}^T \underline{\underline{\Omega}}_{BM}^{-1} \underline{f}_{BM} + \underline{\underline{\Omega}}_{SR}^{-1} \right)^{-1} \left(\underline{f}_{BM}^T \underline{\underline{\Omega}}_{BM}^{-1} \underline{c}^0 + \underline{\underline{\Omega}}_{SR}^{-1} \underline{c}_{SR} \right) \quad (92)$$

Resultados da predição de concentração utilizando informações do balanço de massa, com 3% de desvio padrão para as concentrações de reagentes adicionados estão mostradas na Figura 42 (com restrição). Claramente, não houve uma melhora significativa na precisão da predição das concentrações reais. O desempenho desta abordagem pode ser comparado na Tabela 14.

Embora a melhora no desempenho tenha sido numericamente baixa, foi o suficiente para reduzir bastante o erro nos balanços de massa. O grande problema na utilização do balanço está na diferença na precisão do modelo para EMFG e FG, de um lado, e para a ampicilina e 6-APA, de outro. EMFG e FG têm baixos valores de absorvidade molar em relação à ampicilina e ao 6-APA. O balanço de massa não pode aumentar significativamente o desempenho do método de análise, pois ambos os componentes com baixa precisão estão na mesma equação de balanço. Portanto, embora a soma desses dois componentes possa ser calculada com certa precisão, a razão entre as concentrações desses componentes não pode ser calculada com precisão maior que a obtida diretamente pela multicalibração.

Tabela 14 RMSE (raiz quadrada do erro quadrado médio) calculado para cada componente (em concentração) entre o valor predito e o valor real de concentração utilizando e sem utilizar informações de Balanço de Massa (B.M.). **B.M.1** indica o erro encontrado no cálculo do Balanço de Massa 1 ou no valor de \underline{c}_1^0 (equação 64). Idem para o **B.M.2**.

<i>Modelo</i>	<i>RMSE / 10⁻³M</i>					
	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>	<i>B.M.1</i>	<i>B.M.2</i>
Multicalibração sem restrição	22,8	20,0	62,3	76,3	21,2	14,0
Multicalibração com B.M.	20,2	19,8	62,7	70,6	6,78	4,84

Apesar da utilização dos balanços de massa não aumentar significativamente o desempenho do método, ele pode ser usado para reconciliação de dados. Isto é, fazer com que o resultado da análise forneça valores de concentração que obedeçam à conservação de massa.

5.5.4 Análise de espectros de FG e EMFG em diferentes pHs

Bons resultados teóricos para o monitoramento do produto desejado, ampicilina, foram obtidos em pH 6,5. Contudo, devido à baixa absorvidade molar do EMFG e da FG, pouca precisão foi encontrada na estimativa destes dois componentes. Além disso, suas respostas resultaram muito correlacionadas devido à grande similaridade entre suas moléculas.

Com o intuito de melhorar o desempenho dos modelos de multicalibração, uma análise da influência do pH sobre o espectro da FG e do EMFG foi realizada. Os gráficos presentes na Figura 43 mostram o espectro UV de EMFG e FG para diversos valores de pH. Observa-se que os espectros obtidos para a FG quase não se alteram com o pH. Isto é reflexo da presença de apenas uma espécie carregada de FG para os diversos valores de pH. Nesta região de pH, a FG está quase que totalmente como espécie *zwiteriônica*, como pode ser visto no gráfico da Figura 44. Já o EMFG tem uma maior variação no espectro UV na região de pH apresentada. Isto pode ser também explicada pela diferença na concentração de diferentes espécies iônicas carregadas. Entre os valores de pH 4 e 6, apesar da diferença na absorvância,

os gráficos estão apenas deslocados. Isso pode ser verificado pelo gráfico da primeira derivada do espectro, Figura 43C. Nesta região de pH o éster está presente principalmente na forma catiônica. Quando o pH passa de 6,5 para 8, observa-se uma grande variação do perfil do espectro. Nesta faixa há a transição entre EMFG na forma catiônica para forma neutra. Entre 250 e 265 nm é possível verificar um certo deslocamento da primeira e segunda derivadas do espectro em direção a comprimentos de ondas maiores (Figura 43C-D). Em pH 8, a maioria das moléculas de éster está na forma neutra.

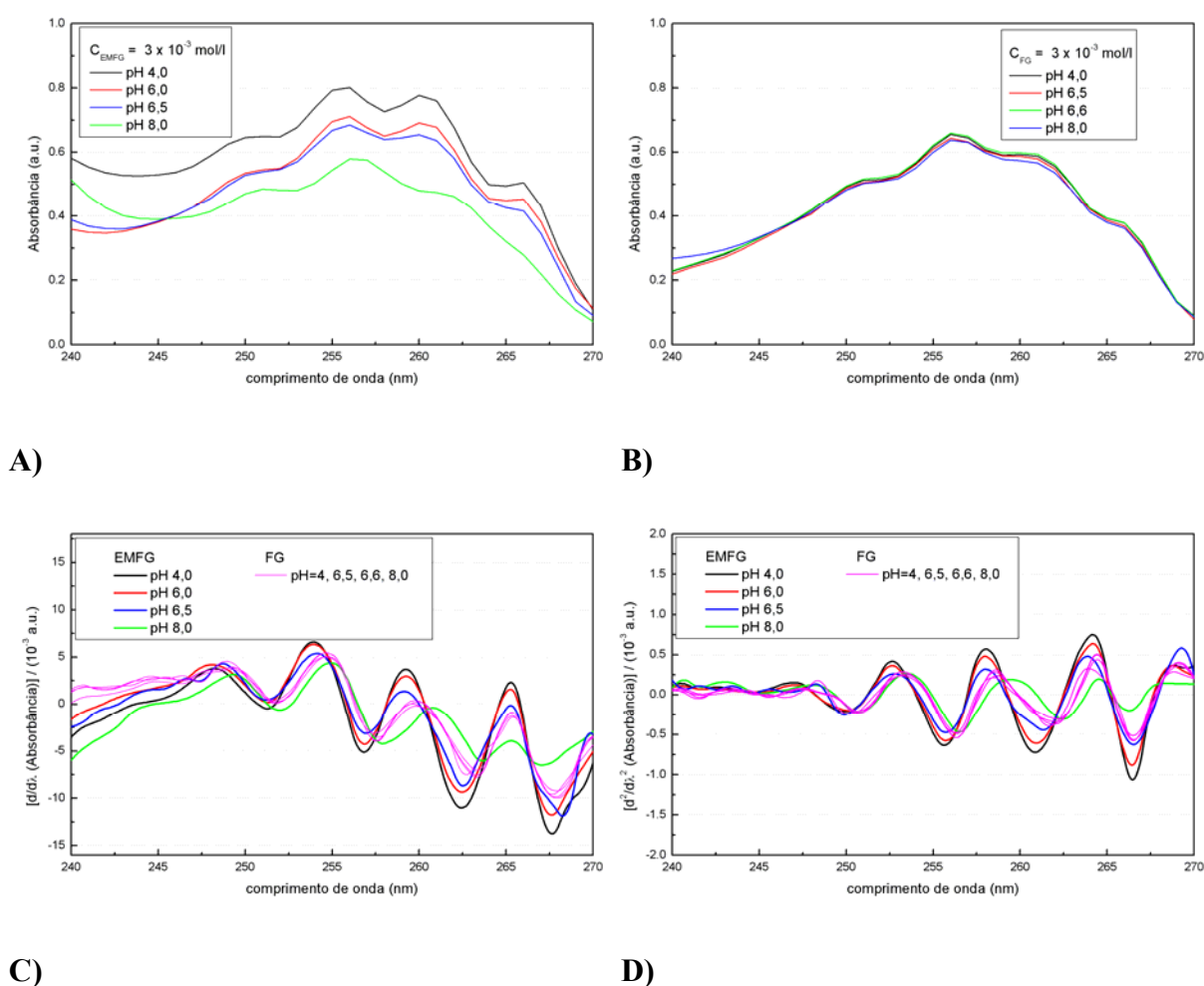


Figura 43 Espectro de absorvância entre 230 e 280 nm para diferentes valores de pH. Concentração de tampão fosfato, 50mM. Soluções de 3mM de Éster metílico de fenilglicina (A) e fenilglicina (B). Primeira (C) e segunda (D) derivadas do espectro em relação ao comprimento de onda, λ .

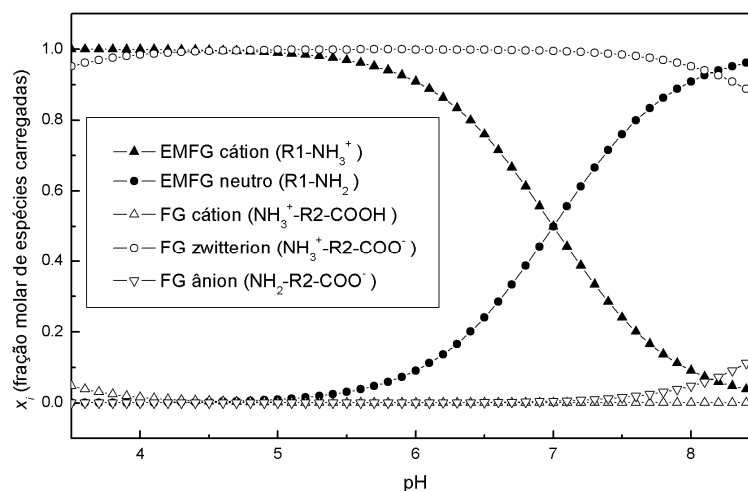


Figura 44 Fração molar de espécies carregadas de EMFG e FG em relação ao pH. Cálculos realizados a partir da Equação 21, supondo solução ideal, e valores de pKa dados pela Tabela 1.

O espectro de absorvância do EMFG em pH 8 apresenta uma maior semelhança com espectro do FG que nas regiões de pH. Isto implica que o espectro do EMFG na forma neutra tem um perfil de absorvância mais parecido ao da FG.

Assim, a pouca sensibilidade da multicalibração com relação a essas moléculas, a pH 6,5, pode ser explicada em parte pela influência do pH na carga do éster. Isto é, uma pequena diferença no pH ao redor de 6,5 pode alterar significativamente a concentração das espécies carregadas de éster e, conseqüentemente, o espectro característico utilizado na calibração. Além disso, um desvio do pH para valores maiores faz com que o espectro de EMFG se aproxime do espectro da FG, o que pode trazer perda na precisão do método e aumentar a alta correlação na detecção dessas espécies.

Levando em consideração esses aspectos, um novo procedimento de multicalibração foi realizada, em pH 5,5. A escolha deste pH se deu pela maior diferença entre os espectros de EMFG e FG e pela baixa sensibilidade das espécies carregadas com uma pequena alteração do pH nessa região.

5.5.5 Análise multicomponente (pH 5,5).

Todos os procedimentos utilizados na análise de calibração multivariável em pH 6,5 foram repetidos para o pH 5,5. A coluna referente ao comprimento de onda 270 nm foi novamente escolhida como a primeira coluna utilizada (\mathbf{a}_0) no SPA. Os espectros obtidos e sua derivada em relação ao comprimento de onda, para as 32 amostras, estão apresentados na Figura 45. Os limites de concentração de cada componente, descrito na Tabela 15, foram escolhidos de tal forma a apresentarem uma relação linear de resposta com a concentração.

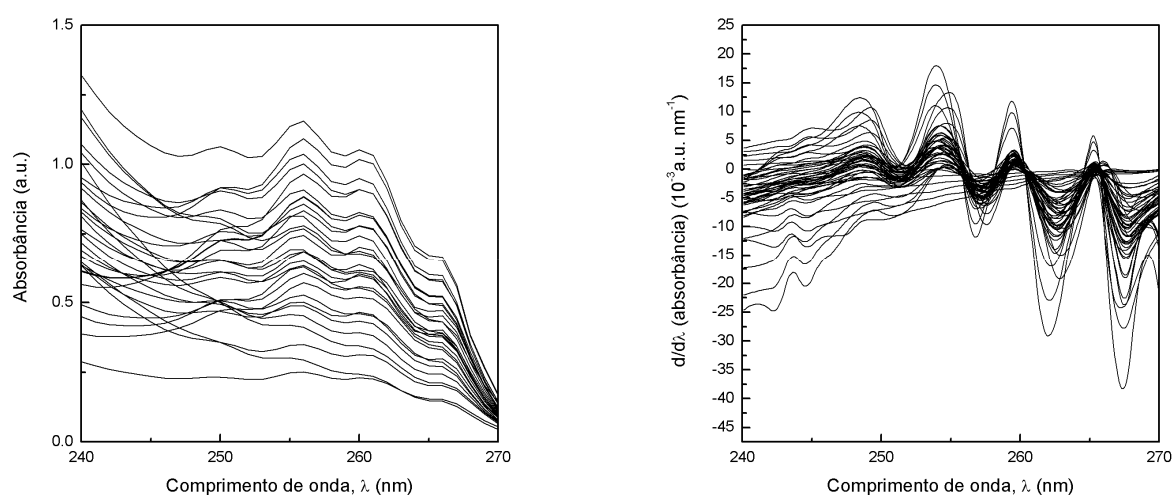


Figura 45 Espectros utilizados na calibração multicomponente pH5,5. À esquerda, o espectro das absorbâncias e à direita, a primeira derivada do espectro UV em relação a λ .

Tabela 15 Limites de concentração utilizados na multicalibração utilizando (pH 5,5)

<i>Limite</i>	<i>Concentração / 10⁻³ M</i>			
	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>
<i>Superior</i>	0,414	0,75	2,0	2,0
<i>Inferior</i>	0,083	0,15	0,40	0,41

A Figura 46 mostra os resultados obtidos de erros de ajuste e no procedimento de validação cruzada, no caso da ampicilina. Observou-se uma diferença no comportamento desses gráficos em relação aos obtidos em pH 6,5 (Figura 39). Houve uma queda brusca no

erro de validação logo no início e depois as curvas de validação se mantiveram quase que estacionárias. Isso sugere que poucos desvios experimentais ocorreram. A utilização de solução de tampão fosfato como solução de diluição ao invés do ajuste do pH por hidróxido de sódio pode ter sido responsável por parte desse baixo desvio. Além disso, observa-se que o método PCR tem uma resposta inicial melhor que o PLS, ao contrário do obtido em pH 6,5. Contudo, no método PLS, o erro de validação cai consistentemente conforme se aumenta o número de regressores.

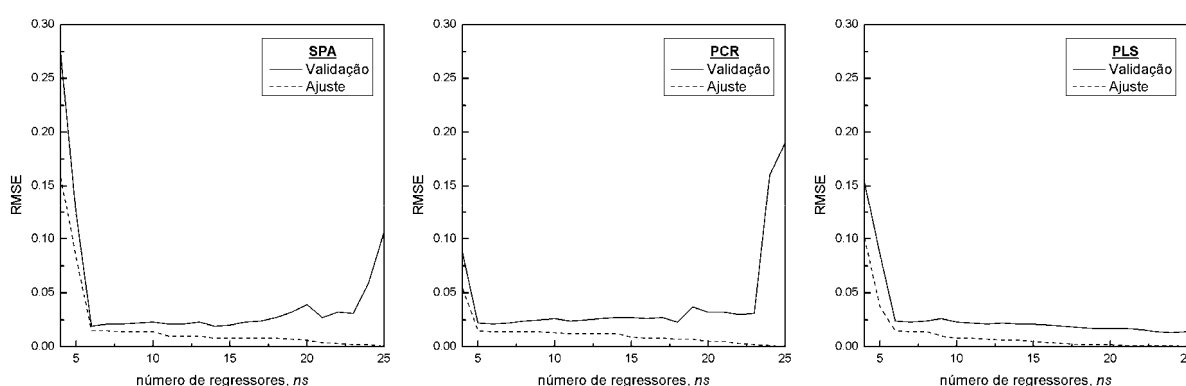


Figura 46 Resultados obtidos na validação cruzada dos modelos de calibração multicomponente para a Ampicilina. Os gráficos mostram a raiz quadrada do erro quadrado médio (*root-mean-square error*, *RMSE*, Equação 86) de ajuste (- -) e validação (—) em função do número de regressores. Os erros estão em relação a concentrações normalizadas entre 0 e 1.

Os melhores resultados na validação cruzada, com erros em unidades de concentração, e o número de regressores para cada método, estão expostos na Tabela 16.

Comparando os modelos SPA, PCR e PLS utilizando a matriz de absorvância como dados de entrada, observa-se que, assim como em pH 6,5, não houve diferença significativa entre os modelos a pH 5,5. Contudo, há uma diferença grande entre os resultados obtidos em pH 6,5 e pH 5,5. Embora não haja melhora no erro de validação cruzada da FG, a ampicilina teve um decréscimo substancial no erro de validação. O fato de se ter utilizado uma concentração de ampicilina menor que a utilizada na multicalibração realizada em pH 6,5 (vide Tabelas 11 e 15) pode ter contribuído para a queda deste erro. Além disso, tanto o 6-APA como o EMFG, tiveram uma queda no erro de validação de quase 50% com relação ao

obtido anteriormente. A utilização da primeira derivada neste procedimento pareceu não alterar substancialmente o erro de validação, assim como nos resultados obtidos anteriormente, a pH 6,5.

Tabela 16 Valor mínimo de RMSEV obtido na validação cruzada de cada modelo e o número de regressores utilizados. Sobrescrito ⁽⁰⁾ indica o uso do espectro de absorbância e ⁽¹⁾ sua derivada. **pH 5,5**.

<i>Modelo</i>	<i>RMSEV / 10⁻³ M</i>				<i>Número de regressores, ns</i>			
	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>
SPA⁽⁰⁾	0,0078	0,011	0,056	0,050	6	14	9	11
PCR⁽⁰⁾	0,0086	0,013	0,051	0,049	6	5	5	5
PLS⁽⁰⁾	0,0056	0,012	0,052	0,050	24	16	8	5
SPA⁽¹⁾	0,019	0,031	0,068	0,046	21	19	6	8
PCR⁽¹⁾	0,0072	0,0081	0,045	0,047	14	25	8	7
PLS⁽¹⁾	0,0082	0,017	0,045	0,045	16	9	25	4

A avaliação final de cada modelo foi feita na predição de amostras cujos dados não foram utilizados na validação cruzada. Como mostrado na Figura 47 e na Tabela 17, comprova-se que a diferença no desempenho entre os métodos é pouco relevante.

Com o aumento no número de amostras experimentais retiradas do reator de síntese de ampicilina, espera-se que o re-ajuste dos modelos leve-nos a obter um melhor desempenho na predição das espécies com espectros semelhantes de absorção da luz UV, FG e EMFG, na região de interesse do espectro. Apesar disso, o modelo se mostrou eficiente no monitoramento dos analitos de interesse da síntese de ampicilina, o que viabiliza sua utilização em reator industrial.

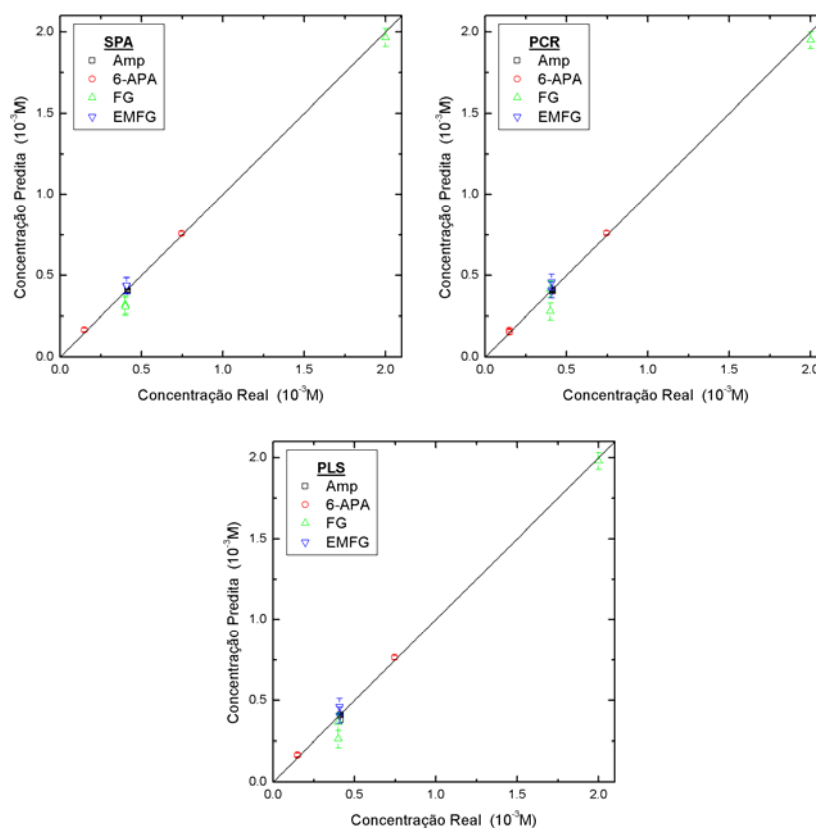


Figura 47 Predição de amostras de teste (não utilizadas na validação cruzada) utilizando melhores modelos de cada componente (SPA, PCR, PLS). As barras de erros mostram os valores de RMSEV (estimativa do desvio padrão do erro) obtidos na validação cruzada os quais indicam um limite de confiabilidade na predição.

Tabela 17 Raiz quadrada do erro quadrado médio de teste ($RMSET$). **pH 5,5**. Sobrescrito ⁽⁰⁾ indica a utilização do espectro UV e ⁽¹⁾ a derivada do espectro.

<i>Modelo</i>	<i>RMSET / 10⁻³M</i>			
	<i>AMP</i>	<i>6-APA</i>	<i>FG</i>	<i>EMFG</i>
SPA⁽⁰⁾	0,011	0,017	0,074	0,064
PCR⁽⁰⁾	0,010	0,013	0,076	0,070
PLS⁽⁰⁾	0,022	0,018	0,083	0,11
SPA⁽¹⁾	0,024	0,026	0,23	0,091
PCR⁽¹⁾	0,018	0,034	0,046	0,070
PLS⁽¹⁾	0,022	0,021	0,085	0,13

5.6 Validação do sistema de amostragem automatizada

5.6.1 Materiais e métodos utilizados

Montagem do sistema de amostragem

Para a validação do sistema de amostragem automática, o sistema proposto apresentado na Figura 35 (página 123) foi montado. Para isso foram usadas:

- a) 3 válvulas solenóides Cole-Parmer, 12 volts (V-1, 2 e 3);
- b) 2 bombas peristálticas Masterflex com controle remoto liga/desliga (B-2, B-3);
- c) 1 bomba Masterflex com controle remoto via portas analógicas (4-20 mA) de entradas e saídas e controle de sentido do fluxo via porta digital (B-1);
- d) 4 relês (acionados a 5 V);
- f) espectrofotômetro UV-Vis Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) com porta de comunicação RS232;
- g) cubeta de quartzo de fluxo com caminho ótico de 1,0 cm;
- h) filtro de placa porosa (com retenção de partículas acima de 0,4 μm) para a aquisição da amostra.

A proposta inicial do sistema de aquisição era utilizar uma bomba que ficasse ligada constantemente (B-1, vide Figura 35 e Tabela 10). Contudo, esta abordagem teve que ser modificada. O acúmulo de biocatalisador no filtro depois de certo tempo de sucção impedia um fluxo contínuo e constante. Portanto, uma bomba analógica foi utilizada, onde era possível modificar o sentido do fluxo remotamente via porta digital. A disponibilidade de apenas 4 portas digitais (entrada/saída 5 V), no entanto, acarretou a necessidade de controle manual da bomba responsável por levar a amostra ao espectro, B-3 (Figura 35). O equipamento de aquisição de dados utilizado está descrito na seção 5.2.

Programas de controle de *hardware* foram escritos em LabVIEW (*National Instruments*). Cálculos de multicalibração foram realizados em Matlab.

Síntese de ampicilina

Experimento de síntese de ampicilina foi realizado utilizando 4,0 g de enzima imobilizada comercial (Recordatti, Itália) de carga enzimática de 260 UI/g (medida pelo método PDAB) e diâmetro médio de 7 μm . O experimento de síntese se deu em reator de bancada (100 ml), com agitação magnética, encamisado, com temperatura controlada a 25°C utilizando banho termostatzado. O pH foi controlado em 6,5 utilizando pH-stat Tritino (Metrohm) e solução de NaOH 1,0 M.

Quantificação dos analitos de interesse

Concentrações de EMFG, FG, 6-APA e ampicilina foram determinadas usando cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography, HPLC*) Shimadzu com as seguintes características: coluna Phenomenex C18, 5 μm , 150 \times 4,6mm; 1 ml/min de fase móvel contendo 35% de acetonitrila, 2‰ SDS (dodecil sulfato de sódio), pH 3,0 corrigido por tampão fosfato 0,015M, a 25°C; sensor de UV, $\lambda = 225 \text{ nm}$.

No monitoramento dos analitos de interesse, empregando análise por injeção em fluxo, alíquotas de 0,072 ml de amostra eram diluídas em 2,0 ml de solução tampão fosfato 0,1 M, pH empregando-se o sistema de amostragem (válvulas e bombas peristálticas) descritos na Figura 35. Após a diluição, a solução era conduzida até o espectrofotômetro, onde foi obtido o perfil de absorção da amostragem intervalo entre 230 e 280 nm. Os valores de absorbância obtidos alimentavam o modelo PCR de multicalibração (vide seção 5.3.2), onde eram calculadas as concentrações de cada analito de interesse.

Neste ensaio, três tipos de amostragens foram realizados: amostras do reator foram retiradas e analisadas no cromatógrafo (HPLC); amostras foram retiradas da saída de

descarte do espectrofotômetro e analisadas em HPLC; e, análises em espectrofotômetro foram realizadas utilizando multicalibração. A análise de amostras retiradas depois da saída do espectrofotômetro propicia identificar erros no resultado da análise da multicalibração referentes a problemas na diluição automática.

5.6.2 Resultados da validação e discussões

Os resultados do teste da automação da amostragem se encontram nos gráficos da Figura 48. Antes de discutir os resultados, contudo, é importante esclarecer as diferentes definições das barras de erro mostradas nos gráficos. As barras de erro referentes às análises de multicalibração são resultantes do RMSEV (raiz quadrada do erro médio quadrado de validação- *root mean squared error of validation*). O valor para cada componente está presente na Tabela 16. No caso, o modelo utilizado foi o PCR⁽⁰⁾, pH 5,5. Note que as barras de erro são muito maiores que os descritos na Tabela 16. Contudo, isso se deve à diluição. Quando o valor é corrigido descontando a diluição, o erro aumenta na mesma proporção que o valor da concentração. As duplicatas presentes nos resultados de multicalibração não são duplicatas de amostragens, mas sim de análises. Isto é, os perfis de absorção eram obtidos em duplicatas entre 230 e 280nm. Observe que a duplicata de análise está sempre dentro do erro estimado. As barras de erro de análises em HPLC representam o erro das concentrações utilizadas nas curvas de calibração do HPLC. Esses erros são estimados a partir da propagação do erro experimental (mapeado pelos erros de balanças, pipetas, balões etc.). Isto foi feito porque uma parte do erro só pode ser percebida quando há reação. A diferença na pureza dos reagentes só se verifica a partir do erro no balanço de massa dos componentes. Os possíveis erros de diluição não estão representados.

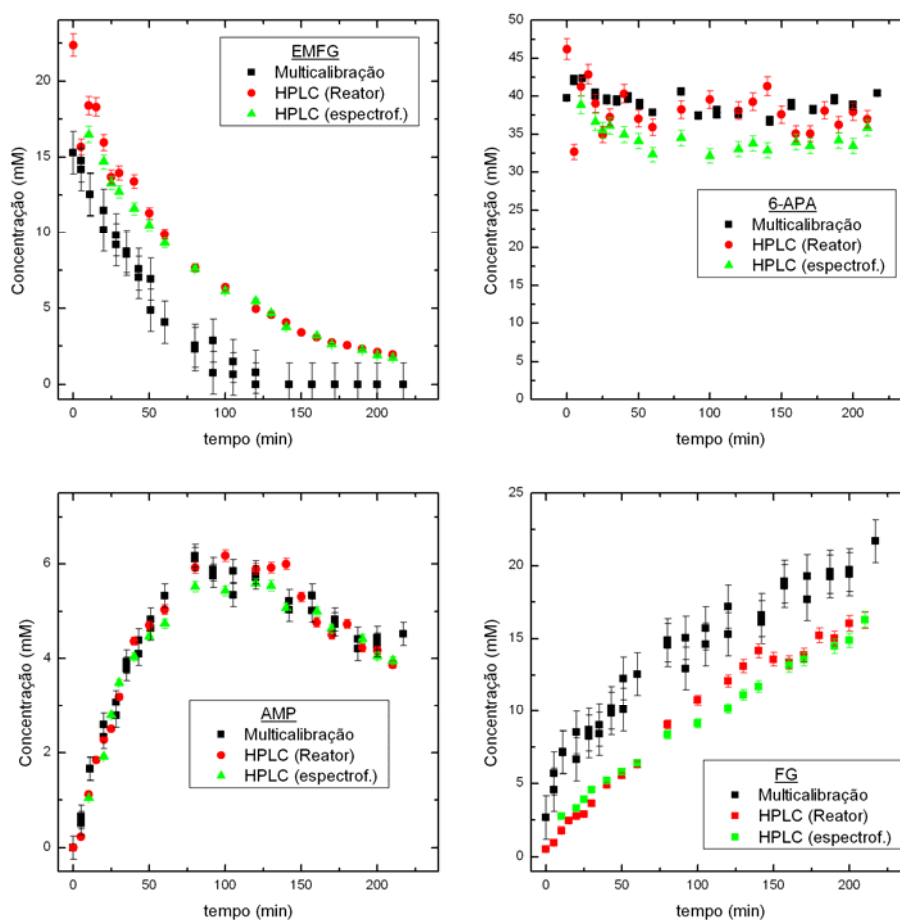


Figura 48 Resultados das análises das concentrações de ensaio de síntese enzimática de ampicilina. Preto: análise em espectrofotômetro por *multicalibração*, onde as barras de erros correspondem ao RMSE de validação cruzada. Vermelho: análise em *HPLC* na saída do *espectrofotômetro*; Verde: análise em *HPLC* de amostras retiradas do *reator*. As barras de erro das análises feitas em HPLC correspondem à propagação teórica do erro na obtenção das curvas de calibração do HPLC.

Os resultados obtidos para o teste da automação da amostragem mostram que, no caso da ampicilina (produto desejado) e para o 6-APA (substrato mais oneroso), a análise pela multicalibração é tão precisa quantitativamente quanto a análise por HPLC. O fato do valor do 6-APA predito pela multicalibração estar mais próximo do valor dado pelo HPLC proveniente do reator pode parecer estranho. Contudo, as diluições do reator e do espectrofotômetro diferiram e neste último a concentração de 6-APA estava um pouco abaixo da curva de calibração do HPLC, o que refletiu em um deslocamento sistemático no valor desta variável em quase 10%.

Outro aspecto importante dos resultados obtidos é que eles mostram que a diluição da amostra via o equipamento de automação montado tem tanta precisão quanto a amostragem direta do reator via micropipeta.

Apesar dos bons resultados para a ampicilina e 6-APA, os resultados da multicalibração para o EMFG e FG mostram que a precisão na predição dessas concentrações é baixa. Isto era de se esperar, devido à baixa absorvidade molar desses dois componentes frente à absorvidade da ampicilina e do 6-APA. Os resultados mostram também uma correlação na predição do EMFG e da FG mesmo em pH 5,5, resultado da grande dificuldade na diferenciação do espectro desses dois componentes com moléculas similares. Este problema, entretanto, pode ser contornado utilizando dados mais próximos da concentração de análise para calibrar estes dois componentes. Observe-se que a variação entre as varreduras durante toda a reação é muito pequena, como mostra a Figura 49. Observe-se também que a multicalibração foi feita para um amplo espectro de concentração nas amostras (vide Figura 45). Com isso, podem-se utilizar os resultados obtidos neste ensaio para obter outra curva de calibração com melhor capacidade preditiva nessa região.

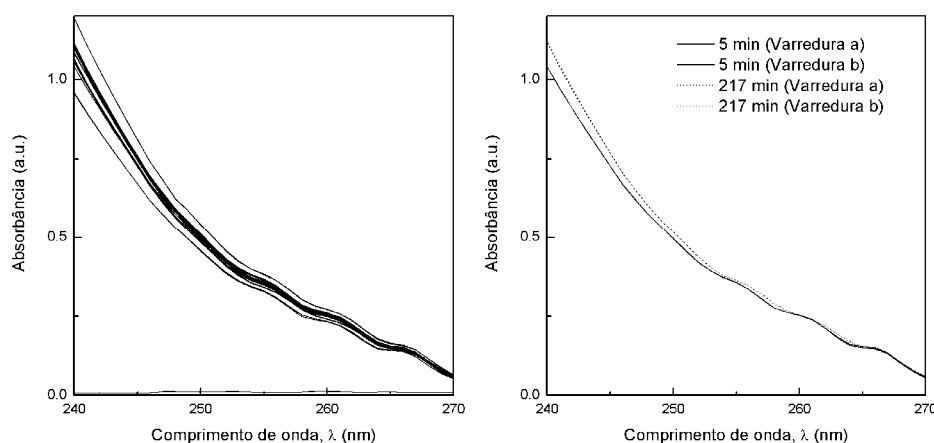


Figura 49 Espectros UV obtidos pelas varreduras em espectrofotômetro das amostragens automatizadas. O gráfico à esquerda apresenta todos os espectros obtidos no ensaio de síntese de ampicilina, inclusive a linha de base (próxima ao zero de absorbância). À direita, o gráfico mostra quatro varreduras de duas amostras: uma a 5 minutos de reação e a 217 minutos de reação.

Embora o desempenho da multicalibração para o EMFG e FG tenha sido inferior em relação ao desempenho obtido para o 6-APA e para a ampicilina, e mesmo que não seja possível melhorar este desempenho, o que é pouco provável, os resultados como um todo para a multicalibração são promissores. O esquema montado de análise em tempo real propiciou, no experimento realizado, a prorrogação do ensaio, que a princípio estava estipulado para 150 minutos, a fim de obter melhores dados da hidrólise da ampicilina. Isto seria impossível ser feito utilizando dados de análise provindos de HPLC. A obtenção do resultado das concentrações neste tempo de reação, se apenas uma amostra fosse retirada do reator a cada 10 minutos, só seria possível depois de quase 5,5 horas depois do início da reação. Isto é, depois de 3 horas que a reação tivesse sido finalizada. Além disso, ambos os resultados (EMFG e FG) provenientes da multicalibração seguem exatamente a tendência real das concentrações no reator. Isso é o suficiente para manter a concentração de éster em patamar desejado, tendo como base a concentração inicial conhecida no reator. Vale notar que a concentração de EMFG predita pela multicalibração permanece em zero a partir de 130 minutos de reação. Isso se deve a uma restrição imposta no algoritmo de cálculo, de que a concentração de nenhum componente pode ser inferior a zero.

Finalmente, a utilização de modelos empíricos para predição de perfis de alimentação do reator semi-contínuo facilmente acarretará em desvios no perfil de alimentação obtido teoricamente e usado pelos algoritmos de controle, e conseqüentemente no perfil de alimentação real, quando se trabalhar em malha fechada, para manter os perfis de concentração otimizados no reator. Em vista disso, o monitoramento da reação em tempo real é imprescindível quando se pretende manter o controle da reação. Os resultados obtidos mostram que a utilização do sistema FIA de amostragem proposto, com multicalibração em espectrofotômetro, permite esse monitoramento.

O sistema FIA possibilita também um maior número de amostragens, e com isso, mais dados experimentais disponíveis para reajuste dos parâmetros dos modelos matemáticos. Por fim, uma técnica estabelecida e validada de monitoramento *on-line* da reação de síntese enzimática de ampicilina possibilita um aumento de escala com maior controle e segurança, mesmo utilizando-se de modelos cinéticos aparentes e/ou empíricos.

6 Ensaios Cinéticos

Embora tenham sido obtidos resultados promissores de políticas ótimas de operação através de métodos de otimização dinâmica em malha aberta, esses resultados foram obtidos utilizando um modelo cinético simplificado, cujos parâmetros foram ajustados por Ferreira *et al.*, 2000, utilizando ensaios com biocatalisadores de gel de agarose com baixa carga enzimática. Além disso, efeitos difusivos podem aumentar ainda mais a distância entre o resultado obtido e uma corrida real. Em vista disso, várias bateladas de síntese enzimática de ampicilina foram realizadas com o intuito de avaliar modelos cinéticos.

6.1 Procedimento experimental: síntese de ampicilina

Experimentos de síntese de ampicilina foram realizados utilizando enzima imobilizada comercial (Recordatti, Itália) de carga enzimática de 260 UI/g. O pH foi controlado em 6,5 utilizando pH-stat Tritino (Metrohm) e solução de NaOH 1,0 M. Os experimentos de síntese se deram em reator encamisado (30 - 100 ml), com temperatura controlada a 25°C utilizando banho termostaticado. A agitação foi realizada por agitador magnético. Para iniciar a reação, 6-APA é dissolvido controlando o pH abaixo de 9,0 para que não haja uma degradação acelerada do reagente. O EMFG é então dissolvido controlando-se o pH em 6,5 (pH da reação). O volume da solução é ajustado para o de reação controlando o valor de pH. A solução reacional inicial é mantida em reator para entrar em equilíbrio térmico com a camisa. A reação se dá início quando o biocatalisador é inserido na solução.

Análise das concentrações de EMFG, 6-APA, ampicilina e FG se deu por cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography*, HPLC) como descrita na seção 5.6.1.

6.2 Resultados dos ensaios cinéticos

Os experimentos de síntese de ampicilina foram realizados em reator batelada em pH do meio reacional em 6,5 e a temperatura a 25°C. Utilizou-se biocatalisador industrial (PGA imobilizada Recordatti) geralmente empregado na produção industrial do 6-APA a partir da hidrólise da penicilina G. A utilização de biocatalisador industrial tem como objetivo validar modelos (semi-empíricos) de reator visando à produção em larga escala.

Tabela 18 Características dos diferentes ensaios de síntese de ampicilina realizados em reator de bancada a 25°C e pH 6,5, utilizando biocatalisador industrial de PGA imobilizada (Recordatti).

<i>Batelada no.</i>	<i>Volume reator (ml)</i>	<i>Massa catalisador (g)</i>	<i>Atividade do catalisador (UI/g)</i>	<i>Tempo de reação (min)</i>	<i>Concentração inicial nominal</i>	
					<i>EMFG (mM)</i>	<i>6-APA (mM)</i>
<i>1</i>	30	0,30	258	90	50,0	10,0
<i>2</i>	30	0,30	258	90	50,0	10,0
<i>3</i>	30	0,30	258	90	50,0	10,0
<i>4</i>	30	0,30	258	90	50,0	10,0
<i>5</i>	100	4,0	258	130	100	300
<i>6</i>	100	3,5	258	120	50,0	150
<i>7</i>	100	4,0	258	220	25,0	40,0
<i>8</i>	50	1,6	258	120	25,0	250

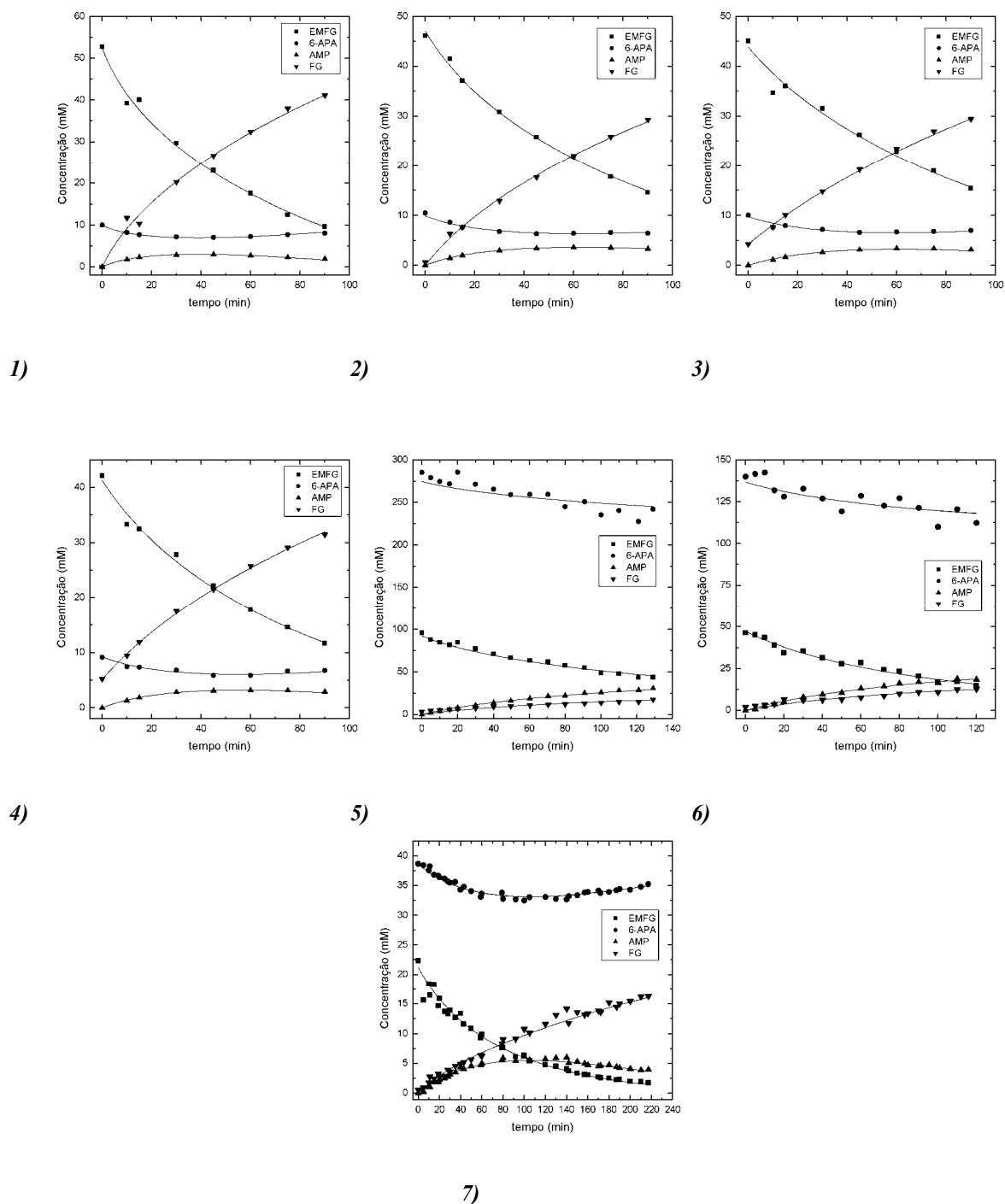


Figura 50 Resultados de ensaios em batelada de síntese enzimática de ampicilina (25°C, pH 6,5) utilizando biocatalisador industrial (PGA imobilizada Recordatti). Os parâmetros de cada experimento (1, 2, ..., 7) estão presentes na Tabela 18. As linhas desenhadas entre os pontos experimentais indicam a tendência do gráfico, onde é validado o balanço de massa dos componentes.

A Tabela 18 mostra variáveis características de cada batelada. Os gráficos presentes na Figura 50 mostram os resultados obtidos. Os pontos denotam dados experimentais. As linhas de tendência dos gráficos foram obtidas a partir do seguinte procedimento: reajustaram-se, para cada batelada separadamente, os parâmetros cinéticos do

modelo simplificado proposto por Ferreira *et al.*, 2000 (seção 2.7.1), onde as concentrações iniciais de EMFG, FG e 6-APA no tempo zero, foram também considerados parâmetros de ajuste (utilizando o método da máxima verossimilhança, Himmelblau, 1970) e integraram-se numericamente os balanços de massa usando as velocidades obtidas, simulando a batelada por modelo pseudo-homogêneo (hipótese de que toda a enzima está homoganeamente distribuída pelo reator). Note que, desta forma, o balanço de massa nas linhas de tendência é obrigatoriamente obedecido. Como o ajuste foi feito para cada experimento separadamente, as linhas não necessariamente indicam um bom ajuste do modelo utilizado. Contudo, validam o balanço de massa das componentes presentes na reação, indicando que não há reações paralelas além das consideradas (reações enzimáticas e hidrólise inespecífica do éster) que degrade algum dos componentes (EMFG, FG, 6-APA e AMP) em outra espécie química que não esteja sendo considerada aqui. Além disso, as linhas de tendência funcionam como um bom alisamento dos dados experimentais, podendo ser utilizadas para interpolar os dados obtidos.

Quatro bateladas (Figura 50, gráficos 1 a 4) foram realizadas com concentração inicial de EMFG acima da concentração de 6-APAampicilina. As condições de reação foram mantidas constantes, o que propicia uma indicação do desvio experimental entre uma batelada e outra. Observa-se, nos quatro primeiros gráficos, que a concentração inicial de fenilglicina diferencia de batelada para batelada. Estes resultados pode ser atribuído à hidrólise inespecífica do EMFG anterior à reação enzimática, o que pode acontecer enquanto os substratos estão sendo dissolvidos na solução reacional. A dissolução dos substratos tende a alterar o pH que, se não for bem controlado, pode levar a velocidades diferentes de hidrólise inespecífica do éster. Outros três experimentos foram realizados utilizando concentração de 6-APA inicial acima da de EMFG. Nesses experimentos, a concentração de enzima foi aumentada consideravelmente para aumentar as velocidades de reação e diminuir o tempo dos

experimentos. A redução das velocidades enzimáticas se deve, provavelmente à inibição pelo 6-APA da formação do complexo acil-enzima (vide discussão do capítulo 2). No experimento 7, o tempo foi prolongado a fim de se obterem dados de hidrólise enzimática do antibiótico formado (*Hidrólise 2* da Figura 4). A decisão do tempo de finalização da reação foi tomada a partir dos resultados obtidos pela amostragem automática e análise *on-line* da reação via multicalibração (sistema FIA).

6.2.1 Avaliação de modelos para a representação da síntese enzimática de ampicilina.

O modelo de reator pseudo-homogêneo, utilizando modelos cinéticos propostos na literatura, foi simulado e comparado com os ensaios experimentais realizados. Os resultados obtidos (Figuras 51 e 52) mostram que os modelos simplificados utilizados não são adequados para descrever os dados experimentais. Tal resultado era esperado. Em parte, a utilização de biocatalisador com altas cargas de enzimas imobilizadas gera efeitos difusionais no interior da partícula, causando perfis de concentrações e de pH que não podem ser desprezados. Como é sabido, a hipótese utilizada, de reação pseudo-homogênea, implica em parâmetros cinéticos aparentes dependentes das condições de reação, principalmente quando os efeitos difusionais são pronunciados. Além disso, os modelos cinéticos simplificados empregados, embora possam ser utilizados em regiões limitadas com certo grau de confiabilidade, podem não conseguir prever com precisão a cinética em toda região de concentrações de substratos e produtos presentes nesses experimentos – e que são necessárias para uma síntese otimizada, industrialmente competitiva.

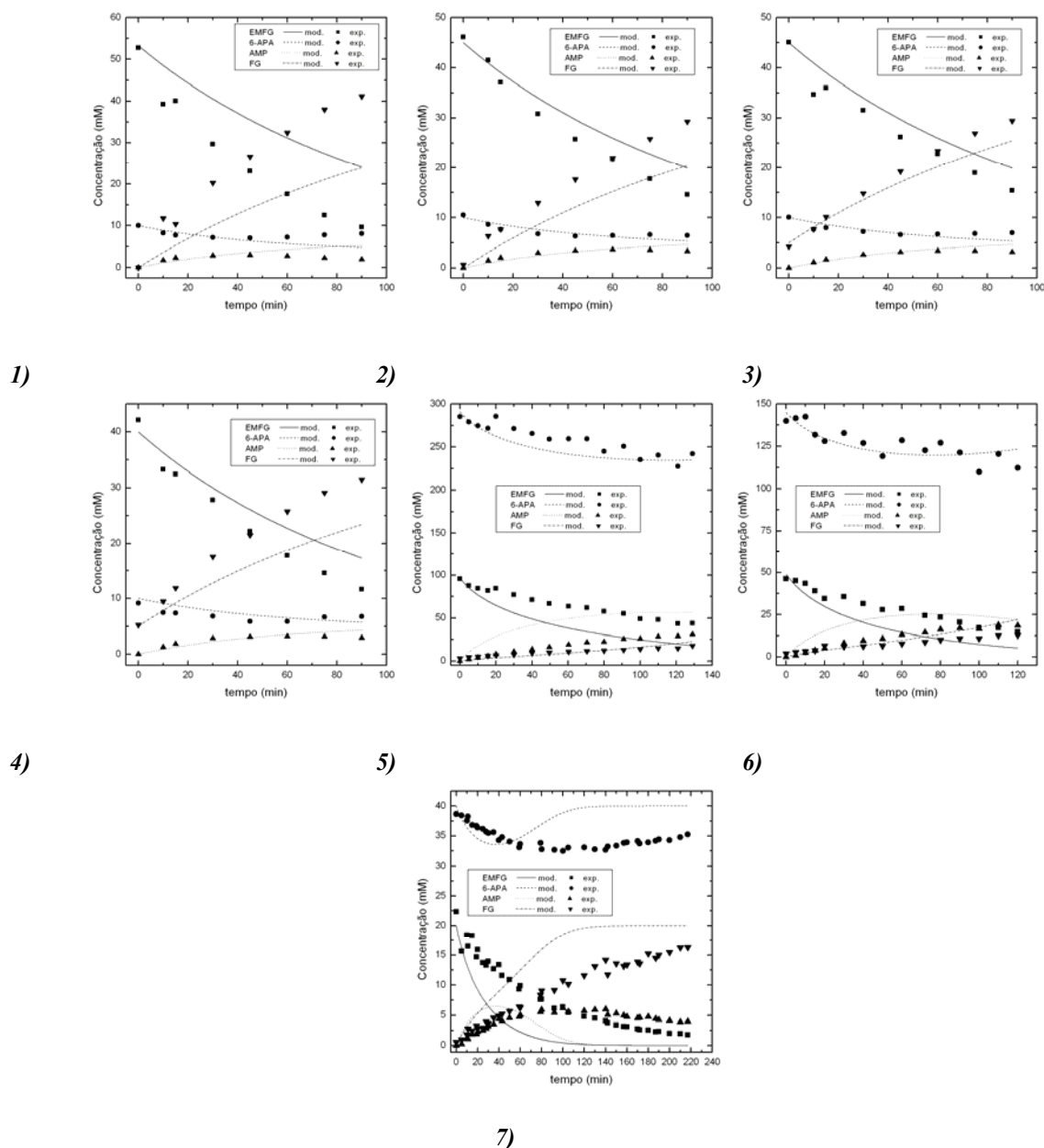


Figura 51 Avaliação do modelo pseudo-homôgeneo de síntese enzimática de ampicilina utilizando modelo cinético simplificado proposto por Ferreira *et al.*, 2000. Os parâmetros de cada experimento (1, 2..., 7) estão presentes na Tabela 18

É importante notar que, no modelo cinético de Youshko e Svedas, 2000b (MS2, seção 2.6.2), a concentração enzimática (C_{E0} , 5) é dada em mol.l^{-1} . Contudo, a informação que temos de concentração enzimática está em termos de atividade em unidade internacional, UI. Em vista disto, foi feito um ajuste de um termo de conversão, α_{Enz} , onde $C_{E0}^{[molar]} = \alpha_{Enz} C_{E0}^{[UI]} / V$. Dessa forma, os dados experimentais obtidos foram necessários para o cálculo deste termo, cujo valor resultante – devido à utilização do modelo pseudo-homôgeneo

– é aparente. Portanto, a boa qualidade na previsão do modelo no gráfico 7 da Figura 52, por exemplo, é aparente. Dependendo então, do valor de α_{Enz} , os resultados do modelo nos gráficos 1-4 da Figura 52 poderiam estar melhores que os dos gráficos 5-7 da mesma figura.

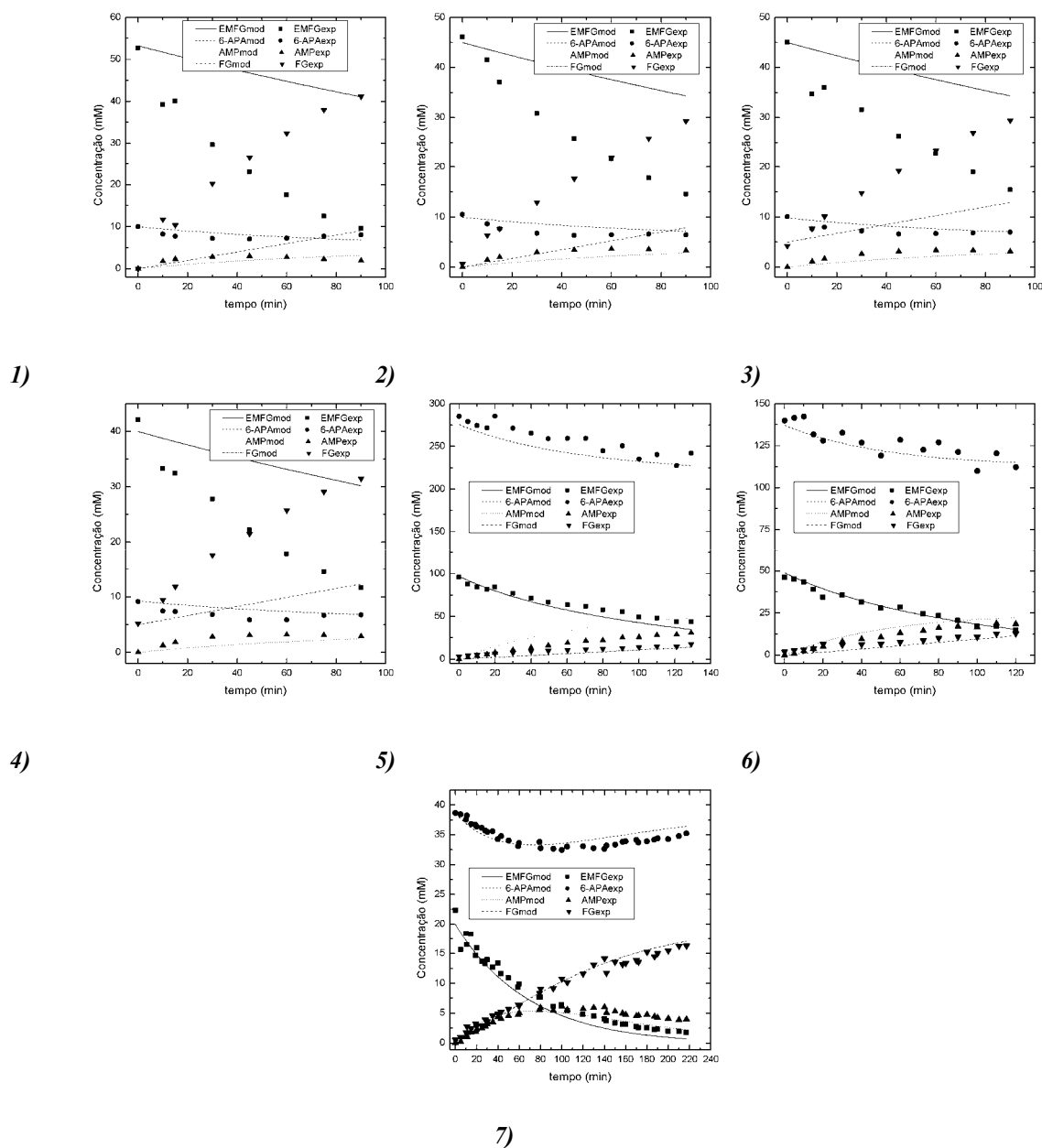


Figura 52 Avaliação do modelo pseudo-homôgeneo de síntese enzimática de ampicilina utilizando modelo cinético simplificado proposto por Youshko e Svedas, 2000b. Para termo de conversão, $\alpha_{Enz} = 4,0 \times 10^{-9} \text{ mol}_{enz} \cdot \text{UI}^{-1}$. Os parâmetros de cada experimento (1, 2, ..., 7) estão presentes na Tabela 18.

6.3 Reajuste dos modelos cinéticos

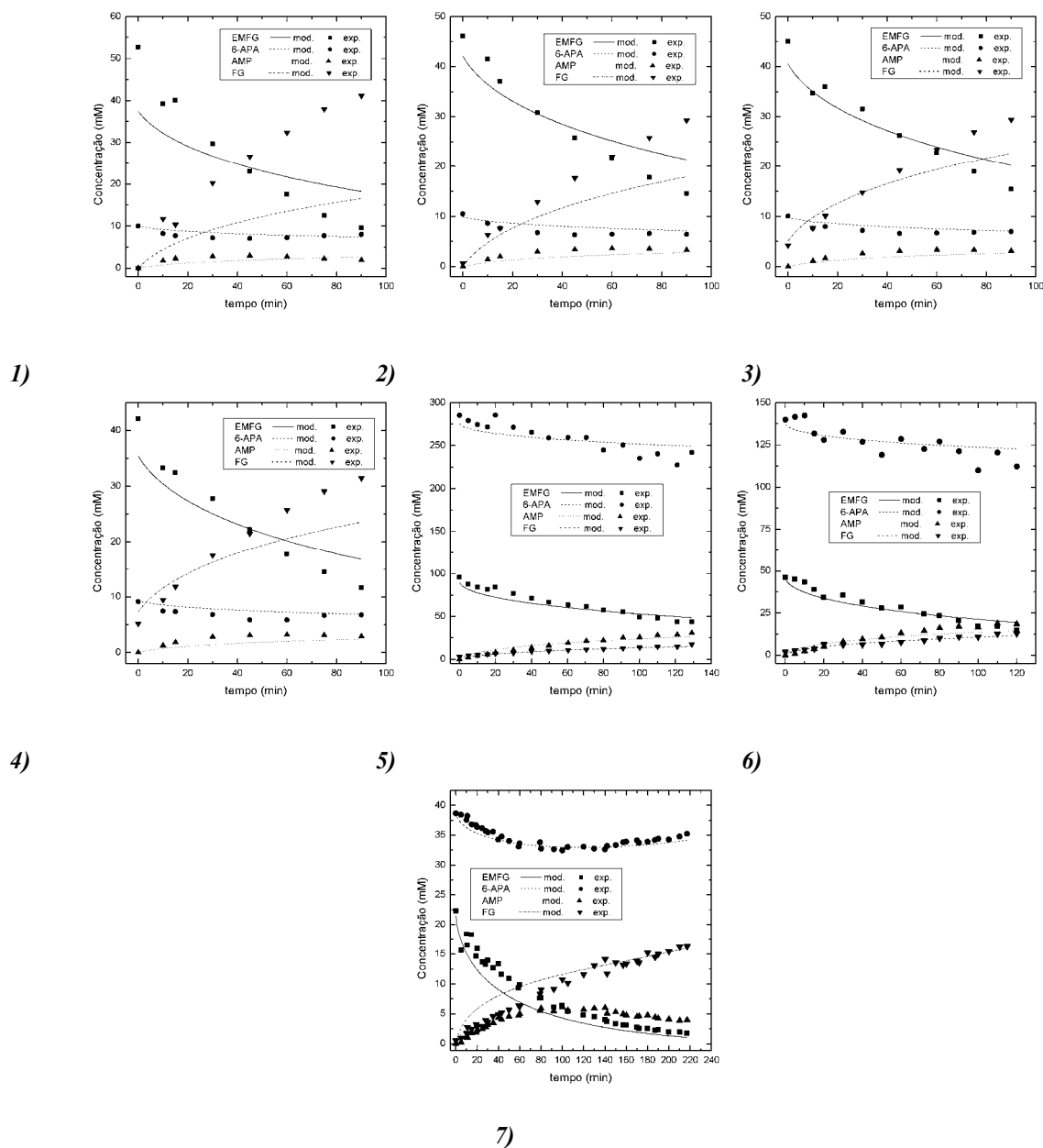


Figura 53 Resultado do ajuste dos parâmetros cinéticos aparentes do modelo cinético proposto por Ferreira *et al.*, 2000, admitindo modelo de reator pseudo-homôgeneo. Os parâmetros de cada experimento (1, 2, ..., 7) estão presentes na Tabela 18.

Os resultados obtidos em ensaios de síntese enzimática de ampicilina utilizando biocatalisador industrial mostraram que modelos cinéticos presentes na literatura, assumindo hipótese de reator pseudo-homôgeneo, não são capazes de prever o comportamento do reator em toda sua faixa operacional. Portanto, os modelos devem ser

modificados a fim de serem utilizados em algoritmos de controle ótimo. Como comentado na seção 3.3, o ajuste de uma cinética mecanística, com suas constantes de velocidade dependentes do pH, utilizando um modelo reativo-difusivo, seria tarefa extremamente difícil (senão impossível), uma abordagem certamente inviável no âmbito deste doutorado.

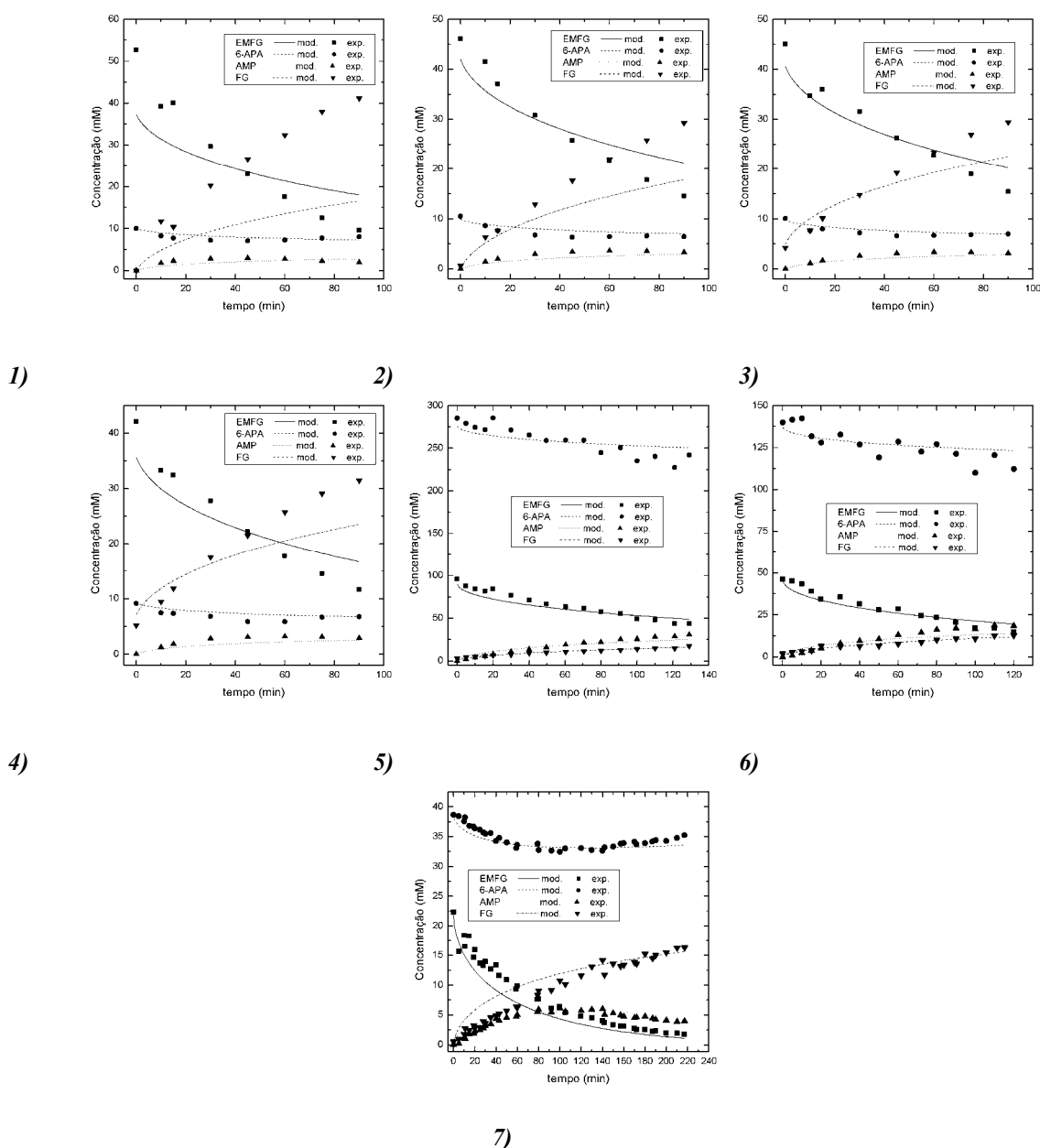


Figura 54 Resultado do ajuste dos parâmetros cinéticos aparentes do modelo cinético proposto por Youshko e Svedas, 2000b, admitindo modelo de reator pseudo-homogêneo. Os parâmetros de cada experimento (1, 2, ..., 7) estão presentes na Tabela 18.

Utilizou-se o modelo pseudo-homogêneo para reajustar a cinética, desprezando, assim o modelo difusivo. Isso implica em admitir que o coeficiente de

efetividade (η , definido como razão entre a velocidade real de reação global e a velocidade de reação que resultaria se toda a superfície catalítica fosse exposta à concentração da superfície externa do catalisador - Fogler, 2002) seja praticamente constante durante a reação. Dessa forma, os parâmetros cinéticos ajustados dependem das condições operacionais. Esse enfoque foi testado utilizando os modelos cinéticos simplificados abordados aqui (Figuras 53 e 54).

Os parâmetros dos modelos cinéticos simplificados foram reajustados utilizando todos os experimentos (1-7). A concentração de 6-APA inicial de cada batelada foi calculada a partir da média da soma das concentrações de 6-APA e ampicilina (em função do tempo) para todas as amostras. As concentrações de EMFG e FG iniciais foram deixadas livres para serem ajustadas. Para o modelo proposto por Youshko e Svedas, 2000b, também foi ajustado um novo valor de α_{Enz} . Os resultados presentes nas Figuras 53 e 54, mostram que os modelos cinéticos utilizados, mesmo com seus parâmetros reajustados, não são capazes de representar os dados experimentais. Observa-se também que os modelos se mostraram equivalentes, o que não era necessariamente esperado, mesmo tendo ambos os modelos cinéticos a mesma quantidade de parâmetros.

Resultados mostram que os modelos cinéticos simplificados, utilizados como modelos aparentes, não conseguem se ajustar a todas as condições experimentais. Então, uma nova abordagem deve ser tentada.

A utilização de uma cinética mecanística completa como modelo cinético aparente resulta em uma quantidade muito grande de parâmetros, cujos valores ajustados seriam, muito provavelmente, altamente correlacionados. Então, optou-se por um modelo cinético aparente utilizando Redes Neurais Artificiais Alimentadas Adiante (*feed forward artificial neural network*) (Haykin, 2001), também conhecidas como *Multilayer Perceptrons* (MLPs) Duas redes foram utilizadas, uma para modelar a velocidade de geração de ampicilina e outra para a velocidade de geração de fenilglicina. As demais velocidades são linearmente

dependentes destas duas e podem ser facilmente calculadas a partir delas. O treinamento das redes (ajuste dos parâmetros) se deu via algoritmo de retropropagação, utilizando pacote de redes neurais do Matlab⁷, e seu término via parada antecipada (aumento do erro de validação com o número de iterações, Haykin, 2001), evitando assim um sobre-ajuste (*overfitting*). As redes foram ajustadas a partir de velocidades calculadas derivando as curvas de tendência presentes nos gráficos da Figura 50. Dessa forma, foi possível utilizar um maior número de pontos no treinamento (ajuste) das redes. 25% dos dados aleatoriamente coletados foram utilizados na validação cruzada. Dez neurônios foram usados na camada oculta da rede para a predição da velocidade de ampicilina, e sete para predição da velocidade de fenilglicina. As entradas das redes neurais foram as mesmas utilizadas como entradas das velocidades de reação: as concentrações de EMFG, 6-APA, AMP e FG. Com as velocidades de reação ajustadas pelo modelo neural, utilizou-se dos dados de concentração experimentais (e não mais das curvas de tendência) para ajustar as concentrações iniciais de cada batelada (1-7) para mostrar graficamente o resultado do ajuste por redes neurais na Figura 55.

Os resultados obtidos utilizando redes neurais para modelar as cinéticas aparentes da síntese enzimática de ampicilina mostraram que este tipo de modelo é flexível o bastante para se ajustar a todos os dados experimentais. Conseqüentemente, terá grande probabilidade de se ajustar a todas as regiões de concentrações necessárias em uma síntese industrial.

¹ Treinamento dos pesos das redes neurais se deu a partir de algoritmo de *Levenberg-Marquardt backpropagation* (Matlab7). Tangente hiperbólica como funções de transferência em todos os neurônios (camada oculta e saída). Portanto, variáveis dependentes (velocidades) foram normalizadas entre -0,95 e 0,95. Função minimizada, erro quadrado médio da variável de saída.

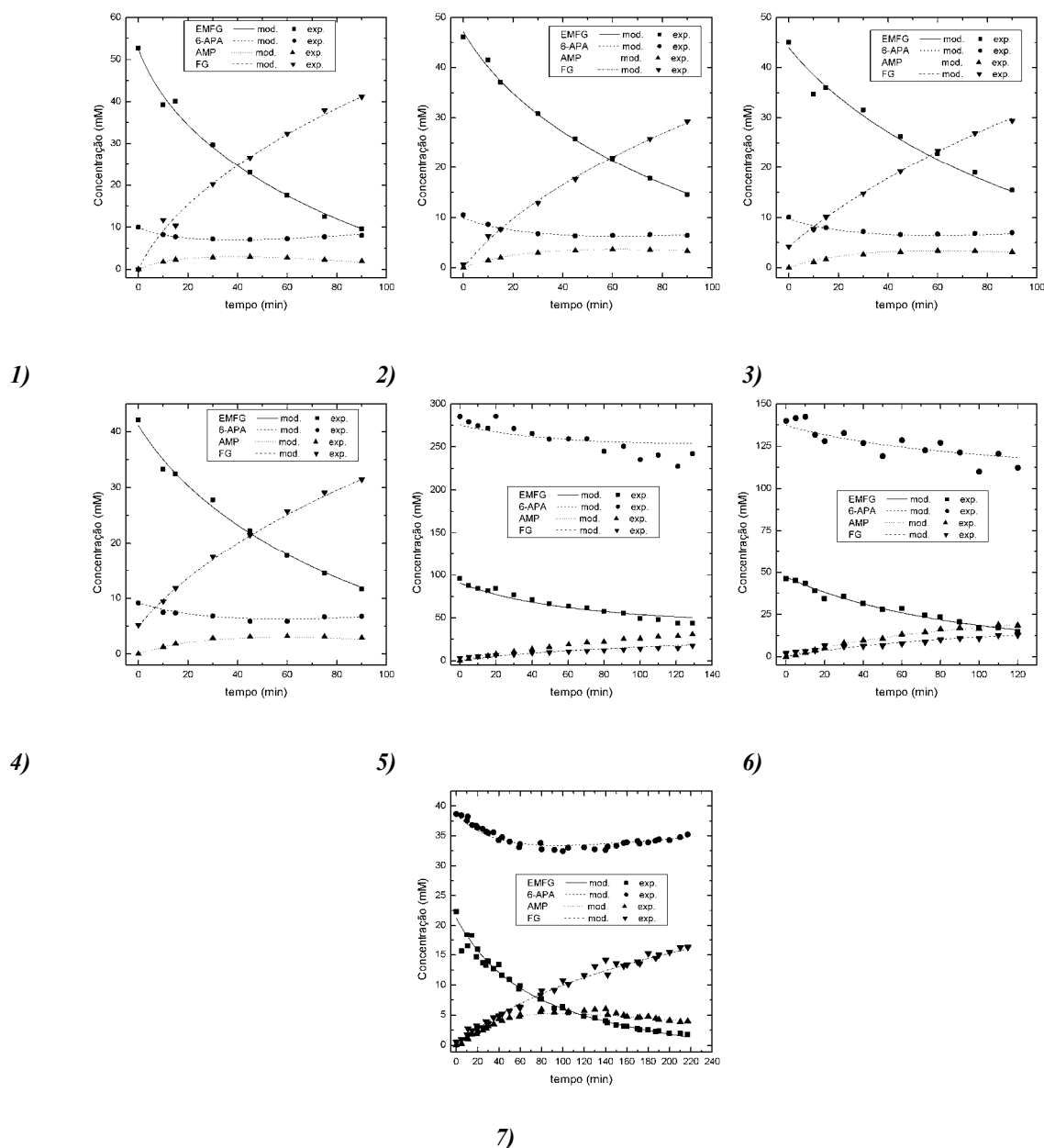


Figura 55 Resultado do ajuste de redes neurais para modelar as cinéticas aparentes da síntese enzimática de ampicilina, admitindo modelo de reator pseudo-homogêneo. Os parâmetros de cada experimento (1, 2, ..., 7) estão presentes na Tabela 18.

Entretanto, a utilização de um modelo cinético puramente empírico carece de confiabilidade na predição de dados em regiões onde o modelo não tenha sido ajustado. Por exemplo, se a concentração de EMFG for reduzida de 0,02 M para 0,0025 M, como no caso do ensaio 7, a predição do modelo pode ser bem irreal como mostra a Figura 56. A queda da concentração de éster para valores abaixo de zero pode ocorrer, pois o modelo prediz as velocidades dos produtos e as concentrações dos reagentes estão determinadas pelos balanços

de massa. A utilização de três redes para modelar as velocidades reação – de síntese, hidrólise do EMFG e hidrólise do antibiótico (vide Figura 4) – poderia contornar este obstáculo, contudo, ensaios cinéticos diferentes para ajustar cada um desses modelos seriam necessários. Entretanto, com o aumento do número de dados experimentais e reajuste das redes neurais, espera-se que o desempenho da predição do modelo empírico tenda a melhorar.

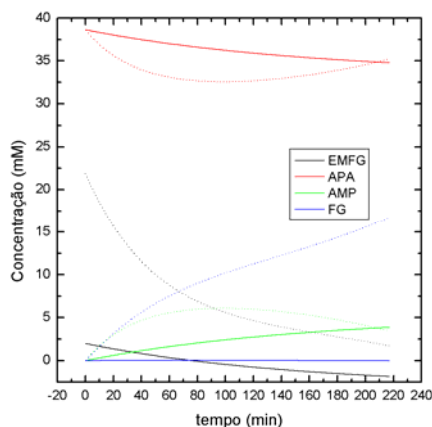


Figura 56 Resultado da predição do modelo empírico (redes neurais) para o ensaio 7, presente na Tabela 18, quando a concentração inicial de EMFG é reduzida de 20 (---) para 2,5 mM (—).

Modelos cinéticos simplificados, mas com base mecanística, devido à sua estrutura, não irão prever concentrações negativas. Portanto, a exploração desses modelos, quando poucos dados experimentais estão disponíveis, pode ser um caminho mais seguro, principalmente ao utilizá-los em algoritmos de otimização dinâmica. Contudo, outra abordagem deve ser utilizada para que o modelo cinético simplificado seja mais fiel aos dados experimentais. Escolheu-se para esse fim, portanto, o modelo proposto por Ferreira *et al.*, 2000, ajustando apenas os dados onde altas concentrações de 6-APA e baixas de EMFG estão presentes. Esta é a faixa de concentrações onde melhores resultados têm sido obtidos nas fases 1 e 2 na otimização do processo semi-contínuo integrado (vide seção 4.4).

Resultados do ajuste para dados experimentais com altas concentrações de 6-APA estão presentes na Figura 57. A figura mostra também dados de dois outros experimentos, um com alta concentração de 6-APA (8), que valida o ajuste e outro, com baixa

concentração de 6-APA (3) indicando que este modelo (ou seus parâmetros) não é indicado nesta situação.

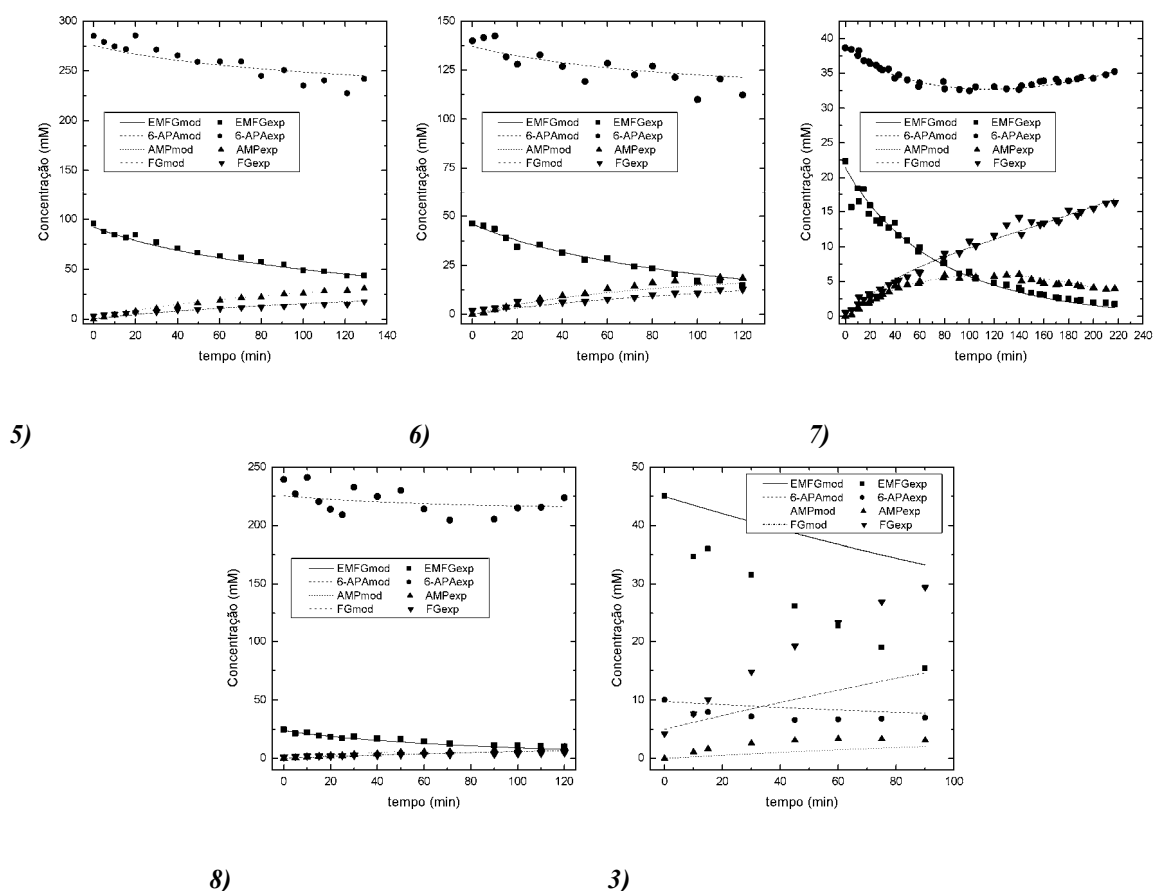


Figura 57 Resultado do ajuste dos parâmetros cinéticos aparentes do modelo cinético proposto por Ferreira *et al.*, 2000, admitindo modelo de reator pseudo-homogêneo. Utilizou-se dos dados dos experimentos 5, 6 e 7 (Tabela 18) para o ajuste dos parâmetros. Experimento 8 e 3 não foram utilizados nos ajustes.

Em suma, os seguintes resultados foram obtidos:

- modelos cinéticos simplificados presentes na literatura com parâmetros ajustados para enzimas livres ou imobilizadas em baixa carga em gel de agarose não predizem os dados experimentais obtidos para biocatalisador industrial;
- modelos cinéticos simplificados presentes na literatura reajustados, assumindo reator pseudo-homogêneo, não são capazes de representar os dados experimentais obtidos em todas as regiões de concentrações apresentadas;
- modelos empíricos (redes neurais) foram capazes de representar os dados experimentais com boa precisão em todas as regiões utilizadas, contudo, sua utilização em algoritmo de

- controle ótimo carece de confiança devido ao pequeno número de dados utilizados no ajuste dos pesos das redes;
- d) modelos cinéticos simplificados são capazes de descrever certas regiões concentrações de interesse com boa precisão.

7 Síntese Enzimática de Ampicilina em Reator Semi-Contínuo

Integrado

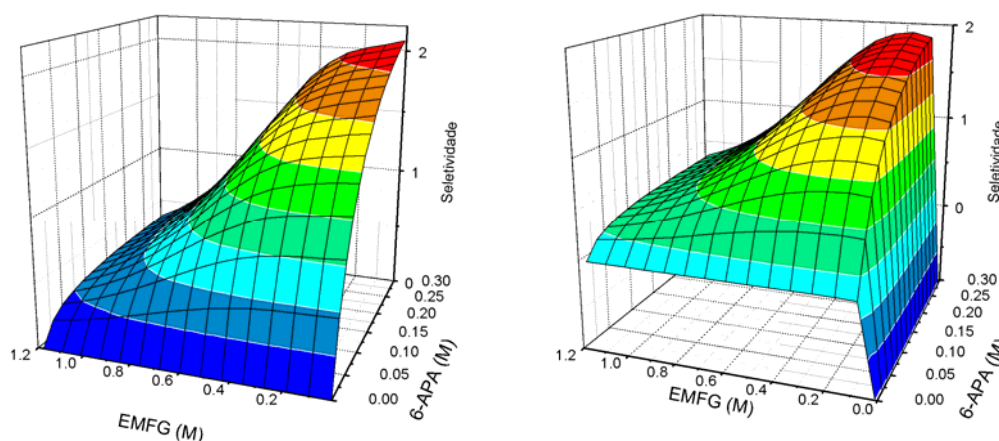
A resolução do problema de controle ótimo para a síntese enzimática de ampicilina utilizando cinética simplificada resultou em estratégias promissoras (altos rendimentos). Contudo, respostas provenientes de algoritmo de otimização dinâmica, dependem muito do modelo utilizado. Com o objetivo de verificar o método proposto, nova otimização foi realizada utilizando um modelo simplificado ajustado para os dados experimentais obtidos de síntese de ampicilina catalisada por biocatalisador comercial de alta carga enzimática.

Escolheu-se o modelo proposto por Ferreira *et al.*, 2000, ajustado para dados onde altas concentrações de 6-APA e baixas de EMFG estão presentes. Como comentado na seção 6.3. Esta foi a faixa de concentrações onde melhores resultados foram obtidos nas fases 1 e 2 na otimização do processo semi-contínuo integrado.

7.1 Otimização utilizando modelo reajustado.

Como comentado na seção 4.3.2, deixar livres as concentrações iniciais dos reagentes pode gerar uma grande correlação entre tais concentrações e a velocidade de alimentação inicial, se não houver nenhum limite para essa última. Contudo, é necessário iniciar o reator de forma que a seletividade seja máxima. A Figura 58A mostra a seletividade no tempo zero de reação, i.e., em um meio reacional sem a presença de produto.

A Figura 58 foi construída utilizando o modelo ajustado por meio de dados obtidos com biocatalisador Recordatti e válidos para quando a concentração de 6-APA é maior que a do EMFG. A seletividade inicial indica que quanto maior a concentração de 6-APA e menor a de EMFG maior será a seletividade da reação quando na ausência de produtos.



A)

B)

Figura 58 Seletividade ($v_{\text{síntese}}/v_{\text{hidrólise}}$) calculada utilizando modelo simplificado proposto por Ferreira *et al.*, 2000, com parâmetros ajustados por meio de ensaios utilizando biocatalisador industrial (Recordatti) e concentrações de 6-APA maiores que as de EMFG, como descrito na seção 6.3. **A)** Início da reação (ausência de produtos). **B)** fase 2 – produtos cristalizados (supondo limites de solubilidade dos componentes puros).

Segundo resultados simulados de otimização dinâmica obtidos na seção 4.4, foi possível identificar 3 fases do reator. A primeira parece ser uma fase de transição onde os produtos são levados a cristalizar e os reagentes a manter uma concentração onde haja maior seletividade. Esta é uma fase que poderá ser retirada do processo industrial, começando a reação com reator semeado de produtos, isto é, com o reator no limite de solubilidade dos produtos e já na fase 2. A fase 2 é quando a produção de antibiótico se dá de maneira contínua e em estado quase estacionário. Nesta fase, quando os produtos estão cristalizados, e portanto suas concentrações em solução são constantes e iguais aos limites de solubilidade, a seletividade em função da concentração dos reagentes está apresentada na Figura 58B. O

gráfico indica que a seletividade aumenta com a concentração de 6-APA e tem um máximo quando a concentração de EMFG é aproximadamente $0,15 \text{ mol.litro}^{-1}$.

Observa-se que a seletividade da reação apresentada em ambos os gráficos da Figura 58 tem um valor máximo de 2. Este valor é inferior a 4, que foi o obtido experimentalmente por Ferreira, 2004a, em reator integrado de síntese de ampicilina (pH 6,5 e 25°C) utilizando biocatalisador industrial Recordatti envolvido por uma matriz secundária (pectina). A segunda matriz pode ser a causa desta diferença. O diâmetro médio das partículas do biocatalisador Recordatti é de $7 \mu\text{m}$ e a utilização de um biocatalisador envolvido por segunda matriz, com um diâmetro médio de cerca de 2 mm , (Giordano *et al.*, 2003, Ferreira, 2004a) causa um aumento na resistência difusiva o que pode gerar uma diminuição no pH no interior da partícula. Embora a queda do pH aumente a seletividade, a atividade da enzima e consequentemente, a produtividade é reduzida por essa diminuição (vide seção 1.4.1).

Tabela 19 Parâmetros e condições iniciais usadas na otimização do modelo de reator simplificado usando a abordagem do gradiente.

<i>Parâmetros de Otimização</i>		<i>Atribuições iniciais e restrições</i>
$\eta = 1,0 \times 10^{-4}$		$\underline{u}(t) _{k=1} = 0,01 \text{ mol.min}^{-1}$
$\beta = 5,0 \times 10^{-5}$		$0 \leq \underline{u}(t) \leq 0,1 \text{ mol.min}^{-1}$
$\xi_l = 10$		$V(0) _{k=1} = 0,13 \text{ l}$
		$V(t_f) = 0,2 \text{ l}$
<i>Condições iniciais e parâmetros de integração</i>		
(otimização A)	$C_{EMFG}(0) = 0,01 \text{ mol.l}^{-1}$	$t_f = 720 \text{ min}$
(otimização B)	$C_{EMFG}(0) = 0,10 \text{ mol.l}^{-1}$	
	$C_{6APA}(0) = 0,3 \text{ mol l}^{-1}$	$E^0 = 5000 \text{ UI (38 - 25 UI/ml)}$
<i>Parâmetros do Modelo</i>		
	$\gamma_{EMFG} = -1$	$\gamma_{6APA} = 0$
	$C_{Q.C.I.} = 2,0 \text{ mol/l}$	

Foi realizada otimização utilizando o método do gradiente apresentado na seção 4.3. A formulação do problema foi a mesma apresentada na seção 4.3.2 e os parâmetros estão presentes na Tabela 19. Duas otimizações foram feitas, com concentração de EMFG inicial de 10 mM e 100 mM. A concentração inicial de 6-APA foi mantida a 300 mM. Os resultados estão apresentados na Figura 59.

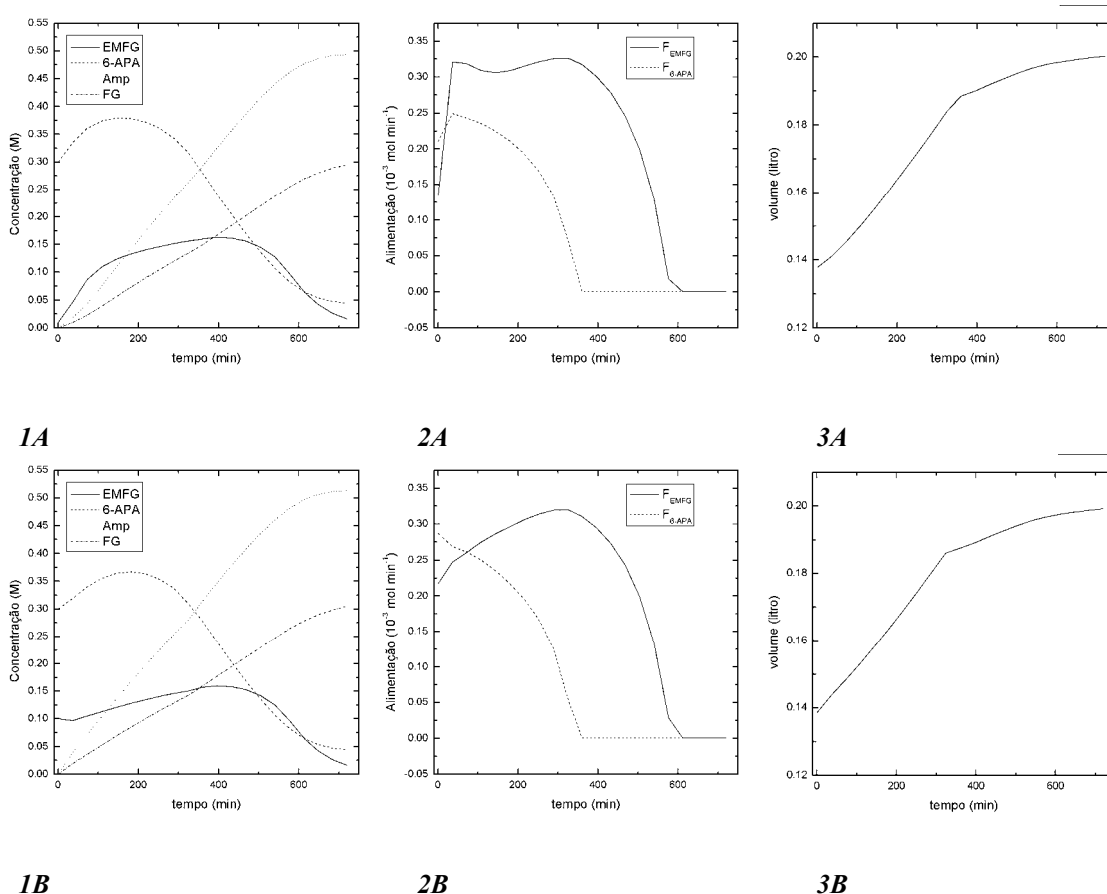


Figura 59 Resultados de controle ótimo obtidos utilizando estratégia do gradiente. 1) simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação ótima resultante 2) perfis de alimentação ótima obtidos, F . 3) volume do reator, V . A) $C_{EMFG}(0) = 0,01$ M. B) $C_{EMFG}(0) = 0,10$ M.

Os resultados mostram que a modificação feita na concentração inicial de EMFG não altera de forma significativa o perfil de concentrações depois de 100 minutos de reação. Isto é, a concentração inicial altera o perfil ótimo apenas da primeira fase de reação, onde os produtos ainda não estão cristalizados. Os resultados obtidos para produtividade e conversões de 6-APA e EMFG também não sofreram modificações significativas. Entretanto, os resultados de seletividade obtidos (1,7 para ambos os casos) são muito inferiores aos

obtidos experimentalmente por Ferreira, 2004a. Embora, o uso de pH 6,5 tenha se mostrado ótimo para a síntese utilizando biocatalisador Recordatti envolvido por matriz secundária (pectina), no caso da utilização do biocatalisador Recordatti não envolvido, será provavelmente necessário manter valores mais baixos de pH para aumentar a seletividade da reação.

Tabela 20 Resultados obtidos na otimização dinâmica para as variáveis representativas do processo. A) $C_{EMFG}(0) = 0,01$ M. B) $C_{EMFG}(0) = 0,10$ M.

	<i>Conversão 6-APA</i>	<i>Rendimento do Éster</i>	<i>Seletividade</i>	<i>Produtividade</i>
	$X_{6-APA} = \frac{C_{Amp}}{C_{Amp} + C_{6-APA}}$	$X_{EMFG} = \frac{C_{Amp}}{C_{Amp} + C_{FG} + C_{EMFG}}$	$S = \frac{C_{Amp}}{C_{FG}}$	$P = \frac{C_{Amp} V_f}{E_0 t_f}$
A)	0,917	0,613	1,67	$8,2 \times 10^{-3}$ mol/h/UI
B)	0,921	0,615	1,68	$8,5 \times 10^{-3}$ mol/h/UI

Com o objetivo de obter resultados experimentais da síntese enzimática de ampicilina com reator semi-contínuo integrado, e devido à ausência de um equipamento de alimentação de reagentes sólidos, as funções de alimentações ótimas obtidas foram discretizadas. 21 pontos de discretização foram utilizados com a alimentação ocorrendo por dois minutos. O resultado simulado para os perfis de concentração no reator e variação do volume estão apresentados na Figura 60. Observa-se que a alteração do tipo de alimentação não altera de forma expressiva os perfis de concentração de produtos no reator embora diminua em 10% a concentração final do produto desejado.

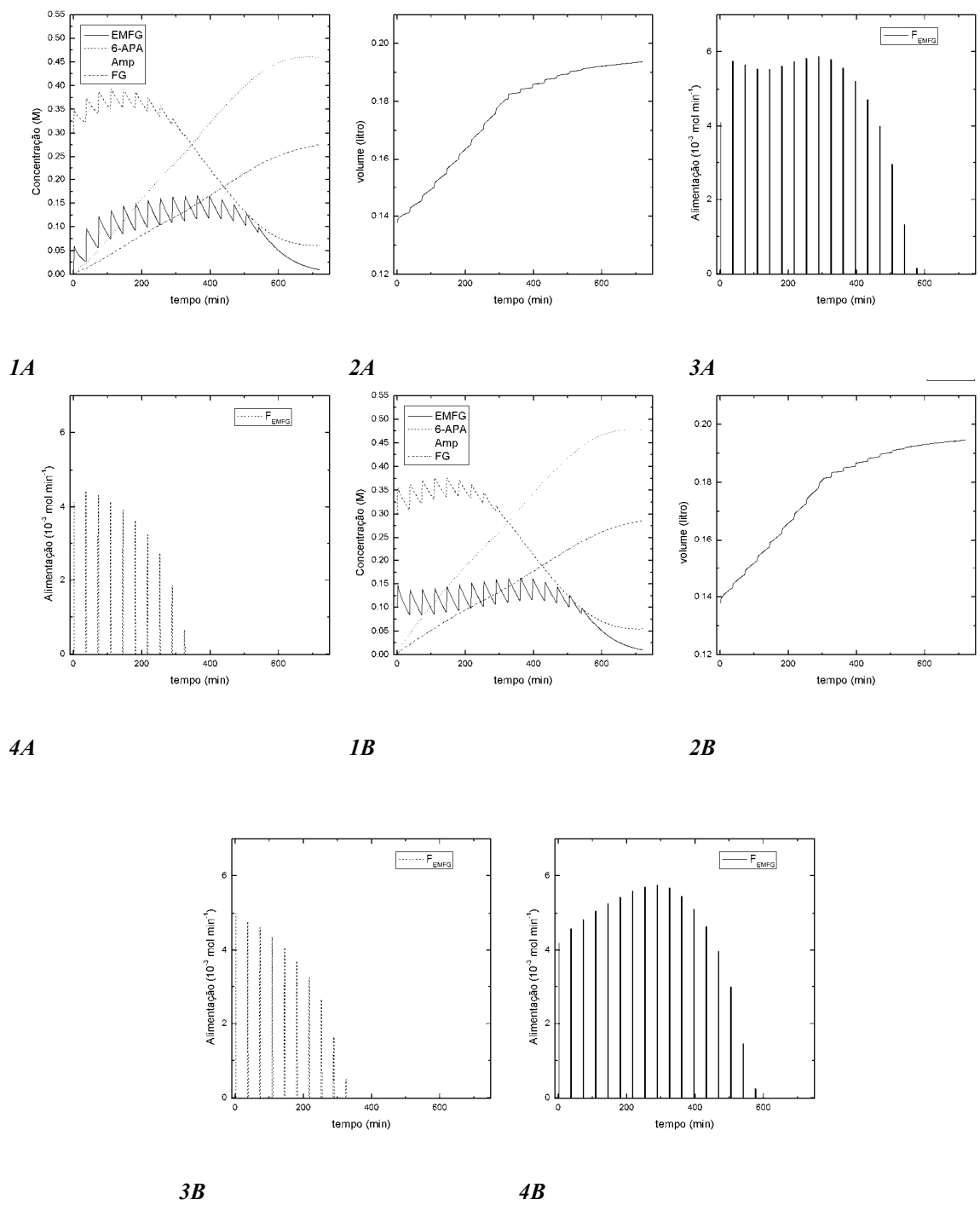


Figura 60 Resultados simulados para a síntese de ampicilina com alimentação de reagentes em pulsos. 1) simulação dos perfis de concentração obtidos utilizando alimentação dada 2) perfil de alimentação em pulso de EMFG e 3) de 6-APA. 4) volume do reator, V . A) $C_{EMFG}(0) = 0,01 \text{ M}$. B) $C_{EMFG}(0) = 0,10 \text{ M}$.

7.2 Ensaios experimentais:

7.2.1 Síntese de ampicilina

Experimentos de síntese de ampicilina foram realizados utilizando enzima imobilizada comercial (Recordatti, Itália) de carga enzimática de 260 UI/g cujo diâmetro médio é de 7 μm .

Alimentação dos reagentes em estado sólido foi realizada de forma discreta, i.e., em pulsos. O pH foi controlado em 6,5 com pH-stat Tritino (Metrohm) e solução de NaOH 2,0 M (como descrito na seção 6.1).

A adição dos reagentes, em pulsos, gera uma queda brusca do pH e o controlador não é capaz de manter o pH. Neste caso, ajuste manual do pH foi realizado quando necessário, transferindo de uma proveta para controle do volume adicionado.

Os experimentos de síntese se deram em reator de bancada (100 a 200 ml) encamisado com temperatura controlada a 25°C utilizando banho termostatizado. A agitação foi realizada com agitador mecânico. Para iniciar a reação, o 6-APA foi dissolvido controlando o pH abaixo de 7,0 para que não houvesse uma degradação acelerada do reagente. O EMFG foi então dissolvido controlando-se o pH em 6,5 (pH da reação). O volume da solução foi ajustado controlando-se o valor de pH. A solução reacional inicial foi mantida em reator para entrar em equilíbrio térmico com a camisa. A reação teve início quando o biocatalisador foi inserido na solução.

7.2.2 Amostragem do reator

Uma alíquota era retirada do reator utilizando micropipeta com filtro de placa porosa o que impedia a entrada de biocatalisador e cristais para a pipeta. A amostra era filtrada novamente utilizando filtro de papel. Esta amostra, contendo apenas a parte solúvel do

reator, era dividida em duas, uma para análise em espectrofotômetro através de multicalibração e outra para análise em HPLC.

7.2.3 Quantificação dos analitos de interesse

Duas metodologias foram utilizadas para o monitoramento das espécies de interesse: cromatografia líquida, como descrita na seção 5.6.1; e aquele desenvolvido empregando multicalibração.

Para utilizar os modelos de multicalibração e monitorar as concentrações no interior do reator durante a reação, alíquotas de amostra eram diluídas em tampão fosfato 0,1 M pH 5,5. Após a diluição, o perfil de absorção das amostras foi obtido, empregando espectrofotômetro, no intervalo entre 230 e 280 nm. Esses dados eram colocados no modelo ajustado de multicalibração e a concentração de cada componente de interesse era então, estimada. O modelo de multicalibração escolhido foi o PCR (vide seção 5.3.2).

Devido à dificuldade na separação do biocatalisador ao retirar amostras dos cristais que estão no reator, a concentração dos produtos, quando estes estavam cristalizados, foi estimada pelo balanço de massa.

7.3 Resultados obtidos

A Figura 61 mostra os resultados obtidos em síntese de ampicilina em reator semi-contínuo integrado para o caso **A** ($C_{EMFG}(0) = 0,01$ M). O gráfico 1 da Figura 61 mostra o perfil de concentrações obtidos através de análise em HPLC. As concentrações totais de ampicilina e fenilglicina foram estimadas a partir do balanço de massa. O gráfico 2 apresenta a predição do modelo utilizando alimentação dada pela Figura 60A e B, e os resultados experimentais.

Os resultados mostram um distanciamento entre o modelo e o processo real. Embora o monitoramento em tempo real tenha sido realizado com sucesso por meio de multicalibração em espectrofotômetro (vide Figura 61, gráficos de 4 a 7), nenhuma ação para o controle do perfil de concentrações foi tomada. Velocidades de reação mais altas que as previstas foram obtidas no início da reação. No entanto, a seletividade foi menor que a esperada.

Um ponto importante é que há aumento significativo na solubilidade tanto da ampicilina quanto da fenilglicina quando em meio reacional, ou seja, em solução multicomponente. O aumento na solubilidade da ampicilina poderia aumentar a velocidade de hidrólise do antibiótico em relação à prevista utilizando dados de equilíbrio dos componentes puros no modelo. Contudo, simulação utilizando solubilidades de ampicilina e fenilglicina obtidas neste ensaio experimental (≈ 60 mM) mostra uma redução em ambas as velocidades de reação (vide Figura 61, gráfico 8).

O gráfico 3 da Figura 61 mostra que o volume obtido experimentalmente foi bem superior que o previsto pelo modelo, em razão das velocidades experimentais de hidrólise do éster serem maiores que as previstas pelo modelo cinético – demandando, assim, mais base para controlar o pH do meio.

Observou-se também que a alta atividade enzimática no início da reação parece diminuir conforme a reação é levada a cabo. O aumento do volume além do previsto pode ter sido responsável por parte da queda na carga enzimática por volume de reator. Além disso, o aumento da quantidade de cristais no meio pode aumentar as resistências ao transporte de massa – por exemplo, bloqueando a entrada de poros do catalisador. Esse efeito, mais uma vez, aparentemente é menor para o catalisador envolvido por uma matriz secundária, como descrito em Ferreira, 2004a, e Giordano *et al.*, 2003.

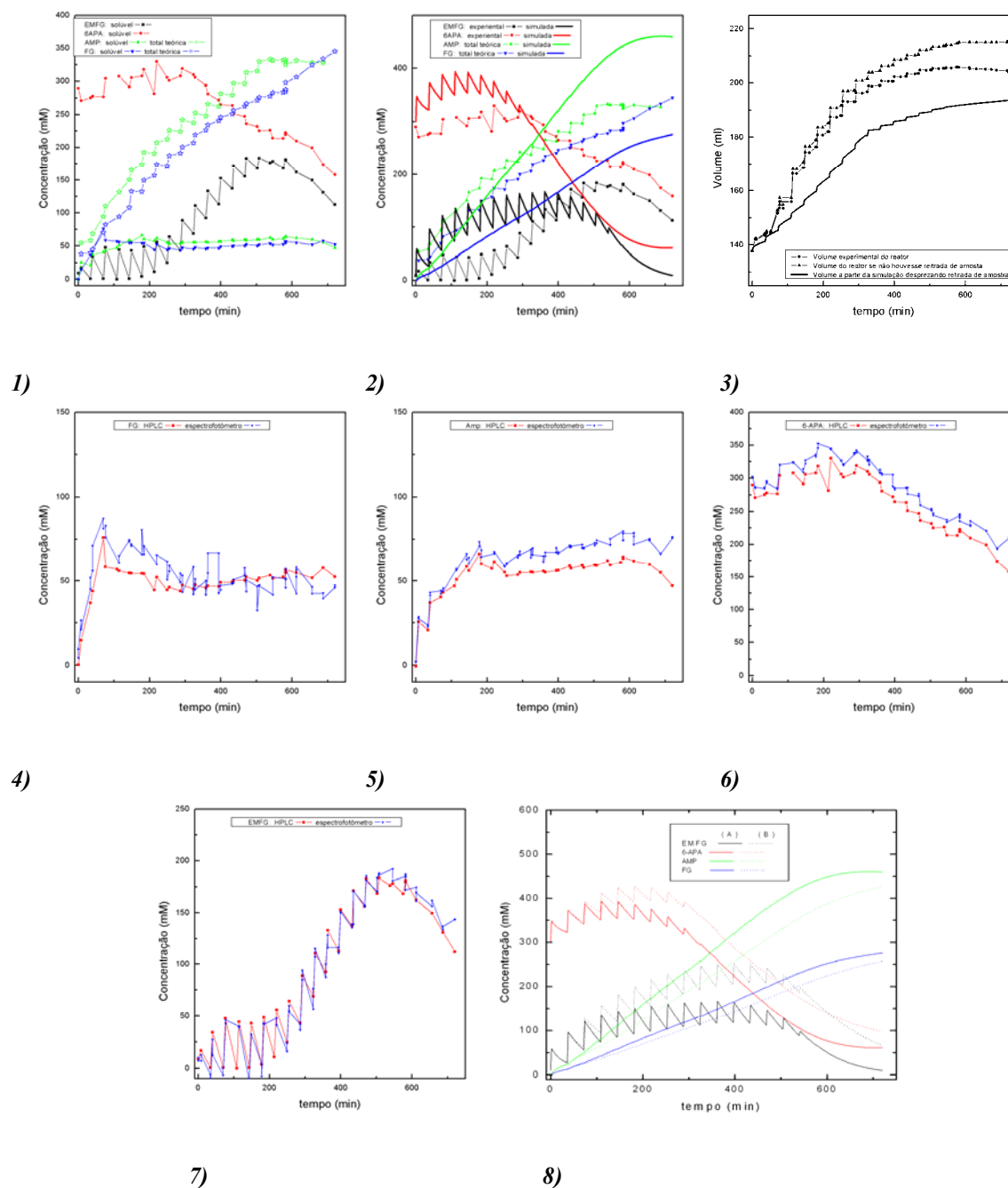


Figura 61 Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado semi-contínuo com alimentação de reagentes em pulsos. $C_{EMFG}(0) = 0,01$ M. 1) perfis de concentrações obtidos, onde as concentrações totais de ampicilina e fenilglicina foram estimadas pelo balanço de massa. 2) comparação entre perfis preditos pelo modelo, a partir da alimentação dada e perfis obtidos experimentalmente 3) volume predito, volume obtido experimentalmente e volume caso não houvesse a retirada de amostras. 4 – 7) comparação entre concentrações na fase solúvel obtidas através de análise de HPLC e espectrofotômetro via multicalibração. 8) perfil predito pelo modelo utilizando solubilidade das substâncias puras, ou seja, 25 mM, para ampicilina, (A —) e utilizando 60 mM como solubilidade da ampicilina (B ---).

Vale notar que neste ensaio a atividade enzimática inicial foi de aproximadamente 40 UI/ml de reator, muito acima das concentrações utilizadas nos ensaios do Capítulo 6, com um máximo de 10 UI/ml de reator. Essa maior quantidade de

biocatalisador foi empregada para reduzir o tempo de reação. Consequentemente, a razão enzima/substrato foi aumentada, o que pode causar discrepâncias em um modelo pseudo-homogêneo com cinética simplificada, como o empregado nos cálculos de otimização. Como a atividade enzimática pareceu muito maior que a predita no início da reação, isso implica numa não linearidade da atividade enzimática com a quantidade de biocatalisador utilizado.

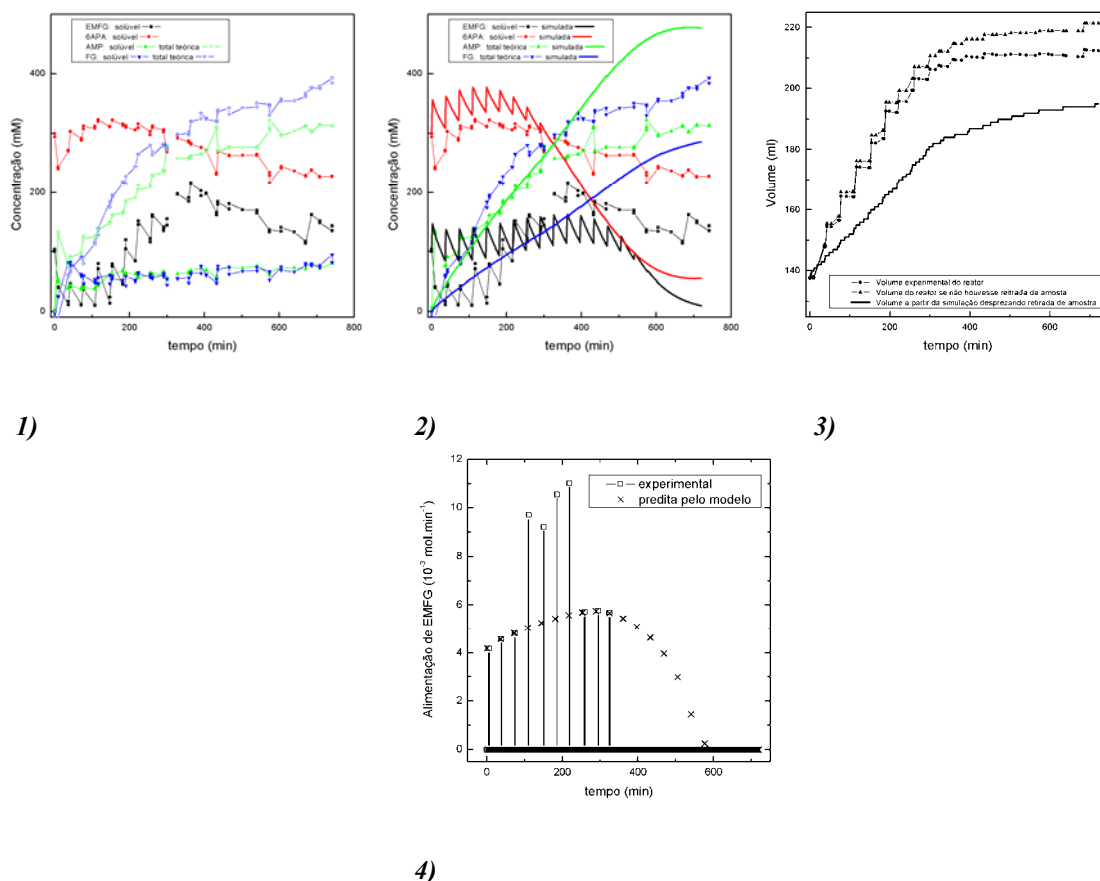


Figura 62 Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado semi-contínuo com alimentação de reagentes em pulsos. $C_{EMFG}(0) = 0,10$ M. 1) perfis de concentrações obtidos, onde as concentrações totais de ampicilina e fenilglicina foram estimadas pelo balanço de massa. 2) comparação entre perfis preditos pelo modelo, a partir da alimentação dada e perfis obtidos experimentalmente 3) volume predito, volume obtido experimentalmente e volume caso não houvesse a retirada de amostras. 4) perfil de alimentação ótima calculada e experimental.

A síntese de ampicilina utilizando o caso **B** simulado ($C_{EMFG}(0) = 0,10$ M) mostrou-se novamente desacoplar do modelo utilizado (Figura 62). Desta vez, entretanto, a alimentação estipulada inicialmente foi alterada na tentativa de aumentar a concentração de EMFG nas primeiras horas de reação (vide Figura 62, gráfico 4). Contudo, este controle manual não foi suficiente para manter os perfis de concentração nos valores estipulados. A

seletividade obtida foi menor à que a do ensaio anterior. O aumento do volume foi novamente maior que o esperado devido à maior velocidade de hidrólise.

Resultados obtidos por Ferreira, 2004a, em síntese enzimática de ampicilina em reator semi-contínuo utilizando biocatalisador industrial envolto por pectina mostraram seletividades muito acima da obtida nestes experimentos em condições de pH e temperatura similares. Além disso, os dados de Ferreira, 2004a, apresentam menor atividade enzimática. Como comentado anteriormente, isso pode indicar que um maior gradiente de pH no interior da partícula do biocatalisador envolto por pectina pode ter contribuído para aumentar a seletividade e diminuir a atividade do biocatalisador. Portanto, embora Ferreira, 2004a, tenha apresentado um bom desempenho em pH 6,5, no caso da utilização do biocatalisador Recordatti sem envolvimento de matriz secundária, a utilização de valores menores de pH pode ser decisiva. Contudo, o uso de biocatalisador fino que é o caso deste biocatalisador acaba gerando um problema de separação dos cristais formados, o que, com um catalisador envolto, devido à grande diferença no tamanho das partículas do biocatalisador e dos cristais, pode ser facilmente contornado com o uso de peneiras.

Portanto, embora resultados teóricos de alimentação ótima tenham sido obtidos, o modelo matemático do processo ainda não é suficientemente preciso para um resultado realista. Um modelo que leve em conta o pH parece ser cada vez mais necessário para permitir um ajuste fino na seletividade e produtividade do reator industrial de síntese de penicilinas semi-sintéticas. Um modelo empírico, baseado em redes neurais, pode ser melhor ajustado, contudo um maior número de dados experimentais será necessário para aumentar a confiabilidade do modelo. Assim, um extenso mapeamento cinético pode ser necessário.

Ainda assim, em reação a pH constante em reator semi-contínuo, os resultados obtidos em otimização dinâmica parecem indicar sempre uma mesma heurística, dividida em três etapas de reação. A utilização de diferentes modelos cinéticos ou catalisadores pode fazer

alterar os valores ótimos onde as concentrações de reagentes devem ser mantidas, contudo, uma diferença muito grande na heurística obtida não é esperada.

8 Conclusões

Durante a elaboração deste trabalho, diversos estudos foram realizados para ajudar a compreender a síntese enzimática de ampicilina. Além disso, ferramentas foram desenvolvidas para monitoração e otimização da síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas que poderão ser utilizadas na implementação da rota enzimática em reator industrial. Contudo, devido à complexidade do sistema, há ainda a necessidade de diversos estudos para se chegar a um processo ótimo para um reator industrial de síntese enzimática de ampicilina.

Dos estudos realizados, as principais conclusões obtidas serão brevemente comentadas.

O estudo do mecanismo da síntese enzimática de ampicilina utilizando a rota cineticamente controlada indicou que a ligação do 6-APA diretamente à enzima é possível e que este fato não impede que a formação do complexo acil-enzima ocorra. Isso torna o número de passos elementares de reação muito alto, e o ajuste de todos os parâmetros cinéticos, inviável. Resultados apresentando a inibição do 6-APA na hidrólise do EMFG fornecem informações importantes sobre a forma de operação do reator. Abordagem comumente encontrada na literatura é a inicialização do reator de síntese de ampicilina com altas concentrações de EMFG e baixas concentrações de 6-APA. Contudo, ao iniciar a reação com baixas concentrações de EMFG e altas concentrações de 6-APA evita-se a hidrólise do éster, aumentando a seletividade da reação.

Resultados obtidos a partir de cálculos teóricos indicam que há resistências difusivas apreciáveis no interior de biocatalisador de PGA imobilizada em alta carga. O atraso difusivo é, teoricamente, o suficiente para gerar perfis de pH no interior da partícula, o que

torna complexa a resposta do sistema reativo-difusivo, devido à dependência altamente não linear da cinética com o pH.

A otimização dinâmica utilizando modelos cinéticos simplificados presentes na literatura resultou em processos promissores quando aplicados em dois tipos de modelo de reator semi-contínuo integrado de ampicilina (com e sem variação de volume). Diferentes técnicas de otimização dinâmica foram utilizadas, obtendo-se resultados semelhantes. Uma mesma heurística foi obtida em todos os casos, em que o processo pode ser dividido em três partes: inicialização, onde os produtos são levados ao limite de solubilidade; produção, onde a fase líquida permanece em estado quase estacionário; e finalização, onde a concentração do substrato mais oneroso é reduzida.

A complexidade do sistema acarretará na utilização de modelos simplificados e/ou empíricos a fim de torná-lo mais facilmente tratável. Com isso, funções de alimentação obtidas teoricamente em algoritmos de controle ótimo poderão desviar-se da função de alimentação real calculadas para manter os perfis de concentração no reator otimizado em malha aberta. Além disso, qualquer perturbação nas variáveis de entrada do sistema poderá levá-lo a trajetórias bem distintas. Em vista disso, algum monitoramento da reação em tempo real é imprescindível se se pretende manter o controle da reação em um reator piloto ou industrial. A utilização de multicalibração, por meio de modelos lineares, a partir do espectro UV (em sistema FIA) mostrou-se viável no monitoramento do reator de síntese enzimática de ampicilina, reduzindo o tempo de análise de 30 minutos, comumente obtido por HPLC, para 1 ou 2 minutos. Além disso, ela permite o aumento do número de amostragens e de dados experimentais sem aumento na produção de solventes orgânicos, tal como a acetonitrila, utilizada na fase móvel em análise cromatográfica.

Era esperado que resultados obtidos utilizando modelos cinéticos simplificados presentes na literatura com parâmetros ajustados para enzimas livres ou imobilizadas em

baixa carga em gel de agarose, não predissessem exatamente o comportamento da síntese utilizando biocatalisador comercial de alta carga enzimática. Entretanto, os modelos cinéticos simplificados presentes na literatura, assumindo reator pseudo-homogêneo, após re-estimativa paramétrica, também não foram capazes de representar os dados em todas as regiões de concentrações quando se usou biocatalisador industrial. Contudo, os modelos foram capazes de descrever certas regiões de concentrações mais restritas, de interesse, com boa precisão. Resultados mostraram, também, que modelos empíricos (redes neurais) são capazes de representar os dados experimentais com boa precisão em todas as regiões utilizadas, contudo sua utilização confiável em algoritmo de controle ótimo ainda demandaria maior número de dados para treinamento das redes.

A utilização do modelo cinético reajustado para biocatalisador industrial em algoritmos de otimização resultou em um processo otimizado que segue a mesma heurística já obtida anteriormente. Entretanto, a seletividade teórica resultante foi bem menor que a apresentada experimentalmente na literatura utilizando o mesmo biocatalisador, no entanto, envolvido em uma segunda matriz. Isso pode indicar que a maior resistência difusiva presente no biocatalisador envolto por matriz secundária ocasionaria um perfil de pH no interior da partícula suficientemente pronunciado para aumentar a seletividade, em detrimento da redução na atividade enzimática.

Resultados experimentais obtidos em reator semi-contínuo integrado apresentaram um claro desvio entre o modelo utilizado e o processo real. Embora o monitoramento da reação tenha mostrado este desvio em tempo real, uma tentativa de controlar a reação manualmente não foi eficiente. Atividade enzimática maior que a predita pelo modelo no início da reação foi encontrada em ambos os ensaios experimentais. Seletividade resultante foi menor que a predita pelo modelo contudo, parte dessa queda pode ser atribuída à falta de controle do perfil de reagentes nos experimentos.

Um sistema automático de alimentação que atuasse para manter as concentrações de reagentes em perfis estipulados ajudaria a controlar a reação e melhorar em parte os resultados obtidos.

Os resultados obtidos, por sua vez, poderão ser utilizados para reajustar os modelos ou na sugestão de novos modelos. Com o aumento do número de dados experimentais, a utilização de um modelo cinético empírico (redes neurais, por exemplo) poderá melhorar a capacidade de interpolação dos pontos experimentais obtidos. Novos modelos cinéticos poderão ser acoplados aos algoritmos de otimização já desenvolvidos.

A utilização de biocatalisador comercial envolvido por matriz secundária pode apresentar melhores resultados para a seletividade. Se causa de melhores seletividades tiver como causa a queda do pH no interior da partícula, a utilização de biocatalisador não envolto em meio reacional com pH mais baixo poderá levar a um aumento da seletividade sem que maiores problemas difusionais sejam incorporados. Contudo, é necessário verificar a estabilidade do catalisador em sistema aquoso-precipitado. A utilização de um catalisador envolvido poderá aumentar a estabilidade do biocatalisador nesse ambiente, além de ser mais fácil de separá-lo dos cristais.

Finalmente, a utilização de um modelo que leve em conta o efeito do pH sobre a cinética, pode ser importante para permitir um ajuste fino na seletividade e produtividade do reator industrial de síntese de penicilinas semi-sintéticas.

9 Referências Bibliográficas

- Abbaspour, A.; Mirzajani, R. Simultaneous determination of phenytoin, barbital and caffeine in pharmaceuticals by absorption (zero-order) UV spectra and first-order derivative spectra - multivariate calibration methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 38, n. 3, p.420-427, 2005.
- Adler-Nissen, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier, 1986.
- Alkema, W.B.L.; Hensgens, C.M.H.; Snijder, H.J.; Keizer, E.; Dijkstra, B.W.; Janssen, D.B. Structural and kinetic studies on ligand binding in wild-type and active-site mutants of penicillin acylase. **Protein. Eng. Des. Sel.**, v. 17, n. 5, p.473-480, 2004.
- Alkema, W.B.L.; Dijkhuis, A.J.; de Vries, E.; Janssen, D.B. The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 8, p.2093-2100, 2002.
- Alkema, W.B.L.; Hensgens, C.M.H.; Kroezinga, E.H.; de Vries, E.; Floris, R.; van der Laan, J.M.; Dijkstra, B.W.; Janssen, D.B. Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. **Protein Eng.**, v. 13, n. 12, p.857-863, 2000.
- Andrade, S.R.C.; Scarminio, I.S.; Nery, M.M.F.; de Oliveira, A.C. Comparison of multivariate calibration methods to determine simultaneously mebendazole-cambendazole and mebendazole-thiabendazole in pharmaceutical preparations by UV-visible spectrophotometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 33, n. 4, p.655-665, 2003.
- Araujo, M.C.U.; Saldanha, T.C.B.; Galvao, R.K.H.; Yoneyama, T.; Chame, H.C.; Visani, V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, v. 57, n. 2, p.65-73, 2001.
- Balasingham, K.; Warburton, D.; Dunnill, P.; Lilly, M.D. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 276, n. 1, p.250-256, 1972.
- Banga, J.R.; Balsa-Canto, E.; Moles, C.G.; Alonso, A.A. Dynamic optimization of bioprocesses: Efficient and robust numerical strategies. **J. Biotechnol.**, v. 117, n. 4, p.407-419, 2005.
- Barros Neto, B.; Scarminio, S.I.; Bruns, R. **Como fazer experimentos, pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2a. ed. Campinas: UNICAMP, 2003.

- Biegler, L.T.; Grossmann, I.E.; Westerberg, A.W. **Systematic Methods of Chemical Process Design**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1997.
- Bock, A.; Wirth, R.; Schmid, G.; Schumacher, G.; Lang, G.; Buckel, P. The Penicillin Acylase From *Escherichia-Coli* Atcc11105 Consists Of 2 Dissimilar Subunits. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 20, n. 2, p.135-139, 1983.
- Brannigan, J.A.; Dodson, G.C.; Done, S.H.; Hewitt, L.; McVey, C.E.; Wilson, K.S. Structural studies of penicillin acylase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 88, n. 1-3, p.313-319, 2000.
- Bruggink, A.; Roy, P.D. **Synthesis of beta-Lactam antibiotics (Chapter I)**. 1st. ed. Netherlands: Kluwer, 2001.
- Bruns, W.; Hoppe, J.; Tsai, H.; Bruning, H.J.; Maywald, F.; Collins, J.; Mayer, H. Structure Of The Penicillin Acylase Gene From *Escherichia-Coli* - A Periplasmic Enzyme That Undergoes Multiple Proteolytic Processing. **J. Mol. Appl. Genet.**, v. 3, n. 1, p.36-44, 1985.
- Calleri, E.; Temporini, C.; Massolini, G. & Caccialanza, G. Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, n. 2, p.243-258, 2004.
- Cao, L.; van Langen, L.M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of beta-lactam antibiotics. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, n. 4-6, p.665-670, 2001.
- Cole, M. Factors Affecting Synthesis Of Ampicillin And Hydroxypenicillins By Cell-Bound Penicillin Acylase Of *Escherichia Coli*. **Biochem. J.**, v. 115, n. 4, p.757, 1969.
- Dantas, H.A.; Galvao, R.K.H.; Araujo, M.C.U.; da Silva, E.C.; Saldanha, T.C.B.; Jose, G.E.; Pasquini, C.; Raimundo, I.M.; Rohwedder, J.J.R. A strategy for selecting calibration samples for multivariate modelling. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, v. 72, n. 1, p.83-91, 2004.
- Diender, M.B.; Straathof, A.J.J.; van der Does, T.; Zomerdijk, M.; Heijnen, J.J. Course of pH during the formation of amoxicillin by a suspension-to-suspension reaction. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, n. 8, p.576-582, 2000.
- Diender, M.B.; Straathof, A.J.J.; van der Wielen, L.A.M.; Ras, C.; Heijnen, J.J. Feasibility of the thermodynamically controlled synthesis of amoxicillin. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 5, n. 1-4, p.249-253, 1998.
- Done, S.H.; Brannigan, J.A.; Moody, P.C.E.; Hubbard, R.E. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase. **J. Mol. Biol.**, v. 284, n. 2, p.463-475, 1998.

- Duggleby, H.J.; Tolley, S.P.; Hill, C.P.; Dodson, E.J.; Dodson, G.; Moody, P.C.E. Penicillin Acylase Has A Single-Amino-Acid Catalytic Center. **Nature**, v. 373, n. 6511, p.264-268, 1995.
- Edgar, T.F.; Himmelblau, D.M.; Lasdon, L.S. **Optimization of chemical processes**. McGraw-Hill, 2001.
- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Guisan, J.M. The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized Penicillin G acylase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 23, n. 5, p.305-310, 1998.
- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Piatkowska, B.; Guisan, J.M. Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: Evaluation and optimization of different synthetic approaches. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 19, n. 1, p.9-14, 1996.
- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Guisan, J.M. Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 13, p.898-905, 1991.
- Ferreira, A.L.O. **Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado**. 2004. Tese. UFSCar, São Carlos, 2004a.
- Ferreira, A.L.O.; Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C. Improving selectivity and productivity of the enzymatic synthesis of ampicillin with immobilized penicillin G acylase. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 21, n. 4, p.519-529, 2004b.
- Ferreira, A.L.O.; Goncalves, L.R.B.; Giordano, R.C.; Giordano, R.L.C. A simplified kinetic model for the side reactions occurring during the enzymatic synthesis of ampicillin. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 17, n. 4-7, p.835-839, 2000.
- Ferreira, A.L.O.; Goncalves, L.R.B.; Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C. Efeitos Difusivos na Síntese de Ampicilina Catalisada por Penicilina G Acilase Imobilizada. **ENEMP**. Campos do Jordão, 1999.
- Ferreira, L.S.; Trierweiler, J.O.; De Souza, M.B.; Folly, R.O.M. A lactose FIA-biosensor system for monitoring and process control. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 21, n. 2, p.307-315, 2004.
- Fogler, H.S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 3a. ed. LTC, 2002.
- Ghosh, A.C.; Bora, M.M.; Dutta, N.N. Developments in liquid membrane separation of beta-lactam antibiotics. **Bioseparation**, v. 6, n. 2, p.91-105, 1996.
- Giordano, R.C.; Ribeiro, M.P.A.; Giordano, R.L.C. Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, n. 1, p.27-41, 2006.

- Giordano, R.C., Giordano, R.L.C.; Ferreira, A.L.O. **Protection of insoluble enzymatic biocatalysts consists of a physical integrity and catalytic activity enhancer for prolonged separation of the biocatalyst.** 2003. Patent no. WO2004050822-A1, 2003
- Goncalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C. Inhibitory effects in the side reactions occurring during the enzymic synthesis of amoxicillin: p-hydroxyphenylglycine methyl ester and amoxicillin hydrolysis. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 38, p.77-85, 2003.
- Goncalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Giordano, R.L.C. The role of 6-aminopenicillanic acid on the kinetics of amoxicillin enzymatic synthesis catalyzed by penicillin G acylase immobilized onto glyoxyl-agarose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, n. 4, p.464-471, 2002.
- Goncalves, L.R.B. **Estudo cinético da síntese enzimática de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em agarose.** 2001. Tese. UFSCar, São Carlos, Brasil, 2001a
- Goncalves, L.R.B.; Suzuki, G.S.; Giordano, R.C.; Giordano, R.L.C. Kinetic and mass transfer parameters of maltotriose hydrolysis catalyzed by glucoamylase immobilized on macroporous silica and wrapped in pectin gel. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 91-3, p.691-702, 2001b.
- Goncalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Giordano, R.L.C. A kinetic study of synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 84-6, p.931-945, 2000.
- Goncalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J.M. Influência do pH e da temperatura na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina g acilase imobilizada em gel de agarose. **Anais do XII Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM).** Uberlândia, 1998.
- Goncalves, L.R.B.; Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C. Effects of diffusion on the kinetics of maltose hydrolysis using glucoamylase immobilized on macroporous silica. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 14, n. 4, 1997.
- Haaland, D.M.; Thomas, E.V. Partial Least-Squares Methods For Spectral Analyses.1. Relation To Other Quantitative Calibration Methods And The Extraction Of Qualitative Information. **Anal. Chem.**, v. 60, n. 11, p.1193-1202, 1988.
- Haykin, S. **Redes Neurais: Princípios e Práticas.** 2nd. ed. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- Himmelblau, D.M. **Process analysis by statistical methods.** J. Willie, 1970.
- Hou, J.P.; Poole, J.W. Amino Acid Nature Of Ampicillin And Related Penicillins. **J. Pharm. Sci.**, v. 58, n. 12, p.1510-1515, 1969.

- Inaba, Y.; Mizukarni, K.; Harnada-Sato, N.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Watanabe, E. Development of a D-alanine sensor for the monitoring of a fermentation using the improved selectivity by the combination of D-amino acid oxidase and pyruvate oxidase. **Biosens. Bioelectron.**, v. 19, n. 5, p.423-431, 2003.
- Joly, M.; Pinto, J.M. Optimal control of product quality for batch nylon-6,6 autoclaves. **Chem. Eng. J.**, v. 97, n. 2-3, p.87-101, 2004.
- Kasche, V. Mechanism And Yields In Enzyme Catalyzed Equilibrium And Kinetically Controlled Synthesis Of Beta-Lactam Antibiotics, Peptides And Other Condensation Products. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 8, n. 1, p.4-16, 1986.
- Kasche, V. Ampicillin-Synthesis And Cephalixin-Synthesis Catalyzed By Escherichia-Coli Penicillin Amidase - Yield Increase Due To Substrate Recycling. **Biotechnol. Lett.**, v. 7, n. 12, p.877-882, 1985.
- Kasche, V.; Haufler, U.; Zollner, R. Kinetic-studies on the mechanism of the penicillin amidase-catalyzed synthesis of ampicillin and benzylpenicillin. **Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**, v. 365, n. 12, p.1435-1443, 1984.
- Kazan, D.; Ertan, H.; Erarslan, A. Stabilization of penicillin G acylase against pH by chemical cross-linking. **Process. Biochem.**, v. 31, n. 2, p.135-140, 1996.
- Kim, M.G.; Lee, S.B. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of beta-lactam antibiotics in water-methanol mixtures: Effect of cosolvent content and chemical nature of substrate on reaction rates and yields. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 1, n. 3-6, p.201-211, 1996.
- Lehninger, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 5a. ed. Saevier, 1989.
- Leite, O.D.; Fatibello-Filho, O.; Rocha, F.R.P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, v. 27, p.337-341, 2004.
- Lopez-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **J. Biotechnol.**, v. 116, n. 1, p.1-10, 2005.
- Magalhães, L.C.G.; Safatle, L.P.; Leal, J.C.; Tomich, F.A.; Silveira, F. Tendências da balança de comércio exterior da indústria farmacêutica brasileira: evolução das importações e exportações de farmoquímicos e medicamentos na década de 1990. **Planejamento e políticas públicas (PPP), Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - Ipea, Brasília**, n. 26, p.33-63, 2003.
- Margolin, A.L.; Svedas, V.K.; Berezin, I.V. Substrate-specificity of penicillin amidase from escherichia-coli. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 616, n. 2, p.283-289, 1980.

- McVey, C.E.; Walsh, M.A.; Dodson, G.G.; Wilson, K.S.; Brannigan, J.A. Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: Structural insights into the catalytic mechanism. **J. Mol. Biol.**, v. 313, n. 1, p.139-150, 2001.
- Nelles, O. **Nonlinear System Identification**. 1st. ed., 2001.
- Ospina, S.; Barzana, E.; Ramirez, O.T.; LopezMunguia, A. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 19, n. 6, p.462-469, 1996a.
- Ospina, S.; Barzana, E.; Ramirez, O.T.; LopezMunguia, A. Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin: a whole cell E. coli recombinant penicillin amidase biocatalyst. **Progr. Biotechnol.**, v. 11, p.464-471, 1996b.
- Ospina, S.S.; Lopezmunguia, A.; Gonzalez, R.L.; Quintero, R. Characterization And Use Of A Penicillin Acylase Biocatalyst. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 53, n. 2, p.205-213, 1992.
- Pinto, J.C.; Lage, P.L.C. **Métodos numéricos em problemas de engenharia química**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.
- Polderman-Tijmes, J.J. **Biochemical characterization of alpha-amino acid ester hydrolases**. 2004. Tese. University of Groningen, The Netherlands, 2004
- Press, W.H.; Flannery, B.P.; Teukolsky, S.A.; Vetterling, W.T. **Numerical Recipes: the art of Scientific Programming**. 2nd. ed. Cambridge, 2002.
- Ramirez, W.F. **Process control and identification**. 1st. ed. San Diego: Academic Press, 1994.
- Ribeiro, M.P.A.; Ferreira, A.L.O.; Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C. Selectivity of the enzymatic synthesis of ampicillin by E-coli PGA in the presence of high concentrations of substrates. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 33, n. 3-6, p.81-86, 2005a.
- Ribeiro, M.P.D.; Giordano, R.D. Variational calculus (optimal control) applied to the optimization of the enzymatic synthesis of ampicillin. **Braz. Arch. Biol. Tech.**, v. 48, p.19-28, 2005b.
- Rudolph, E.S.J.; Zomerdijk, M.; Luyben, K.C.A.M.; van der Wielen, L.A.M. Correlating the phase behaviour of semi-synthetic antibiotics and their precursors in water+1-butanol mixtures. **Fluid Phase Equilib.**, v. 160, p.903-912, 1999.
- Schroen, C.G.P.H.; Nierstrasz, V.A.; Bosma, R.; Kroon, P.J.; Tjeerdsma, P.S.; DeVroom, E.; VanderLaan, J.M.; Moody, H.M.; Beeftink, H.H.; Janssen, A.E.M.; Tramper, J. Integrated reactor concepts for the enzymatic kinetic synthesis of cephalixin. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 80, n. 2, p.144-155, 2002.

- Schroen, C.G.P.H.; Nierstrasz, V.A.; Moody, H.M.; Hoogschagen, M.J.; Kroon, P.J.; Bosma, R.; Beeftink, H.H.; Janssen, A.E.M.; Tramper, J. Modeling of the enzymatic kinetic synthesis of cephalixin - Influence of substrate concentration and temperature. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 73, n. 3, p.171-178, 2001.
- Schroen, C.G.P.H.; Nierstrasz, V.A.; Kroon, P.J.; Bosma, R.; Janssen, A.E.M.; Beeftink, H.H.; Tramper, J. Thermodynamically controlled synthesis of beta-lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 24, n. 8-9, p.498-506, 1999.
- Schulz, A.R. **Enzyme Kinetics: from diastase to multi-enzyme systems**. 1st. ed. New York: Cambridge, 1994.
- Sengupta, S.; Modak, J.M. Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme processes. **Chem. Eng. Sci.**, v. 56, n. 11, p.3315-3325, 2001.
- Smets, I.Y.; Van Impe, J.F. Optimal control of (bio-)chemical reactors: generic properties of time and space dependent optimization. **Math. Comput. Simulat.**, v. 60, n. 6, p.475-486, 2002.
- Spieß, A.; Schlothauer, R.C.; Hinrichs, J.; Scheidat, B.; Kasche, V. pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of beta-lactam hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62, n. 3, p.267-277, 1999.
- Srinivasan, B.; Palanki, S.; Bonvin, D. Dynamic optimization of batch processes - I. Characterization of the nominal solution. **Comput. Chem. Eng.**, v. 27, n. 1, p.1-26, 2003.
- Travascio, P.; Zito, E.; De Maio, A.; Schroen, C.G.P.H.; Durante, D.; De Luca, P.; Bencivenga, U. & Mita, D.G. Advantages of using non-isothermal bioreactors for the enzymatic synthesis of antibiotics: The penicillin G acylase as enzyme model. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 79, n. 3, p.334-346, 2002.
- Unger, J.; Kroner, A. & Marquardt, W. Structural-Analysis Of Differential-Algebraic Equation Systems - Theory And Applications. **Comput. Chem. Eng.**, v. 19, n. 8, p.867-882, 1995.
- Vassiliadis, V.S.; Sargent, R.W.H. & Pantelides, C.C. Solution of a class of multistage dynamic optimization problems.1. problems without path constraints. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 33, n. 9, p.2111-2122, 1994.
- Vieira, M.F. **Separação de ampicilina produzida enzimaticamente por reação entre éster metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico**. 2003. Tese. UFSCar, São Carlos, Brasil, 2003

- Wegman, M.A.; Janssen, M.H.A.; van Rantwijk, F. & Sheldon, R.A. Towards biocatalytic synthesis of beta-lactam antibiotics. **Adv. Synth. Catal.**, v. 343, n. 6-7, p.559-576, 2001.
- Youshko, M.I.; Bukhanov, A.L. & Svedas, V.K. Study of nucleophile binding in the penicillin acylase active center. Kinetic analysis. **Biochemistry-Moscow**, v. 68, n. 3, p.334-338, 2003.
- Youshko, M.I.; Chilov, G.G.; Shcherbakova, T.A. & Svedas, V.K. Quantitative characterization of the nucleophile reactivity in penicillin acylase-catalyzed acyl transfer reactions. **Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics**, v. 1599, n. 1-2, p.134-140, 2002a.
- Youshko, M.I.; van Langen, L.M.; de Vroom, E.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. & Svedas, V.K. Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: A new approach to optimization. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 78, n. 5, p.589-593, 2002b.
- Youshko, M.I.; van Rantwijk, F. & Sheldon, R.A. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by aminoacylase I. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 12, n. 23, p.3267-3271, 2001.
- Youshko, M.I.; van Langen, L.M.; de Vroom, E.; Moody, H.M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. & Svedas, V.K. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in "aqueous solution-precipitate" systems. High substrate concentration and supersaturation effect. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 10, n. 5, p.509-515, 2000a.
- Youshko, M.I. & Svedas, V.K. Kinetics of ampicillin synthesis catalyzed by penicillin acylase from E-coli in homogeneous and heterogeneous systems. Quantitative characterization of nucleophile reactivity and mathematical modeling of the process. **Biochemistry-Moscow**, v. 65, n. 12, p.1367-1375, 2000b.