

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

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA EM**  
**REATOR INTEGRADO**

Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

São Carlos – SP  
2004

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

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA EM**  
**REATOR INTEGRADO**

Autora: Andrea Lopes de Oliveira Ferreira  
Orientador: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel de Lima Camargo Giordano

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 - SP  
Fevereiro de 2004

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

F383se

Ferreira, Andrea Lopes de Oliveira.

Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado/  
Andrea Lopes de Oliveira Ferreira. -- São Carlos : UFSCar,  
2004.

190 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2004.

1. Biotecnologia - processos. 2. Redes neurais. 3. Reator  
em vortice. 4. Ampicilina. 5. Antibióticos. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE  
ANDREA LOPES DE OLIVEIRA FERREIRA APRESENTADA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA, DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 11 DE FEVEREIRO DE  
2004.

BANCA EXAMINADORA:

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel de Lima Camargo Giordano  
(Co-Orientadora PPG-EQ/UFSCar)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rocha de Barros Gonçalves  
(DEQ/UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo  
(IQ/UNESP)

---

Prof. Dr. Massami Yonashiro  
(DQ/UFSCar)

---

Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz  
(DEQ/UFSCar)

Ao painho, à mainha  
Ao Son, à Heloísa e ao Binho

“Saberíamos muito mais das complexidades da vida se nos aplicássemos a estudar com afinco as suas contradições em vez de perdermos tanto tempo com as identidades e as coerências, que essas têm obrigação de explicar-se por si mesmas”.

J. Saramago

## **AGRADECIMENTOS**

Ao término desta tese tenho a oportunidade de agradecer aquelas pessoas que sem o apoio e ajuda, com certeza, este trabalho seria uma tarefa árdua. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a professora Luciana Rocha Barros Gonçalves pela ajuda no desenvolvimento desta tese e pelas boas discussões tanto científicas quanto humanas; a professora Raquel de Lima Camargo Giordano por seus valiosos conselhos, críticas francas e comentários que foram de generosa ajuda. Agradeço aos amigos que encontrei pelo caminho que enriqueceram minha vida e fizeram as jornadas passadas, e as ainda por vir valerem a pena serem feitas: Kelly Frigo Valverde, Alexandre Valverde, Caio Valverde, Ana Claudia Ambrosio Lucke da Silva, Roger L. Lucke da Silva, Ana Paula Turci, Renato, Juliana Almeida, Edson Daniel, Adriana Almeida, Leandro, Andréia, Kléber, Verinha, Letícia. Quero também expressar minha gratidão aos amigos do laboratório pelo espírito profissional, pela estima e amizade a mim dedicados nos momentos de troca de idéias e descontração: Rosineide, professor Antonio Cruz, Suzana, Ruy Jr., Célia Maria, Charles, Paulo, Marcelo Vieira, Angélica, Renata, Patrick, Rafael, Álvaro, Camila, Vanessa, Juliana, Laura, Edson, Anny, Marcelo Ribeiro, Maria Márcia, Marina Gracindo, Eneida de Lucca, Luis Augusto (Guto), Romilda Fernandez, Riberte, Miriam Maria, Ocileide Custódio, Adriana Martin, Militão, Maria Helena, professor Alberto, Fernando Camargo e Júlio Dainezi. Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria realizado. Finalmente, gostaria de agradecer ao professor Roberto de Campos Giordano, talentoso e dedicado, que me ensinou a gostar de fazer pesquisa (para aprender é preciso ter admiração pelo mestre).

## SUMÁRIO

	página
<i>Nomenclatura</i> .....	<i>i</i>
<i>Lista de figuras</i> .....	<i>iii</i>
<i>Lista de tabelas</i> .....	<i>viii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>x</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>xi</i>
1 Introdução.....	01
2 Revisão Bibliográfica.....	05
2.1 Enzimas.....	05
2.1.1 Penicilina G Acilase.....	07
2.1.2 Uso da PGA como Catalisador de Síntese de Antibióticos.....	08
2.1.3 Imobilização da PGA.....	09
2.1.4 Suportes para Imobilização.....	11
2.1.4.1 Gel de agarose.....	12
2.1.4.2 Sílica macroporosa.....	13
2.2 Penicilinas.....	14
2.2.1 Histórico.....	15
2.2.2 Estrutura Geral.....	16
2.2.3 Nomenclatura.....	16
2.2.4 Uso Terapêutico.....	17
2.2.5 Obtenção.....	17
2.2.5.1 Fermentação.....	17
2.2.5.2 Semi-sintéticas.....	18
2.2.5.3 Sintética.....	18

2.3 Ampicilina.....	18
2.4 Cinética Enzimática.....	20
2.5 Síntese Enzimática de Ampicilina.....	21
2.5.1 Síntese Termodinamicamente Controlada.....	22
2.5.2 Síntese Cineticamente Controlada.....	24
2.5.3 Efeito dos Solventes Orgânicos.....	26
2.5.4 Dependência do pH.....	27
2.5.5 Dependência da Temperatura.....	28
2.5.6 Efeito da Concentração Iônica.....	28
2.5.7 Influência da Concentração dos Substratos.....	29
2.6 Redes Neurais na Cinética da Síntese de Ampicilina.....	30
2.7 Sistema Híbrido-Neural.....	32
2.8 Reatores para Síntese Enzimática de Antibióticos.....	34
2.8.1 Reator de Leito Fixo.....	35
2.8.2 Reator de Escoamento em Vórtices (REV).....	36
3 Materiais e Métodos.....	39
3.1 Imobilização da PGA aos Diferentes Suportes.....	39
3.1.1 Materiais e Equipamentos.....	39
3.1.2 Pré-tratamento das Membranas de Diálise.....	40
3.1.3 Diálise.....	40
3.2 Ativação dos Suportes.....	40
3.2.1 Ativação do Gel de Agarose.....	40
3.2.2 Oxidação do Gel Ativado a Gel Aldeído.....	41
3.2.3 Ativação da Sílica.....	41
3.2.4 Oxidação da Sílica Silanizada.....	43
3.2.5 Metodologia para Quantificação do Número de Grupos Aldeídos dos Suportes.....	43
3.3 Imobilização da PGA.....	44



3.4 Método PDAB para Determinação da Atividade da PGA.....	46
3.5 Ensaio de Síntese.....	47
3.5.1 Materiais e Equipamentos.....	47
3.5.2 Procedimento para as Sínteses em Reator de Mistura.....	47
3.5.3 Procedimento para as Sínteses em Reator de Leito Fixo.....	49
3.5.4 Método Analítico.....	50
3.6 Planejamento Experimental.....	50
4 Resultados e Discussões.....	53
4.1 Resultados da Imobilização em Agarose.....	53
4.2 Resultados do Planejamento Fatorial da Síntese de Ampicilina.....	54
4.2.1 Rendimento de Síntese com Relação à Concentração Inicial de 6-APA.....	55
4.2.2 Produtividade da Síntese de Ampicilina.....	61
4.2.3 Seletividade da Síntese de Ampicilina.....	66
4.2.4 Razão de Concentração dos Reagentes para a Síntese de Ampicilina.....	73
4.3 Resultados da Imobilização em Sílica.....	76
4.4 Síntese de Ampicilina com PGA Imobilizada em sílica em Reator de Leito Fixo.....	78
4.5 Uso de Redes Neurais na Modelagem Cinética da Síntese Enzimática de Ampicilina.....	84
4.5.1 Treinamento da Rede Neural.....	84
4.5.2 Validação das Redes Neurais.....	88
4.5.3 Modelo Híbrido-Neural.....	89
4.6 Síntese de Ampicilina com Alta Concentração Inicial de Reagentes em Reator de mistura.....	92
4.7 Atividade do Biocatalisador de Alta Carga Enzimática.....	95
4.8 Síntese de Ampicilina em Reator em Vórtices.....	99
5 Conclusões.....	109
6 Referências Bibliográficas.....	111
Apêndice A.....	123
A.1 Redes Neurais Artificiais.....	123
A.1.1 Breve Histórico.....	123

A.1.2 Neurônios Biológicos.....	126
A.1.3 Componentes de um Neurônio Artificial.....	127
A.1.4 Arquitetura de uma RNA.....	129
A.1.5 Aprendizado ou Treinamento de RNAs.....	130
A.1.6 Treinamento com Algoritmo Retropropagação ( <i>Back-Propagation</i> ).....	131
A.1.7 Parâmetros de Treinamento da Rede Neural.....	132
A.1.8 Vantagens do Uso de Redes Neurais.....	134
A.2 Sistema Híbrido-Neural.....	135
A.3 Aplicações.....	137
Apêndice B.....	139
B.1 Reator de Escoamento em Vórtices (REV).....	139
Apêndice C.....	147
C.1 Método de Análise em HPLC das Substâncias Químicas Envolvidas na Síntese de Ampicilina.....	147
C.1.1 Fase Móvel 1.....	147
C.1.2 Fase Móvel 2.....	147
C.1.3 Fase Móvel 3.....	148
C.1.4 Fase Móvel 4.....	148
Apêndice D.....	149
D.1 Procedimento para Obtenção de Fotografias Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	149
D.2 Referências.....	150
Apêndice E.....	151
E.1 Resultados do Programa de Planejamento Fatorial.....	151

## NOMENCLATURA

Símbolo	Descrição	Unidade
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico	-
7-ADCA	Ácido 7-aminodiacetocefalosporânico	-
AFA	Ácido fenilacético	-
AG	Gel de agarose	-
BCL	Ligações cruzadas (bond cross linked)	-
$d$	espaço anular	L
E	Enzima	-
EMFG	Éster fenilglicinato de metila	-
ES	Complexo enzima-substrato	-
$f(x)$	Função de saída	-
FCTP	Fluxo de Taylor-Couette-Poiseuille	-
FG	Fenilglicina	-
G	Energia livre de Gibbs	$ML^2T^{-2}$
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten	$ML^{-3}$
P	Produto	-
$P$	Produtividade	$ML^{-3}T^{-1}$
PG	Penicilina G	-
PGA	Enzima penicilina G acilase	-
$r$	raio	L
$r_s$	Velocidade de reação enzimática	$ML^{-3}T^{-1}$
R	Rendimento de Síntese	-

Símbolo	Descrição	Unidade
$R_i$	raio do cilindro interno	L
RFV	Reator de fluxo em vórtices	-
S	Substrato	-
$S$	Seletividade	-
t	tempo	T
Ta <sub>c</sub>	valor do número de Taylor crítico	-
UI	Unidade internacional, PG 5% a 37°C e pH 8	MT <sup>-1</sup>
$V_d$	Relação entre a velocidade com que os vórtices caminhavam ao longo do reator e a velocidade axial média	-
$V_{max}$	Velocidade máxima	ML <sup>-3</sup> T <sup>-1</sup>
$x$	Dados de entrada	
$\Omega_i$	rotação do cilindro interno	T <sup>-1</sup>
$\varphi$	Adimensional de comprimento	-
$\lambda$	Amplitude axial do vórtice	L
$\tau$	Adimensional de tempo	-

Obs.: Na unidade o indicador ( - ) indica que o símbolo não tem unidade, espaço em branco indica que o símbolo tem unidade variável.

## LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1.1: Desenvolvimento de um processo enzimático de interesse comercial. <sup>20</sup> .....	02
Figura 2.1: PGA de <i>E. coli</i> , subunidade $\alpha$ (em lilás), subunidade $\beta$ (em vermelho) e serina (em verde) .....	08
Figura 2.2: Representação diagramática das técnicas de imobilização. (a) ligação covalente, (b) adsorção, (c) entrecruzamento, (d) encapsulamento. <sup>4</sup> .....	10
Figura 2.3: Propriedades da enzima imobilizada. <sup>168</sup> .....	11
Figura 2.4: Suportes para imobilização. <sup>67</sup> .....	12
Figura 2.5: molécula de agarobiose.....	13
Figura 2.6: Derivado anidro da galactose.....	13
Figura 2.7: Estrutura geral das penicilinas.....	16
Figura 2.8: Ampicilina e circundado o anel $\beta$ -lactâmico.....	20
Figura 2.9: Rendimento da síntese de ampicilina em função do tempo, controle cinético e controle termodinâmico. <sup>173</sup> .....	21
Figura 2.10: Síntese de ampicilina termodinamicamente controlada.....	22
Figura 2.11: Síntese de ampicilina cineticamente controlada.....	24
Figura 2.12: Passos do mecanismo proposto para a ação catalítica da penicilina G acilase na hidrólise de penicilina G. 39.....	26
Figura 2.13: Reações envolvidas na síntese enzimática de ampicilina a partir de EMFG.....	30
Figura 2.14: Esquema experimental do reator de leito fixo para síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em sílica.....	35
Figura 2.15: Reator de escoamento em vórtice de Taylor-Poiseuille.....	36
Figura 3.1: Reação do gel com glicidol em meio alcalino.....	40
Figura 3.2: Reação de oxidação até gel-aldeído na presença de periodato de sódio.....	41
Figura 3.3: Silanização (ativação) da sílica porosa.....	42
Figura 3.4: Hidrólise do suporte silanizado com ácido sulfúrico.....	43
Figura 3.5: Reação de oxidação na presença de periodato de sódio.....	43
Figura 3.6: Imobilização de PGA a suporte ativado.....	45
Figura 3.7: Detalhe da síntese no momento da retirada de amostra com filtro na ponta da pipeta.....	48
Figura 3.8: Equipamento utilizado em todos os ensaios a 25°C.....	48
Figura 3.9: Esquema experimental do reator para síntese de ampicilina catalisada por PGA.....	49

	página
Figura 4.1:	Gráfico de probabilidade cumulativa dos efeitos de rendimento de síntese. Efeitos significativos • e efeitos desprezados o..... 59
Figura 4.2:	Diagramas para interpretação dos resultados do planejamento fatorial ..... 60
Figura 4.3:	Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 4°C, pH 6,5, Cinicial de 6-APA = 10mM, Cinicial de EMFG = 50mM sem adição de metanol e tampão fosfato..... 61
Figura 4.4:	Gráfico de interação pH e concentração inicial de 6-APA para produtividade..... 62
Figura 4.5:	Gráfico de interação pH e tampão fosfato para produtividade..... 62
Figura 4.6:	Gráfico do efeito da concentração inicial de 6-APA sobre a produtividade na temperatura de 25°C e pH 6,5..... 64
Figura 4.7:	Gráfico de probabilidade cumulativa dos efeitos de produtividade. Efeitos significativos em preto..... 65
Figura 4.8:	Gráfico do efeito da concentração inicial de 6-APA sobre a seletividade nas temperaturas de 4 e 25°C e pHs de 6,5 e 7,5..... 68
Figura 4.9:	Gráfico de probabilidade normal dos efeitos da seletividade do antibiótico ao EMFG.Efeitos desprezados: Δ..... 69
Figura 4.10:	Gráfico para reagentes e produtos ao longo do tempo na síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5, Cinicial de 6-APA = 50mM, Cinicial de EMFG = 50mM sem adição de metanol e tampão fosfato..... 72
Figura 4.11:	Ensaio de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina, pH 6,5; 25oC, 50mM 6-APA, PGA imobilizada com 20UI/ggel. Barras de erro são ensaios em triplicata. VAMP = velocidade inicial do antibiótico, VFG = velocidade inicial da fenilglicina, S/H = VAMP/VFG..... 74
Figura 4.12:	Ensaio de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina, pH 6,5; 25oC, 10mM 6-APA, PGA imobilizada com 20UI/ggel. VAMP = velocidade inicial do antibiótico, VFG = velocidade inicial da fenilglicina, S/H = VAMP/VFG..... 74
Figura 4.13:	Ensaio de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina com PGA livre, pH 6,5; 25oC, 50mM 6-APA. VAMP = velocidade inicial do antibiótico, VFG = velocidade inicial da fenilglicina, S/H = VAMP/VFG..... 75
Figura 4.14:	Ensaio de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina com PGA livre, pH 6,5; 25oC, 10mM 6-APA. VAMP = velocidade inicial do antibiótico, VFG = velocidade inicial da fenilglicina, S/H = VAMP/VFG..... 76
Figura 4.15:	Gráfico da síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em sílica a 25°C, pH 6,5, Cinicial de 6-APA = 50mM, Cinicial de EMFG = 50mM, 20UI/gss..... 78

	página
Figura 4.16: Perfis de concentrações de EMFG durante as sínteses de ampicilina com diferentes vazões ao longo do tempo. Concentrações iniciais de reagentes: 20mM. T = 25°C, carga enzimática de 6UI/gss e pH 6,5. As vazões foram 15, 30, 45 e 60mL/min.....	81
Figura 4.17: Perfis de concentrações de EMFG durante as sínteses de ampicilina com diferentes cargas enzimáticas ao longo do tempo. Concentrações iniciais de reagentes: 20mM. T = 25°C, vazão de 30mL/min e pH 6,5. As cargas enzimáticas foram: 6, 11, 20 e 37UI/gss .....	82
Figura 4.18: Teste de sensibilidade paramétrica do modelo. Atividade 120UI/gss. Vaz=25 mL/min, T= 25°C e pH 6,5.....	83
Figura 4.19: Exemplo de resultado da simulação do reator de leito fixo, com reciclo total. Atividade 120 UI/gss. Vaz=25 ml/min, T = 25°C e pH 6,5 .....	83
Figura 4.20: Topologia de rede neural MLP usada neste trabalho.....	85
Figura 4.21: Domínio de treinamento da RNA para obtenção de modelo cinético da síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5. Concentrações iniciais de éster e 6-APA, para ensaios em batelada.....	86
Figura 4.22: Comparação da raiz do erro quadrático médio (RMS) no treinamento de RNA para síntese de ampicilina com diferentes no de neurônios. Todos os conjuntos de dados de treinamento foram considerados.....	87
Figura 4.23: Teste da qualidade do ajuste da rede. Dispersão das velocidades de produção de ampicilina: experimental e simulada (RNA); base de dados utilizada no treinamento.....	87
Figura 4.24: Teste da qualidade do ajuste da rede. Dispersão das velocidades de consumo de éster: experimental e simulada (RNA); base de dados utilizada no treinamento.....	88
Figura 4.25: Dispersão das velocidades de produção de ampicilina: Ensaio de validação.....	88
Figura 4.26: Dispersão das velocidades de hidrólise do EMFG: Ensaio de validação .....	89
Figura 4.27: Modelo híbrido para síntese de ampicilina, T = 25°C, pH 6,5.....	90
Figura 4.28: Modelo híbrido para síntese de ampicilina, T = 25°C, pH 6,5.....	91
Figura 4.29: Validação do modelo híbrido para síntese de ampicilina, T = 25°C, pH 6,5.....	91
Figura 4.30: Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5, Cinicial de 6-APA = 250mM, Cinicial de EMFG = 250mM .....	94
Figura 4.31: Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5, Cinicial de 6-APA = 250mM, Cinicial de EMFG = 50mM .....	94

	página
Figura 4.32: Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5, Cinicial de 6-APA = 50mM, Cinicial de EMFG = 250mM .....	95
Figura 4.33: (A) Corte do biocatalisador logo após ser preparado, antes de ser utilizado em sínteses.....	97
Figura 4.33: (B) Corte do biocatalisador após ser utilizado em sínteses.....	98
Figura 4.34: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25°C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300 mM e EMFG, 60 mM. Adição só de um substrato (EMFG).....	101
Figura 4.35: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25°C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300mM e EMFG, 25mM. Adição de 6-APA e EMFG.....	102
Figura 4.36: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25°C e pH 7,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300mM e EMFG, 25mM. Adição de EMFG...	102
Figura 4.37: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25°C e pH 7,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300mM e EMFG, 25mM. Adição de 6-APA e EMFG .....	103
Figura 4.38: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 20°C e pH 7,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300mM e EMFG, 25mM. Adição de EMFG...	103
Figura 4.39: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 20°C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300mM e EMFG, 25mM. Adição de EMFG...	104
Figura 4.40: Seletividade (S/H) ao longo da reação para diferentes estratégias de operação do reator.....	104
Figura 4.41: (a) Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25°C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300mM e EMFG, 25mM. Adição de EMFG .....	105
Figura 4.41: (b) Detalhe das 10 primeiras horas da síntese de ampicilina da Figura 4.41(a) com a curva de concentração de ampicilina e FG solúveis no meio reacional.....	105
Figura 4.42: Síntese enzimática de ampicilina com adição dos reagentes sólidos ao longo da reação, pH 6,5 e temperatura 25°C.....	107
Figura 4.43: Síntese enzimática de ampicilina com adição de 6-APA em solução e de EMFG sólido ao longo da reação, pH 6,5 e temperatura 25°C .....	107
Figura A.1: Esquema de um neurônio 14.....	127
Figura A.2: Neurônio de McCulloch e Pitts 14.....	127
Figura A.3: Exemplos de arquiteturas de RNAs.....	129



	página
Figura B.1: Corte longitudinal do reator de fluxo de vórtice. <sup>62</sup> .....	142
Figura B.2: Comparação de correntes de fluxo a) com “by-pass”, b) com “empilhamento” <sup>120</sup> .....	143
Figura B.3: Velocidade de arraste em função dos números de Reynolds rotacional e axial para diversos fluidos <sup>62</sup> .....	144

## LISTA DE TABELAS

		página
Tabela 1.1:	Produção de resíduo em vários ramos da indústria química <sup>173</sup>	01
Tabela 3.1:	Variáveis operacionais e seus respectivos níveis.....	51
Tabela 3.2:	Matriz de planejamento com os coeficientes de contraste.....	52
Tabela 4.1:	Atividade enzimática do sobrenadante na imobilização de PGA .....	54
Tabela 4.2:	Resultados de um planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> tendo como resposta o rendimento de síntese com relação à concentração inicial de 6-APA.....	56
Tabela 4.3:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> tendo como resposta o rendimento de síntese com relação à concentração inicial de 6-APA.....	57
Tabela 4.5:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> da Tabela 4.3 e seus desvios padrão, rendimento com relação ao 6-APA inicial .....	58
Tabela 4.6:	Resultados de um planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> para produtividade de síntese.....	63
Tabela 4.7:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> tendo como resposta a produtividade de síntese de ampicilina ( $\times 10^3$ ).....	65
Tabela 4.8:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> da Tabela 4.7 e seus desvios padrão ( $\times 10^3$ ).....	66
Tabela 4.9:	Resultados de um planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> tendo como resposta a seletividade (razão síntese/hidrólise).....	67
Tabela 4.10:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> tendo como resposta a seletividade (razão síntese/hidrólise).....	69
Tabela 4.11:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial e seus desvios padrão da seletividade (razão síntese/hidrólise).....	70
Tabela 4.12:	Atividade enzimática do sobrenadante nas imobilizações de PGA em sílica .....	77
Tabela 4.13:	Difusividades axiais calculadas e utilizadas na rotina computacional .....	80
Tabela 4.14:	Resultado dos ensaios realizados em diferentes concentrações iniciais de reagentes.....	93
Tabela 4.15:	Atividade enzimática do sobrenadante na imobilização da PGA .....	96
Tabela 4.16:	Atividade da enzima doada da indústria pré e pós-tratamento..	98
Tabela 4.17:	Desempenho do reator integrado para a síntese enzimática de ampicilina em diferentes condições operacionais.....	100
Tabela D.1:	Diluições das soluções empregadas.....	149

## ABSTRACT

Enzymatic route to produce antibiotic acts in mild reaction conditions (aqueous medium, neutral pH and moderate temperatures). Furthermore it reduces the number of reaction steps and decreases the amount and toxicity of waste products per kilogram of antibiotic. The enzymatic synthesis of ampicillin from phenylglycine methyl ester (PGME) and 6-aminopenicillanic acid (6-APA) can be an attractive alternative, replacing the chemical route. The use of an immobilized enzyme to catalyze the synthesis is very important to reduce costs. Penicillin G acylase (PGA) [EC 3.5.1.11] from *E. coli* was immobilized on two supports (agarose gel and silica). This work undertakes an optimization study of the enzymatic synthesis of ampicillin, to find out optimized process conditions. Therefore, it was studied the influence of the following variables: pH, temperature, 6-APA initial concentration, buffer concentration and the presence of methanol. Response variables were productivity, selectivity and yield (based on 6-APA initial concentration). The assays were carried on according to factorial design 2<sup>5</sup>. Temperature, pH, and 6-APA initial concentration influenced significantly the responses.

At synthesis of ampicillin from PGME and 6-APA, two other reactions compete with the synthesis reaction: hydrolysis of PGME (a parallel reaction) and hydrolysis of ampicillin (in series with the synthesis). The yield of the synthesis of ampicillin depend on the rates of three different reactions. The highest yield was achieved at 4°C, pH 6.5, without methanol, and with low buffer concentration. The results also indicate that it is possible to work with this system at high productivities, and it still keeps high yields at 25°C, without buffer, and pH 6.5.

After the selection of reaction conditions (25°C, pH 6.5), assays with PGA immobilized on silica carrier were realized. Conventional reactors may cause shearing on derivative enzyme-silica, which led using fixed-bed reactor. Mass transport parameters were estimated by fitting heterogeneous mathematical model to experimental data of catalytic bed with recirculation, running on transient state.

Another used support on immobilized enzyme was agarose gel. Domain of experimental assays used in the neural network training and validation were initial substrate concentrations ranged from 50 to 250mM. A mechanistic model to represent the synthesis of ampicillin from PGME and 6-APA is a set of series-parallel reactions (ampicillin and PGME hydrolysis are undesirable side reactions) would be too complex, with an intractable number of kinetic parameters. Simplified models could not represent all the experimental data, and a hybrid model was used. Neural networks were trained to predict reaction rates and used in the mass balance equations. A feedforward neural network, with one hidden layer was used. Results of the simulation were promising. The operational region that of high productivity and selectivity of antibiotic could be successfully mapped. An important aspect to improve the selectivity of ampicillin synthesis is to precipitate the antibiotic because the hydrolysis reaction would be decreasing. An appropriated biocatalyst which preventing the precipitation was developed, and used in a Taylor vortex reactor where shears are smaller. Synthesis assays using high substrate concentrations were performed in this reactor, occurring precipitate of antibiotic during reaction, to improve yield, selectivity, and productivity of this system.

## RESUMO

A rota enzimática para produção de antibióticos atua em condições suaves de temperatura, pressão e pH, em meio aquoso, além de ter bem menor impacto ambiental. A síntese enzimática de ampicilina a partir de éster metílico de fenilglicina (EMFG) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) foi estudada como alternativa à rota de produção química. O uso de enzimas imobilizadas é comum na literatura devido aos benefícios que estas apresentam em relação às enzimas solúveis: separação do meio reacional e reutilização do biocatalisador.

A enzima penicilina G acilase [EC 3.5.1.11] foi imobilizada em dois diferentes suportes (sílica e agarose). O primeiro passo estudado para produção do antibiótico foi a determinação das condições ótimas de operação. Assim, estudou-se a influência das seguintes variáveis: pH, temperatura, concentração inicial de 6-APA, concentração iônica do meio reacional e presença de solvente orgânico (metanol). As variáveis-resposta utilizadas foram produtividade, seletividade e rendimento. Os ensaios foram conduzidos segundo um planejamento fatorial  $2^5$ . As variáveis que mais influenciaram nas respostas foram: temperatura, pH e concentração inicial de 6-APA. O uso de EMFG para acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico, 6-APA, resulta num sistema reativo série-paralelo, cujas reações indesejadas de hidrólise (do EMFG e do antibiótico) ocorrem simultaneamente à de formação do antibiótico. Assim, a concentração máxima atingida de antibiótico depende das velocidades relativas das três reações. Observou-se que o maior rendimento de síntese foi obtido na temperatura de 4°C, pH 6,5, sem adição de solvente orgânico e em meio reacional de baixa concentração iônica. Os resultados também mostraram que é possível operar o sistema com alta produtividade, e ainda se manterem os rendimento elevados a 25°C, concentração mais elevada de reagentes, ausência de tampão fosfato e pH 6,5.

Após a seleção das condições reacionais (25°C, pH 6,5), ensaios, utilizando-se a PGA imobilizada em sílica, foram realizados. O derivado enzima-sílica sofre desgaste por cisalhamento em reator convencional, o que levou à utilização de reator de leito fixo. Parâmetros de resistência à transferência de massa externa e interna no suporte sobre a velocidade global de reação foram estimados a partir de dados experimentais, com auxílio de modelo matemático heterogêneo do leito catalítico com recirculação total, operando em regime transiente.

O outro suporte empregado na imobilização de PGA foi agarose intercruzada, que tem maior resistência ao cisalhamento. Experimentos de síntese com concentrações iniciais de reagentes variando de 50 a 250mM, utilizando-se o derivado enzima-agarose, formaram o domínio para treinamento de redes neurais que pudessem prever as velocidades de reação, pois um modelo mecanístico das três reações, levando em conta efeitos inibitórios e alostéricos de reagentes e/ou produtos, mostrou-se muito complexo, com número intratável de parâmetros cinéticos. Simplificações desse modelo, diminuindo-se o número de parâmetros ajustáveis, não conseguiram representar os dados experimentais em toda a faixa de interesse. Conjuntos de dados para treinamento supervisionado foram alimentados a redes “feedforward” com uma camada oculta. Essa abordagem permitiu uma boa representação da síntese de ampicilina na faixa operacional estudada e também direcionou os ensaios para região onde se maximizassem produtividade e seletividade. As velocidades de reação previstas pelas redes

neurais foram incluídas nas equações fundamentais de balanço de massa, compondo um modelo híbrido do processo. As simulações com o modelo híbrido-neural direcionaram os ensaios de síntese para região onde se maximizaram a produtividade e seletividade da reação.

Observou-se que aspecto importante para a melhoria da seletividade na produção de ampicilina era a operação do reator em uma região onde ocorria precipitação do antibiótico, pois quando este cristalizava no próprio reator, diminuía-se sua perda por hidrólise. Um biocatalisador adequado, que suportasse a precipitação da ampicilina no meio reacional, foi desenvolvido, patenteado e utilizado em reator de escoamento em vórtices de Taylor, onde as tensões de cisalhamento são menores. Sínteses utilizando concentrações altas de reagentes foram realizadas nesse reator, de modo a precipitar o antibiótico, incrementando-se rendimento, seletividade e produtividade do sistema.

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1996, o mercado mundial de antibióticos era estimado em 23 bilhões de dólares.<sup>33</sup> O mercado de bactericidas dos Estados Unidos era maior que US\$ 8 bilhões, incluindo cefalosporinas (US\$ 3,6 bilhões), penicilinas (US\$ 1,2 bilhão) e tetraciclina (US\$ 0,5 bilhão).<sup>160</sup> Em contraste, o mercado mundial de fungicidas era de aproximadamente 3 bilhões de dólares e o mercado antiviral era de 2,6 bilhões com uma previsão de mercado para mais de 5 bilhões no ano 2000. Hoje, o mercado mundial para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é estimado em 15 bilhões de dólares e as penicilinas têm vendas de 5 bilhões, ou seja, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos dão conta de mais de 65% do mercado mundial de antibióticos.<sup>41</sup>

Existe uma tendência na indústria de química fina em substituir os métodos clássicos de síntese por rotas catalíticas mais limpas, que minimizem a geração de resíduo e evitem, se possível, o uso de solventes tóxicos. A síntese química de  $\beta$ -lactâmicos, utilizada atualmente na indústria em vista de seu alto rendimento, emprega solventes organoclorados, indesejáveis tanto como resíduo, como enquanto impureza presente no produto.

No passado, só uma atenção superficial foi dada à eficiência ambiental e energética. Entretanto, ao se considerar a quantidade de resíduos formados por Kg de produto (ver Tabela 1.1), observa-se uma clara necessidade de redução do impacto ambiental das indústrias de química fina e farmacêutica devido as novas leis de proteção ambiental.<sup>173</sup>

Tabela 1.1: Produção de resíduo em vários ramos da indústria química.<sup>173</sup>

Ramo industrial	Produto (t/a)	Fator*
Refinamento de óleo	$10^6 - 10^8$	$\ll 0,1$
Química geral	$10^4 - 10^6$	1 - 5
Química fina	$10 - 10^4$	5 - 50
Farmacêutica	$1 - 10^5$	25 - > 100

\* Resíduo formado por produto industrializado (Kg/Kg).

Nos últimos anos as enzimas se tornaram disponíveis mais facilmente e a um custo mais baixo para aplicação em larga-escala – por exemplo, as enzimas

hidrolíticas usadas em sabões. Isto estimulou sua aplicação pela indústria de química fina, o que melhorou a estabilidade e eficiência dos biocatalisadores disponíveis, em condições industriais de produção. O uso de enzimas imobilizadas é comum na literatura devido aos benefícios que apresentam em relação às enzimas solúveis: fácil separação do meio reacional e reutilização do biocatalisador. As características singulares das enzimas fornecem oportunidades para desenvolver procedimentos ambientalmente aceitáveis que são mais eficientes na utilização de energia e matéria-prima e, além disso, as enzimas freqüentemente proporcionam produtos de qualidade superior. Penicilina G acilase (PGA) é uma enzima atualmente empregada na indústria na hidrólise da penicilina G para a produção de 6-APA, mas também pode ser empregada para a síntese de antibióticos semi-sintéticos. A síntese enzimática de ampicilina realizada neste trabalho utilizou como catalisador a PGA de *Escherichia coli* [EC 3.5.1.11]. PGA é o segundo catalisador mais usado em escala industrial, em nível mundial. Estima-se que entre 10 e 30 toneladas de enzima imobilizada são usadas em todo o mundo em diferentes preparações biocatalíticas <sup>134</sup>. A utilização industrial de enzimas, contudo, tem sido limitada pela instabilidade operacional desses catalisadores. A imobilização da enzima é ponto essencial para viabilizar economicamente a rota enzimática em virtude do alto custo do catalisador. Em aplicações industriais, essa técnica possibilita o reaproveitamento da enzima e seu uso em reatores contínuos. A enzima utilizada neste trabalho foi imobilizada em dois diferentes suportes (gel de agarose e sílica macroporosa).

A engenharia enzimática pode apresentar-se como uma alternativa para mudar a produção vigente da indústria farmacêutica. Ela conta com três ferramentas fundamentais (ver Figura 1.1):

1. A engenharia do catalisador: voltada ao projeto de catalisadores enzimáticos mais eficientes e estáveis;
2. A engenharia da reação, cujo objetivo é buscar condições ótimas de reação (pH, temperatura, características cinéticas da reação);
3. A engenharia do reator, incluindo o projeto do reator enzimático considerando as características cinéticas da reação e os requerimentos gerais do processo.

## PROJETO DE PROCESSOS ENZIMÁTICOS DE INTERESSE INDUSTRIAL

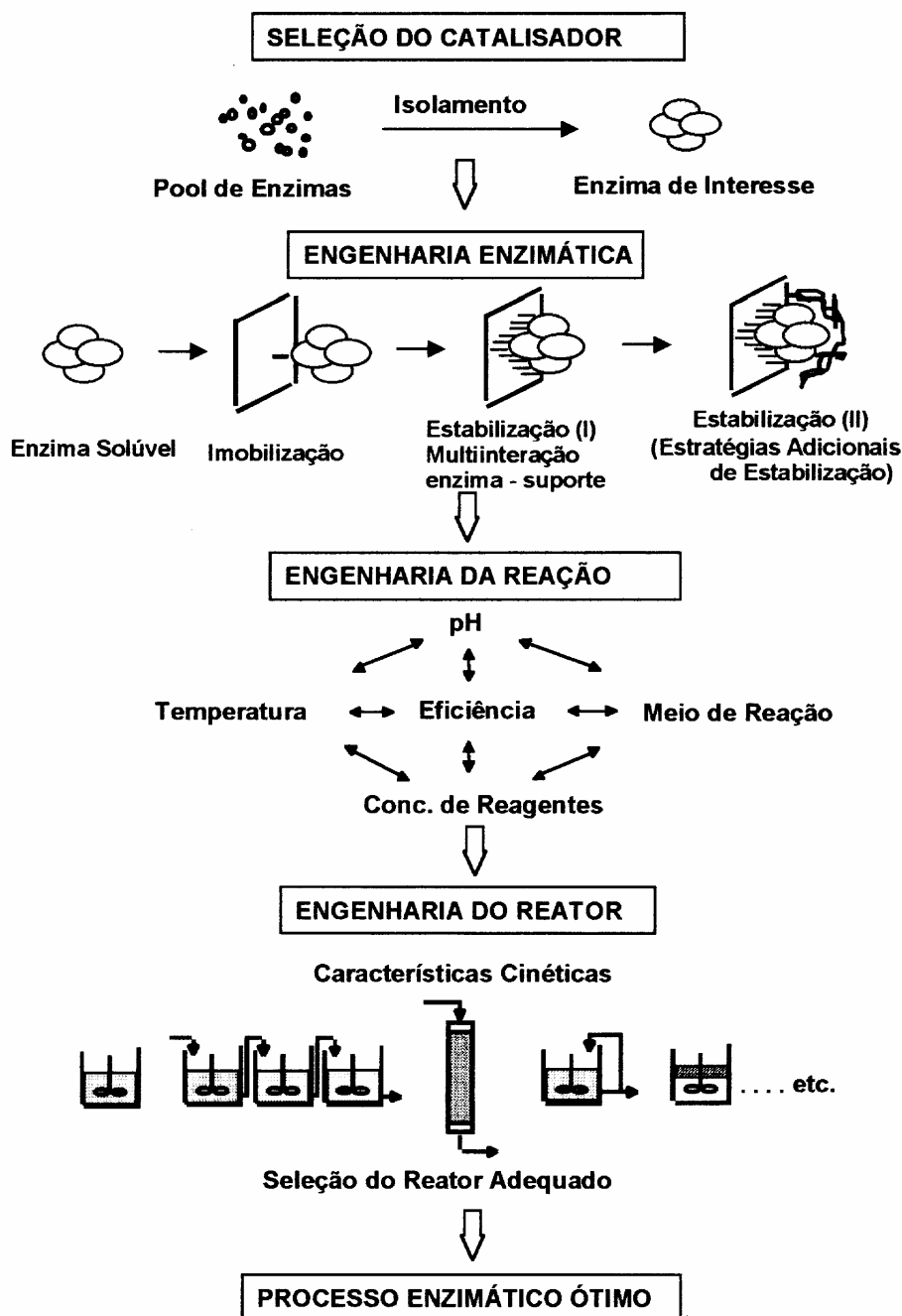


Figura 1: Desenvolvimento de um processo enzimático de interesse comercial. <sup>20</sup>

Nesse contexto insere-se este trabalho, parte de uma linha de pesquisa atualmente em andamento no DEQ/UFSCar, a qual objetiva estudar a produção de antibióticos semi-sintéticos por rota enzimática como alternativa aos processos químicos. Esta tese comparou diferentes suportes para o catalisador e diferentes



concepções para o reator enzimático. Modelos matemáticos dos reatores de síntese de ampicilina foram utilizados como ferramentas auxiliares nesses estudos.

A indústria farmacêutica desenvolveu-se ao longo dos últimos 50 anos tendo os antibióticos como uma de suas principais linhas de produtos. Dentre eles estão os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, dos mais importantes clinicamente. Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são aqueles que possuem um grupamento químico chamado anel  $\beta$ -lactâmico, responsável pela atividade bactericida. As penicilinas são compostas por este anel ligado a um anel tiazolidina. A manipulação da estrutura lateral ao anel  $\beta$ -lactâmico resultou na síntese de aminopenicilinas com melhor absorção oral e superior atividade contra agentes patogênicos em relação à benzilpenicilina (penicilina G), que foi o primeiro antibiótico natural utilizado em larga escala. Tais antibióticos também são importantes em medicina veterinária. O antibiótico deste trabalho (ampicilina) foi produzido enzimaticamente, a partir de éster metílico de fenilglicina (EMFG) e ácido 6-amino penicilânico (6-APA).

Ampicilina (ácido 6-[2-amino-2-fenilacetamida]penicilânico) é um antibiótico semi-sintético muito estável em meio ácido, bem absorvido pelo organismo e efetivo a baixas concentrações para uma grande variedade de organismos Gram-negativos e Gram-positivos. 89 No Brasil, os antibióticos respondem pela maior parte do faturamento da indústria farmacêutica – cerca de 68% – e têm sido um dos maiores responsáveis pela elevação significativa dos preços de medicamentos no mercado brasileiro (Folha de São Paulo, caderno 3, 15 de março de 2000).

A importância dos antibióticos semi-sintéticos, como a ampicilina, decorre de sua maior estabilidade, facilidade de absorção e do fato de originarem menos reações secundárias. A rota atual de produção industrial de ampicilina é a síntese química. A rota enzimática pode oferecer importantes vantagens sobre a química, pois atua em condições suaves de temperatura, pressão e pH, além de ter menor impacto ambiental. Assim, a tecnologia enzimática é uma alternativa interessante, sob o ponto de vista ambiental e econômico, para a produção de antibióticos semi-sintéticos. No entanto, o ponto fraco dessa rota é que a enzima pode hidrolisar tanto o EMFG (ou qualquer outro precursor, doador acil, que se utilize) quanto o antibiótico formado, reduzindo o rendimento do processo.

Assim, na reação de síntese enzimática, o uso de EMFG para acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA) resulta num sistema reativo série-paralelo, cujas reações indesejadas de hidrólise (do EMFG e do antibiótico) ocorrem simultaneamente à de formação do antibiótico. A máxima concentração atingida de antibiótico depende predominantemente das velocidades relativas das três reações. Conseqüentemente, a otimização do processo é dependente das propriedades da enzima, da temperatura, da concentração dos substratos, do pH, da força iônica do meio reacional e do suporte utilizado na imobilização. Um outro aspecto importante para a otimização do processo é a operação do reator em região onde ocorra precipitação do antibiótico. Na síntese enzimática de ampicilina, seletividade e rendimento do processo serão aumentados se o antibiótico cristalizar no próprio reator, diminuindo assim sua perda por hidrólise. Desta forma, a linha de pesquisa em que se insere este trabalho tem dupla motivação: econômica e ambiental, pois a melhoria de seu rendimento também contribuirá para torná-la mais competitiva.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica desta tese inicia-se pela enzima, suportes e processos de imobilização utilizados para formação do biocatalisador. Em seguida enfocam-se os processos enzimáticos para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, especificamente, de ampicilina. Depois, destacam-se informações sobre o mecanismo de reação envolvido. Um breve informe sobre redes neurais também é apresentado, já que elas foram usadas para prever a velocidade de reação do antibiótico. Finalmente, apresentam-se tipos de reatores enzimáticos, com destaque para os usados na síntese enzimática de ampicilina.

### 2.1 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores e, portanto, apenas aumentam a velocidade da reação, diminuindo sua energia de ativação. Elas têm alta eficiência ao realizar as complexas reações bioquímicas que formam parte do metabolismo dos seres vivos. As boas propriedades catalíticas destas singulares proteínas podem também ser usadas “in vitro”, ou seja, fora dos organismos vivos. Existe muito interesse no emprego de enzimas como catalisadores industriais, pois elas têm atividade catalítica em condições suaves de temperatura, pH, etc. Isto faz delas interessantes catalisadores de processos químicos cujos reagentes e/ou produtos sejam instáveis, que se decomponham em condições extremas de reação (ex.: fármacos). Estas suaves condições de reação são favoráveis sob o ponto de vista ambiental e também econômico, por baixarem custos energéticos e de purificação do produto.

As enzimas têm elevada seletividade ao substrato. São capazes de catalisar especificamente uma única reação sobre reagentes complexos, que podem converter vários grupos funcionais com reatividade similar. Esta característica faz com que as enzimas sejam úteis em processos complexos de química fina, tais como, oxidações, condensações e hidrólises muito seletivas. As reações enzimáticas apresentam as seguintes formas de especificidade: (1) especificidade de reação, (2) especificidade de ligação e (3) estereoespecificidade (por exemplo, especificidade ótica).<sup>4</sup> Podem atuar seletivamente, com um único tipo de substrato em uma solução de compostos similares. Também são capazes de

discriminar isômeros de um composto quiral\*. <sup>87</sup> Em consequência de todas estas características, as enzimas são catalisadores de grande potencial industrial. Além disso, são às vezes a única alternativa para processos que exigem as características mencionadas acima.

Atualmente, os processos enzimáticos vêm se mostrando excelentes competidores dos processos químicos tradicionais. Na indústria alimentícia, o processamento de alimentos requer reações muito específicas e seletivas e, na indústria farmacêutica, as reações lidam com substratos ou produtos complexos e instáveis. Aqui é necessário ressaltar uma tendência da aplicação de processos enzimáticos no nível industrial, nos próximos anos, devido a crescente preocupação com a preservação dos recursos ecológicos e devido à implementação de novas legislações de controle ambiental, penalizando (multas e até fechamento) as indústrias que contaminam o meio ambiente.

Atualmente, vários processos enzimáticos são comercialmente utilizados, entre eles, pode-se citar: hidrólise da penicilina pela penicilina G acilase para a formação do ácido 6-aminopenicilânico; uso de invertase e glicose-isomerase na indústria alimentícia; utilização de tripsina para a transformação da insulina de porco em insulina humana <sup>156</sup>.

Apesar das excelentes perspectivas que as enzimas apresentam como catalisadores, sua aplicação industrial não é imediata, pois têm peculiaridades que limitam sua utilização em escala industrial. Na sua forma livre, são catalisadores instáveis. São solúveis no meio reacional e estão presentes sempre em baixas concentrações. Por isso, sua separação do produto final é muitas vezes inviável economicamente, impedindo seu uso em forma solúvel em processos contínuos. Algumas enzimas podem apresentar inibição competitiva por produtos da reação, e também podem catalisar “in vitro” reações que não realizavam “in vivo” (por exemplo, poderiam apresentar reações secundárias, tendo estereoespecificidade ou regioseletividade diferentes) <sup>87</sup>. A complexidade inerente à estrutura da enzima livre confere a esta uma baixa estabilidade operacional.

A engenharia enzimática busca aumentar a estabilidade do biocatalisador e a carga enzimática no reator através da imobilização da enzima em suportes

---

\* Substância que possui ao menos um carbono assimétrico em sua estrutura.

insolúveis. Desta forma, economiza-se na produção do biocatalisador e na separação do produto final, além de se poder reduzir o volume do reator <sup>20</sup>.

Muitas enzimas foram designadas pela adição do sufixo *ase* ao nome do substrato, isto é, a molécula sobre a qual exerce ação catalítica. Contudo essa nomenclatura nem sempre tem sido prática, resultando que muitas enzimas receberam nomes pouco informativos, sob o ponto de vista químico. Uma classificação sistemática das enzimas foi adotada por recomendação de uma comissão internacional em enzimas (EC). O novo sistema divide as enzimas em seis classes principais e conjuntos de subclasses, de acordo com o tipo de reação catalisada <sup>114</sup>. Por causa dos diferentes sistemas de nomenclatura vários nomes podem ser aplicados a uma única enzima. A enzima utilizada neste trabalho será designada aqui por penicilina G acilase (PGA).

### 2.1.1 Penicilina G Acilase

Uma das enzimas de maior interesse industrial é a PGA <sup>45</sup>. A enzima PGA [EC 3.5.1.11] é também conhecida como penicilina amidase, penicilina amidohidrolase ou penicilina aciltransferase <sup>28, 96, 135</sup>. Sua nomenclatura aprovada pela comissão de enzimas é benzilpenicilina amidohidrolase.

PGA originada de vários microorganismos (*Streptomyces lavendulae*, *Norcadia*, *Proteus rettgeri*, *E. coli*, *Bacillus megaterium*, *A. faecalis*) foi relatada desde 1960 <sup>2</sup> e sua atividade varia consideravelmente de acordo com o microorganismo de origem <sup>4</sup>. PGA de *Escherichia coli* (empregada neste trabalho) é a enzima mais estudada com respeito à síntese de antibióticos semi-sintéticos. <sup>2</sup> Ela é um  $\alpha,\beta$ -heterodímero e se localiza no espaço periplasmático das células de *E. coli* produtoras <sup>13</sup>. A atividade específica da enzima é estimada em 40 UI/mg de enzima pura <sup>87</sup>, sendo 1 UI (unidade internacional) definida como a concentração em  $\mu\text{mol}$  de 6-APA produzida por minuto a partir da hidrólise de penicilina G, PG a 37°C e pH 8.

$$1\text{UI} = \frac{1\mu\text{mol de 6-APA}}{\text{min}}(37^\circ\text{C}, \text{pH } 8,0)$$

O centro ativo da enzima se encontra situado entre as duas subunidades (ver Figura 2.1). A subunidade  $\alpha$ , de 20 kDa, é responsável pelo reconhecimento do

substrato específico para a enzima (especificidade), ou seja, reconhece a cadeia lateral do substrato, e a subunidade  $\beta$ , de 70 kDa, contribui com um resíduo serina terminal essencial para a atividade catalítica <sup>13,32</sup>. Ambas subunidades são produzidas a partir de uma pré-proteína na qual os peptídeos desenvolvidos são separados por um peptídeo-espaçador, e são precedidos por um líder seqüencial que direciona a proteína para o periplasma. Durante ou depois do transporte para o periplasma, o peptídeo-líder é removido, a proteína dobra e o peptídeo-espaçador é cortado para produzir a  $\alpha,\beta$ -enzima desenvolvida <sup>2</sup>.

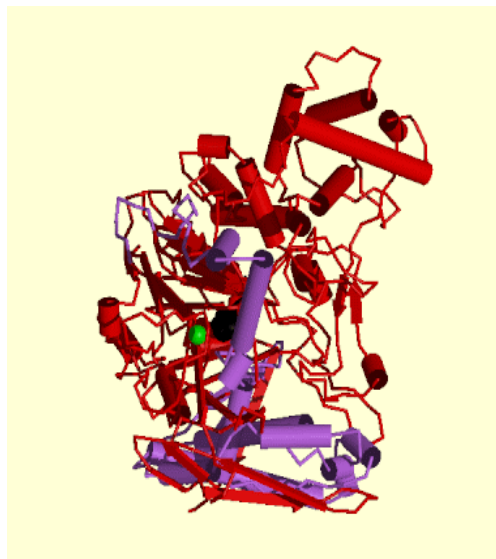


Figura 2.1: PGA de *E. coli*, subunidade  $\alpha$  (em lilás), subunidade  $\beta$  (em vermelho) e serina (em verde).

Em 1995, a estrutura tridimensional da PGA e um mecanismo para a hidrólise da penicilina G foram apresentados <sup>39</sup>. A enzima contém um único resíduo catalítico, a serina N-terminal da subunidade  $\beta$ . O centro ativo da PGA tem uma estrutura complexa que envolve sítios de domínio hidrofóbico. Juntas, as subunidades formam a enzima cataliticamente ativa. Sua dissociação ocasiona a inativação da mesma. O mecanismo de ação que faz o acoplamento enzima-substrato é complexo, pois a serina cataliticamente ativa (situada no centro ativo) é inacessível à ação do meio quando não está presente ácido fenilacético ou um composto análogo. Assim, na presença desses substratos há uma série de mudanças conformacionais, fazendo o sítio ativo (serina) da enzima ser exposto e permitindo que se forme o complexo acil-serina.

### 2.1.2 Uso da PGA como Catalisador de Síntese de Antibióticos

Penicilinas acilase estão sendo usadas em indústrias farmacêuticas para a fabricação de 6-APA e 7-ADCA (ácido 7 amino- diacetocefalosporâmico).<sup>104,105</sup> Além desta aplicação principal, as PGAs fornecem ferramentas úteis para realizar reações em síntese orgânica. Isto está de acordo com a tendência de aumento do uso de enzimas como catalisadores para construir moléculas orgânicas, particularmente onde a estereoespecificidade absoluta é necessária. Várias enzimas são usadas na resolução racêmica de aminoácidos, amidas e álcoois.<sup>40</sup> O princípio fundamental no desenvolvimento de tais processos é sua estereoespecificidade.<sup>28</sup> Também catalisam a hidrólise de ésteres de fenilacetil de certos carbinóis, e os produtos gerados são matérias-primas para síntese de vários produtos naturais e antibióticos. Além disso, são usadas em reações de proteção e desproteção dos grupos funcionais tanto de aminoácidos e peptídeos como de açúcares.

As penicilinas semi-sintéticas apresentam melhores propriedades que as obtidas unicamente por fermentação. Elas possuem maior estabilidade, são melhor absorvidas pelo organismo e originam menos reações colaterais. Uma prova da importância que estes compostos vêm alcançando é que 85% das penicilinas produzidas são obtidas a partir da modificação química do 6-APA.<sup>87</sup> Estimou-se que a produção mundial anual do intermediário fundamental, 6-APA, chegaria a 7.000 toneladas no ano 2000.<sup>155</sup> A produção mundial de 6-APA para o ano 2000 foi de 9.000 toneladas.<sup>16</sup> Estes dados confirmam que o uso da PGA na indústria farmacêutica continuará sendo primordial nas próximas décadas. A utilização da PGA industrialmente como catalisador requer o conhecimento de suas propriedades intrínsecas, pois assim é possível traçar os limites das condições experimentais que serão empregadas nas reações enzimáticas.

Em um reator industrial, a simples dissociação das subunidades da PGA seria suficiente para provocar sua inativação irreversível. Quanto mais ativos e estáveis os derivados enzimáticos utilizados, maior será a viabilidade econômica de sua utilização. Dos problemas mencionados para utilização de enzimas como catalisadores, dois de fundamental importância devem ser ressaltados:

1. Sua solubilidade ao meio reacional, que dificulta sua separação dos produtos e sua reutilização e;
2. Sua baixa estabilidade nas condições de reação.

Esses problemas podem ser solucionados usando-se diferentes tipos de suportes para imobilização da enzima.

### **2.1.3 Imobilização da PGA**

Imobilização de enzimas é uma alternativa bem estabelecida no desenvolvimento de processos. A variedade de métodos e suportes existentes permite um grande número de combinações, de forma que praticamente toda enzima pode ser imobilizada.<sup>169</sup> Os melhores resultados na imobilização de proteínas são obtidos quando se mantém ou se realça a sua estabilidade estrutural e térmica em vista de aplicações em longos períodos.<sup>131</sup>

Apesar das excelentes perspectivas que as enzimas apresentam como catalisadores, sua aplicação industrial não é imediata. Têm elevado custo, são solúveis em água e estão presentes sempre em baixas concentrações. Por isso, sua separação do produto final é muitas vezes inviável economicamente, impedindo seu uso em processos contínuos. Os problemas podem ser solucionados usando enzima imobilizada. Numerosas técnicas de imobilização para PGA foram testadas em escala de bancada. Por exemplo, adsorção, ligação cruzada, ligação covalente e encapsulamento (ver Figura 2.2).<sup>4,50,106</sup> Segundo Van Beynum,<sup>67</sup> uma enzima imobilizada é aquela que está fisicamente confinada ou localizada em uma região definida do espaço com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser utilizada repetida e continuamente. Os fatores econômicos que são levados em consideração para estabelecer a possibilidade de se usar enzima imobilizadas são: (1) custo da enzima, (2) ampliação da necessidade de enzima purificada, (3) custos dos produtos químicos da imobilização e do processo de imobilização, (4) estabilidade enzimática; (5) efeitos de inibição e envenenamento<sup>4</sup>.

O método de imobilização, neste trabalho, consistiu em ligar covalentemente as enzimas a suportes insolúveis em água, já que o meio reacional é aquoso. Essa técnica de imobilização é a mais antiga e prevalecente. As enzimas são covalentemente ligadas ao suporte na presença de um inibidor competitivo ou



substrato para prevenir a possibilidade de dano ao sítio ativo da enzima.<sup>114</sup> A seleção das condições para imobilização é mais difícil que em outros métodos de ligação. Só alguns suportes que contêm sítios reativos podem ligar-se diretamente com as enzimas. A maioria dos materiais-suporte não possui esta característica, mas tem grupos hidroxil, amino, amida ou carboxil que requerem ativação anterior para formação da ligação covalente com a enzima. Este é o caso dos suportes utilizados neste trabalho. Para preservar a atividade enzimática, o suporte só pode se combinar quimicamente com grupos funcionais da enzima que não são essenciais para sua ação catalítica. Os reagentes usados também devem ser tais que não afetem a ligação ou os resíduos de aminoácidos essenciais do sítio ativo da enzima.

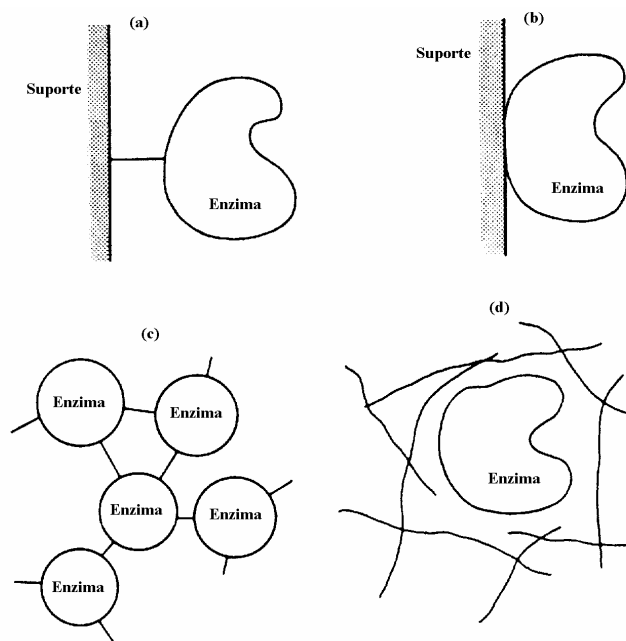


Figura 2.2: Representação diagramática das técnicas de imobilização. (a) ligação covalente, (b) adsorção, (c) entrecruzamento, (d) encapsulamento.<sup>4</sup>

Depois que as ligações covalentes são formadas, a natureza forte da ligação impede o arraste do biocatalisador para fora dos poros do suporte. O biocatalisador assim produzido deve ter algumas características importantes: promover o aumento da interação enzima-substrato e a diminuição da inibição pelo produto; alterar o pH ótimo aparente para um valor desejado; desencorajar o crescimento microbiano e facilitar a pronta recuperação da enzima para

reutilização. Para uso em um reator, o suporte deve ser estável em solução e não se deteriorar sob as condições de reação.

A escolha do método de ligação, como também do suporte insolúvel, é de muita importância. As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pelas interações da enzima com o suporte. Tais interações fornecem uma enzima imobilizada com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (ver Figura 2.3). Ao se imobilizar uma enzima eliminam-se diversos problemas, porém a enzima imobilizada adquire outras características que devem ser analisadas.

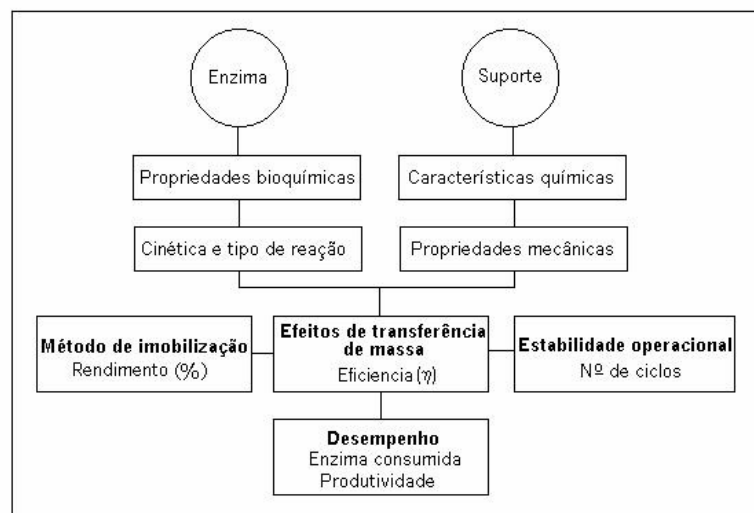


Figura 2.3: Propriedades da enzima imobilizada. <sup>168</sup>

No desenvolvimento dos processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro de fundamental importância é a estabilidade operacional (Figura 2.3). Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com enzima livre se a meia-vida da enzima imobilizada for suficientemente longa. <sup>158</sup> A literatura a respeito de enzimas imobilizadas, enfocando sua estabilidade e a importância do atraso difusional é muito vasta. Seguem alguns casos, a título de ilustração: estimativa de parâmetros cinéticos e de transferência de massa para produção de etanol, a partir de amido liquefeito, usando glicoamilase imobilizada em sílica macroporosa; efeitos difusivos de processos utilizando PGA imobilizada em sílica e em gel de agarose; efeitos da difusão utilizando glicoamilase imobilizada em sílica no processo de hidrólise de

maltose; estabilidade operacional de lipases imobilizadas em sílica na hidrólise do azeite de oliva; estudo comparativo da imobilização de glicosidase em sílica para obter melhor estabilidade térmica do derivado são alguns exemplos concernentes ao tipo de imobilização e aos suportes utilizados neste trabalho. <sup>21,51,68,73,125,158</sup>

#### 2.1.4 Suportes para Imobilização

Os suportes utilizados na imobilização de enzimas podem ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. A Figura 2.4 mostra a classificação dos suportes segundo sua composição. Quanto à morfologia, os suportes podem ser porosos, não-porosos ou com estrutura gel. Na imobilização de uma enzima, a morfologia do poro e de sua superfície é fator fundamental, pois este deve ser suficientemente grande para permitir a acomodação da enzima e o livre acesso do substrato; mas quanto maior o poro menor a área superficial do suporte e, conseqüentemente, menor o espaço disponível para a ligação da enzima. O suporte também deve apresentar numerosos grupos de fácil ativação para participar da formação das ligações com os grupos reacionais da enzima. Além da morfologia do poro, as condições de imobilização também devem ser consideradas, pois elas influenciam na quantidade e na distribuição da enzima que se liga ao suporte poroso.

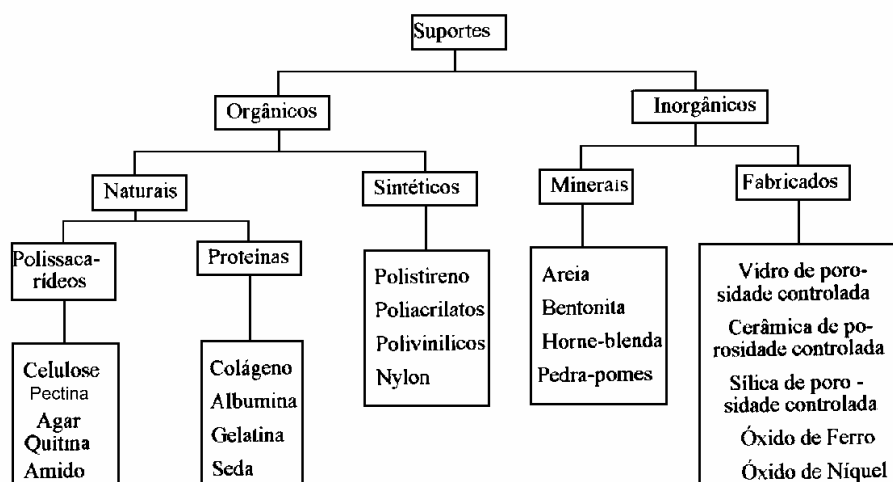


Figura 2.4: Suportes para imobilização. <sup>67</sup>

Diferentes suportes já foram usados na imobilização da PGA, tais como: gel de agarose, sílica macroporosa, epoxi, aluminossilicato mesoporoso (MCM-41),

resinas poliacrílicas como amberlite XAD7, partículas de nylon e quitosana. 9,15,18,35,42,48,86,124,167

#### 2.1.4.1 Gel de agarose

O gel de agarose foi o primeiro suporte a ser utilizado neste trabalho, por possuir uma grande área superficial, ser de fácil ativação a partir de grupos hidroxila, e apresentar boas propriedades mecânicas, que o tornam resistente à agitação e a pressões relativamente altas, podendo ser usado sem dificuldade em condições industriais.

A agarose é uma fração de um polímero natural conhecido como ágar. Este polímero natural é obtido a partir de algas vermelhas, entre elas as conhecidas como *Gelidium amansii*, *G. subcostatum*, *G. japonicum*, *Pterocladia tenius*, *Ceramium boydenii*,<sup>136</sup> *Gloiopeltis complanata*.<sup>163</sup> Suas características dependem não só das algas utilizadas para sua obtenção, mas também, da época de coleta, lugar e método de extração. As duas frações que formam o ágar são chamadas agarose e agarpectina pela sua semelhança com as duas frações que formam o amido. A agarose, fração geleificante do ágar, é um polímero cuja cadeia principal é constituída por agarobiose, molécula formada por 1,3- $\beta$ -D-galactopiranosose e 1,4- $\alpha$ -galactopiranosose (Figura 2.5) ou seu derivado anidro 1,3- $\beta$ -D-galactopiranosose 3,6-anidro-galactose (Figura 2.6).

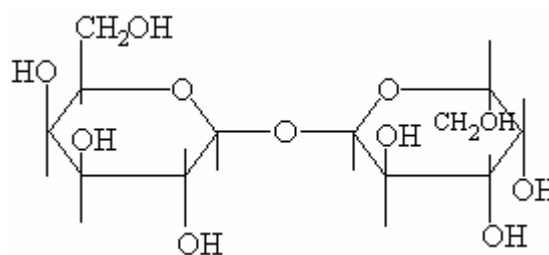


Figura 2.5: molécula de agarobiose.

A cadeia de agarose tem uma estrutura de dupla hélice que se agrega para formar uma estrutura tridimensional capaz de reter líquidos no seu interior. A agarpectina possui a mesma composição, mas algumas unidades dos polímeros são substituídas por 4-6-O-(1-carboxietilidena)-D-galactopiranosose ou por açúcares residuais sulfatados ou metilados.<sup>136,150</sup>

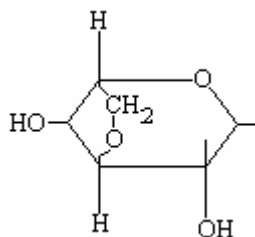


Figura 2.6: Derivado anidro da galactose.

A resistência mecânica do gel de agarose pode diminuir em até 75% quando este é usado como suporte para imobilizações e não se recomenda a sua utilização em temperaturas superiores a 50°C.<sup>159</sup> Porém sua baixa densidade de cargas elétricas livres e sua pouca reatividade tornam esses géis muito atrativos para aplicações em processos biotecnológicos.

Para melhorar suas características mecânicas e aumentar sua estabilidade, as hélices duplas do polímero podem ser reforçadas por interligações, num processo conhecido como ligação cruzada. Muito frequentemente, usa-se 2-3-dibromopropanal como agente de ligação entre as fibras. Uma característica do gel de agarose, quando comparado com outros géis naturais, é o grande raio de poro, na faixa de 20-680Å, dependendo do método de preparação e da concentração do polímero.<sup>150</sup>

#### 2.1.4.2 Sílica macroporosa

Existe uma grande variedade de suportes para imobilização. A sílica macroporosa apresenta uma série de vantagens, tais como: elevada resistência mecânica à compressão, estabilidade térmica, resistência a ataque de microrganismos e de solventes orgânicos, e fácil regeneração por processo de pirólise.<sup>67</sup> Entretanto, normalmente apresentam baixa resistência à abrasão e cisalhamento. A sílica macroporosa é um dos suportes já estudados pelo grupo de trabalho do DEQ/UFSCar, por isso foi o segundo suporte escolhido para produzir derivados estabilizados de PGA de *E. coli*.

Sílica porosa é uma das várias formas de sílica amorfa. Outras formas são precipitados não-porosos, hidrogéis de sílica, materiais pirogênicos, minerais opalinos. Essas substâncias variam consideravelmente na aparência, dureza e grau

de hidratação, mas podem ser consideradas como produtos da policondensação do ácido ortosilícico-Si(OH)<sub>4</sub>.<sup>126</sup>

Textura porosa da sílica, área superficial específica, volume e diâmetro do poro dependem do tamanho e empacotamento das partículas elementares. Uma partícula elementar consiste de uma rede tridimensional de tetraedros de SiO<sub>4</sub>, cada átomo de silício estando ligado a quatro oxigênios e cada oxigênio estando ligado a dois silícios. A superfície da partícula é coberta com grupos OH que são responsáveis pela natureza hidrofílica da sílica normal, e numerosas moléculas de água são ligadas aos grupos OH durante o processo de condensação polimérica do ácido ortosilícico, gerando o hidrogel. Quando esse hidrogel é seco, com o processo de policondensação ainda ocorrendo, um xerogel (sílica porosa) é formado.<sup>22,139</sup> Análises de raio-X apresentadas por Pereira, 1996<sup>139</sup> revelaram que a sílica utilizada neste trabalho é amorfa.

Os silanóis na superfície da sílica porosa podem reagir com vários componentes químicos ficando superficialmente estáveis e permitindo, assim, a adaptação da superfície para aplicações específicas. Das diversas reações químicas que podem ocorrer na superfície da sílica porosa,<sup>125</sup> a reação com compostos orgassilânicos foi utilizada para a ativação do suporte neste trabalho. Além da morfologia do poro, as condições de imobilização também devem ser consideradas, pois influenciam na quantidade e na distribuição da enzima que se liga ao suporte poroso.

## 2.2 PENICILINAS

As penicilinas, antibióticos empregados, inicialmente, para o tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana, são produzidas por várias espécies de *Penicillium*, principalmente pelo *P. chrysogenum*, bem como por outras espécies de fungos. A benzilpenicilina, desde sua descoberta, sempre teve maior atividade *in vivo*. Seu largo uso se deve à baixa toxicidade e alta segurança como agente quimioterápico. Apesar disso, apresenta sérias limitações: rápida excreção através dos rins, espectro limitado, susceptibilidade a todas as β-lactamases conhecidas e, em consequência de seu sistema anelar, alta reatividade química, tanto em meio básico como ácido, impedindo sua utilização por via oral. Além disso, pode

desencadear efeito alérgico, como urticária. Devido a essas limitações, compostos de maior estabilidade e lenta velocidade de excreção já eram desejados mesmo no início do uso da droga. <sup>116,132</sup>

### 2.2.1 Histórico

O estudo de Pasteur, em 1877, que descreve a inibição do crescimento do bacilo carbunculoso na urina por outras bactérias que ali se desenvolviam ao mesmo tempo, pode ser destacado como o precursor dos estudos que levaram à descoberta da penicilina e, conseqüentemente, dos demais antibióticos. Seus trabalhos enfatizam principalmente o antagonismo entre bactérias. Em 1886, Bartolomeu Gosio isolou, de um fungo que denominou *Penicillium glaucum*, pequena quantidade de uma substância bactericida. Enerst Duchesne, em 1897, publicou uma tese de doutoramento “Contribuição ao estudo da concorrência vital entre os microrganismos. Antagonismo entre os bolores e os micróbios”, em que demonstrou o antagonismo entre certos bolores e bactérias patogênicas, *in vivo*, pela inoculação concomitante, em um animal, de culturas e verificando a atenuação da virulência. A indicação de possíveis aplicações terapêuticas surge freqüentemente como conclusão destes trabalhos. <sup>116,157</sup>

Em 1928, Sir Alexander Fleming, <sup>57</sup> professor de bacteriologia no *St Mary's Hospital* da Universidade de Londres, estudando mais ou menos ao acaso o bolor, verificou que o mesmo fez desaparecer, em algumas placas, estafilococcus em volta da formação miceliana. Fleming notou que este fungo, isolado, e identificado mais tarde como sendo o *Penicillium notatum*, produzia uma substância bactericida seletiva. Por conveniência, ele chamou o filtrado do caldo de cultura “penicillin”. Em 1929, publicou, no *British Journal of Experimental Pathology*, trabalho mostrando o poderoso efeito antibacteriano da substância contida no caldo, em diferentes bactérias e em diferentes graus. Estudou sua estabilidade quanto ao tempo, condições de temperatura e pH, bem como sua toxicidade. Sugeriu seu uso terapêutico como anti-séptico.

Em 1940, Chain *et al.* publicaram trabalho sobre as propriedades químicas, farmacológicas e quimioterápicas da substância produzida pelo fungo e descrita por Fleming. Era um pó castanho, levemente solúvel em água, obtido do meio de

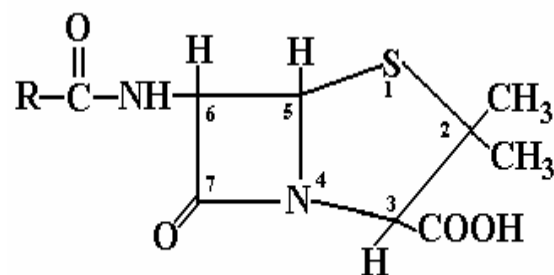
cultura, que, mesmo não sendo puro, mostrou atividade antibacteriana muito alta e não parecia relacionar-se com qualquer substância quimioterápica em uso na época. Um extenso trabalho dos primeiros resultados clínicos, juntamente com o método de extração, foi publicado por Abraham *et al.* em 1941.

Foi na Inglaterra, em 1941, que a penicilina foi testada pela primeira vez em ser humano. Em 1942, iniciaram-se os testes clínicos nos Estados Unidos. Devido às péssimas condições impostas pelo estado de guerra, na Inglaterra, verificou-se a impossibilidade de se produzir a penicilina em grande escala naquele país. Em 1941, Howard Walter Florey e N. G. Heatley foram para os Estados Unidos e, nos laboratórios americanos, com a colaboração de Robert D. Coghill aperfeiçoaram as técnicas britânicas e as aplicaram na manufatura industrial da penicilina naquele país. Em 1945, Fleming juntamente com Florey e Chain ganharam o prêmio Nobel de medicina.

A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico que encontrou uso prático no homem, marcou o início de uma era que produziu grande número de tais substâncias. As primeiras penicilinas, biossintéticas, ainda hoje estão em uso clínico. Outras, semi-sintéticas, com amplo espectro e melhores propriedades fármaco-cinéticas, foram paulatinamente sendo utilizadas.

### 2.2.2 Estrutura Geral

A estrutura básica das penicilinas contém uma série de componentes: um anel tetragonal  $\beta$ -lactâmico fundido a outro tiazolidínico, e uma cadeia lateral variável ligada ao sistema bicíclico na posição 6, através do grupo acilamino, uma carboxila em 3, e duas metilas em 2, conforme fórmula geral:



**R = cadeia lateral variável**

Figura 2.7: Estrutura geral das penicilinas.



O anel  $\beta$ -lactâmico é uma condensação de moléculas de alanina e  $\beta$ -dimetilcisteína para formar núcleos penam. O anel  $\beta$ -lactâmico é essencial para atividade antimicrobiana e a cadeia lateral determina o espectro de atividade e as propriedades fármaco-cinéticas do composto. Modificações estruturais da cadeia lateral da penicilina podem levar de algum modo a um aumento de estabilidade frente a  $\beta$ -lactamases e assim, expandir a atividade antibacteriana das penicilinas.

### 2.2.3 Nomenclatura

Uma vez determinado que as penicilinas possuem um núcleo comum e diferem apenas na cadeia lateral, elas foram, primeiramente, distinguidas, na Inglaterra, por algarismos romanos e nos Estados Unidos, por letras, seguindo a seqüência de suas descobertas. Para evitar ambigüidade na nomenclatura o sistema de números e letras foi substituído por prefixos, indicando a natureza da cadeia lateral. Deste modo, o grupo amida é incluído no nome básico penicilina.

O sistema de anel bicíclico não substituído (Figura 2.7) é denominado penam. Assim as penicilinas são também chamadas ácidos 6-acilamino-2,2-dimetilpenam-3-carboxílico, obedecendo a numeração aceita desde o início dos estudos e indicada na estruturação da Figura 2.7. O penam com duas metilas no carbono 2 e a carboxila em 3 é denominado ácido penicilânico. Portanto, as penicilinas são, ainda, chamadas ácidos 6-acilaminopenicilânicos.

### 2.2.4 Uso Terapêutico

As penicilinas são mais ativas contra bactérias gram-positivas do que contra as gram-negativas. A mais usada, entre todas, é a benzilpenicilina. A obtenção de derivados levou a compostos mais ativos contra os gram-negativos. As várias penicilinas podem ser divididas em seis grupos: <sup>132</sup> (1) penicilinas naturais (ex.: benzilpenicilina), (2) penicilinas administradas oralmente (ex.: fenoximetilpenicilina, ou penicilina V), (3) penicilinas anti-estafilocócicas (ex.: meticilina, oxacilina), (4) penicilinas de amplo-espectro (ex.: ampicilina, amoxicilina), (5) penicilinas ativas contra *P. aeruginosa* (ex.: carbenicilina), e (6) penicilinas resistentes as  $\beta$ -lactamases (ex.: formidacilina, temocilina).

As penicilinas são administradas via oral, intramuscular, endovenosa e tópica. São inativadas em meio ácido com relativa facilidade e, por isso, algumas não têm atividade por via oral, por serem degradadas pela ação do suco gástrico. São notáveis em sua ausência geral de toxicidade. Esta falta de toxicidade é marcante em indivíduos normais, mas o amplo uso destas substâncias torna considerável a incidência de reação adversa, o que exige cuidado em sua prescrição. O efeito adverso mais comum é uma reação alérgica a qual pode levar de leves erupções até choque anafilático que pode ser fatal.

### **2.2.5 Obtenção**

As penicilinas podem ser obtidas por fermentação, por via semi-sintética ou sintética.

#### 2.2.5.1 Fermentação

Por este processo foi obtida acima de uma centena de penicilinas. Destas somente a benzilpenicilina e a fenoximetilpenicilina são de grande utilidade clínica. São produtores, principalmente, o *Penicillium notatum* e o *P. chrysogenum*, além de outras espécies de fungos. Por volta de 1970, com os melhoramentos no meio e no processo de cultura, a produção industrial de penicilina tinha chegado a 20.000 unidades por mililitro.

Os meios de cultura para o crescimento dos organismos contêm poucos ingredientes básicos: açúcar fermentável, uma adequada fonte de nitrogênio e tampão, ou outros meios para controlar o pH. Com o uso de água de milho no meio de cultura, no início dos estudos sobre a produção da penicilina, observou-se um grande aumento no rendimento e redução no período necessário para incubação. A adição de ácido fenilacético ao meio de cultura aumenta o rendimento na produção de benzilpenicilina. Estes resultados, somados aos estudos de biossíntese, levaram à obtenção de penicilinas com diferentes cadeias laterais, através da adição de precursores adequados ao meio de cultura. Porém, não foi obtido composto comparável à benzilpenicilina quanto à sua ação antibacteriana.

### 2.2.5.2 Semi-sintéticas

A adição de precursor ao meio de fermentação teve alcance limitado na obtenção de novas penicilinas. Em 1959, entretanto, o ácido 6-aminopenicilânico foi descoberto e sintetizado em quantidade. Isto possibilitou a acilação de seu aminogruppo e iniciou a síntese de uma ampla faixa de outros derivados.<sup>132</sup>

### 2.2.5.3 Sintéticas

A síntese total de penicilinas, de modo geral, tem pouca importância, quando comparada com os processos de fermentação e síntese parcial. Apenas algumas penicilinas foram obtidas por este meio, embora exista grande interesse na obtenção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em geral. A dificuldade na síntese de penicilinas está relacionada a certas características da molécula principalmente a ligação amida, bastante lábil, do anel  $\beta$ -lactâmico. O processo de síntese envolve várias etapas de baixo rendimento e alto custo, não competindo com os outros processos de obtenção.

## **2.3 AMPICILINA**

Em 1949, os Estados Unidos eram o maior país produtor de antibióticos, com uma produção anual de aproximadamente 83 toneladas de penicilina G sódica. Em 1982, a produção mundial de penicilina era maior que 12.000 toneladas, e a Europa era o maior produtor. 170. Em 1995, a produção mundial era de aproximadamente 33.000 toneladas, um aumento de cinco vezes em relação à década de 60. Aproximadamente 75% da penicilina fabricada (~33.000 ton) era convertida em penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas<sup>6</sup>.

Ampicilina “ácido (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-amino-2-fenilacetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-aza-biciclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico” é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico semi-sintético e foi preparada pela primeira vez por Doyle em 1961. A fórmula molecular da ampicilina é  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  com massa molar de 349,42. O anel  $\beta$ -lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio, pode ser visto na Figura 2.8. As características da ampicilina, abaixo relacionadas, podem ser encontradas no seguinte endereço eletrônico: <http://www.dsm.com/dai/products>.

**Química** – Ampicilina é uma aminopenicilina, só se diferenciando estruturalmente de penicilina G pela presença de um grupo amino na posição alfa no anel benzênico. Ampicilina está disponível comercialmente na forma trihidratada para administração oral e como sal de sódio para administração intramuscular. Sua potência é expressa em termos de ampicilina calculada em base anidra. Ampicilina trihidratada ocorre como um pó branco cristalino, praticamente sem odor que é ligeiramente solúvel em água (solubilidade aquosa de cerca de 6mg/ml a 20°C e cerca de 10mg/mL a 40°C). Ampicilina sódica ocorre como um pó branco, cristalino, sem odor, higroscópico, muito solúvel em água.

**Estabilidade** – Cápsulas de ampicilina para suspensão oral devem ser armazenadas entre 15 e 30°C. A suspensão oral pronta preferencialmente deve ser refrigerada entre 2 e 8°C por catorze dias, mas é estável por sete dias a temperatura ambiente. Injeções de solução de ampicilina sódica devem ser usadas dentro de 1 hora e não devem ser congeladas. Ampicilina sódica é potencialmente (química e física) incompatível com algumas drogas, incluindo aminoglicosídeos, mas a compatibilidade depende de vários fatores (por exemplo: concentração das drogas, espécie do diluente usado, pH resultante, temperatura).

**Espectro** – Com base em seu espectro de atividade, ampicilina é classificada como uma aminopenicilina. Ampicilina compartilha os mesmos usos que outras aminopenicilinas, principalmente para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas suscetíveis (por exemplo, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.*). Ampicilina também é usada para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas suscetíveis (por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, estafilocócitos não produtores de penicilinas, *Clostridium sp*, *Bacillus anthracis*, *Corinebacterium xerose*, *Listeria* e grande parte dos enterococos); entretanto, como outras aminopenicilinas, a ampicilina geralmente não deve ser usada para o tratamento de infecções por estreptococos ou estafilococos, quando a penicilina natural seria efetiva. Oralmente administrada, a ampicilina não deve ser usada para tratamentos iniciais graves, infecções com risco de morte. Ampicilina geralmente tem o mesmo espectro de

atividade e o mesmo nível de atividade contra organismos suscetíveis à amoxicilina; entretanto, é menos ativa *in vitro* que a amoxicilina contra enterocócitos e *Salmonella sp.*, porém mais ativa que amoxicilina contra *Shigella* e enterobactérias.

**Absorção** – Ampicilinas anidra e trihidratada geralmente são estáveis na presença de secreções gástricas ácidas e 30 a 55% da dose oral é absorvida em adultos em jejum. A presença de alimentos no estômago geralmente diminui velocidade e extensão da absorção de ampicilina. Ampicilina é distribuída pela biliar. Concentrações biliares de ampicilina em pacientes com função biliar normal pode ser 1 – 30 vezes maiores que concentrações simultâneas no soro, para doses orais únicas de ampicilina.

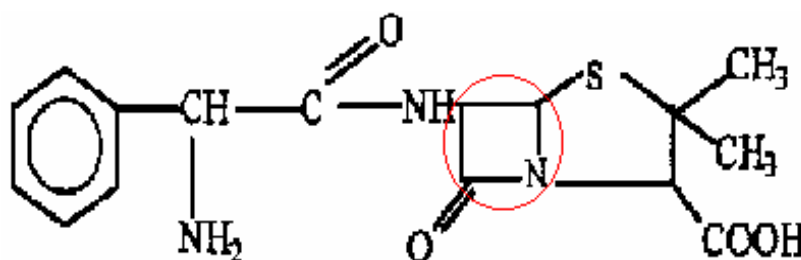


Figura 2.8: Ampicilina e circundadoo anel  $\beta$ -lactâmico.

## 2.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os microrganismos são utilizados industrialmente em conversões bioquímicas de compostos orgânicos solúveis em água. As células dos microrganismos são usadas como fonte de enzimas em estudos de bancada e em aplicações comerciais. Os produtos dessas conversões podem ser: bebidas como cervejas e vinhos, fármacos como antibióticos e esteróides.

A hidrólise da sacarose catalisada pela invertase desempenhou um importante papel no desenvolvimento inicial de uma equação adequada para explicar o comportamento de reações catalisadas por enzimas. Na época, havia numerosas hipóteses para explicar o diferente comportamento cinético, mas nenhuma recebeu plena aceitação, até a proposta sugerida por Brown, 1902, de um modelo em que um complexo enzima-substrato era um intermediário obrigatório na seqüência da reação.<sup>153</sup>



O modelo proposto por Brown para reações enzimáticas resistiu ao tempo. Porém, era estritamente intuitivo e carecia de uma fundamentação matemática. Um tratamento matemático deste modelo foi mostrado por Vitor Henri em 1903. Foi Henri quem obteve a equação que é freqüentemente atribuída a Michaelis-Menten. Na verdade, Michaelis e Menten reconhecem que o propósito de seus trabalhos era fornecer confirmação experimental à formulação publicada por Henri.<sup>153</sup>

$$-r_s = \frac{V_{\max}S}{K_m + S} \quad (2.1)$$

Em uma concentração constante de enzima,  $E$ , a velocidade de uma reação catalisada por enzima,  $r_s$ , aumenta com o aumento da concentração do substrato,  $S$ . Uma característica das reações catalisadas por enzima, na ausência de efeitos de inibição pelo substrato, é que a velocidade tende assintoticamente a um máximo quando  $S$  tende ao infinito. Essa velocidade máxima é geralmente expressa por  $V_{\max}$ .<sup>4</sup> A observação experimental do comportamento de enzimas mostra que há, para a maioria delas, desvios do modelo de Michaelis-Menten. Estes desvios podem ser explicados por efeitos inibidores do substrato e/ou produto.<sup>114,153</sup> Baseando-se nesta constatação, modelos mais complexos foram desenvolvidos a partir da equação 2.1.

## 2.5 SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA

Hoje, os antibióticos semi-sintéticos  $\beta$ -lactâmicos, tais como ampicilina, amoxicilina, cefalexina, cefadroxil, cefaclor, são preparados, em escala industrial, por métodos químicos. Geralmente, eles têm o grupo carboxil da cadeia lateral protegido, com posterior remoção do grupo de proteção por hidrólise. Por exemplo, a ampicilina pode ser preparada pela reação com 6-APA, tendo o grupo carboxil da D-fenilglicina protegido como ácido D-fenilglicina cloro, seguido da remoção do grupo de proteção por hidrólise. Estas reações tipicamente envolvem passos dispendiosos, tais como o uso de várias etapas, com o perigo de ocorrer racemizações e reações secundárias; utilização de compostos altamente tóxicos (piridina, dimetilnilina, diclorometano, etc) e necessidade de trabalhar com temperaturas extremamente baixas ( $-40^{\circ}\text{C}$ ).<sup>26,30,31</sup>

A penicilina estudada neste trabalho (ampicilina) é semi-sintética, pois parte da molécula (núcleo  $\beta$ -lactâmico ou 6-APA) é produzida por fermentação (natural). Ao se adicionar à cadeia lateral (FG) o 6-APA, forma-se a ampicilina, que não é produzida por fermentação.

Cada uma das variáveis que definem o meio reacional (pH, temperatura, natureza e concentração dos solventes, entre outros) tem efeitos diferentes sobre a síntese enzimática de ampicilina, por isso as condições ótimas de reação são estabelecidas não otimizando uma das variáveis de interesse, mas buscando faixas de condições que permitam obter simultaneamente bons valores em todos os parâmetros industriais do processo enzimático.

Duas possíveis estratégias de síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos com PGA são a rota de síntese termodinamicamente controlada e a cineticamente controlada (Figura 2.9).

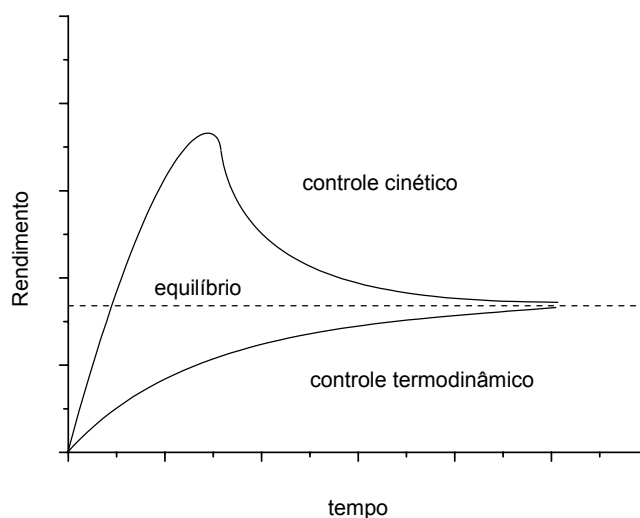


Figura 2.9: Rendimento da síntese de ampicilina em função do tempo, controle cinético e controle termodinâmico. <sup>173</sup>

Processos enzimáticos de condensação, em princípio, podem ser realizados via rota de controle termodinâmico ou de controle cinético. A síntese termodinamicamente controlada segue em direção ao equilíbrio, enquanto a síntese cineticamente controlada pode ultrapassar o equilíbrio, dependendo das condições de reação e das propriedades do biocatalisador. Na síntese cineticamente controlada o rendimento do produto é determinado pelo balanço

entre as atividades esterase, sintetase e amidase, que são diferentemente afetadas pelas condições de reação.<sup>91</sup>

### 2.5.1 Síntese Termodinamicamente Controlada

Sob qualquer ponto de vista (teórico, prático, econômico, etc), esta seria a estratégia mais simples de síntese de antibióticos semi-sintéticos.<sup>43</sup> Neste caso haveria a condensação direta do doador de acil (fenilglicina) e do núcleo antibiótico (6-APA). A reação inversa seria a hidrólise da ampicilina, ver Figura 2.10. Em termos de processo, deve-se buscar o deslocamento do equilíbrio no sentido da síntese.

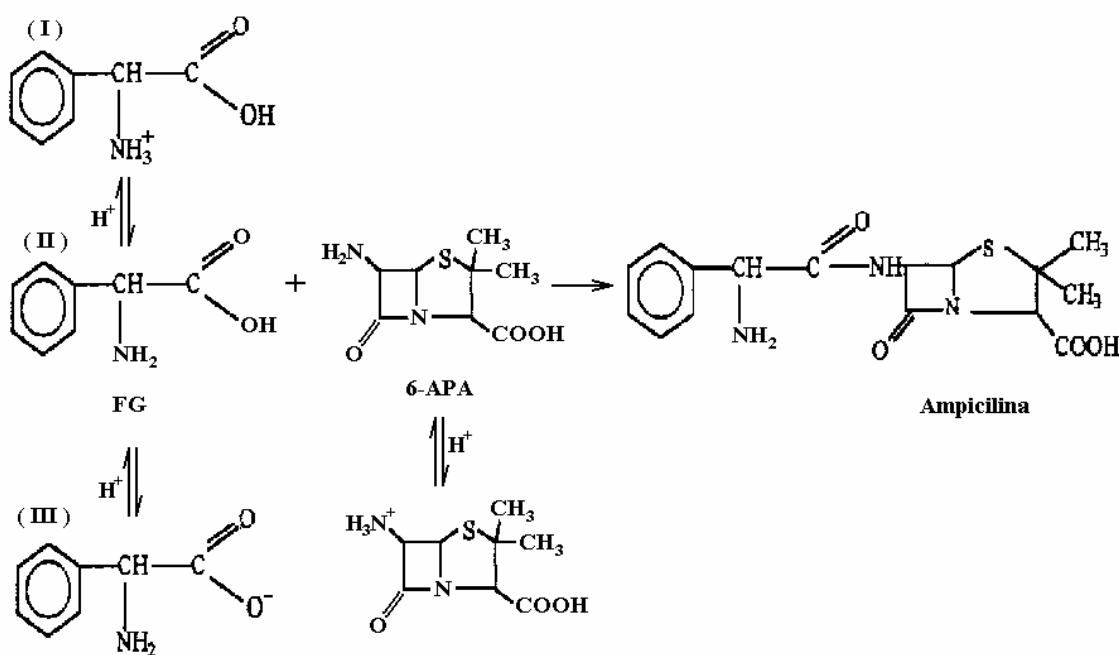


Figura 2.10: Síntese de ampicilina termodinamicamente controlada.

Vários trabalhos reportam ser inviável em meio aquoso a síntese termodinamicamente controlada de ampicilina, diretamente a partir de fenilglicina (FG) e de 6-APA. Há dois sérios inconvenientes nessa rota. O primeiro, de natureza cinética, está relacionado com a dificuldade da PGA de *E. coli* ligar-se a formas carregadas de substratos.<sup>18,39,122</sup> Para que o substrato seja reconhecido e o sítio hidrofóbico se “abra”, a FG deveria ter os grupos carboxil e amino descarregados (ver Figura 2.10). Entretanto, dada a diferença entre os respectivos



pK's, não haverá nenhum pH em que seja apreciável a concentração de moléculas nessa situação (estado de ionização II na Figura 2.10). Quando o grupo carboxil da FG não está ionizado, seu grupo amino está na forma  $\text{NH}_3^+$ , estado de ionização I (Figura 2.10). Ao se aumentar continuamente o pH do meio, a FG perde primeiro o hidrogênio do grupo carboxil para depois perder o hidrogênio do grupo amino, chegando ao estado de ionização III (Figura 2.10). Esta peculiaridade da PGA de *E. coli* é um obstáculo importante a síntese direta (ou “termodinamicamente controlada”) de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que contenham um grupo amino ligado ao carbono  $\alpha$ , como é o caso da ampicilina.

O segundo inconveniente é de natureza termodinâmica: em meio aquoso o equilíbrio da reação está fortemente deslocado no sentido da hidrólise, como se verá a seguir. Assim, há em tese três opções para melhorar os rendimentos da síntese termodinâmica: usar PGA's de outra origem microbiana, diminuir a concentração de água (a reação será deslocada no sentido da síntese) ou favorecer a presença de substrato na forma não-iônica, atuando sobre as constantes de ionização.

A primeira alternativa foi testada, empregando PGA isolada de *Xanthomonas sp.*<sup>11</sup> Observou-se que essa enzima não necessitava que o substrato estivesse neutro para reconhecê-lo e tinha alta especificidade para substratos que possuíam um grupo  $\alpha$ -amino. A hidrólise de ampicilina e cefalexina foi testada a pH 7 e se observou que a reação de hidrólise era favorecida termodinamicamente e a síntese desses antibióticos, diretamente a partir de fenilglicina e 6-APA ou 7-ADCA não era factível em meio aquoso.

Testaram-se solventes orgânicos para contornar o problema do equilíbrio termodinâmico, porém a dificuldade nessa solução é a estabilidade da enzima em meio orgânico; sua atividade é reduzida em virtude de mudanças conformacionais indesejadas pelo meio hidrofóbico.<sup>151</sup>

Esta rota, embora simples, é uma estratégia rígida, já que o rendimento do produto é determinado exclusivamente pela constante de equilíbrio. Uma forma de contornar esses problemas é a substituição da FG por um derivado: éster, amida, ou fenilglicina N-acilada. Com este procedimento, elimina-se o radical carboxil que, desprotonado, prejudica o reconhecimento do substrato pela enzima de *E.*

*coli*. A reação de síntese a partir desses derivados é denominada “cineticamente controlada”. O emprego de ésteres é mais vantajoso para a síntese de muitos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, do ponto de vista termodinâmico, que o uso de outros derivados. A energia de Gibbs padrão da síntese a partir de ésteres é consideravelmente reduzida, e o pH ótimo muda da faixa ácida para uma faixa fracamente ácida ou neutra.<sup>162</sup>

### 2.5.2 Síntese Cineticamente Controlada

Na síntese cineticamente controlada, o rendimento do produto é determinado pelo balanço entre as atividades esterase, sintetase e amidase, que são diferentemente afetadas pelas condições de reação.<sup>91</sup> A Figura 2.11 ilustra a síntese de ampicilina cineticamente controlada a partir de éster metílico de fenilglicina (EMFG) e 6-APA (rota de síntese deste trabalho).

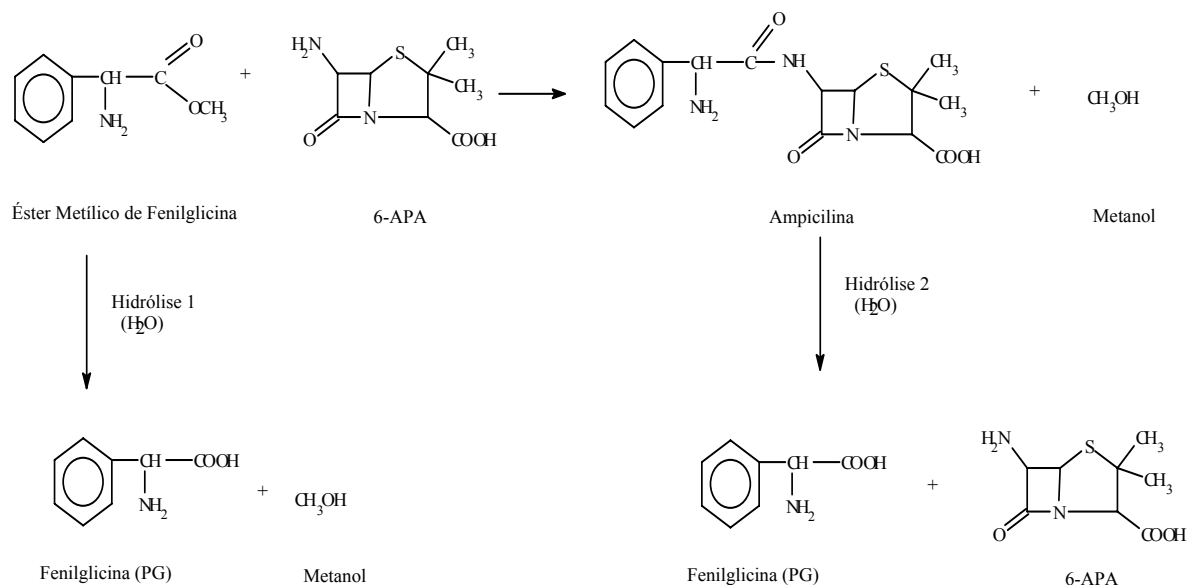


Figura 2.11: Síntese de ampicilina cineticamente controlada.

Esta é uma das estratégias de síntese mais populares na literatura científica<sup>28,29,98,109</sup>. Como já se viu, uma alternativa para lidar com a limitação termodinâmica da síntese de ampicilina é o uso de derivados ativos de FG, como ésteres e amidas. De tais compostos, o EMFG levou a rendimentos mais altos do que as amidas<sup>43,97</sup>. Note-se que essa rota apresenta uma nova reação paralela, indesejada: a formação de FG e metanol pela hidrólise do EMFG. Além disso, a

ampicilina produzida pode, também, ser hidrolisada em FG e 6-APA. Para se obter rendimento mais alto em ampicilina, a síntese é interrompida antes que a velocidade de hidrólise do antibiótico se torne maior que sua velocidade de síntese

53

Para facilitar a compreensão da discussão que segue, definem-se aqui os critérios usados para avaliar o desempenho do processo de síntese: **rendimento** é [*antibiótico produzido/EMFG consumido*]; **seletividade** é [*antibiótico produzido/fenilglicina produzida*] e **produtividade** é [*antibiótico produzido/tempo/volume de reator*].

O mecanismo da rota cineticamente controlada da síntese enzimática de ampicilina segue duas etapas. Inicialmente, um grupo da enzima liga-se covalentemente com o derivado da cadeia lateral, formando o intermediário acil-enzima. O sítio ativo da enzima de *E. coli* só formará este intermediário se o grupo  $\alpha$ -amino na molécula de EMFG estiver desprotonado. Em seguida, na desacilação, esse doador acil (complexo acil-enzima) reagirá com o nucleófilo (6-APA), formará o antibiótico e a enzima regenerada. É necessário que o nucleófilo se encontre adsorvido no centro ativo da enzima antes da formação do acil-enzima, já que a concentração de água é extremamente maior que a de 6-APA.<sup>45,73</sup> Assim, se o nucleófilo não estiver posicionado, o complexo acil-enzima desacilar-se-á com a água formando FG (hidrólise 1 da Figura 2.11). A formação do complexo acil-enzima também ocorre com o antibiótico; a alta concentração de água promove a desacilação do intermediário liberando FG e 6-APA e novamente regenerando a enzima (hidrólise 2 da Figura 2.11).

A estrutura do sítio ativo da PGA é complexa, em forma de bolsa com grupamentos serina e asparagina, entre outros. Na Figura 2.12 vê-se uma proposta de mecanismo catalítico que mostra a importante função das pontes de hidrogênio entre a água e o grupo  $\alpha$ -amino da serina B1 (altamente nucleofílico). O substrato também interage com os nitrogênios B69 e os da ligação lateral da asparagina B241. Nessa bolsa (sítio ativo) a serina B1 fica posicionada para um ataque nucleofílico ao carbono carbonil do substrato (penicilina G, no caso da Figura 2.12).<sup>39</sup> Quando o substrato é o EMFG, sua hidrólise segue esse mesmo mecanismo. A dissociação do 6-APA pode ter efeito na síntese de ampicilina, pois

ele tem de estar neutro para aceitar próton e dirigir um ataque nucleofílico sobre o grupo ácido do intermediário acil-enzima <sup>135</sup>. O papel da molécula de água, formando ponte de hidrogênio no amino terminal da serina B1, entretanto, não é consensual. McVey *et al.*, 2001, <sup>121</sup> propuseram outro mecanismo de formação do complexo acil-enzima que dispensa essa interação com uma molécula de água. A atividade da enzima seria altamente dependente da asparagina B241 (contribui com o posicionamento do substrato e sítio ativo), sugerindo que um par Ser-Asn seria uma maneira mais apropriada para descrever seu sítio ativo.

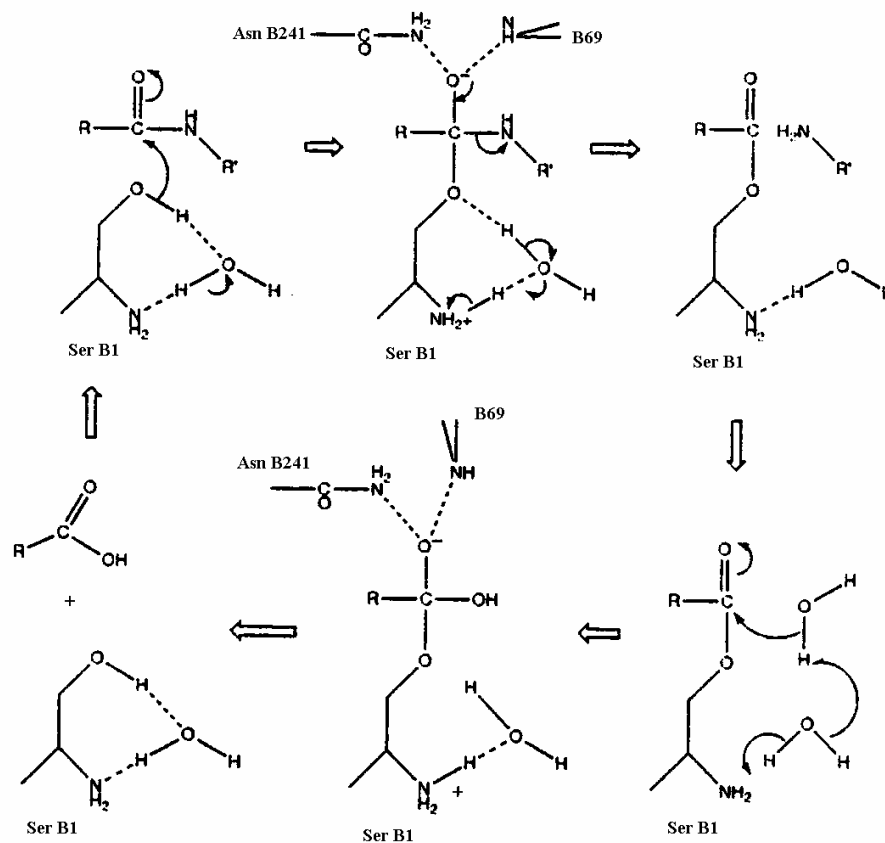


Figura 2.12: Passos do mecanismo proposto para a ação catalítica da penicilina G acilase na hidrólise de penicilina G. <sup>39</sup>

Esta rota de síntese parece mais complexa que a termodinamicamente controlada, mas tem características interessantes. A rota é realizada em condições suaves de reação (meio aquoso), rendimentos mais elevados que a rota termodinamicamente controlada são obtidos, e as velocidades de reação são mais elevadas. Como a enzima atua como transferase e como hidrolase, os rendimentos

dependem das propriedades da enzima, dos substratos e das variáveis experimentais (pH, temperatura, força iônica, presença de solventes orgânicos).

Por exemplo, a 4° C a velocidade da reação de síntese de ampicilina supera as velocidades das reações de hidrólise, resultando em alto rendimento de síntese – às custas, entretanto, de uma menor produtividade, em virtude da menor temperatura. Viu-se, também, que a interação dos efeitos do pH-temperatura era importante e que o efeito do pH era mais significativo em uma temperatura mais baixa (4°C).<sup>55</sup> Estas características indicam que a análise dos experimentos deve integrar todos os fatores que influenciam a reação.

### 2.5.3 Efeito dos Solventes Orgânicos

Do ponto de vista termodinâmico, os solventes orgânicos são imprescindíveis em sistemas monofásicos de síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos. Os solventes alteram as constantes termodinâmicas de dissociação, aumentando os valores dos pK's dos grupos carboxílicos. Reduzem, ainda, a concentração de água, desfavorecendo assim a reação de hidrólise. Por outro lado, se a enzima estiver em forma solúvel (não imobilizada) pode ocorrer sua precipitação em meio apolar.

No caso da síntese cineticamente controlada, a presença de solventes orgânicos (etilenoglicol, metanol, etanol, acetona, dimetilformamida) leva a um aumento de rendimento de síntese, quando se trabalha numa faixa de concentração baixa de substrato (< 50mM)<sup>43,44,47,149,161</sup>. Quando o solvente está muito diluído, o rendimento de síntese aumenta à medida que aumenta sua concentração (os resultados mais expressivos são obtidos usando metanol), mas para soluções acima de 40% v/v esse rendimento começa a decrescer. Neste caso, ocorre queda de atividade da enzima em virtude de mudanças indesejadas de sua estrutura terciária em meio hidrofóbico, que dificultam o acesso dos substratos ao sítio ativo.<sup>107,108</sup> Solventes orgânicos foram empregados na rota cineticamente controlada para minimizar as reações indesejadas de hidrólise, apesar da redução da estabilidade da enzima em meio orgânico.<sup>27,36,91,134</sup>

#### 2.5.4 Dependência do pH

Em catálise enzimática é necessário escolher cuidadosamente o pH do meio e controlá-lo, pois essa variável interfere diretamente na formação do complexo enzima-substrato. A dependência das constantes cinéticas de reações enzimáticas com relação ao pH pode render informações importantes sobre o mecanismo de interação enzima-substrato.

Em sínteses cineticamente controladas, uma redução de pH diminui a velocidade de hidrólise do éster e do antibiótico. Entretanto, a velocidade de hidrólise do substrato diminui mais que a do antibiótico. Desta forma, se a reação for interrompida em momento conveniente, o rendimento da reação com relação ao éster (ou amina) precursor da cadeia lateral pode ser maximizado.<sup>55,69,97,135</sup>

No mecanismo proposto por Ospina *et al.* (1996)<sup>135</sup> o grupo amino do 6-APA não pode estar protonado; ao contrário, deve estar pronto para dirigir um ataque nucleofílico sobre o complexo intermediário acil-enzima. Assim, o efeito do pH na reação de síntese está também fortemente ligado à dissociação do 6-APA. Quando aqueles autores promoveram sínteses de ampicilina a vários pHs, a seletividade aumentou quando se trabalhou a menores pHs (até 6,0); abaixo desse valor a seletividade da reação diminuiu.

Outro aspecto que é influenciado pelo pH é a desacilação do complexo acil-enzima (síntese do antibiótico ou hidrólise do EMFG). Ela é prejudicada pela queda do pH, mas o ataque nucleofílico pelo 6-APA é menos afetado (pois, 6-APA ainda está com grupo amino na forma  $\text{NH}_2$  em pH mais baixo,  $\text{pK}_a = 2,5$  e  $\text{pK}_b = 4,9$ ) do que o promovido pela água: a velocidade de síntese decresce menos que a de hidrólise do EMFG, aumentando assim a seletividade da síntese.<sup>45,87</sup>

Note-se, ainda, que a atividade catalítica da enzima cai em pHs ácidos, pois o grupo amino da serina terminal precisa estar descarregado para poder promover o ataque nucleofílico à ligação carboxílica (éster ou amida) do substrato (vide primeira etapa do mecanismo na Figura 2.12). Uma possível explicação para o aumento de seletividade da síntese quando se diminui o pH pode estar na maior afinidade do 6-APA para adsorção em seu respectivo sítio na enzima, quando o pH é reduzido, mas não tanto a ponto de desnaturar a enzima. Isso pode parecer contraditório com a necessidade do grupo amino livre do 6-APA dever estar

desprotonado para o ataque nucleofílico ao acil-enzima (desacilação), mas resultados experimentais em pH igual a 6,5 indicaram claramente esse favorecimento<sup>55,69</sup>. Em valores de pH ainda mais baixos (<6,0), a seletividade diminui novamente. Esta última queda pode ser atribuída à enzima estar fora da sua faixa de estabilidade.

### 2.5.5 Dependência da Temperatura

A velocidade de reações catalisadas por enzimas aumenta com o aumento da temperatura, até certo ponto. Acima de uma certa temperatura, a atividade da enzima decresce com a temperatura por causa de sua desnaturação. Assim, o efeito da temperatura sobre as enzimas é regido por dois fenômenos opostos: (1) o aumento na atividade enzimática segue equações tipo Arrhenius; (2) a perda de atividade pode ser devida à desnaturação térmica da enzima, que possui uma cinética de desnaturação que também varia com a temperatura de acordo com a equação de Arrhenius<sup>4,114,157</sup>.

Numa síntese controlada pelo equilíbrio termodinâmico, o efeito da temperatura sobre a conversão pode ser antecipado. Quando a reação é exotérmica, como no caso da formação de benzilpenicilina a partir de ácido fenilacético (AFA) e 6-APA, a conversão (definida como *antibiótico formada/AFA inicialmente presente*) decresce com o aumento da temperatura. Para processos endotérmicos, como a formação de fenoximetilpenicilina, acontece o contrário. Entretanto, para a síntese cineticamente controlada de ampicilina a questão da seletividade é essencial. Como se trata de sistema reacional complexo, série-paralelo, os efeitos térmicos não são imediatamente previsíveis. Ao se favorecer a hidrólise 1 (ver Figura 2.11) perde-se substrato e se eleva o custo global do processo. Por outro lado, trabalhando-se com tempos de residência no reator inadequados, pode-se favorecer a hidrólise 2, novamente encarecendo o processo. Há um decréscimo do rendimento máximo de síntese com o aumento da temperatura. Comparando-se as velocidades de hidrólise 1 e 2, e de síntese em duas temperaturas, obviamente, todas velocidades diminuem com a redução da temperatura, mas as velocidades de hidrólise são mais significativamente afetadas na menor temperatura.<sup>12,55,69,87,97</sup> É nessa condição que se observam as maiores

velocidades relativas (síntese do antibiótico/hidrólise do éster), assim favorecendo uma maior conversão em antibiótico. Entretanto, a temperaturas mais baixas a produtividade do reator cairá. Na síntese de ampicilina, a queda do rendimento não é linear com o aumento da temperatura: ele se mantém com uma tendência decrescente suave até 20°C e a partir deste ponto há uma diminuição sensível.<sup>87</sup>

### **2.5.6 Efeito da Concentração Iônica**

A concentração iônica do meio reacional é mais uma variável que interfere nas propriedades catalíticas da enzima. Altas concentrações de sais inorgânicos induzem a dissociação das sub-unidades da proteína, o que poderia resultar em uma diminuição drástica da atividade enzimática. O controle de pH no reator, em escala industrial, é feito pela adição de NaOH em combinação com um tampão, normalmente fosfato de potássio. Porém, uma concentração iônica alta pode encarecer os processos de purificação subsequentes, já que antibióticos são produtos que requerem alto grau de pureza.

Um aumento na concentração iônica de tampão fosfato no meio reacional leva a um aumento da velocidade de hidrólise da penicilina G para a produção de 6-APA<sup>171</sup>. Nas sínteses de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos realizadas com enzimas livres, o efeito de uma alta concentração iônica (um tampão fosfato ou um sal inerte como NaCl) no meio reacional inibe a síntese do antibiótico, assim uma redução da concentração iônica aumentaria a seletividade no sentido da síntese<sup>103</sup>. Quando se utiliza enzima imobilizada, o rendimento de síntese de ampicilina aumenta com o aumento da concentração de tampão fosfato até 25mM. Acima dessa concentração o rendimento de síntese volta a cair, pois numa concentração iônica alta a enzima diminui sua capacidade de adsorção de substrato e, assim, diminui sua capacidade de síntese de antibiótico<sup>45,50,55,87</sup>.

### **2.5.7 Influência da Concentração dos Substratos**

O 6-APA atua ora como inibidor, ora como ativador na formação do complexo acil-enzima durante a síntese do antibiótico. Esse efeito é mais acentuado nos ensaios realizados a pH mais ácido, pois nestas condições o 6-APA estaria mais adsorvido à enzima, indicando que a velocidade de síntese é



proporcional à fração de 6-APA adsorvida à enzima.<sup>52,73,135</sup> Um aumento no rendimento e/ou seletividade de síntese do antibiótico é observado quando se aumenta a concentração de reagentes no meio reacional<sup>17,26,27,37,55,73,84,96,109,171</sup>.

Uma estratégia promissora para reação enzimática envolve o uso de substratos e/ou produtos sólidos.<sup>37</sup> Neste caso, suspensões dos produtos e/ou substratos estão presentes no meio reacional, enquanto a reação enzimática acontece na fase líquida. Esta estratégia é especialmente vantajosa, pois com a ampicilina cristalizada facilita-se a purificação ao mesmo tempo em que se reduz a reação de hidrólise<sup>26,27,174</sup>.

A síntese de ampicilina realizada em concentrações iniciais altas de substratos ( $\geq 100\text{mM}$ ) alcança rendimentos maiores ( $\sim 90\%$ ) do que as sínteses realizadas em concentrações iniciais de substratos bem abaixo das concentrações de saturação. Porém, há um inconveniente: devido à grande concentração do produto no meio reacional<sup>17</sup> pode ocorrer degradação de ampicilina em níveis inaceitáveis. Outro inconveniente é a presença de EMFG em concentração alta, o que aumenta a solubilidade do antibiótico, efeito não desejado, pois dificulta sua separação do meio<sup>175</sup>.

Ampicilina, como qualquer outro antibiótico  $\beta$ -lactâmico com um grupo amino na cadeia lateral, pode, sob certas circunstâncias, formar ácido penicilóico, polímeros, entre outros produtos de degradação. A estabilidade da ampicilina em soluções aquosas e diferentes pH's foi estudada, e sua degradação em condições ácidas é mais lenta<sup>58,145</sup>. Para minimizar os efeitos da degradação do antibiótico, soluções clássicas como filtração ou cristalização e, também, sínteses em pH ácido podem ser adotadas.

## 2.6 REDES NEURAIIS NA CINÉTICA DA SÍNTESE DE AMPICILINA

A modelagem matemática e a simulação de processos bioquímicos utilizam amplamente modelos determinísticos cada vez mais complexos. No entanto, em alguns casos, esses modelos não se aplicam devido à falta de informação experimental ou mesmo à complexidade do sistema em estudo.<sup>80</sup> Como já visto, a síntese enzimática cineticamente controlada de ampicilina realizada neste trabalho partiu de EMFG e 6-APA. O uso de EMFG para acilação do anel  $\beta$ -lactâmico, 6-

APA, resulta num sistema reativo série-paralelo, cujas reações indesejadas de hidrólise (do EMFG e do antibiótico) ocorrem simultaneamente à de formação do antibiótico (Figura 2.13). Vários autores apresentaram modelos cinéticos para as reações de síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, <sup>47,52,53,73,95,97,134,135</sup> porém todos vêm acompanhados de numerosas simplificações. Modelos semi-empíricos e mecanísticos clássicos simplificados não conseguem ser extrapolados para toda a faixa de estudo.

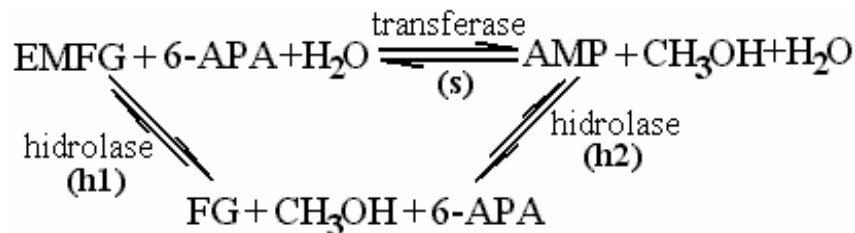


Figura 2.13: Reações envolvidas na síntese enzimática de ampicilina a partir de EMFG.

A cinética da síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos é complexa e altamente não-linear. Conseqüentemente, sua modelagem mecanística conduz a equações de velocidade de reação com grande número de parâmetros. O desenvolvimento de modelos empíricos alternativos tem grande relevância neste caso. Uma alternativa factível aos modelos cinéticos convencionais é o uso de redes neurais artificiais (RNA), uma técnica de inteligência artificial cujo ponto forte é apreender as características da resposta de um sistema a partir de conjuntos experimentais de dados de entrada e/ou saída. Esta ferramenta apresenta a capacidade de reproduzir comportamentos não-lineares complexos diretamente a partir de dados do processo, e de se adaptar a mudanças no comportamento dinâmico do mesmo através de um procedimento de treinamento ou aprendizado. <sup>1</sup> Assim, RNAs podem substituir ou complementar modelos determinísticos. A aplicação de RNAs em processos biotecnológicos vem aumentando nos últimos anos. Elas têm sido utilizadas para estimar variáveis de estado, para determinar fases biológicas em conjunto com sistemas especialistas, monitorando reatores bioquímicos. <sup>94</sup>

Uma RNA é composta por um conjunto de neurônios com capacidade de processamento, e sua topologia define a forma como estes neurônios estão conectados. Seja  $x$  um conjunto de dados de entrada,  $f(x)$  a função saída. A

estimativa da saída  $f(x)$  é  $\underline{f(x)}$ , função do vetor de entrada e dos coeficientes de adaptação da rede (pesos)  $w$ . De uma maneira geral, o que se deseja obter é o valor do incremento  $\Delta w$  a ser aplicado ao vetor  $w$  que faça  $\underline{f(x)}$  aproximar-se de  $f(x)$ . Este procedimento é chamado de treinamento ou aprendizado da rede. Dois eficientes algoritmos para isso são os de Marquardt (1963), para problemas de menores dimensões, e o de retropropagação, que não leva em conta todas as dimensões do erro para o cálculo de seu gradiente com respeito aos pesos a cada iteração, mas às custas de uma convergência mais lenta. Este último algoritmo é mais adequado a redes com maior número de neurônios. Ambos buscam o valor de  $w$  que, em geral, minimiza o quadrado da norma dos erros,  $\|f(x) - \underline{f(x)}\|^2$ ; usualmente, recai-se em problema de mínimos quadrados.

Os neurônios são a base da rede neural. Os componentes de um neurônio artificial são: <sup>8</sup>

1. Entradas e Saídas
2. Pesos
3. Limiar do Neurônio
4. Funções de Transferência

A arquitetura de uma RNA se refere a como seus neurônios estão interconectados. Fazem parte da definição da arquitetura os seguintes parâmetros: número de camadas da rede, número de neurônios em cada camada, tipo de conexão entre os neurônios.

Treinar uma rede neural consiste em um processo iterativo de ajuste de parâmetros: os pesos das conexões entre as unidades de processamento, que guardam, ao final do processo, o conhecimento que a rede adquiriu do ambiente em que está operando. Diversos métodos para treinamento de redes foram desenvolvidos, podendo ser agrupados em dois grupos principais: aprendizado supervisionado e aprendizado não supervisionado. Outros dois grupos bastante conhecidos são os de aprendizado por reforço (caso particular de aprendizado supervisionado) e aprendizado por competição (caso particular de aprendizado não-supervisionado).

Existem vários algoritmos para treinar redes. Uma das formas mais comuns de treinamento de redes neurais é o método de correção de erros. Uma das técnicas dessa classe é conhecida como retropropagação (*back-propagation*).<sup>8</sup>

O algoritmo de retropropagação é supervisionado e utiliza pares (entrada, saída desejada) para, por meio de um mecanismo de correção de erros, ajustar os pesos da rede. O treinamento ocorre em duas fases, chamadas de fase *forward* e fase *backward*. A fase *forward* é utilizada para definir a saída da rede para um dado padrão de entrada. A fase *backward* utiliza a saída desejada e a saída fornecida pela rede para atualizar os pesos de suas conexões.

Existem muitos parâmetros que controlam o desempenho e capacidade preditiva de uma RNA. Para se obter uma rede eficiente, deve-se levar em conta vários aspectos. No caso da RNA escolhida neste trabalho, eles são: (1) seleção do número de camadas ocultas e do número de neurônios nelas contidos; (2) normalização do conjunto de dados de entrada/saída; (3) inicialização dos pesos; (4) determinação da taxa de aprendizado e do termo de momento; (5) seleção de uma função de transferência apropriada e (6) realização de testes de sobre-treinamento e de validação.

A rede neural é um exemplo de modelo empírico e opera por ajuste de curva. É paralela, pois cada neurônio trabalha independentemente dos outros. Por causa do paralelismo, redes neurais têm uma melhor capacidade de filtração de dados com ruídos ou incompletos. Porém, a rede neural tem algumas limitações, pois necessita de longos tempos de treinamento, grandes quantidades de dados para o treinamento e não tem nenhuma garantia de bom resultado e robustez em extrapolações. A rede neural pode cair em mínimos locais durante seu treinamento, ser precisa em determinadas regiões e imprecisas em outras.

A explosão do uso de redes neurais aplicadas a engenharia pode ser atribuída a algumas razões:<sup>90</sup>

1. O grande avanço de *hardware* que possibilitou que o treinamento das redes fosse econômico, relativamente fácil e rápido;
2. O sucesso na aplicação de RNAs, que utilizam técnicas algorítmicas, como sensores;

3. A capacidade de extrair informações das plantas industriais de maneira eficiente;
4. Alguns profissionais sustentam que RNAs são mais fáceis de usar e aplicar a processos reais quando comparadas a modelos polinomiais ou estatísticos;
5. Finalmente a versatilidade na estrutura e aplicação das RNAs possibilita seu uso com modelos convencionais (sistemas híbridos).

## 2.7 SISTEMA HÍBRIDO NEURAL

Embora RNAs tenham se mostrado uma técnica eficiente para a solução de um grande número de problemas, é um grave erro afirmar que elas são suficientes para resolver qualquer tipo de problema. RNAs apresentam várias limitações que não permitem seu uso exclusivo. Sistemas híbridos combinam dois ou mais tipos diferentes de enfoques de modelagem matemática, podendo um deles ser uma RNA.<sup>14</sup>

A utilização de redes neurais em modelos híbridos é prática difundida em vários campos.<sup>110</sup> Modelos híbridos podem ser constituídos por modelos fenomenológicos acoplados a redes neurais, cuja função é fornecer parâmetros ou substituir equações constitutivas do modelo. A idéia por trás do desenvolvimento de sistemas híbridos é a de que uma única técnica, devido às suas limitações e/ou deficiências, pode não ser capaz, por si só, de resolver um dado problema. Neste caso, a combinação de duas ou mais técnicas pode levar a uma solução mais robusta e eficiente. É importante ressaltar, porém, que a utilização de sistemas híbridos não leva necessariamente a uma melhora do desempenho do sistema como um todo sobre aquele obtido individualmente pelas técnicas que foram combinadas para gerá-los. Um importante foco de pesquisas em sistemas híbridos tem sido o de combinar técnicas fortemente baseadas em dados (RNAs, por exemplo) com técnicas que utilizam de conhecimento.

Uma metodologia geral para formulação de um modelo híbrido-neural é:<sup>1</sup>

- Estabelecer as equações de balanço que, junto com relações termodinâmicas e de transporte, permitem relacionar as variáveis de entrada e saída com parâmetros do modelo;
- Determinar quais os parâmetros do modelo que serão estimados pela rede neural e estabelecer a dependência com as variáveis de entrada;

- Determinar a estrutura e o treinamento das redes neurais usando dados obtidos do processo;
- Avaliar a qualidade do ajuste e a capacidade de predição do modelo final usando dados não incluídos no ajuste.

Em reações enzimáticas, muitos efeitos podem influenciar a velocidade de reação, tais como inibição/ativação por produtos e/ou reagentes. A obtenção de modelos que representem adequadamente o comportamento dos dados experimentais não é uma tarefa fácil. Para poder reduzir o número de parâmetros que decorrem do modelo mecanístico usado, geralmente se fazem hipóteses muito simplificadoras. Esses modelos tornam-se restritos e a expressão da velocidade da reação pouco generalizável.

A aplicação de modelos híbridos usando RNAs em processos biotecnológicos vem aumentando nos últimos anos. Aspectos do problema que são bem conhecidos são descritos fenomenologicamente, enquanto RNAs descrevem os termos desconhecidos do modelo <sup>75</sup>.

Com o intuito de não deixar o texto cansativo para o leitor, detalhes acerca da rede neural, seus métodos de treinamento e de validação, utilizados neste trabalho, bem como alguns princípios de funcionamento de uma rede neural e alguns aspectos históricos estão descritos no Apêndice A.

## **2.8 REATORES PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ANTIBIÓTICOS**

Para definição do tipo de reator e de suas condições operacionais deve-se levar em conta todo o conhecimento acerca da reação e do catalisador. A escolha do melhor reator busca minimizar os problemas que surgem durante a reação para se obter o maior rendimento, seletividade e/ou produtividade possíveis.

A escolha de um reator para síntese de ampicilina é influenciada por diversos fatores. Ao se realizar a síntese cineticamente controlada do antibiótico ocorre uma queda no pH do meio devido às reações de hidrólise do EMFG e da ampicilina. Assim, deve-se ter um controle dessa variável, mas, como já visto, o emprego de tampões deve ser minimizado, pois sua presença encarece a purificação e extração do produto.

Para uma análise racional do sistema de reator com enzima imobilizada, é necessário investigar o efeito da resistência à transferência de massa externa às partículas de catalisador, e das resistências difusionais no suporte poroso sobre a velocidade global de reação. A restrição difusiva, que normalmente aparece em catálise heterogênea, também tem sido freqüentemente encontrada em reações com enzimas imobilizadas.<sup>138</sup> Neste trabalho de doutorado este estudo não foi realizado, pois trabalhos anteriores do grupo<sup>20,50,51,72</sup> detectaram a região em que efeitos de transporte de massa são significativos. Assim, todos os experimentos cinéticos foram realizados na região em que os efeitos da resistência no filme externo à partícula e efeitos intrapartícula foram eliminados.

No âmbito deste trabalho foram comparadas alternativas de reator para a produção de ampicilina na presença de partículas de catalisador suspensas em meio aquoso: reator convencional tipo tanque agitado, reator de leito fixo e reator de escoamento em vórtices (REV) de Taylor-Poiseuille. Este último reator tem como característica a presença de vórtices toroidais no espaço anular entre dois cilindros, obtidos pela rotação do cilindro interno. Esse tipo de escoamento apresenta algumas vantagens. A agitação obtida é suave, embora eficiente, tornando-o ideal em aplicações para as quais baixas tensões de cisalhamento sejam uma exigência do processo (como é o caso dos suportes porosos utilizados na imobilização). Assim, para se atingir rendimentos mais altos e melhores condições operacionais, reatores não convencionais, como o REV, podem reduzir os custos de processamento. Em um reator de mistura, a agitação pode ser muito agressiva para as partículas de catalisador. No caso de um reator de leito fluidizado, a velocidade axial necessária à fluidização tornaria necessário operar com alta razão de reciclo. Gradientes de pH entre o reator e o tanque de circulação poderiam afetar substratos ou produtos. Um reator tubular de leito fixo pode apresentar sérias limitações ao transporte de massa extrapartícula, reduzindo a velocidade aparente de reação e, conseqüentemente, a eficiência do processo.

### **2.8.1 Reator de Leito Fixo**

O uso da sílica como suporte para imobilização de enzimas implica a necessidade de uma configuração de reator que atenda a sua restrição de baixa

resistência ao cisalhamento. Dessa forma, reatores tipo tanque agitado – usados nas reações de síntese com gel – não são indicados. Para viabilizar o estudo do suporte sílica, desde a medida de atividade da enzima imobilizada no suporte até a garantia de operação sem limitação por efeitos difusivos, testou-se uma configuração de reator em leito fixo, com recirculação.<sup>60</sup>

O balanço material em reator diferencial (com pequena massa de catalisador) de leito fixo:

$$q\Delta C_s = rW \quad (2.2)$$

em que:

$q$  é a vazão volumétrica de recirculação;

$\Delta C_s$  é a mudança na concentração de substrato através do reator;

$r$  é a velocidade de reação (considerada invariante ao longo do leito, pois o reator é suposto diferencial) dada em mol por unidade de tempo por unidade de enzima imobilizada;

$W$  é a massa da matriz de enzima imobilizada.

É necessária uma baixa conversão por passe no reator para ter uma aproximação de operação sem gradiente no sistema. Isso foi conseguido empregando uma vazão volumétrica de recirculação  $q$  suficientemente alta, de forma que a conversão por passe calculada através da equação 2.2 fosse pequena. A síntese de ampicilina foi realizada utilizando-se o sistema com recirculação com reator de leito fixo. A Figura 2.14 mostra um esquema do sistema reacional.

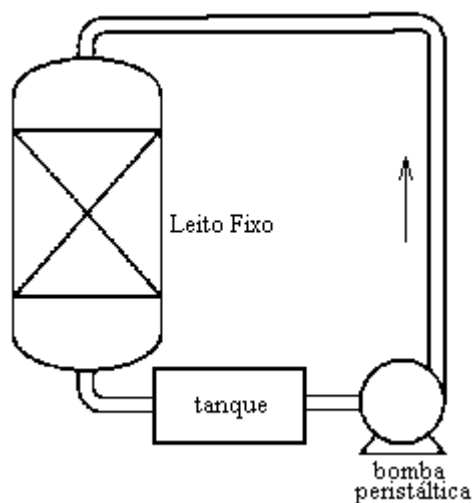


Figura 2.14: Esquema experimental do reator de leito fixo para síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em sílica.



### 2.8.2 Reator de Escoamento em Vórtices (REV)

O escoamento que aparece no espaço anular entre dois cilindros, sendo que ao menos um deles seja rotatório, é a base de numerosos estudos de fluidodinâmica. Observando a Figura 2.15 vê-se um esquema de dois cilindros concêntricos com a formação de pares de vórtices com sentidos alternados de rotação, pela rotação do cilindro interno. A partir de uma rotação crítica, inicia-se a formação de vórtices toroidais sobrepostos ao fluxo principal de Couette.

O escoamento de um fluido entre cilindros concêntricos compridos, interno estacionário e externo rotante, foi estudado por Couette (1890) para medir a viscosidade dinâmica,  $\mu$ , do fluido. Couette propôs dois arranjos experimentais: medir o momento exercido pela rotação de um cilindro externo sobre um cilindro interno estacionário, com o fluido preenchendo o espaço anular, e medir o fluxo através de tubos (método introduzido anteriormente por Poiseuille). A viscosidade foi determinada através da medida do torque transmitido pelo fluido ao cilindro interno<sup>110</sup>. Embora os experimentos de Couette não fossem muito precisos, constituíram-se em uma contribuição duradoura à fluidodinâmica. A partir deles consagrou-se a denominação de escoamento de Couette: o fluxo de cisalhamento entre limites móveis ou estacionários, circulares ou planos.

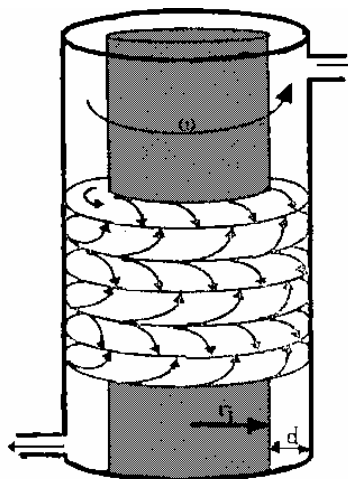


Figura 2.15: Reator de escoamento em vórtice de Taylor-Poiseuille.

G. I. Taylor (1923)<sup>165</sup> determinou a velocidade de rotação crítica dos cilindros para a formação de vórtices no espaço anular. A rotação do cilindro interno impõe uma força centrífuga mais alta ao fluido adjacente do que àquele

mais distante. Até certo limite, a força viscosa consegue compensar esse efeito, mas a partir da rotação chamada de crítica, o escoamento de Couette torna-se instável. Surgem, então, pares de vórtices girando em sentidos opostos. A amplitude axial do vórtice é aproximadamente igual ao tamanho da abertura anular. A energia que é transmitida para o fluido pela rotação do cilindro interno produz dois movimentos rotacionais: uma rotação tangencial global e uma rotação secundária (com componente axial e radial) dentro dos vórtices.

Taylor calculou teoricamente e confirmou experimentalmente o critério para a formação de vórtices em um anel estreito, baseado no número de Taylor ( $Ta$ ), assim chamado “*a posteriori*” por outros autores. Este autor descartou os termos não lineares das equações de Navier-Stokes e conseguiu solucioná-las, antecipando a rotação crítica para o início da instabilidade. O escoamento de Couette é facilmente reproduzível sendo, portanto, muito adequado para o estudo das conseqüências de distúrbios infinitesimais em seu campo de velocidades. Detalhes acerca do modelo do reator vide Apêndice B.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em várias etapas. Para cada uma, mostrar-se-ão os materiais, equipamentos e procedimentos analíticos usados para uma melhor visualização das etapas experimentais desenvolvidas.

#### 3.1 IMOBILIZAÇÃO DA PGA EM DIFERENTES SUPORTES

A penicilina G acilase de *Escherichia coli* recombinante [EC 3.5.1.11] foi doada por Antibióticos S.A., Espanha. O caldo doado contendo a solução de enzima foi previamente purificado, centrifugado 11.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Em seguida, fez-se a diálise, também a 4 °C, do sobrenadante. A PGA foi dialisada e armazenada em congelador para todas as futuras imobilizações. A atividade desta solução de enzima foi de 256 UI/mL. Essa PGA foi imobilizada em sílica e em gel de agarose.

##### 3.1.1 Materiais e Equipamentos

###### *Materiais*

- Suporte 1: agarose 6BCL, 8BCL e 10BCL (6%, 8% e 10% em peso) produzida por Hispanagar S.A. (Espanha) doada por Dr. J. M. Guisán, do Instituto de Catálise e Petróleo Química (ICP/CSIC), Madri, Espanha.
- Suporte 2: sílica macroporosa foi preparada conforme procedimento descrito na literatura <sup>169</sup>. A sílica possuía a seguinte caracterização: 273Å de diâmetro médio de poro; área BET: 56,6 m<sup>2</sup>/g; área de adsorção 53,1 m<sup>2</sup>/g; volume de poros: 0,3262 m<sup>3</sup>/g.
- Reagentes de imobilização: borohidreto de sódio, 2,3 epoxipropanol (glicidol), periodato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido fenilacético, hidróxido de sódio e fosfato de sódio, 3 glicidoxi propil trimetoxi silano (GPTMS), ácido 6-nitro-3-fenilacetamido benzóico (NIPAB), todos de grau analítico de diversas marcas. Penicilina G da Paraquímica, p-dimetilamino benzaldeído (PDAB) da Q.M.

### *Equipamentos*

- Balança analítica marca QUIMIS modelo 500L210C;
- pHmetro marca Orion modelo 410;
- Espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000;
- Banho termostático marca BROOKFIELD modelo EX – 200;
- Bomba de vácuo marca QUIMIS, modelo Q-355B;
- Agitador mecânico, marca LabMaster, modelo Lightnin L1U08;
- Agitador magnético;

### **3.1.2 Pré-Tratamento das Membranas de Diálise**

Preparou-se uma solução de 100mM de  $\text{NaHCO}_3$  e 10mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  com pH 7. Transferiram-se as membranas para essa solução em banho termostático a 60°C com agitação por duas horas, trocou-se duas vezes a solução das membranas totalizando um tempo de seis horas. Em seguida, armazenaram-se as membranas em geladeira com água destilada.

### **3.1.3 Diálise**

Inicialmente, colocou-se a solução de enzima centrifugada a 4°C na membrana de ultrafiltração pré-tratada. Em seguida, colocou-se a membrana em um béquer (para 100mL de solução de enzima, usou-se béquer de 3L) contendo tampão fosfato 5mM e pH 6. A membrana contendo a solução de enzima ficou em contato com o tampão por dois dias a 4°C, e a cada doze horas a solução de tampão fosfato foi trocada. Após 48 horas, tirou-se uma alíquota da solução para verificar se havia ocorrido alguma perda da atividade enzimática. Armazenou-se a solução de enzima purificada em congelador para todas as futuras imobilizações.

## **3.2 ATIVAÇÃO DOS SUPORTES**

Suportes para imobilização de enzimas devem apresentar boas propriedades mecânicas e estabilidade química. A seleção das condições para imobilização é tarefa difícil, pois só alguns suportes, que já contêm sítios reativos, podem ligar-se diretamente com as enzimas. A maioria dos materiais-suporte não possui esta

característica, tendo grupos hidroxil, amino, amida, ou carboxil que necessitam de prévia ativação para formação da ligação covalente com a enzima – este é o caso dos nossos suportes. A ativação dos suportes os preparou para combinarem-se quimicamente só (ou preferencialmente) com os grupos funcionais da enzima que não fossem essenciais para sua ação catalítica.

### 3.2.1 Ativação do Gel de Agarose

O gel de agarose (AG–OH) para poder ser utilizado na imobilização de PGA teve de ser previamente ativado e ficou com grupos gliceril. Os géis glioxil-agarose foram preparados por eterificação (ativação) do gel com glicidol, como mostrada na Figura 3.1:

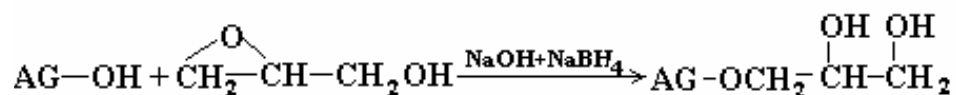


Figura 3.1: Reação do gel com glicidol em meio alcalino

Utilizou-se gel de agarose 8%, com ligações cruzadas, produzido por Hispanagar S.A. (Espanha). Imobilizaram-se 50mL de gel. A esse volume de gel adicionaram-se 10mL de água, 17mL de uma solução 1,7N de NaOH e 0,475g de NaBH<sub>4</sub> de maneira a se ter 28,5mg de NaBH<sub>4</sub> por mL de gel de agarose. Esta solução foi colocada em banho de gelo, na capela sob agitação suave com pás. Em seguida, gotejaram-se 12mL de glicidol lentamente para que a temperatura do meio não se elevasse. Após o gotejamento, retirou-se o banho de gelo e essa solução ficou sendo agitada por aproximadamente 18 horas. Após esse período, lavou-se o gel abundantemente com água destilada usando um filtro poroso. Esse gel ativado foi armazenado em geladeira para posteriores utilizações.

### 3.2.2 Oxidação do Gel Ativado a Gel Aldeído

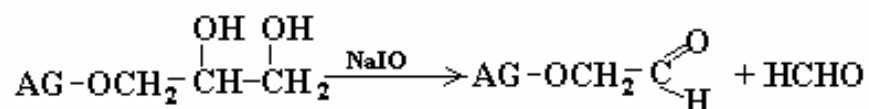


Figura 3.2: Reação de oxidação até gel-aldeído na presença de periodato de sódio.

Fez-se a oxidação do gel de agarose para obtê-lo com terminações aldeídicas e só então se realizou a imobilização propriamente dita. Os grupos aldeído reagiram com os grupos amino, principalmente dos resíduos lisina da enzima e, assim, esta foi imobilizada multipontualmente. Suspendeu-se o gel ativado em água destilada para a relação 1/10 em volume. Sob agitação com pás, adicionaram-se 37,5mL de NaIO<sub>4</sub> 0,1M. Deixou-se agitando por um período de duas horas. Por último, lavou-se abundantemente com água destilada.

O número total de grupos gliceril na agarose é a soma dos grupos formados pela eterificação, subprodutos da reação de entrecruzamento. Pode-se conseguir géis com uma quantidade de grupos aldeído desde 0 a 200 µM/mL, equivalente a uma densidade superficial de 17-20 resíduos aldeído/1000Å<sup>2</sup> <sup>45</sup>.

### 3.2.3 Ativação da Sílica

Os silanóis na superfície da sílica porosa podem reagir com vários componentes químicos produzindo entidades superficiais estáveis, permitindo, assim, a adaptação da superfície da sílica para aplicações específicas. A reação da sílica com compostos organosilânicos é uma das diversas reações que podem ocorrer em sua superfície. Os silanos são agentes de ligação de uma família de organosilicinas, que caracteristicamente possuem dois tipos diferentes de funcionalidade química. A fórmula geral da molécula é R-Si-X, em que R é o grupo organo funcional ligado ao átomo de uma maneira termodinâmica e hidroliticamente estável e X designa os grupos hidrolizáveis ligados ao silício. Através do grupo X o silano reage com o suporte e através do grupo R podem interagir com moléculas orgânicas. Fazendo isso, a molécula de silano forma pontes químicas entre as superfícies orgânica e inorgânica. A Figura 3.3 mostra a reação de silanização utilizada neste trabalho <sup>22,138</sup>. Os agentes γ-APTS (γ-amino propil trietoxi silano) e GPTMS (3 glicidoxi propil trimetoxi silano) foram testados <sup>20,22</sup> e o GPTMS mostrou-se mais adequado, pois os suportes apresentaram uma superfície muito mais ativada.

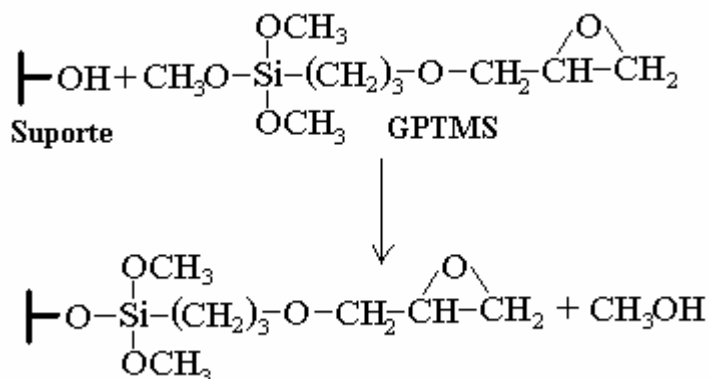


Figura 3.3: Silanização (ativação) da sílica porosa

A sílica, para poder reagir com o GPTMS, deve estar protonada, ou seja, com grupos hidroxila prontos para reagir. Em solução aquosa e a baixo pH, os  $O^-$  da sua superfície estarão protonados. Assim, lavou-se a sílica com ácido nítrico 10% v/v, durante 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a sílica foi lavada com a mesma solução de ácido nítrico e soluções de acetona/água em concentrações crescentes de 25, 50, 75 e 100 % de acetona. Após a lavagem, a sílica ficou em estufa durante 1 hora a 40 °C. A reação de silanização com GPTMS (ver Figura 3.3), para obtenção do suporte glioxil-sílica, foi realizada a 60 °C, pH 8,5 e na razão de 30 mL de solução de GPTMS 5 % v/v por grama de sílica. Deixou-se reagir por 5 horas sob agitação suave. O pH da solução de GPTMS foi corrigido com KOH, pois NaOH precipita o GPTMS. Em seguida o suporte foi lavado com água e soluções de acetona/água em concentrações crescentes de 25, 50, 75 e 100 % de acetona. Após a lavagem, a sílica ficou em estufa durante 1 hora a 40 °C. Procedeu-se a hidrólise dos grupos epóxidos com solução de ácido sulfúrico 0,1 M por duas horas, a 85 °C, na mesma razão da silanização, ou seja, 30 mL de solução de  $H_2SO_4$  por grama de sílica. Novamente a sílica foi lavada com água e soluções de acetona/água em concentrações crescentes de 25, 50, 75 e 100 % em volume de acetona. Após a lavagem, a sílica ficou em estufa durante 1 hora a 40 °C. A Figura 3.4 mostra a reação com ácido sulfúrico.

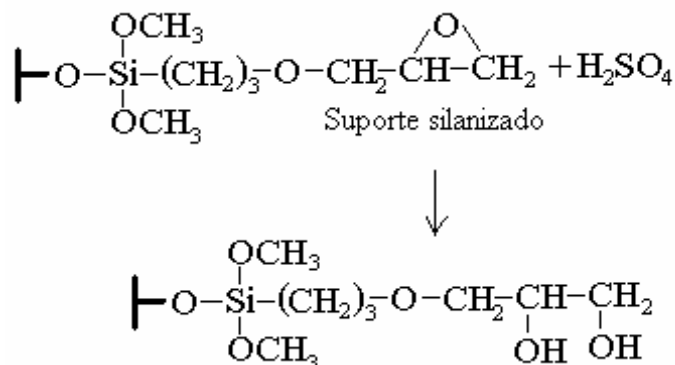


Figura 3.4: Hidrólise do suporte silanizado com ácido sulfúrico.

### 3.2.4 Oxidação da Sílica Silanizada

O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos é à reversibilidade da ligação amino-aldeído (enzima-suporte), que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica. A reação de oxidação da sílica com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) tem essa finalidade: deixa o suporte com terminações aldeídicas pronto para reagir com a enzima. A reação de oxidação ocorreu em temperatura ambiente, por 1 hora, na razão de 5mL de solução (40mM de  $\text{NaIO}_4$ ) por grama de sílica. A Figura 3.5 mostra a reação de oxidação do suporte. A adição de  $\text{NaIO}_4$  foi realizada lentamente com pipeta Pasteur. Depois desta reação o suporte estava completamente ativado e pronto para reagir com a enzima. Esse suporte pode ser armazenado úmido em geladeira; após a etapa de oxidação, a sílica não precisa mais ser seca em estufa. Basta lavá-lo com água destilada.

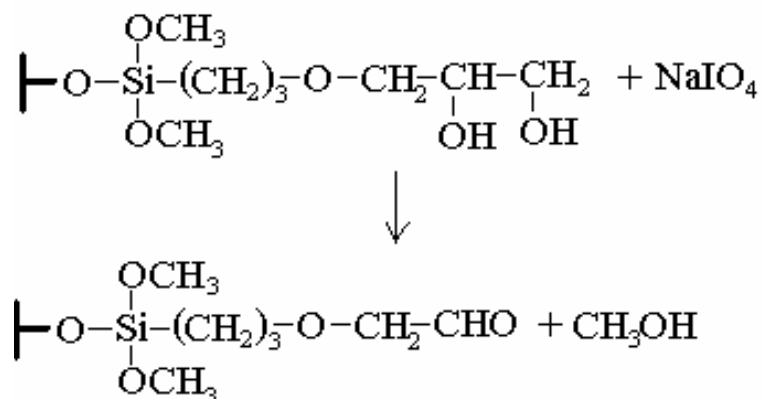


Figura 3.5: Reação de oxidação na presença de periodato de sódio.



### 3.2.5 Metodologia para Quantificação do Número de Grupos Aldeídos dos Suportes

A necessidade de controlar o grau de ativação do suporte requer a determinação do número de grupos aldeídos presentes na superfície do suporte. Os grupos hidroxil do suporte oxidados com periodato de sódio resultam nos grupos aldeídos desejados. A quantificação dos grupos aldeídos foi realizada pela medida de NaIO<sub>4</sub> não consumido (sobrenadante). Utilizou-se do fato do iodeto de potássio em excesso (I<sup>-</sup>) reagir com o periodato (IO<sub>4</sub><sup>-</sup>) não consumido da reação de oxidação, gerando iodo na forma I<sup>3-</sup>, segundo a seguinte reação:



A metodologia desenvolvida para a quantificação do iodo formado e, em consequência, do periodato não consumido, é baseada em colorimetria. O iodo formado foi quantificado medindo-se a absorção de luz visível em espectrofotômetro. É necessário o uso de iodeto em excesso, para garantir a formação I<sup>3-</sup>. A mesma quantidade de periodato foi adicionada ao suporte (sílica ou agarose) ativado e ao branco. Em tempos determinados, retiraram-se alíquotas que reagem com uma solução de iodeto de potássio/carbonato de sódio. Neste método, 100 µL da solução de NaIO<sub>4</sub> sobrenadante na reação de oxidação reagiram com 3 mL de uma mistura 1:1 de KI 10 % p/v e bicarbonato de sódio saturado, sendo realizada análise em espectrofotômetro.

Utilizou-se sempre como padrão um branco em paralelo, que correspondia a igual quantidade de NaIO<sub>4</sub> adicionada a uma massa de água equivalente à massa de suporte. Portanto, o branco continha a quantidade total de periodato presente inicialmente na amostra. Inicialmente, tomaram-se 100 µL de branco, reagiram-se com a solução de iodeto de potássio: bicarbonato de sódio saturado, a cor resultante foi ajustada para absorbância próxima a 0,7 (~ 470 nm), alterando-se, se necessário, o comprimento de onda do aparelho. Dessa forma o periodato da amostra contendo suporte ativado foi sempre quantificado como uma porcentagem do periodato total presente, uma vez que é linear a relação entre absorbância da amostra e do padrão com a concentração do iodo e, conseqüentemente, do periodato presente. Essa metodologia permitiu, de forma rápida e reprodutível,

determinar a quantidade de periodato consumida para diferentes graus de ativação dos suportes <sup>138</sup>.

### 3.3 IMOBILIZAÇÃO DA PGA

A maioria das proteínas apresenta alguns resíduos de lisina, os quais geralmente não estão envolvidos no sítio ativo da enzima. Grupos amino são polares e estes ficam geralmente expostos para o meio na superfície da proteína; quando desprotonados são muito reativos e, sem prévia ativação, atuam como agente nucleófilo contra os átomos com carga parcialmente positiva localizados na superfície do suporte (ver Figura 3.6).

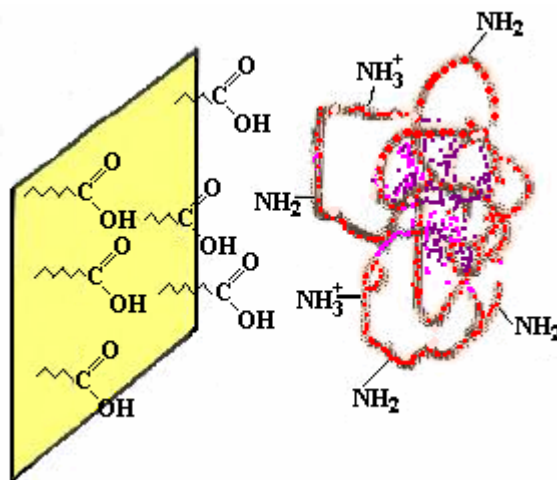


Figura 3.6: Imobilização de PGA a suporte ativado.

É necessário um rigoroso controle da intensidade do processo de multi-interação enzima-suporte, de modo a se obter uma alta estabilização sem, contudo, promover a distorção da estrutura terciária da enzima e, conseqüentemente, do seu centro ativo. A estrutura cataliticamente ativa da enzima é mantida por diferentes forças, como pontes de hidrogênio, forças iônicas, interações de van der Waals. O alinhamento entre os grupos amino da enzima e os grupos aldeído do suporte é produzido por movimentos vibracionais da estrutura imobilizada. Os grupos amino situados na superfície da proteína não estão exatamente alinhados com os grupos aldeído do suporte, ou seja, a enzima e o suporte ativado não são estruturas complementares. Assim, quando a enzima, já imobilizada, continua a interagir com o suporte ativado, novos alinhamentos entre os grupos da enzima e os grupos

aldeídos do suporte são formados. Quando esses alinhamentos têm a direção correta, a subsequente ligação química será muito rápida e irreversível.

Para iniciar a imobilização da PGA em sílica foi necessário lavar a sílica oxidada com tampão bicarbonato 500 mM, pH 10,5 e em seguida com tampão bicarbonato 100 mM, pH 10. Este procedimento não foi necessário para o suporte gel de agarose. Ele foi colocado diretamente para reagir com a enzima pelo procedimento que se segue.

Em separado, preparou-se uma solução de ácido fenilacético, 100mM, em tampão bicarbonato pH 10. O sítio ativo da enzima com ácido fenilacético adsorvido ficou protegido de alterações em sua estrutura tridimensional, preservando sua atividade catalítica durante o processo de imobilização. Deve-se primeiro preparar o ácido fenilacético e depois elevar o pH para 10. Em seguida, adicionou-se o bicarbonato, sempre monitorando o pH para ele não baixar, pois poderia haver formação de ácido carbônico e liberação de CO<sub>2</sub>. A essa solução adicionou-se a de enzima na quantidade desejada. Nessa solução resultante adicionou-se o suporte – sílica úmida na razão de 20 mL de solução total por grama de sílica seca ou 1 mL de gel de agarose para 10 mL de solução total (tampão bicarbonato com fenilacético + solução de enzima).

Deixou-se reagir por 3 horas em temperatura aproximadamente de 20 °C. Os grupos aldeídos do suporte reagiram com os grupos amino formando bases de Schiff. Essa reação é rápida, porém reversível. Dessa forma muitos enlaces enzima-suporte podem ser formados rapidamente, porém a reversibilidade faz com que ligações que provoquem grandes distorções na enzima sejam termodinamicamente desfavoráveis e se desfaçam. Depois das 3 horas de reação, tempo suficiente para que todos os enlaces fossem formados, a reação foi terminada com adição do agente redutor suave borohidreto de sódio, na razão de 1 mg por mL de solução de imobilização. Para 1 mL de solução total usou-se 1mg de borohidreto de sódio, durante 30 minutos. Ao final da imobilização, lavou-se o derivado com tampão fosfato 5 mM, pH 7 anteriormente preparado, e em seguida com bastante água destilada para tirar o excesso de borohidreto. O derivado foi armazenado em solução 3 % p/v de azida sódica.

A mistura reacional foi mantida sob agitação lenta. Assim que se colocou a enzima na solução, marcou-se o tempo e retirou-se a primeira amostra do sobrenadante. Depois de trinta minutos retirou-se outra amostra para verificar se toda enzima já estava imobilizada. A imobilização foi acompanhada pela queda de atividade enzimática do sobrenadante, até esta ser zerada. Geralmente, deixa-se agitando por um tempo total de 3 horas para aumentar o número de enlaces. As amostras foram analisadas pelo método PDAB, que mede a atividade da enzima. Em paralelo ao processo de imobilização, fez-se um branco, que foi preparado substituindo o suporte ativado por suporte não ativado no processo descrito anteriormente <sup>81</sup>.

### 3.4 MÉTODO PDAB PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PGA

Este método determina a atividade amidase da penicilina G acilase utilizando o reagente p-dimetilamino benzaldeído (PDAB). Baseia-se na formação de base de Schiff pela reação do 6-APA com PDAB <sup>5</sup>. O ácido 6-amino-penicilânico (6-APA) produzido na reação de hidrólise da penicilina G, reage com o PDAB, gerando um produto colorido que é acompanhado em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 415 nm.

A hidrólise da penicilina G foi realizada a 37 °C, em reator encamisado. Colocaram-se 5 mL de solução de PG 5 % (p/v) em tampão fosfato 10 mM pH 8. Adicionou-se 1 mL da solução com enzima sob agitação. Tiraram-se amostras de 0,5 mL em diferentes tempos de reação. Essas amostras foram colocadas em cubetas que já continham solução de PDAB, deixadas para reagir por 2,5 minutos. Leu-se a absorbância de todas as amostras. A concentração de 6-APA foi obtida por comparação do resultado com curva de calibração previamente preparada. Construiu-se o gráfico de concentração versus tempo, e a tangente da curva foi usada para o cálculo da atividade enzimática.

$$\text{Atividade} = \frac{(\mu\text{g/mL}_{\text{sol}} \cdot \text{min}) * \text{vol}_{\text{sol}} (\text{mL}) / m_{\text{derivado}} (\text{g})}{\text{PM}_{6\text{-APA}}} = \text{UI/g}_{\text{derivado}}$$

O reagente PDAB é composto por:

- 0,5 mL de PDAB 0,5 % p/v em metanol,

- 2,0 mL de ácido acético 20 % v/v e
- 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio 0,05 M.

Para determinar a atividade dos derivados, utilizou-se a diferença entre as atividades enzimáticas do sobrenadante antes e depois da imobilização. Uma UI (unidade internacional) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de penicilina G por minuto em pH 8 e 37 °C.

### 3.5 ENSAIOS DE SÍNTESE

#### 3.5.1 Materiais e Equipamentos

##### *Materiais*

- Éster metílico de fenilglicina (EMFG) da Aldrich Chemical Company; ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) da Winlab, fosfato de sódio e hidróxido de sódio. Todos os outros reagentes usados eram de grau analítico de diferentes marcas.
- Reagentes HPLC: Acetonitrila, SDS (Lauril sulfato de sódio),  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , água mili-Q. Todos os reagentes utilizados no preparo das fases móveis eram de grau HPLC.

##### *Equipamentos*

- Reator de vidro com camisa de água;
- Agitador mecânico, marca LabMaster, modelo Lightnin L1U08;
- Agitador magnético;
- pHmetro, marca Orion modelo 410;
- Bomba peristáltica, marca MASTERFLEX L/S, Cole-Parmer, modelo 7523-40;
- Banho termostático, marca BROOKFIELD, modelo EX – 200;
- Cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC), marca Shimadzu;
- Coluna para HPLC Nova-Pak, C18, 60  $\text{\AA}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 3,9  $\times$  150 mm da Waters.

### 3.5.2 – Procedimento para as Sínteses em Reator de Mistura

Os experimentos foram realizados em batelada usando reator de vidro sob agitação mecânica. Nos ensaios a 25 °C, a temperatura foi mantida por banho termostático e os ensaios a 4 °C foram realizados em câmara fria. O reator encamisado tinha um volume total de 50 mL. Em todas as sínteses, usaram-se 2 mL de derivado. O pH foi monitorado usando pHmetro e se gotejava solução de hidróxido de sódio periodicamente para manter o pH constante. Amostras foram coletadas usando pipetas automáticas (ver detalhe na Figura 3.7) com filtro na ponta para não se coletar o gel de agarose contendo enzima imobilizada, em tempos pré-determinados. A Figura 3.8 mostra o sistema operacional usado nos ensaios. As concentrações de EMFG, ampicilina, 6-APA e fenilglicina (reagentes e produtos da síntese) foram determinadas conforme o item 3.5.4. A amostragem foi realizada periodicamente para monitorar o curso da reação. Retiravam-se 25  $\mu$ L de amostra do vaso e se analisavam as concentrações dos componentes. As concentrações de EMFG, 6-APA, ampicilina e FG foram obtidas utilizando HPLC. As regiões nessas sínteses que apresentavam efeito de resistência à transferência de massa externa e interna que foram estudadas anteriormente<sup>50,51</sup>. A Figura 3.9 mostra o esquema experimental utilizado no reator em vórtices com precipitação do produto separado por uma peneira na base do reator.



Figura 3.7: Detalhe da síntese no momento da retirada de amostra com filtro na ponta da pipeta.<sup>75</sup>

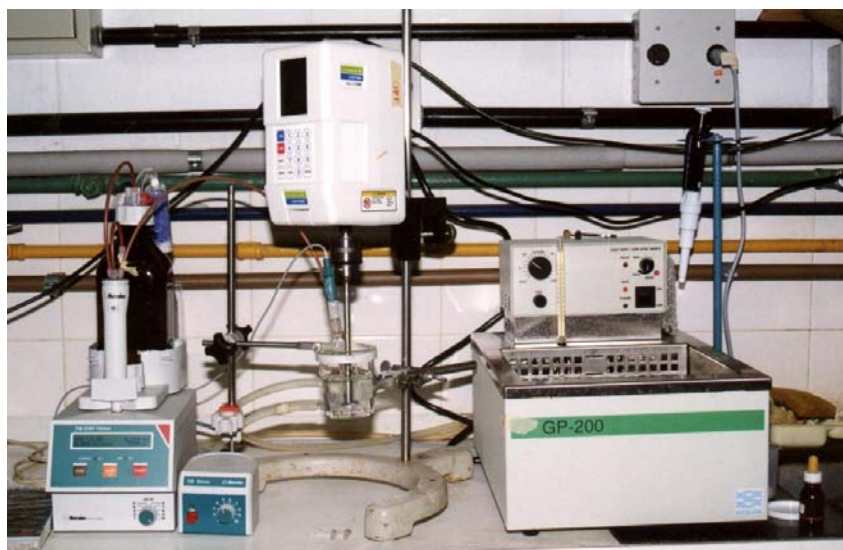


Figura 3.8: Equipamento utilizado em todos os ensaios a 25°C. <sup>75</sup>

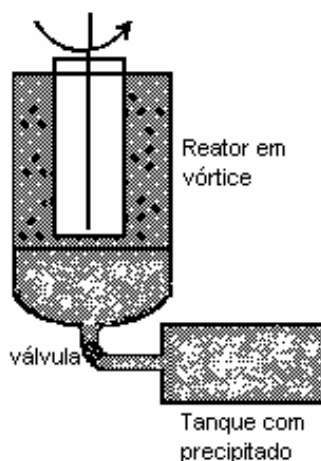


Figura 3.9: Esquema experimental do reator para síntese de ampicilina catalisada por PGA.

### 3.5.3 – Procedimento para as Sínteses em Reator de Leito Fixo

Esses ensaios foram realizados em reator com 50 mL de solução reacional. A síntese de ampicilina foi realizada utilizando-se o sistema com recirculação com reator de leito fixo. A Figura 2.14 mostra um esquema do sistema reacional. O reator tinha 10 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro. Uma determinada quantidade do derivado (PGA imobilizada em sílica) foi posta em contato com tampão fosfato 5 mM pH 6,5 e se deixou o leito de sílica ser compactado. Batia-se levemente e, seguidas vezes, nas paredes do reator com uma mangueira de silicone para ajudar a compactação. Esperaram-se alguns minutos para que o sistema encamisado ficasse na temperatura de 25 °C. Em seguida, retirou-se esse tampão do leito. Em paralelo preparou-se a solução

reagente na temperatura de 25 °C. Quando todo o sistema entrou em equilíbrio térmico, ajustou-se o pH para 6,5 e se iniciou a reação ligando-se a bomba peristáltica para circulação da solução reagente. Purgou-se o ar do sistema aumentando-se a vazão de recirculação do sistema por alguns segundos e inclinando o reator para a eliminação das bolhas de ar.

Antes de se realizar sínteses enzimáticas de ampicilina no reator de leito fixo, investigaram-se as regiões que apresentavam efeitos de resistência à transferência de massa externa. Correlações da literatura podem ser empregadas para estimar o coeficiente do filme. Para fazer o cálculo do coeficiente foi necessário medir a densidade da sílica usada. Para isso, utilizou-se um picnômetro e pela massa de água deslocada e sua densidade, obteve-se uma densidade de sílica de 1,25 g/mL. A correlação de Frossling para  $Re < 50$ <sup>59</sup> é:

$$S_h = \frac{k_c d_p}{D_{AB}} = 2 + 0,6 \cdot Re^{1/2} \cdot Sc^{1/3} \quad (3.1)$$

$$Re = \frac{\rho \cdot d_p \cdot U}{\mu} = \frac{d_p \cdot U}{\nu} \quad (3.2)$$

$$Sc = \frac{\nu}{D_{AB}} \quad (3.3)$$

em que:

$k_c$  é o coeficiente de transferência de massa, m/s;

$U$  é a velocidade superficial, m/s;

$\rho$  é a densidade do fluido, kg/m<sup>3</sup>;

$d_p$  é o diâmetro da partícula, m;

$\nu$  é a viscosidade cinemática, m<sup>2</sup>/s;

$D_{AB}$  é a difusividade molecular, m<sup>2</sup>/s;

$Sc$  é o número de Schmidt;

$Sh$  é o número de Sherwood;

$Re$  é o número de Reynolds.

A velocidade superficial usada no reator foi de 35,9 cm/min. Nos ensaios iniciais no reator de leito fixo usou-se concentração inicial de reagente tal que o sistema operasse homoganeamente, sem gradientes. As concentrações dos reagentes não ultrapassaram os 50 mM, assim, não houve precipitação dos



produtos. As condições operacionais dos experimentos usando sílica como suporte foram selecionadas de acordo com o planejamento fatorial realizado para os ensaios com gel de agarose como suporte de imobilização da PGA.

### 3.5.4 Método Analítico

As concentrações de EMFG, ampicilina, 6-APA e FG foram determinadas usando HPLC. A fase móvel aqui apresentada foi implementada no início deste trabalho (ver apêndice A).

- Temperatura de 25 °C;
- Vazão de 1,0 ml/min;
- Comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 225 nm;
- Fase móvel: 35 % de acetonitrila (v/v), 5 mM de SDS, 0,01 M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,005 M de K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- Tempo de retenção das amostras é de aproximadamente 15 min.

### 3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Esta seção tem por objetivo descrever o método do planejamento experimental utilizado.<sup>7,128</sup> Planejamentos fatoriais são extremamente úteis para medir os efeitos (ou influências) de uma ou mais variáveis na resposta de um processo. O planejamento fatorial é uma maneira de prever interações entre fatores. A representação de um planejamento fatorial em dois níveis é  $2^k$ , onde 2 significa o número de níveis e  $k$  o número de fatores. Esse tipo de planejamento é particularmente útil nos estágios iniciais de um trabalho experimental, quando há muitas variáveis a investigar.

Realizou-se a síntese enzimática de ampicilina de acordo com a proposta de um planejamento experimental, cujos fatores operacionais foram temperatura, pH, força iônica do meio, solvente orgânico e concentração do reagente 6-APA, com o objetivo de verificar sua influência sobre o rendimento, seletividade e produtividade da síntese de antibiótico. A partir da literatura, definiram-se níveis (valores) para as variáveis estudadas no planejamento fatorial  $2^5$ . A Tabela 3.1 mostra valores estabelecidos para esses níveis.

Para executar o planejamento fatorial completo é necessário realizar ensaios para todas as combinações possíveis entre os níveis de cada fator analisado (Tabela 3.1). Essas combinações são mais bem descritas em uma matriz de planejamento, em que os níveis são representados por sinais algébricos, (+) para os níveis superiores e (-) para os níveis inferiores. Como exemplo mostramos na Tabela 3.2 os primeiros ensaios realizados.

O cálculo dos efeitos foi realizado com o auxílio de dois programas computacionais desenvolvidos por Barros Neto, Scarminio e Bruns, 1995 <sup>7</sup>.

ENTRADA: banco de dados de entrada, necessários para a estimativa dos efeitos através do programa computacional FATORIAL.

FATORIAL: estimativa dos efeitos correspondentes aos fatores temperatura, pH, metanol, tampão, concentração de 6-APA.

O estudo dos efeitos, pela verificação da significância dos fatores, foi realizado através da análise do desvio padrão de cada efeito, empregando o teste *t* com 95 % de confiança. A existência de interação significativa indica que os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente.

Tabela 3.1: Variáveis operacionais e seus respectivos níveis.

Nº	Fator	Nível	
		-	+
1	T (°C)	4	25
2	pH	6,5	7,5
3	metanol	sem	com (500 mM)
4	tampão	sem	com (50 mM)
5	6-APA (mM)	10	50

OBS.: O metanol e o tampão fosfato são fatores qualitativos, em que (com) indica que a síntese foi realizada na sua presença, na concentração indicada. EMFG com 50mM em todas as sínteses.

Tabela 3.2: Matriz de planejamento com os coeficientes de contraste

Nº do ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5
5	-	-	-	-	+
13	+	-	-	-	-
12	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	+
11	-	-	+	-	-
3	+	-	+	-	+
6	-	+	+	-	+
14	+	+	+	-	-
10	-	-	-	+	-
2	+	-	-	+	+
7	-	+	-	+	+
15	+	+	-	+	-
8	-	-	+	+	+
16	+	-	+	+	-
9	-	+	+	+	-
1	+	+	+	+	+

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este trabalho foi executado de acordo com as seguintes etapas: inicialmente imobilizou-se a enzima no suporte gel de agarose; com esse catalisador, realizou-se um planejamento experimental da síntese de ampicilina para determinação de condições operacionais que favorecessem a produção do antibiótico. Como seriam comparados dois suportes para imobilização da PGA, estudou-se a imobilização em sílica; em seguida, utilizou-se este catalisador em um reator de leito fixo, realizando-se sínteses de ampicilina. Ensaio cinéticos de síntese de ampicilina foram realizados em ampla faixa de concentrações para preencher um adequado domínio de treinamento da rede neural. Após o treinamento, utilizou-se um modelo híbrido (rede neural e balanços de massa) para prever as velocidades de reação envolvidas na síntese enzimática. Durante os ensaios que determinaram o domínio de treinamento da rede neural ocorreu a precipitação do antibiótico, resultado muito interessante para a melhora do rendimento do processo. Assim, novos ensaios foram realizados para definição de estratégias de operação do reator. Após esses ensaios houve a necessidade de desenvolvimento de um novo tipo de biocatalisador, que suportasse a precipitação do produto em longas jornadas. Com esse novo biocatalisador em reator integrado de escoamento em vórtices conseguiu-se produzir o antibiótico de maneira eficiente. Esse conjunto biocatalisador-bioreator foi inscrito para patenteamento nacional e internacional<sup>64</sup>. Os procedimentos para a síntese de ampicilina nos diferentes reatores seguiram de modo geral os procedimentos da seção 3.5; modificações na maneira de operá-los ou na forma de amostragem, citou-se dentro das seções. Apresentam-se a seguir os resultados obtidos.

### 4.1 RESULTADOS DA IMOBILIZAÇÃO EM AGAROSE

Após ativação do gel de agarose (item 3.2.1), iniciou-se sua oxidação. Seguindo a metodologia do item 3.2.5, mediu-se a quantidade de grupos aldeídos do suporte. Esse gel oxidado alcançou uma concentração de  $180 \mu\text{mol}_{\text{CHO}}/\text{g}_{\text{gel}}$ . Uma concentração de grupos aldeídos em torno desse valor foi estipulada pela literatura como a necessária para obtenção de 100 % de rendimento na

imobilização do gel de agarose <sup>48,81</sup>. A partir desse suporte oxidado, realizaram-se todas as imobilizações em gel de agarose.

A atividade da solução de PGA liofilizada e purificada foi medida e era de 256 UI/mL<sub>sol</sub> (solução de enzima produzida e doada por Antibióticos S.A.). A partir dessa solução de enzima obtiveram-se todos os derivados com as diferentes cargas enzimáticas usadas neste trabalho. Na Tabela 4.1, pode-se observar os valores de atividade no sobrenadante ao longo das imobilizações. Esse derivado (enzima + suporte) tinha uma carga enzimática de 45 UI/g<sub>gel</sub>. Essa carga não apresenta atrasos de transporte de massa intra e extrapartícula, condições já pré determinadas pela literatura <sup>51</sup>. O tempo necessário para ocorrer toda imobilização da carga enzimática oferecida foi satisfatório, já que com 1,5 hora de imobilização praticamente toda enzima estava imobilizada; deixou-se o sistema reagindo por mais tempo para aumentar os enlaces e assim, aumentar a estabilização das ligações covalentes entre suporte e enzima.

Tabela 4.1: Atividade enzimática do sobrenadante na imobilização de PGA

Tempo de imobilização (h)	Atividade do sobrenadante (UI)
0,0	45,65
0,5	14,14
1,5	0,32
2,0	0,23
3,0	0,00

Após a imobilização, mediu-se a atividade do derivado para confirmar sua carga enzimática. Após a finalização de cada ensaio também se mediu a atividade do derivado e não se observou nenhuma perda de atividade. A atividade medida pós-imobilização, segundo o item 3.4, foi de 45 UI/g<sub>gel</sub>. Essa carga enzimática garantiu a ausência de atrasos difusionais intrapartícula <sup>51</sup> e, além disso, permitiu uma boa velocidade de reação dentro do volume de reator utilizado. Com esse derivado foram realizados os ensaios de síntese em que se investigou a cinética reacional. Periodicamente a atividade desse derivado foi testada, e se manteve constante ao longo de três anos de utilização.

## 4.2 RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA SÍNTESE DE AMPICILINA

As variáveis que influenciam o desempenho da síntese enzimática de ampicilina são muitas (item 2.5), entretanto nem todas exercem uma forte influência. Assim, com o objetivo de encontrar as condições operacionais que simultaneamente melhorassem rendimento, produtividade e seletividade da reação, realizou-se um planejamento fatorial.<sup>7,128</sup> A síntese cineticamente controlada de ampicilina foi realizada a partir de éster metílico de fenilglicina (EMFG) e do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). As condições experimentais que eliminam os problemas de transferência de massa foram anteriormente investigadas (velocidade de agitação, carga enzimática abaixo de 90 UI/g<sub>gel</sub>).<sup>51</sup> Os ensaios utilizaram penicilina G acilase imobilizada em gel de agarose com carga enzimática de 45 UI/g<sub>gel</sub>. Os ensaios foram realizados em dois níveis: (-1) e (+1): temperaturas de 4 °C e 25 °C; pH de 6,5 e 7,5; tampão fosfato, 0 (zero) e 50 mM; metanol, 0 (zero) e 500 mM; 6-APA, 10 e 50 mM. A concentração de EMFG foi mantida em 50 mM.

### 4.2.1 Rendimento de Síntese com Relação à Concentração Inicial de 6-APA

$$R_{6-APA} = \frac{C_{amp}^{max}}{C_{6-APA}^{inicial}} \quad (4.1)$$

O rendimento de síntese com relação à concentração inicial de 6-APA, neste trabalho, foi definido pela equação 4.1. Note-se que esta é uma definição diferente de rendimento – agora em relação à concentração inicial de 6-APA, que é o substrato de maior custo. As variáveis do planejamento experimental são fatores que afetam a quantidade de antibiótico produzido durante a reação de síntese e seus resultados são mostrados na Tabela 4.2. Esses resultados foram utilizados para o cálculo das estimativas dos efeitos de cada variável, ou seja, da importância que os fatores têm sob cada ensaio.

Os resultados dos efeitos de cada variável se encontram na Tabela 4.3. Lembrando que os experimentos foram realizados de maneira aleatória, os gráficos de probabilidade normal dos resíduos estão no Apêndice E. As letras **A**, **B**, **C**, **D** e **E** representam os efeitos principais isoladamente, ou seja, temperatura,

pH, metanol, tampão fosfato e concentração inicial de 6-APA respectivamente. As letras **AB**, por exemplo, indicam a interação de dois efeitos, temperatura e pH. **ABC** indica a interação de três efeitos.

Tabela 4.2: Resultados de um planejamento fatorial  $2^5$  tendo como resposta o rendimento de síntese com relação à concentração inicial de 6-APA.

Ensaio	A T	B pH	C Metanol	D Tampão	E C <sub>6-APA</sub>	R <sub>6-APA</sub> (%)
01	+	+	+	+	+	10,46
02	+	-	-	+	+	31,61
03	+	-	+	-	+	24,67
04	+	+	-	-	+	15,00
05	-	-	-	-	+	<b>41,06</b>
06	-	+	+	-	+	20,20
07	-	+	-	+	+	32,37
08	-	-	+	+	+	32,40
09	-	+	+	+	-	<b>49,99</b>
10	-	-	-	+	-	<b>42,62</b>
11	-	-	+	-	-	<b>50,34</b>
12	-	+	-	-	-	18,86
13	+	-	-	-	-	29,67
14	+	+	+	-	-	15,18
15	+	+	-	+	-	13,06
16	+	-	+	+	-	27,91
17	-	+	-	-	+	17,02
18	+	-	-	+	-	36,23
19	+	-	+	+	+	22,52
20	-	+	-	+	-	24,46
21	+	-	+	-	-	33,84
22	-	+	+	-	-	<b>44,54</b>
23	-	+	+	+	+	10,39
24	+	-	-	-	+	<b>41,41</b>
25	+	+	+	-	+	25,29
26	-	-	-	-	-	<b>56,92</b>
27	-	-	-	+	+	<b>46,62</b>
28	+	+	-	+	+	11,21
29	-	-	+	-	+	<b>36,52</b>
30	+	+	-	-	-	16,59
31	+	+	+	+	-	15,48
32	-	-	+	+	-	<b>55,42</b>

Dos dez melhores rendimentos de síntese obtidos (ver Tabela 4.2), oito ocorreram quando se trabalhou na menor temperatura. As sínteses ocorridas em pH 6,5 também favoreceram a melhora do rendimento. Independente do pH do meio, a temperatura mais baixa melhorou o rendimento (ensaios 7, 11, 22, 27 e 32). Já uma concentração menor de 6-APA (10 mM) fez o rendimento aumentar, condição em que se trabalhou com um excesso de EMFG (50 mM). Isso indica uma região em que a concentração de 6-APA pode inibir ou ativar a síntese. Esse efeito de inibição/ativação do 6-APA já havia sido observado para a síntese enzimática de amoxicilina.<sup>73</sup> Quando a temperatura estava baixa, uma concentração baixa de 6-APA melhorou o rendimento de reação (ensaios 9, 10, 11, 22, 26 e 32) independente da presença de metanol ou tampão no meio reacional. Numa temperatura mais baixa as reações ocorrem lentamente, mais 6-APA consegue se adsorver ao sítio ativo da enzima independente de sua concentração no meio, o que favorece a reação de síntese do antibiótico. Todas essas hipóteses são confirmadas ao se observar a Tabela 4.3, cujos efeitos da temperatura, pH e concentração de 6-APA (-13,10; -16,85 e -7,02) são os mais significativos.

Solventes orgânicos no meio reacional mudam as constantes de dissociação, i.e., aumentam os valores dos pKs dos grupos carboxílicos e diminuem a concentração de água do meio; ambos efeitos desfavorecem as reações de hidrólise. Portanto, a presença de metanol, em alta concentração, em princípio, deveria aumentar o rendimento de síntese. Porém nas concentrações de reagentes aqui estudadas, mesmo a 4 °C, não se observou melhora significativa no rendimento. Em todos os ensaios, usou-se 500 mM de metanol (região de ativação do solvente, como citada pela literatura, ver item 2.5.3) para uma concentração máxima de reagentes de 50 mM. Quanto a presença de tampão fosfato, ela só ajudou na melhora do rendimento quando se trabalhou com temperatura de 4 °C, pH 7,5 (ensaios 7, 9 e 20). Trabalhando-se com 6-APA a 10 mM, a presença de uma maior concentração iônica inibiu sua adsorção, não ajudando a formação do antibiótico, pois o rendimento tende a cair nessa condição.

O número de fatores que foi analisado (cinco), resulta em um modelo matemático com trinta e dois termos, incluindo interações com até cinco termos.



A Tabela 4.3 mostra claramente que alguns efeitos são mais significativos que outros. Assim, os valores determinados para esses fatores menos significativos podem ser atribuídos às flutuações aleatórias do processo, isto é, ao “ruído” embutido nos valores das respostas (princípio da esparsidade dos efeitos) <sup>128</sup>. Quando o número de fatores é moderadamente grande, como 4 ou 5, uma prática comum é correr somente uma réplica do planejamento. Um método simples de análise deste planejamento é a construção de gráficos das estimativas dos efeitos em uma escala de probabilidade normal. Os efeitos que forem desprezados são normalmente distribuídos, com média zero e tenderão a cair ao longo de uma linha reta desse gráfico <sup>7</sup>.

Tabela 4.3: Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^5$  tendo como resposta o rendimento de síntese com relação à concentração inicial de 6-APA.

Média	29,68		
Efeitos principais:			
(Temperatura) <b>A</b>	-13,10		
(pH) <b>B</b>	-16,85		
(metanol) <b>C</b>	0,03		
(tampão) <b>D</b>	-1,52		
(conc. 6-APA) <b>E</b>	-7,02		
Interações de dois fatores:			
<b>AB</b>	1,16	<b>AC</b>	-2,46
<b>AD</b>	-2,62	<b>AE</b>	6,30
<b>BC</b>	5,34	<b>BD</b>	0,86
<b>BE</b>	$-5,0 \times 10^{-3}$	<b>CD</b>	-1,73
<b>CE</b>	-6,76	<b>DE</b>	-1,43
Interações de três fatores:			
<b>ABC</b>	-0,28	<b>ABD</b>	-2,18
<b>ABE</b>	1,14	<b>ACD</b>	0,22
<b>ACE</b>	5,12	<b>ADE</b>	-2,07
<b>BCD</b>	-2,34	<b>BCE</b>	-0,93
<b>BDE</b>	-1,19	<b>CDE</b>	-3,05
Interações de quatro fatores:			
<b>ABCD</b>	2,04	<b>ABCE</b>	4,70

<b>ABDE</b>	0,84	<b>ACDE</b>	3,71
<b>BCDE</b>	-1,94		
Interação de cinco fatores:			
<b>ABCDE</b>	-2,44		

Para poder distinguir o que é realmente efeito do que é apenas ruído nos resultados do planejamento, fez-se a análise por meio do gráfico de probabilidade normal. Já que os experimentos não foram repetidos, admitiu-se que os efeitos significativos representavam satisfatoriamente a resposta e os demais efeitos foram usados para obter uma estimativa do erro experimental nos valores dos efeitos. Observando a Figura 4.1, vê-se que os pontos se ajustam razoavelmente a uma reta cuja interseção com a probabilidade acumulada de 50 % ocorre praticamente sobre o ponto zero do eixo das abscissas. Assim, consideraram-se esses pontos vindos de uma população normal de média zero, ou seja, esses pontos representam “efeitos” sem qualquer significado físico.

Quanto mais afastados da região central, mais significativos são os efeitos. Desse modo, desprezaram-se os efeitos **AB, C, AC, ABC, D, AD, BD, ABD, CD, ACD, BCD, ABCD, BE, ABE, BCE, DE, ADE, BDE, ABDE, CDE, BCDE, e ABCDE**. Estes efeitos são atribuídos ao ruído embutido nos valores das respostas e foram usados para obter uma estimativa do erro experimental nos valores dos efeitos. Elevando cada um deles ao quadrado obteve-se uma estimativa da variância (e, em seguida do desvio padrão) de um efeito com vinte e dois graus de liberdade, pois eles são valores independentes. A Tabela 4.4 mostra os efeitos considerados com seus desvios padrão.

As Tabelas 4.4 e 4.5 reúnem os resultados da análise dos dados da Tabela 4.3. O rendimento médio global do rendimento de síntese com relação ao 6-APA é de 29,7 %. Os efeitos principais devem ser analisados conjuntamente, pois os efeitos de interação são significativos, por exemplo, o efeito CE, a presença de metanol associada à concentração de 6-APA é significativa. O metanol dificulta a adsorção do 6-APA ao sítio ativo da enzima <sup>135</sup> (ver Fig. 2.12), desfavorecendo a formação do antibiótico. Fez-se uma análise das respostas para os dois principais efeitos (temperatura e pH).

Tabela 4.5: Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^5$  da Tabela 4.3 e seus desvios padrão, rendimento com relação ao 6-APA inicial.

Efeitos principais:			
(Temperatura) <b>A</b>	-13,10	$\pm 0,36$	
(pH) <b>B</b>	-16,85	$\pm 0,36$	
(conc. 6-APA) <b>E</b>	-7,02	$\pm 0,36$	
Interações de dois fatores:			
<b>AE</b>	6,30	$\pm 0,36$	<b>BC</b> 5,34 $\pm 0,36$
<b>CE</b>	-6,76	$\pm 0,36$	
Interações de três fatores:			
<b>ACE</b>	5,12	$\pm 0,36$	
Interações de quatro fatores:			
<b>ABCE</b>	4,70	$\pm 0,36$	<b>ACDE</b> 3,71 $\pm 0,36$

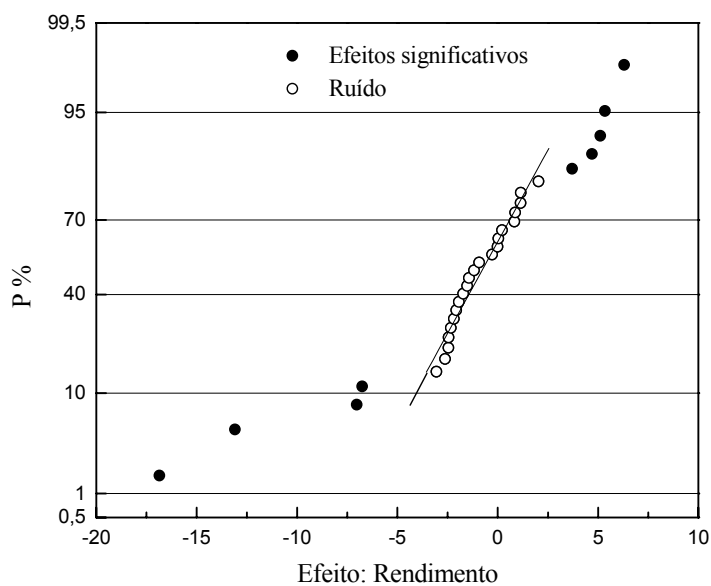


Figura 4.1: Gráfico de probabilidade cumulativa dos efeitos de rendimento de síntese. Efeitos significativos: • e, efeitos desprezados: o.

Primeiro manteve-se todas as outras variáveis no seu nível inferior (ver diagrama 1 da Figura 4.2), ou seja, analisou-se os quatro ensaios em que não foi adicionado metanol, tampão fosfato e a concentração de 6-APA era de 10 mM.

Pode-se concluir que a queda na temperatura aumenta o rendimento de síntese, e que esse efeito é muito mais pronunciado quando o pH é menor, ou seja, 6,5 (27 % contra 2,3 %). A elevação do pH diminui o rendimento da reação, e esse efeito é mais pronunciado a 4 °C (38 % contra 13 %). O maior rendimento é obtido mantendo-se a temperatura a 4 °C e pH a 6,5, como já sabíamos (dados de literatura) para outros antibióticos e para a própria ampicilina.

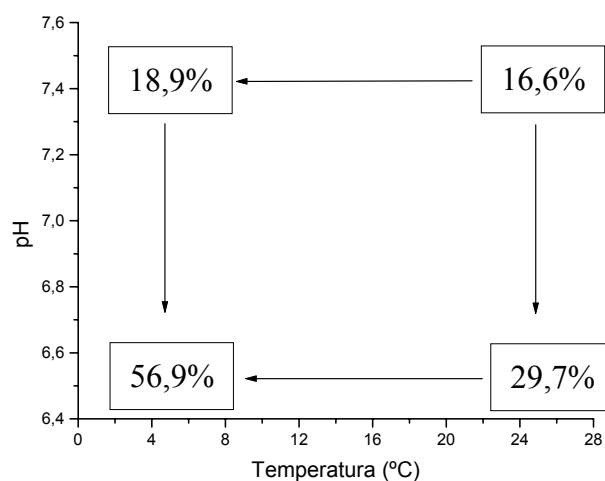
Analisando o diagrama 2 (Figura 4.2, adicionou-se metanol ao meio reacional) vê-se que as respostas aos fatores **A** e **B**, ou seja, temperatura e pH, seguem a mesma tendência que a observada no diagrama 1. O maior rendimento de síntese foi observado quando se realizaram os ensaios a 4 °C e pH 6,5. Porém o rendimento obtido no pH 7,5 e temperatura de 4 °C foi bem maior com a adição de metanol no meio reacional (44 %) do que aquele observado sem a adição do solvente (19 %). A presença de metanol só influenciou uma melhora de rendimento quando se trabalhou num pH desfavorável (7,5) e numa temperatura favorável (4 °C) à síntese.

Analisando temperatura e pH quando se adicionou só tampão fosfato ao meio reacional, ou seja, tendo os fatores C = (-), D = (+) e E = (-), os rendimentos seguiram a mesma tendência da observada no diagrama 1 (Fig. 4.3); foi maior a 4 °C e pH 6,5 (42,6 %, ensaio 10), caiu quando se aumentou a temperatura (36,2 %, ensaio 18) e também caiu quando se aumentou o pH (13,1 % – ensaio 15 e 24,5 % – ensaio 20). Os rendimentos obtidos com a adição de tampão fosfato foram menores que os obtidos sem sua adição. Porém houve um pequeno aumento do rendimento nas sínteses realizadas com tampão fosfato quando se trabalhou a 25 °C, pH 6,5 (36,2 %), comparado ao rendimento obtido no ensaio realizado na ausência de tampão (29,7 %, diagrama 1).

Analisando temperatura e pH quando a concentração de 6-APA passou para 50 mM, ou seja, fatores C = (-), D = (-) e E = (+), o rendimento de síntese com relação a temperatura e pH continuou seguindo a mesma tendência que a observada no diagrama 1 (ver Fig. 4.3), porém o rendimento de síntese a 25 °C e pH 6,5 cresceu, passou para 41 % contra os 30 % visto no diagrama 1. A presença de interações de dois e três fatores (Tabela 4.5) mostra que a temperatura, a concentração de 6-APA e o pH não podem ser analisados separadamente. O

diagrama 1 mostra que o efeito do pH é mais importante a 4 °C e que com a concentração de 6-APA alta, os efeitos da temperatura e pH não são significativos [ensaios (24 e 05) e (04 e 17)]. Isso sugere que o pH deve ser sempre mantido baixo e que quando trabalhando em concentrações altas de 6-APA, o sistema reacional não precisa ser refrigerado para aumentar o rendimento de síntese, ou seja, 6-APA em concentração baixa é mais sensível a variação de temperatura e pH do que 6-APA em concentração alta.

**Diagrama 1:** fatores **C = (-)**, **D = (-)** e **E = (-)**



**Diagrama 2:** fatores **C = (+)**, **D = (-)** e **E = (-)**

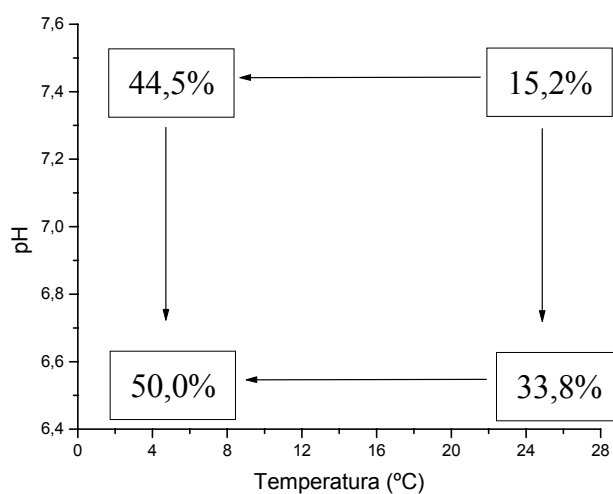


Figura 4.2: Diagramas para interpretação dos resultados do planejamento fatorial.

As comparações realizadas para as outras variações dos fatores **C**, **D** e **E** novamente seguiram a mesma tendência de se ter o melhor rendimento a 4 °C e pH 6,5. Os resultados do modelo aproximado com as estimativas das respostas e os correspondentes resíduos estão relacionados no apêndice E. O modelo aproximado para todas as respostas analisadas foi considerado satisfatório, pois os gráficos dos resíduos contra as respostas têm uma aparência aleatória e os gráficos normais dos resíduos têm uma aparência mais ou menos retilínea. A seguir, pode-se ver o gráfico do ensaio que obteve maior rendimento de síntese, 56,9 % (Figura 4.3).

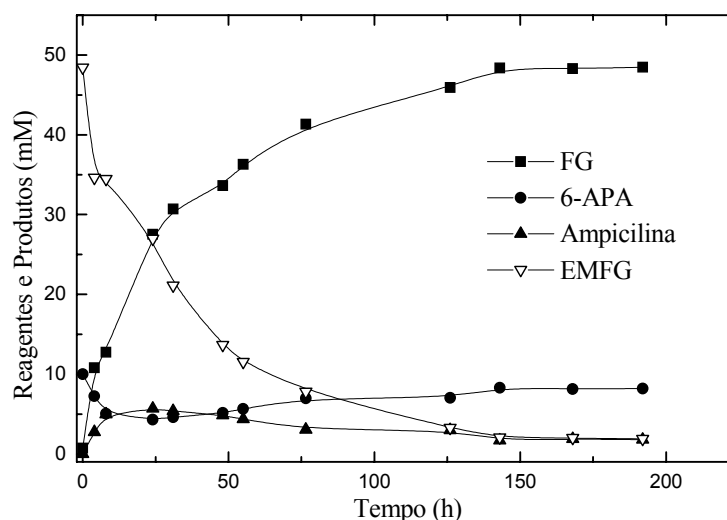


Figura 4.3: Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 4°C, pH 6,5,  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA = 10mM,  $C_{\text{inicial}}$  de EMFG = 50mM sem adição de metanol e tampão fosfato.

#### 4.2.2 Produtividade da Síntese de Ampicilina

$$Pr\ odutividade = \frac{C_{amp}^{\max}}{t_{\max}} \quad (4.2)$$

Neste trabalho, a produtividade da síntese de ampicilina foi definida pela equação 4.2, sendo  $C_{amp}^{\max}$  a concentração máxima de ampicilina atingida em um determinado ensaio e  $t_{\max}$  o tempo em que se atinge a concentração máxima de ampicilina no ensaio. A Figura 4.4 mostra o gráfico de interação pH e concentração inicial de 6-APA. Pode-se observar que as linhas não são paralelas,

isso mostra que os efeitos de interação não podem ser desprezados, ou seja, o pH não pode ser analisado separadamente da concentração inicial de 6-APA. O mesmo se observa na Figura 4.5 para a presença de tampão fosfato no meio reacional. No pH 6,5 a produtividade cai na presença de tampão, mas aumenta quando o pH é 7,5. O efeito do pH na produtividade é mais significativo quando não há presença de tampão no meio reacional. Todos valores dos efeitos podem ser observados na Tabela 4.7 que mostra todas as interações para a produtividade da síntese de ampicilina.

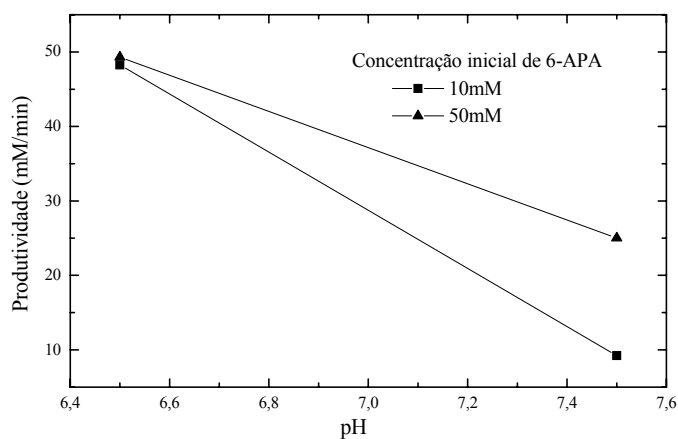


Figura 4.4: Gráfico de interação pH e concentração inicial de 6-APA para produtividade.

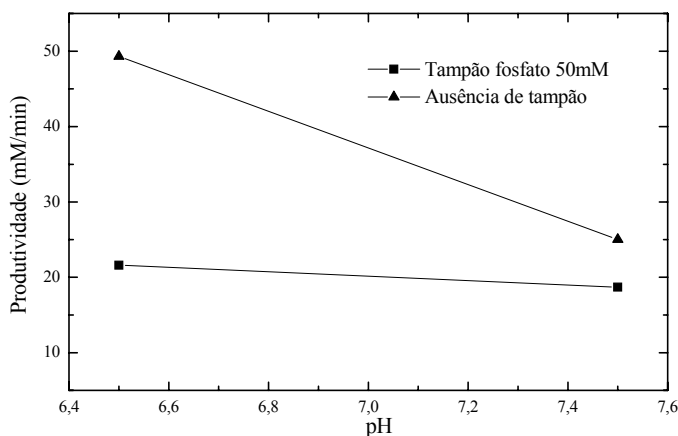


Figura 4.5: Gráfico de interação pH e tampão fosfato para produtividade.

A Tabela 4.6 mostra os resultados obtidos do planejamento para a produtividade. As maiores produtividades de síntese ocorreram quando se trabalhou a pH 6,5 (ensaios 13 – 30, 24 – 04, 26 – 12 e 05 – 17) e, como era de se esperar, na temperatura de 25 °C (rendimento de  $49,3 \times 10^{-3}$  mM/min). Em temperaturas maiores, as velocidades de reação são maiores, e por isso a 25 °C obteve-se produtividade maior. As maiores produtividades foram obtidas quando se trabalhou sem a presença de tampão fosfato (ensaios 13 – 21 e 24 – 03).

Tabela 4.6: Resultados do planejamento fatorial  $2^5$  para produtividade de síntese.

Ensaio	A T	B pH	C Metanol	D Tampão	E C <sub>6</sub> -APA	Prod. $\times 10^3$ (mM/min)
01	+	+	+	+	+	17,43
02	+	-	-	+	+	21,62
03	+	-	+	-	+	22,85
04	+	+	-	-	+	25,00
05	-	-	-	-	+	2,42
06	-	+	+	-	+	2,37
07	-	+	-	+	+	3,74
08	-	-	+	+	+	1,88
09	-	+	+	+	-	1,17
10	-	-	-	+	-	1,02
11	-	-	+	-	-	1,78
12	-	+	-	-	-	0,56
13	+	-	-	-	-	48,25
14	+	+	+	-	-	16,00
15	+	+	-	+	-	43,67
16	+	-	+	+	-	30,39
17	-	+	-	-	+	1,21
18	+	-	-	+	-	20,11
19	+	-	+	+	+	20,85
20	-	+	-	+	-	0,81
21	+	-	+	-	-	28,17
22	-	+	+	-	-	1,04
23	-	+	+	+	+	1,60
24	+	-	-	-	+	49,29
25	+	+	+	-	+	42,13
26	-	-	-	-	-	3,95
27	-	-	-	+	+	2,02
28	+	+	-	+	+	18,70
29	-	-	+	-	+	2,58
30	+	+	-	-	-	9,22
31	+	+	+	+	-	25,83
32	-	-	+	+	-	1,92



Nas temperaturas de 4 e 25 °C, o efeito do pH é significativo (ensaios 26 – 12 e 13 – 30), os efeitos da concentração inicial de 6-APA e de metanol associados a outros efeitos são pequenos. Isso mostra que o efeito do metanol sobre a adsorção de 6-APA ao sítio ativo da enzima pode ser desprezado, quando se tem como resposta a produtividade, ou seja, a presença de metanol, a 25 °C, não ajudou a melhorar a produtividade do antibiótico. A variação da concentração inicial de 6-APA na temperatura de 25 °C e no pH 6,5 não influenciou no aumento da produtividade, e quando se adicionou o metanol ou/e o tampão fosfato a produtividade até diminuiu com o aumento da concentração (ver Figura 4.6).

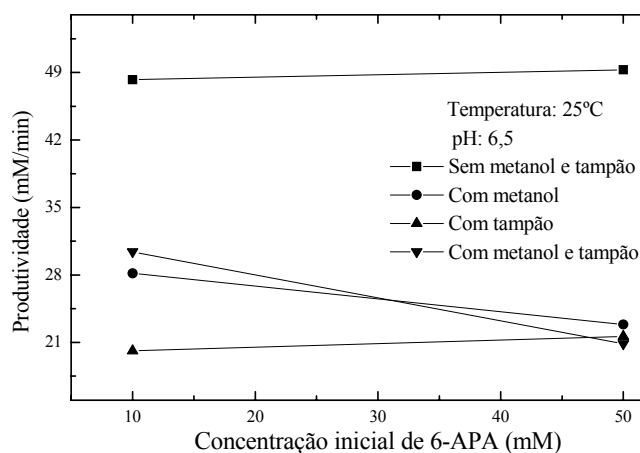


Figura 4.6: Gráfico do efeito da concentração inicial de 6-APA sobre a produtividade na temperatura de 25°C e pH 6,5.

O efeito da concentração de 6-APA, **E**, sobre a produtividade é complexo. Altas produtividades ocorreram tanto com baixa concentração de 6-APA (ensaios 13, 15 e 16), bem como com alta concentração de 6-APA (ensaios 24 e 25). Isto é um indicativo de que a concentração de 6-APA, **E**, não pode ser analisada separadamente dos outros efeitos. O efeito inibidor/ativador da concentração de 6-APA já havia sido descrito <sup>73</sup> para a síntese enzimática de amoxicilina. Os autores mostraram que o 6-APA inibia a formação do complexo acil-enzima na presença de concentrações baixas de éster para-hidroxi-metilico de fenilglicina e tinha papel oposto (ativador) na presença de altas concentrações do éster. Neste trabalho, outro antibiótico é focado, porém o efeito do 6-APA parece ser igualmente complexo.

Na Tabela 4.7 os fatores menos significativos foram desprezados e atribuídos às flutuações aleatórias do processo. Assim, novamente, esses efeitos foram usados para obter uma estimativa do erro experimental nos valores dos efeitos. Os efeitos significativos com seus desvios padrão estão na Tabela 4.8. Os ruídos foram distinguidos dos efeitos significativos pela análise do gráfico de probabilidade normal da Figura 4.7.

Tabela 4.7: Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^5$  tendo como resposta a produtividade de síntese de ampicilina ( $\times 10^3$ ).

Média	14,36		
Efeitos principais:			
(Temperatura) <b>A</b>	-5,75		
(pH) <b>B</b>	7,81		
(Metanol) <b>C</b>	4,09		
(Tampão) <b>D</b>	-7,50		
(Conc. 6-APA) <b>E</b>	5,49		
Interações de dois fatores:			
<b>AB</b>	0,41	<b>AC</b>	-6,40
<b>AD</b>	0,19	<b>AE</b>	-2,23
<b>BC</b>	5,72	<b>BD</b>	0,43
<b>BE</b>	0,06	<b>CD</b>	2,09
<b>CE</b>	0,66	<b>DE</b>	-5,25
Interações de três fatores:			
<b>ABC</b>	-5,88	<b>ABD</b>	0,05
<b>ABE</b>	1,54	<b>ACD</b>	0,05
<b>ACE</b>	0,35	<b>ADE</b>	5,82
<b>BCD</b>	-2,49	<b>BCE</b>	-0,05
<b>BDE</b>	-7,24	<b>CDE</b>	-0,22
Interações de quatro fatores:			
<b>ABCD</b>	5,31	<b>ABCE</b>	-7,12
<b>ABDE</b>	3,47	<b>ACDE</b>	8,63
<b>BCDE</b>	-5,72		
Interação de cinco fatores:			
<b>ABCDE</b>	4,96		

Consideraram-se esses pontos vindos de uma população normal de média zero. Desse modo, desprezaram-se os efeitos **AB**, **AD**, **BD**, **ABD**, **CD**, **ACD**, **BCD**, **AE**, **BE**, **ABE**, **CE**, **ACE**, **BCE** e **CDE**. Estes efeitos são atribuídos ao ruído embutido nos valores das respostas e foram usados para obter uma estimativa do erro experimental nos valores dos efeitos.

Observando os valores dos efeitos na tabela 4.8, vê-se que a produtividade só pode ser analisada em conjunto com todos os cinco fatores. Só algumas interações puderam ser desprezadas na análise do gráfico de probabilidade normal. Fixando-se uma temperatura, os efeitos das presenças de metanol e tampão fosfato não podem ser analisados separadamente, pois as curvas da Figura 4.6 não são paralelas, ou seja, há interação com todos os efeitos.

Tabela 4.8: Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^5$  da Tabela 4.7 e seus desvios padrão ( $\times 10^3$ ).

Média	14,36 $\pm$ 1,16		
Efeitos principais:			
(Temperatura) <b>A</b>	-5,75 $\pm$ 1,16		
(pH) <b>B</b>	7,81 $\pm$ 1,16		
(Metanol) <b>C</b>	4,09 $\pm$ 1,16		
(Tampão) <b>D</b>	-7,50 $\pm$ 1,16		
(Conc. 6-APA) <b>E</b>	5,49 $\pm$ 1,16		
Interações de dois fatores:			
<b>AC</b>	-6,40 $\pm$ 1,16	<b>BC</b>	5,72 $\pm$ 1,16
<b>DE</b>	-5,25 $\pm$ 1,16		
Interações de três fatores:			
<b>ABC</b>	-5,88 $\pm$ 1,16	<b>ADE</b>	5,82 $\pm$ 1,16
<b>BDE</b>	-7,24 $\pm$ 1,16		
Interações de quatro fatores:			
<b>ABCD</b>	5,31 $\pm$ 1,16	<b>ABCE</b>	-7,12 $\pm$ 1,16
<b>ABDE</b>	3,47 $\pm$ 1,16	<b>ACDE</b>	8,63 $\pm$ 1,16
<b>BCDE</b>	-5,72 $\pm$ 1,16		
Interação de cinco fatores;			

ABCDE  $4,96 \pm 1,16$

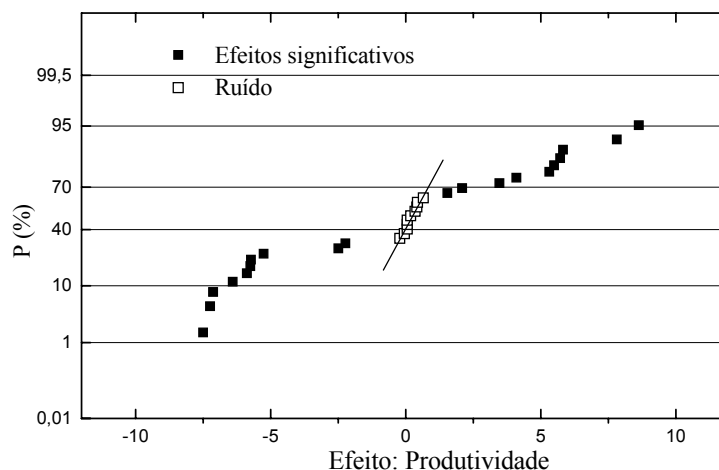


Figura 4.7: Gráfico de probabilidade cumulativa dos efeitos de produtividade. Efeitos significativos em preto.

#### 4.2.3 Seletividade da síntese de ampicilina

$$Seletividade = \frac{C_{amp}}{C_{FG}} \quad (4.3)$$

Uma vez que esses ensaios não incluíram produtos no início da reação, esta definição de seletividade é igual a relação síntese/hidrólise em termos de velocidades médias de reação. As melhores seletividades (Tabela 4.9) ocorreram quando se trabalhou num pH 6,5 (ensaios 24 – 04; 05 – 17, por exemplo). Obteve-se uma seletividade máxima de 2,40, ou seja, a partir da concentração inicial de EMFG conseguiu-se produzir 2,4 vezes mais antibiótico que FG.

A seletividade parece não sofrer muita influência da temperatura, pois altas seletividades foram obtidas tanto a 25°C quanto a 4°C. A partir dos dez maiores valores de seletividade pode-se observar que tanto a presença de metanol quanto de tampão fosfato no meio reacional não influenciaram positivamente a seletividade da síntese de ampicilina. Os melhores resultados foram obtidos quando se usou concentração alta de 6-APA, efeito esperado: a maior presença de 6-APA no meio reacional permitiu que a dissociação do complexo acil-enzima se desse em direção à produção do antibiótico e não de FG.

Tabela 4.9: Resultados do planejamento fatorial  $2^5$  tendo como resposta a seletividade (razão síntese/hidrólise).

Ensaio	A T	B pH	C Metanol	D Tampão	E C <sub>6-APA</sub>	Seletividade
01	+	+	+	+	+	0,20
02	+	-	-	+	+	<b>0,92</b>
03	+	-	+	-	+	<b>1,92</b>
04	+	+	-	-	+	0,39
05	-	-	-	-	+	<b>1,09</b>
06	-	+	+	-	+	0,38
07	-	+	-	+	+	<b>0,61</b>
08	-	-	+	+	+	<b>0,76</b>
09	-	+	+	+	-	0,15
10	-	-	-	+	-	0,19
11	-	-	+	-	-	0,18
12	-	+	-	-	-	0,07
13	+	-	-	-	-	0,09
14	+	+	+	-	-	0,18
15	+	+	-	+	-	0,09
16	+	-	+	+	-	0,17
17	-	+	-	-	+	0,36
18	+	-	-	+	-	0,23
19	+	-	+	+	+	<b>0,71</b>
20	-	+	-	+	-	0,09
21	+	-	+	-	-	0,25
22	-	+	+	-	-	0,11
23	-	+	+	+	+	0,17
24	+	-	-	-	+	<b>2,40</b>
25	+	+	+	-	+	<b>0,85</b>
26	-	-	-	-	-	0,22
27	-	-	-	+	+	<b>0,99</b>
28	+	+	-	+	+	0,22
29	-	-	+	-	+	<b>0,76</b>
30	+	+	-	-	-	0,09
31	+	+	+	+	-	0,14
32	-	-	+	+	-	0,23

A Tabela 4.10 mostra os efeitos calculados para a seletividade. Pode-se observar que os efeitos calculados para a presença de metanol (C) e tampão fosfato (D) no meio reacional são pequenos. As interações entre dois, três e quatro fatores também são pequenas. Os efeitos associados à concentração inicial de 6-APA mostraram-se significativos. A concentração inicial de 50 mM de 6-APA influenciou para o aumento da seletividade. Os dez maiores valores encontrados

para seletividade ocorreram em ensaios realizados com concentração inicial de 6-APA de 50 mM (ensaios em negrito na Tabela 4.9).

Trabalhando com pH 6,5 (maiores seletividades quando comparadas com pH 7,5), os efeitos da presença de tampão fosfato e metanol no meio reacional só contribuíram para uma melhora da seletividade quando a temperatura estava em 25 °C e em concentração baixa de 6-APA (ensaios: 13, 24, 18 e 16). O efeito do pH associado à presença de metanol no meio reacional mostrou-se significativo, pois no pH 7,5 a seletividade alcançou uma melhora (ensaios: 04 – 25). No pH mais favorável a adsorção do 6-APA (6,5), na temperatura mais alta, a presença de metanol dificultou o acesso da água ao complexo acil-enzima diminuindo sua hidrólise, assim, uma sutil melhora da seletividade pôde ser observada neste caso. Não foi encontrada na literatura explicação mecânica para o efeito do pH sobre a adsorção do 6-APA na enzima – não há disponíveis maiores detalhes sobre o sítio ativo onde o 6-APA se aloca. Experimentalmente, observa-se que maiores pHs diminuem a adsorção. Esse efeito desfavorece a reação de síntese. Por outro lado, maiores pHs deslocam o equilíbrio de dissociação de  $\text{NH}_2$  do 6-APA na direção da forma desprotonada, o que favorece o ataque nucleófilo ao acil-enzima e, portanto, favorece a síntese. Esses efeitos opostos fazem com que as respostas a variação de pH sejam complexas, como se observa aqui.

A Figura 4.8 ilustra os efeitos da seletividade com relação a concentração inicial de 6-APA para as temperaturas e para os pHs. Pode-se observar que as retas não são paralelas em nenhum dos casos, indicando que há interação dos efeitos, assim, eles não podem ser analisados separadamente. A influência da temperatura não é tão significativa no pH 7,5 quanto no pH 6,5. Valores de seletividade são mais altos no pH 6,5. A 25 °C, a seletividade foi maior quando se trabalhou com concentração alta de 6-APA (ensaios: 24 – 05; 04 – 17). Havia mais 6-APA para direcionar um ataque nucleófilo ao complexo acil-enzima e produzir o antibiótico.

Tabela 4.10: Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^5$  tendo como resposta a seletividade (razão síntese/hidrólise).

Média	0,47		
Efeitos principais:			
(Temperatura) <b>A</b>	0,16		
(pH) <b>B</b>	-0,44		
(Metanol) <b>C</b>	-0,06		
(Tampão) <b>D</b>	-0,02		
(Conc. 6-APA) <b>E</b>	0,64		
Interações de dois fatores:			
<b>AB</b>	0,09	<b>AC</b>	0,10
<b>AD</b>	0,06	<b>AE</b>	-0,05
<b>BC</b>	-0,22	<b>BD</b>	-0,01
<b>BE</b>	-0,22	<b>CD</b>	-0,07
<b>CE</b>	0,12	<b>DE</b>	0,00
Interações de três fatores:			
<b>ABC</b>	0,64	<b>ABD</b>	0,04
<b>ABE</b>	0,16	<b>ACD</b>	0,07
<b>ACE</b>	-0,36	<b>ADE</b>	0,07
<b>BCD</b>	-0,15	<b>BCE</b>	-0,23
<b>BDE</b>	-0,10	<b>CDE</b>	-0,11
Interações de quatro fatores:			
<b>ABCD</b>	0,13	<b>ABCE</b>	0,03
<b>ABDE</b>	0,12	<b>ACDE</b>	-0,09
<b>BCDE</b>	-0,03		
Interação de cinco fatores:			
<b>ABCDE</b>	-0,03		

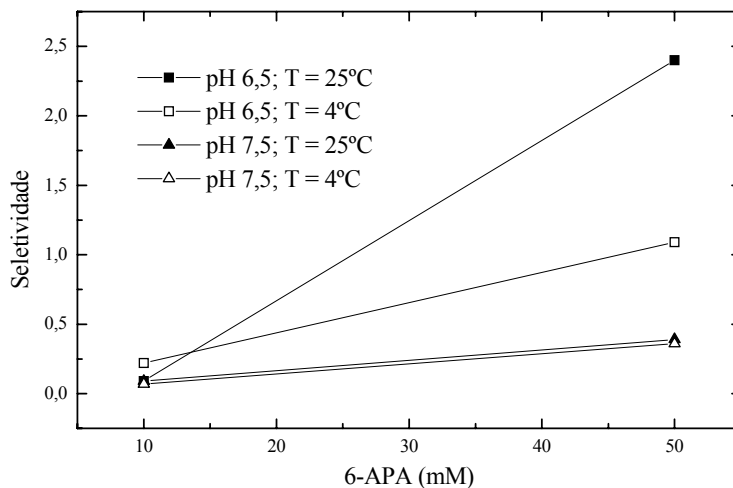


Figura 4.8: Gráfico do efeito da concentração inicial de 6-APA sobre a seletividade nas temperaturas de 4 e 25°C e pHs de 6,5 e 7,5.

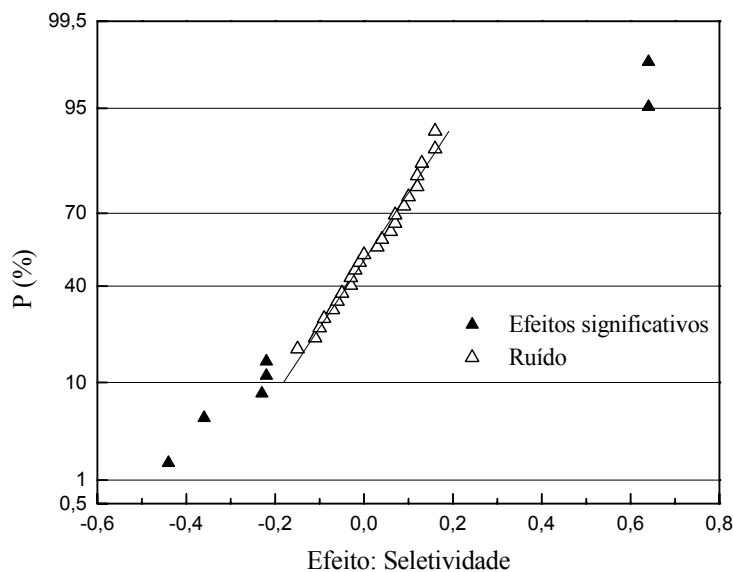


Figura 4.9: Gráfico de probabilidade normal dos efeitos da seletividade do antibiótico ao EMFG. Efeitos desprezados: Δ.

Na Tabela 4.11, novamente, os fatores menos significativos foram atribuídos ao ruído. Assim, a estimativa do erro experimental nos valores dos efeitos foi calculada. Os efeitos significativos com seus desvios padrão estão na Tabela 4.11. A Figura 4.9 mostra o gráfico de probabilidade normal para os efeitos da seletividade. Os efeitos desprezados foram **A, C, D, AB, AC, AD, AE,**



**BD, CD, CE, DE, ABD, ABE, ACD, BCD, BDE, ABD, ACD, ADE, CDE, ABCD, BCDE, ACDE, ABCE e ABCDE.**

Tabela 4.11: Efeitos calculados para o planejamento fatorial e seus desvios padrão da seletividade (razão síntese/hidrólise).

Média	0,47 ± 0,09		
Efeitos principais:			
(pH) <b>B</b>	-0,44 ± 0,09		
(Conc. 6-APA) <b>E</b>	0,64 ± 0,09		
Interações de dois fatores:			
<b>BC</b>	-0,22 ± 0,09	<b>BE</b>	-0,22 ± 0,09
Interações de três fatores:			
<b>ABC</b>	0,64 ± 0,09	<b>ACE</b>	-0,36 ± 0,09
<b>BCE</b>	-0,23 ± 0,09		

Após a análise de todas as respostas (rendimento, produtividade e seletividade) e seus efeitos mais significativos, chegou-se à conclusão, pela análise dos gráficos de probabilidade normal (Figuras 4.1, 4.7 e 4.9), de que os efeitos da presença de metanol e tampão fosfato no meio reacional não eram significativos e esses efeitos menos significativos foram usados para estimar o desvio padrão dos efeitos. O efeito do pH, efeito **B**, foi o maior em todas as respostas ( $R = -16,85$ ;  $P = 7,8 \times 10^{-3}$  mM/min e  $S = -0,44$ ). Ele é positivo para produtividade e negativo para seletividade e rendimento. Assim, valores baixos de pH melhoram a seletividade e o rendimento de síntese, mas a produtividade decresce – um típico problema de otimização. O efeito do metanol, **C**, pode ser desprezado em todas as respostas, porém deve ser considerado ao se analisar sua interação com o pH ( $R = 5,34$ ;  $P = 5,72 \times 10^{-3}$  mM/min e  $S = -0,22$ ), pois ele é significativo do ponto de vista estatístico. O efeito de interação **BC** é positivo para produtividade e rendimento, mas é negativo para a seletividade, mais uma vez um problema de otimização. A concentração de 6-APA, efeito **E**, é significativa em todas as respostas ( $R = -7,0$ ;  $P = 5,5 \times 10^{-3}$  mM/min e  $S = 0,64$ ). Quando a concentração de 6-APA é baixa, altos rendimentos são alcançados, mas a seletividade e a produtividade da reação decrescem. É importante enfatizar que para

se otimizar economicamente a produção de ampicilina, todas as três respostas devem ser levadas em consideração. Alta produtividade e rendimento são importantes, porém a seletividade também deve ser considerada, pois uma baixa seletividade indica que EMFG está sendo hidrolisado em demasia (ver Figura 2.11), e esta perda de substrato é um importante fator econômico.

Altos rendimentos de síntese em relação ao 6-APA foram obtidos nos experimentos com baixa concentração de 6-APA (Tabela 4.2) e, portanto, com excesso de EMFG. Realmente, uma baixa concentração do anel  $\beta$ -lactâmico significa uma maior probabilidade de consumo deste reagente, portanto melhora do rendimento. Por outro lado, EMFG é hidrolisado e a seletividade decresce nesta região. Todos os experimentos que alcançaram alta seletividade foram ensaios com alta concentração de 6-APA (por exemplo, Figura 4.8). A maior quantidade do núcleo no meio reacional facilitou sua adsorção e favoreceu sua competição com a água para promover o ataque nucleófilo ao complexo acil-enzima. Assim a razão  $s/h_1$  (Figura 2.11) aumenta, e alta seletividade leva a concentrações máximas de ampicilina e, portanto, aumenta o rendimento de síntese. Esta combinação de efeitos explica os resultados dos ensaios 5, 24 e 27, os quais alcançaram altos rendimentos a despeito de sua alta concentração de 6-APA (ensaio 5, R = 41 %; ensaio 24, R = 41 %; ensaio 27, R = 47 %).

De acordo com o que já foi discutido no item 2.5.6, a concentração iônica do meio reacional deveria interferir no comportamento catalítico da enzima, inibindo ou ativando a adsorção do 6-APA e, portanto, mudando a velocidade de síntese do antibiótico. Entretanto, para a faixa de concentração de tampão fosfato estudada aqui (0-50 mM), este efeito não foi significativo para rendimento e seletividade. O tampão fosfato no meio reacional foi significativo do ponto de vista estatístico para a produtividade ( $D = -5,5 \times 10^{-3}$  mM/min), ou seja, sua redução no meio melhoraria a produtividade da reação.

Numa síntese enzimática sob controle termodinâmico, os efeitos da temperatura sobre o rendimento podem ser antecipados. Entretanto, numa síntese cineticamente controlada, a seletividade é essencial. A síntese cineticamente controlada de ampicilina é um sistema série-paralelo e, assim, a previsão dos efeitos da temperatura não é direta. Quando a hidrólise 1 é favorecida (ver Figura

2.11), substrato é perdido e o custo global do processo aumenta. Por outro lado, a hidrólise 2 pode ser favorecida quando tempos de residência inadequados são utilizados no reator, mais uma vez aumentando os custos do processo. Temperatura foi testada como uma variável para melhorar a síntese contra as hidrólises. Os melhores rendimentos de síntese ocorreram a 4 °C (Tabela 2). Altas produtividades ocorreram a 25 °C ( $49,3 \times 10^{-3}$  mM/min). Seletividade máxima de 2,40 foi obtida também a 25 °C (Tabela 4.9, ensaio 24). Altas seletividades (exceto para o ensaio 25), rendimentos (exceto para os ensaios 2 e 29), e produtividades (exceto para os ensaios 15 e 25), todos ocorreram a pH 6,5.

O pH afeta a formação do complexo acil-enzima em duas direções opostas. O grupo amina da serina B1 (Figura 2.12) deveria estar descarregado, pronto para aceitar prótons quando direcionado para o ataque nucleófilo ao substrato EMFG; assim, uma queda no pH atrapalharia a formação do complexo acil-enzima. Além disso, num pH levemente ácido quase todos grupos amino do 6-APA ainda estão desprotonados ( $pK_a = 2,5$  e  $pK_b = 4,9$ ), o que facilita o ataque nucleófilo ao complexo acil-enzima pelo 6-APA. Em suma, a definição do melhor pH é claramente um problema de otimização: diminuindo o pH melhora-se a adsorção de 6-APA (um efeito desejado), mas também, diminui-se o número de grupos  $\alpha$ -amino da serina B1 na forma  $NH_2$  (efeito indesejado). Além disso, a necessidade do grupo amino do 6-APA estar descarregado coloca um limite inferior para o pH. No pH 6,5, a velocidade de formação do complexo acil-enzima e o ataque nucleófilo pelo grupo amino do 6-APA ainda não estão seriamente reprimidos. O resultado é uma melhor seletividade reacional.

Ainda se deve notar que no pH 6,5 a atividade catalítica da PGA não está no seu valor máximo, portanto, uma enzima imobilizada multipontualmente foi necessária neste trabalho. A melhor combinação de temperatura e pH foi de 25 °C e 6,5. Nesta temperatura, o rendimento com relação ao 6-APA decresce um pouco, mas ainda é aceitável (41,4 %, contra 56,9 %, a 4 °C). Entre as combinações de condições experimentais testadas, o ensaio 24 forneceu a melhor resposta: máximas seletividade e produtividade e rendimento aceitável. As condições experimentais foram 25 °C, pH 6,5, sem metanol (só a quantidade produzida naturalmente pela hidrólise do EMFG e pela síntese da ampicilina),

sem tampão fosfato e concentrações iniciais de 6-APA e EMFG iguais a 50mM. O gráfico com as concentrações ao longo do tempo para reagentes e produtos da síntese de ampicilina nas condições operacionais escolhidas pode ser visto na Figura 4.10. Note-se que as condições operacionais escolhidas levaram em consideração rendimento, seletividade e produtividade, as quais são importantes para definir o custo operacional da produção do antibiótico em escala industrial.

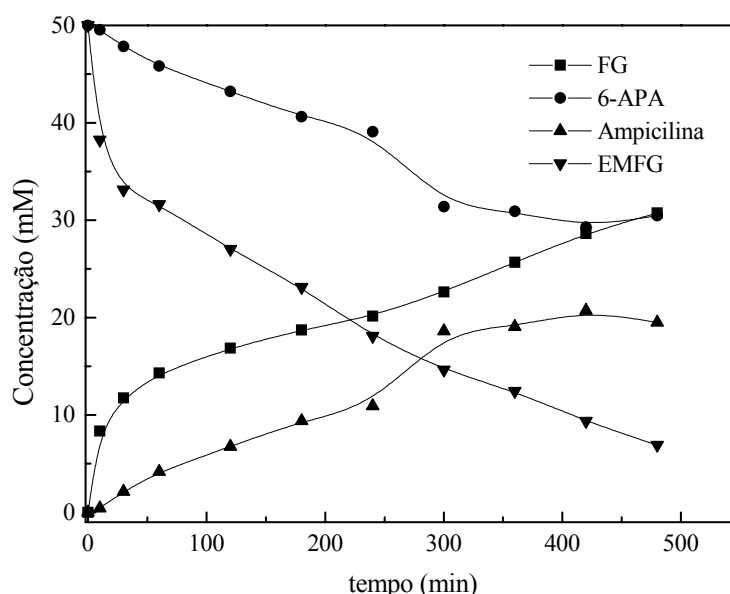


Figura 4.10: Gráfico de reagentes e produtos na síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25 °C, pH 6,5,  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA = 50 mM,  $C_{\text{inicial}}$  de EMFG = 50 mM sem adição de metanol e tampão fosfato.

#### 4.2.4 Razão de Concentrações dos Reagentes para a Síntese de Ampicilina

Considerando todas as variáveis estudadas anteriormente, uma concentração alta de 6-APA foi selecionada como a mais conveniente para operar o reator, porque a baixa razão EMFG/6-APA diminuiria a perda do EMFG pela hidrólise 1 (Figura 2.11), ou seja, uma alta seletividade (razão de velocidades síntese e hidrólise, S/H) seria essencial para a execução econômica do processo. Entretanto, o custo do EMFG é inferior ao do 6-APA. Assim, vários autores <sup>2,17,26,36,41,91,134,155,173,175</sup> trabalharam com excesso de éster, de forma a minimizar as perdas do núcleo  $\beta$ -lactâmico, 6-APA. O comportamento do sistema nessa região ( $0,1 \geq C_{\text{EMFG}}/C_{6\text{-APA}} \geq 10$ ) foi estudado neste item. Desse modo, uma série de

ensaios de velocidade inicial de síntese de ampicilina foi realizada, variando a concentração de EMFG de 10 a 500 mM para duas concentrações de 6-APA (10 e 50 mM). As Figuras 4.11 e 4.12 mostram gráficos de S/H, velocidades iniciais de FG e ampicilina em função da concentração inicial de EMFG. As Figuras 4.11 e 4.12 mostram claramente o decréscimo da seletividade da reação para altas concentrações de EMFG, independente da concentração de 6-APA presente. Em baixas concentrações de EMFG uma oscilação na seletividade também foi notada, embora próxima do erro experimental. De qualquer maneira a dependência da seletividade com a concentração de EMFG está definitivamente presente. Os ensaios foram realizados em reator encamisado de 20 mL com 1 g de PGA imobilizada de 20 UI/g<sub>gel</sub>.

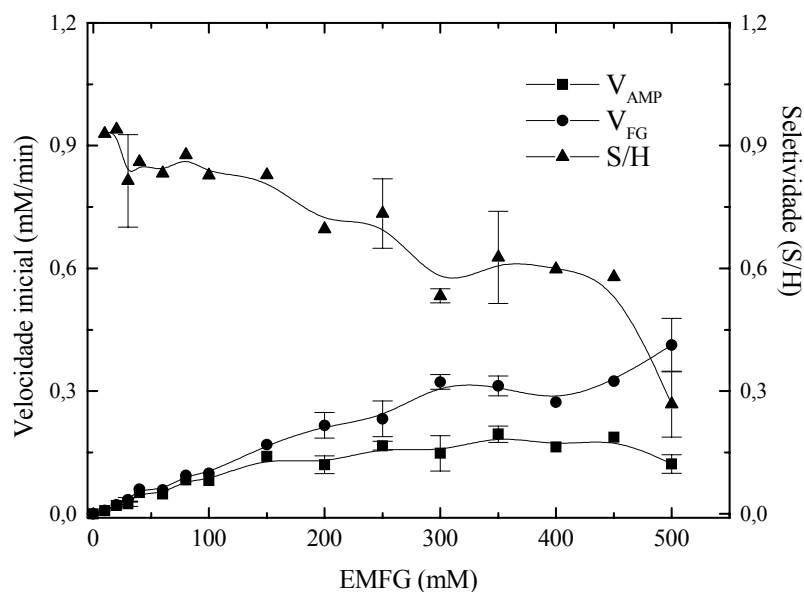


Figura 4.11: Ensaios de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina, pH 6,5; 25 °C, 50 mM 6-APA, PGA imobilizada com 20 UI/g<sub>gel</sub>. Barras de erro são ensaios em triplicata. V<sub>AMP</sub> = velocidade inicial do antibiótico, V<sub>FG</sub> = velocidade inicial da fenilglicina, S/H = V<sub>AMP</sub>/V<sub>FG</sub>.

As Figuras 4.11 e 4.12 mostram uma clara tendência de queda da seletividade com o aumento da concentração de EMFG, porém esses ensaios de velocidade inicial foram realizados com PGA imobilizada em gel de agarose com carga enzimática de 20 UI/g<sub>gel</sub>. Youshko *et al.*, 2000<sup>175</sup> também realizaram experimentos de velocidade inicial com enzima livre numa faixa de concentração

de EMFG de 25 a 275 mM (25°C, pH 6,3 e 50mM de 6-APA) e não observaram tendência decrescente na seletividade que foi constatada aqui. Assim, sabendo-se que não haveria problemas de transporte de massa com essa carga enzimática, ensaios de velocidade inicial foram realizados com enzima livre, pois a enzima solúvel poderia ter comportamento cinético diferente da imobilizada. Então, varreu-se a mesma faixa de concentrações anteriormente utilizadas com ensaios de velocidade inicial.

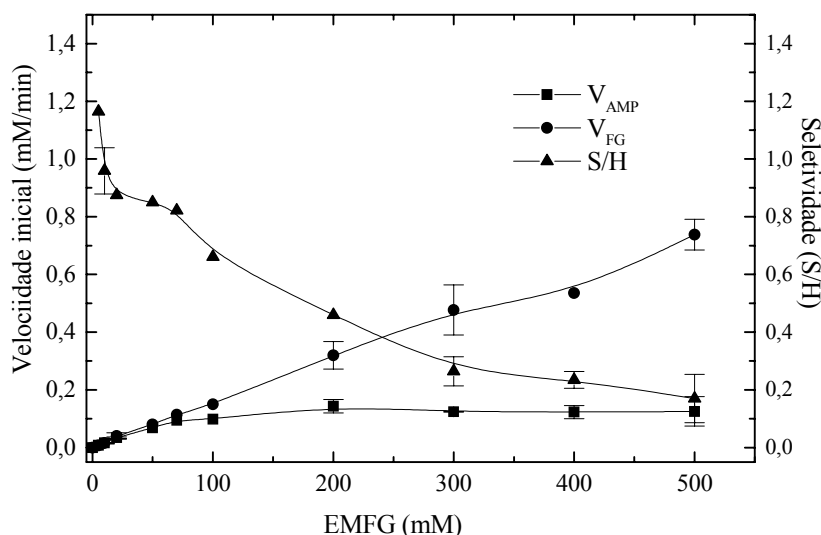


Figura 4.12: Ensaios de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina, pH 6,5; 25 °C, 10 mM 6-APA, PGA imobilizada com 20 UI/g<sub>gel</sub>.  $V_{AMP}$  = velocidade inicial do antibiótico,  $V_{FG}$  = velocidade inicial da fenilglicina,  $S/H = V_{AMP}/V_{FG}$ .

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram gráficos de S/H, velocidades iniciais de FG e ampicilina em função da concentração inicial de EMFG catalisada por PGA livre. Novamente as Figuras 4.13 e 4.14 mostram claramente o decréscimo da seletividade da reação para altas concentrações de EMFG independente da concentração de 6-APA presente. Assim, a dependência da seletividade com a concentração de EMFG está definitivamente presente, contrariando as de Youshko *et al.*, 2000<sup>175</sup>. Um modelo cinético que mostre esse comportamento deve necessariamente ser mais complexo que os modelos de equações cinéticas simples propostos na literatura. A consideração de que o complexo acil-enzima sempre ser formado antes da adsorção do 6-APA<sup>76,77,95,98,152,176,178</sup> é muito restritiva. Por outro lado, a suposição de que a presença do 6-APA<sup>71,78</sup> não

interfere com a velocidade de formação do intermediário acil-enzima também não é satisfatória para toda faixa de concentrações. Esses modelos simplificados podem-se ajustar a dados em faixas estreitas de concentração de substrato, porém não se ajustam quando a faixa de concentração se amplia.

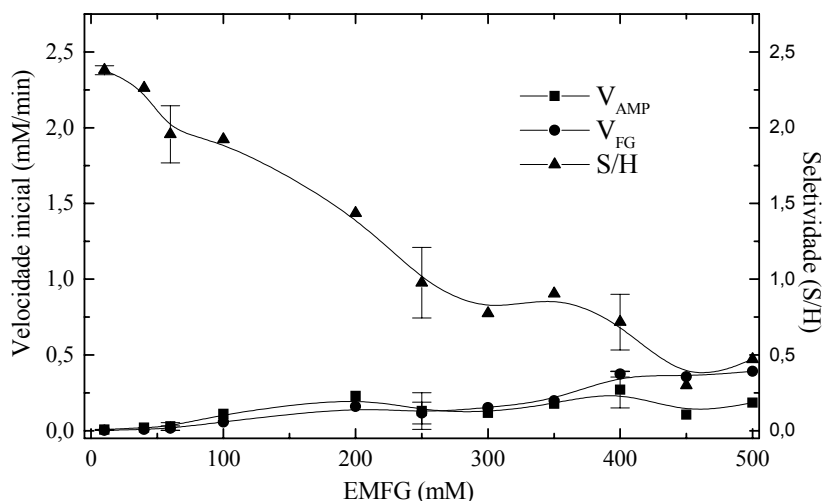


Figura 4.13: Ensaio de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina com PGA livre, pH 6,5; 25 °C, 50 mM 6-APA.  $V_{AMP}$  = velocidade inicial do antibiótico,  $V_{FG}$  = velocidade inicial da fenilglicina,  $S/H = V_{AMP}/V_{FG}$ .

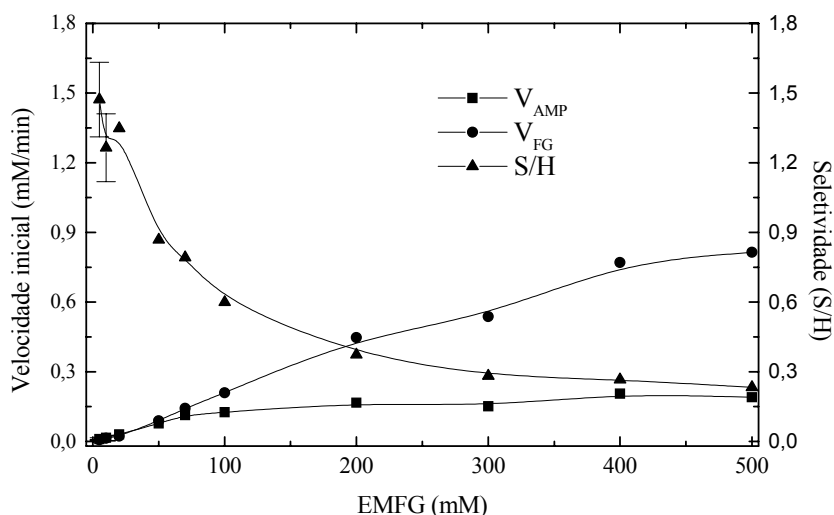


Figura 4.14: Ensaio de velocidade inicial da síntese enzimática de ampicilina com PGA livre, pH 6,5; 25 °C, 10 mM 6-APA.  $V_{AMP}$  = velocidade inicial do antibiótico,  $V_{FG}$  = velocidade inicial da fenilglicina,  $S/H = V_{AMP}/V_{FG}$ . Carga enzimática no reator: 20 UI.

### 4.3 RESULTADOS DA IMOBILIZAÇÃO EM SÍLICA

Após ativação da sílica (item 3.2.3), sua oxidação foi quantificada seguindo a metodologia do item 3.2.5. Essa sílica oxidada alcançou uma concentração de  $137 \mu\text{mol}_{\text{CHO}}/\text{g}_{\text{gel}}$  (concentração aldeídica mínima necessária para a obtenção de alto rendimento de imobilização<sup>22,138</sup>) e foi com ela que se realizaram todas as imobilizações. Com a solução de PGA de 256 UI/mL, imobilizaram-se cargas enzimáticas de 6, 11, 20, 37 e 120 UI/gss (gss = grama de sílica em base seca). Na Tabela 4.12 pode-se observar os valores de atividade do sobrenadante ao longo da imobilização. Nas imobilizações realizadas com baixa carga enzimática, o desaparecimento da enzima ocorreu com 3 horas de reação. Já na imobilização com alta carga enzimática, houve um aumento desse tempo, para que a maior quantidade de enzima oferecida reagisse com o suporte. Mesmo após 7,5 horas de reação ainda se observava atividade enzimática no sobrenadante.

A atividade da enzima imobilizada foi medida para confirmar a carga enzimática existente no derivado. Para medir a atividade da PGA imobilizada pesou-se uma pequena massa de derivado e se adicionou solução de 5mL de penicilina G, seguindo o método PDAB descrito na seção 3.4. As atividades medidas após a imobilização foram  $6,0 \pm 0,2$ ,  $11,2 \pm 0,71$ ,  $18,93 \pm 1,36$ ,  $37,0 \pm 1,3$  e  $56,6 \pm 4,65$  para as cargas enzimáticas oferecidas de 6, 11, 20, 40 e 120 UI/gss, respectivamente. Isso indicaria que efeitos difusivos internos poderiam surgir a partir de uma carga enzimática de 40 UI/gss oferecida para o suporte. Na ausência de problemas difusivos a atividade observada do derivado deveria variar linearmente com sua atividade nominal (dada pela diferença no sobrenadante após a imobilização). Para o derivado com carga teórica de 120 UI/gss não se pode garantir que o desaparecimento da enzima no sobrenadante se deveu unicamente a sua reação com o suporte. A enzima estava em solução com pH alto (10) e pode ter ocorrido alguma desativação, já que o período de imobilização foi maior e a desativação da enzima neste pH foi observada por Pereira, 1996.



Tabela 4.12: Atividade enzimática do sobrenadante nas imobilizações em sílica.

Tempo de imobiliz. (h)	Ativid. do sobren. p/ derivado c/ 6UI	Ativid. do sobren. p/ derivado c/ 11UI	Ativid. do sobren. p/ derivado c/ 20UI	Ativid. do sobren. p/ derivado c/ 40UI	Tempo de imobiliz. (h)	Ativid. do sobren. p/ derivado c/ 120 UI
0,0	5,89	11,07	20,80	41,72	0,0	118,68
0,5	3,98	5,60	5,41	21,30	1,5	87,02
1,5	2,71	3,82	2,95	4,80	3,0	54,18
2,0	0,53	1,66	0,54	1,08	6,0	24,58
3,0	0,00	0,00	0,12	0,79	7,5	8,60

A confirmação da presença de limitação difusional intrapartícula na medida da atividade da enzima foi detectada (determinou-se a constante de reação para hidrólise de penicilina G por PGA, segundo cinética de Michaelis-Menten, e a energia de ativação dessa reação para derivados com mesma carga imobilizada e com diferentes diâmetros de partícula), e acima de uma carga enzimática de 20UI/gss observaram-se restrições difusionais<sup>20</sup>. Essas limitações difusionais se devem à carga enzimática e não ao tamanho da partícula. Como se pode observar pela comparação da Tabela 4.1 com a 4.12, vê-se que a sílica levou muito mais tempo para realizar os enlaces de ligação covalente com a enzima, mesmo quando se trabalhou com cargas enzimáticas baixas. Além disso, a sílica apresentou uma estabilidade de permanência dessa carga enzimática muito inferior a agarose. A atividade da enzima medida na agarose permaneceu inalterada durante os últimos três anos de trabalho, porém a atividade enzimática medida na sílica foi diminuindo até sua perda total com no máximo seis meses de utilização desse derivado. Mesmo com essa dificuldade, decidiu-se realizar ensaios de síntese para verificar o potencial desse suporte na produção do antibiótico, já que o objetivo principal deste trabalho era encontrar as melhores condições de operação para maximizar a produção de ampicilina.

#### 4.4 SÍNTESE DE AMPICILINA COM PGA IMOBILIZADA EM SÍLICA EM REATOR DE LEITO FIXO

Nesta parte do trabalho empregou-se sílica macroporosa como matriz-suporte da enzima. A baixa tolerância da sílica ao cisalhamento, no entanto, impõe o uso de reator em leito fixo ou fluidizado (nos quais não há tensões geradas pelas pás de impelidores). Nos ensaios iniciais no reator de leito fixo usaram-se concentrações iniciais de reagentes tais que o sistema operasse sem gradientes de concentração ao longo do leito.

As concentrações dos reagentes não ultrapassaram os 50 mM e não houve precipitação dos produtos. A Figura 4.15 mostra o gráfico da reação enzimática de ampicilina utilizando o leito fixo a 25 °C, pH 6,5, com concentração inicial de 6-APA de 50 mM e concentração inicial de EMFG de 50 mM, na presença de tampão fosfato no meio reacional. As condições operacionais dos experimentos usando sílica como suporte foram testadas de modo que problemas difusionais nos poros do catalisador fossem afastados. A carga enzimática foi de 20 UI/gss.

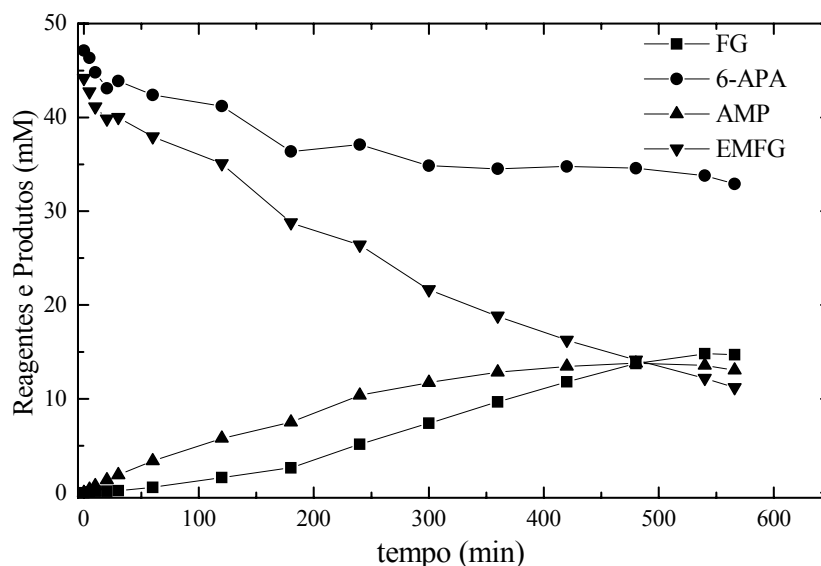


Figura 4.15: Gráfico da síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em sílica a 25°C, pH 6,5,  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA = 50mM,  $C_{\text{inicial}}$  de EMFG = 50mM, 20UI/gss.

A velocidade intersticial de escoamento, (vazão volumétrica)/(porosidade do leito x seção transversal), foi de 35,9 cm/min. Essa síntese alcançou rendimento em 6-APA de 29 %, rendimento em EMFG de 31 %, seletividade de 1,0 e produtividade de  $29 \times 10^{-3}$  mM/min. Resultados semelhantes foram obtidos com a síntese realizada com gel de agarose como catalisador (ensaio 02), 31 %, 0,92 e  $22 \times 10^{-3}$  mM/min, respectivamente.

Realizou-se uma análise do processo com auxílio de modelo fenomenológico do reator (Figura 2.14), que considerou a resistência ao transporte de massa interno e externo nas partículas do catalisador, além da dispersão axial no leito. Considerou-se regime transiente (refluxo total dos produtos ao final do leito) e reator heterogêneo. A dispersão axial foi estimada preliminarmente através do Número de Peclet e Número de Reynolds (Equação 4.4).<sup>59</sup> A correlação indicou que a dispersão axial seria significativa para a faixa de vazões aqui empregadas. Propriedades físicas do fluido ( $\epsilon$ , portanto, sua velocidade superficial) foram admitidas constantes ao longo do leito. Considerou-se também que a enzima estava uniformemente imobilizada nos poros da sílica. O modelo prediz as concentrações dos compostos ao longo do tempo, no seio do fluido e no interior da partícula. A Equação 4.5 representa os balanços de massa para substratos e produtos no seio do fluido.

$$Re'' = \frac{d_p u \rho}{\mu} \quad Pe = \frac{u d_p}{D_{ax}} \quad (4.4)$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial \tau} = -\frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{\partial C_i}{\partial \varphi} + \frac{D_{ax}}{\epsilon L u} \frac{\partial^2 C_i}{\partial \varphi^2} + \frac{3(1-\epsilon)L}{\epsilon R_p u} \cdot k_{ci} \cdot (C_i^S - C_i) \quad (4.5)$$

Cujas condições de contorno são:

$$\tau = 0 \rightarrow C_i(\varphi, 0) = 0$$

$$\varphi = 0 \rightarrow C_i^0(\tau) - C_i(0, \tau) = -\frac{D_{ax}}{uL} \frac{\partial C_i}{\partial \varphi} \Big|_{\varphi=0}$$

$$\varphi = 1 \rightarrow \frac{\partial C_i}{\partial \varphi} = 0$$

em que  $\varphi = z/L$  e  $\tau = L/u$ .

A Equação 4.5 foi resolvida numericamente. Discretizou-se por diferenças finitas, malha constante, na posição axial. A Equação 4.6 representa o balanço de massa para substratos e produtos no interior da sílica. Supõe-se que o processo de difusão através dos poros pode ser satisfatoriamente representado pela equação de Fick, utilizando difusividades efetivas constantes para cada componente.

O sistema de equações resultante foi resolvido numericamente. Utilizou-se colocação ortogonal <sup>172</sup> para discretizar as equações no raio. Os pontos de colocação correspondem aos zeros de polinômios de Jacobi  $P^{(1,1/2)}$ . Testes com 2, 5 e 7 pontos de colocação indicaram que dois pontos internos (três no total, para este problema simétrico) são suficientes para representar este sistema.

$$\frac{\partial C_{pi}}{\partial \tau} = \frac{D_{ef} L}{\varepsilon_p \cdot R_p^2 u} \left( 6 \cdot \frac{\partial C_{pi}}{\partial x} + 4 \cdot x \cdot \frac{\partial^2 C_{pi}}{\partial x^2} \right) + \frac{L \rho_p}{u \cdot \varepsilon_p} R_i \quad (4.6)$$

$$\tau = 0 \rightarrow C_{pi}(x, \tau) = 0$$

$$r = 0 \therefore x = 0 \rightarrow 2\sqrt{x} \cdot \frac{dC_{pi}}{dx} = 0 \forall \tau, \text{ trivial se a derivada for finita}$$

$$r = R_p \therefore x = 1 \rightarrow k_{ci}(C_i - C_{pi}(1, \tau)) = \frac{D_{ef}}{R_p} \cdot 2 \cdot \sqrt{x} \cdot \frac{\partial C_{pi}}{\partial x} \Big|_{x=1}$$

em que:  $x = r/R_p$ .

O balanço de massa no tanque (alimentação e reciclo), assumindo-o perfeitamente agitado, fluido com densidade constante e reciclo total, é:

$$\frac{dC_i^0}{d\tau} = \frac{V_{az} L}{V_t u} (C_i(1, \tau) - C_i^0) \quad (4.7)$$

em que  $V_{az}$  = vazão de meio reacional e  $V_t$  = volume do tanque de alimentação.

As condições de contorno na superfície do catalisador recaem em equações algébricas lineares, permitindo a eliminação da concentração na superfície do rol de variáveis. Assim, evita-se trabalhar com sistema algébrico-diferencial. Resolveu-se o sistema de equações diferenciais ao longo do tempo por método progressivo, o algoritmo DASSL (Differential-Algebraic-System-Solver) <sup>140</sup>.

As expressões para as velocidades de reações usadas no modelo do reator de leito fixo seguiram Gonçalves, 1999, <sup>71</sup> e estão detalhadas em Ferreira, 1999, <sup>50</sup>.

Segundo o modelo, a presença de 6-APA (NH) não interfere na velocidade de reação de desaparecimento de éster (AB), pois esta velocidade é controlada pela formação do complexo acil-enzima. Assim, a expressão para a velocidade de hidrólise do éster representa a velocidade de seu desaparecimento, mesmo quando a reação de síntese ocorre em paralelo à de hidrólise. A velocidade de hidrólise de ampicilina ( $v_{h2}$ ) é expressa por:

$$v_{h2} = \frac{k_2[E_T][AN]}{k_m \left( 1 + \frac{[AB]}{k_{EA}} \right) + [AN]} \quad (4.8)$$

A equação de velocidade de desaparecimento de éster ( $v_{AB}$ ) é expressa por:

$$v_{AB} = \frac{k_2[E_T][AB]}{k_m \left( 1 + \frac{[AN]}{k_{AE}} \right) + [AB]} \quad (4.9)$$

em que:

$k_2$  = constante cinética de velocidade,

$[E_T]$  = concentração de enzima,

$[AN]$  = concentração de ampicilina,

$[AB]$  = concentração de éster,

$k_m$  = constante de Michaelis-Menten,

$k_{EA}$  = constante de inibição por éster,

$k_{AE}$  = constante de inibição por ampicilina.

A expressão para a velocidade de síntese de ampicilina ( $v_S$ ) é dada por:

$$v_S = v_{AB} T_{\max} X = \frac{k_2[E_T][AB]}{k_m \left( 1 + \frac{[AN]}{k_{AE}} \right) + [AB]} T_{\max} X \quad (4.10)$$

$T_{\max}$  é a fração do complexo acil-enzima-núcleo (núcleo = 6-APA) que percorreria a rota de síntese de ampicilina caso todos os sítios em que ocorre a reação estivessem já saturados de 6-APA (NH).  $X$  é a fração de sítios de enzima que tenham adsorvido o 6-APA (NH), dada por hipótese pela expressão:

$$X = \frac{[NH]}{k_{EN} + [NH]}$$

em que:

$[NH]$  = concentração de 6-APA,

$k_{EN}$  = constante de saturação.

Escolheu-se usar reator de leito fixo com refluxo total (Figura 2.14), pois este permitiu testar os efeitos de resistência externa ao transporte de massa. E também através deste modelo foi possível estimar teoricamente a mínima vazão de escoamento capaz de vencer totalmente a resistência ao transporte de massa externo. Isto foi necessário porque as duas resistências (interna e externa à partícula) estavam presentes. O valor da difusividade efetiva<sup>50,51</sup> usado para todas as moléculas presentes foi:  $D_{ef} = 6,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , valor obtido por correlação descrita em Ferreira, 1999<sup>50</sup>. Os coeficientes de dispersão axial foram encontradas de acordo com a Equação (4.4) para as diferentes vazões de trabalho (Tabela 4.13). Os resultados simulados mostraram que vazão de 15 mL/min forneceu o pico de concentração de ampicilina.

Tabela 4.13: Difusividades axiais calculadas e utilizadas na rotina computacional.

Vazões [mL/min]	10	15	30	45	60
Difusividade Axial [ $10^4 \text{ cm}^2/\text{s}$ ]	76	130	282	434	587

Nas sínteses experimentais realizadas, observou-se que a resistência ao transporte de massa externo era importante. Isto pode ser verificado na Figura 4.16, que mostra a velocidade de desaparecimento de EMFG para as diferentes vazões estudadas. Nesta situação foi assegurada a inexistência de resistência interna ao transporte de massa,<sup>21</sup> pois se utilizou sílica macroporosa com atividade enzimática de 6UI/gss. Verificou-se experimentalmente que para vazões acima de 15 mL/min a resistência externa ao transporte de massa havia sido eliminada, pois o perfil de desaparecimento de éster manteve-se o mesmo com a variação da vazão. Assim, pôde-se estimar o coeficiente de transporte de massa externo a partícula de sílica. Para analisar a influência do transporte de massa intrapartícula, diferentes atividades enzimáticas da sílica foram testadas: 6, 11, 20

e 37UI/gss. O resultado obtido para a vazão de 30mL/min é mostrado na Figura 4.17. Como já mencionado, <sup>21</sup> cargas enzimáticas acima de 20UI/gss apresentam atraso difusional intrapartícula.

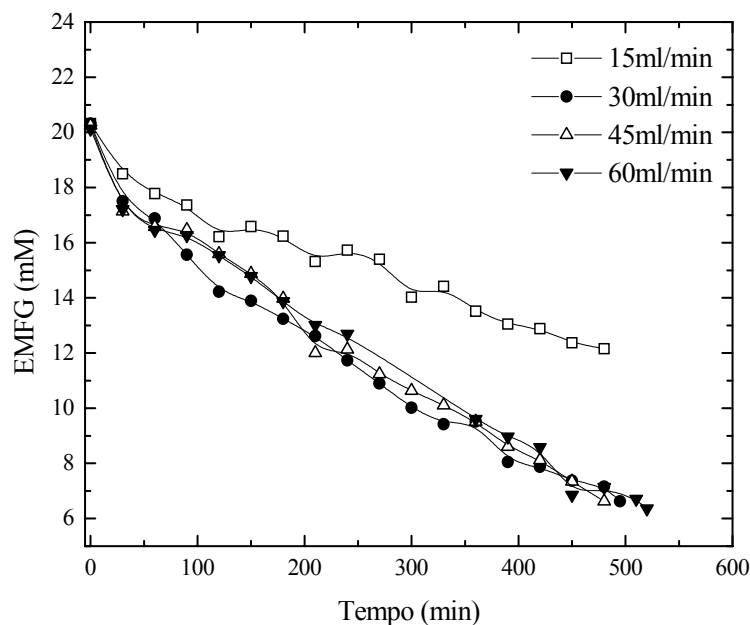


Figura 4.16: Perfis de concentrações de EMFG durante as sínteses de ampicilina com diferentes vazões ao longo do tempo. Concentrações iniciais de reagentes: 20mM. T = 25°C, carga enzimática de 6UI/gss e pH 6,5. As vazões foram 15, 30, 45 e 60mL/min.

Para o caso de líquidos escoando em leito fixo a baixos números de Reynolds, o coeficiente de dispersão (ou difusividade axial efetiva) é um parâmetro que aumenta com a vazão e, portanto, afasta o reator do comportamento ideal <sup>59</sup>. Assim, aproxima-o de um reator de mistura e, conseqüentemente, amortece a melhoria de seu desempenho ocorrida em virtude do aumento do parâmetro  $k_c$ . O modelo matemático foi desenvolvido para tratar de forma sistemática os transportes de massa envolvidos. Alguns testes numéricos foram realizados para analisar a influência do número de pontos de colocação ortogonal e do tamanho do intervalo de discretização por diferenças finitas utilizados no programa. A partir de dois pontos de colocação ortogonal e treze pontos de diferenças finitas os resultados do modelo já apresentavam variações

dentro da faixa de erro experimental. Portanto estes foram os valores assumidos nas simulações.

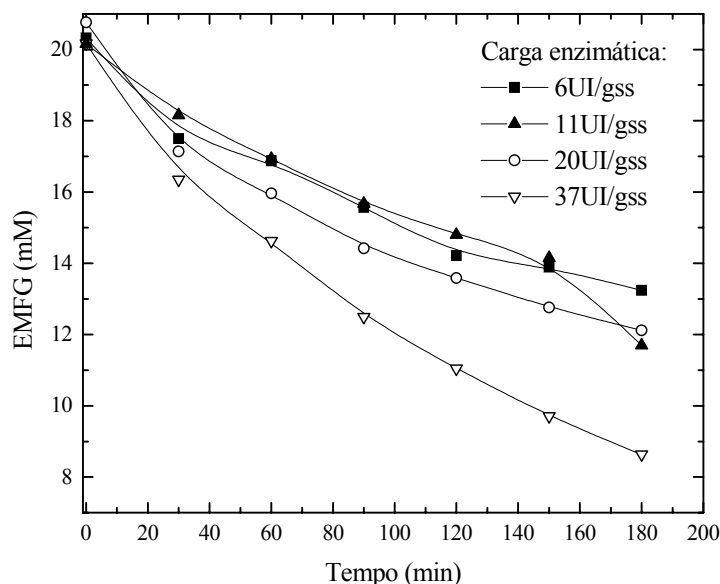


Figura 4.17: Perfis de concentrações de EMFG durante as sínteses de ampicilina com diferentes cargas enzimáticas ao longo do tempo. Concentrações iniciais de reagentes: 20mM.  $T = 25^{\circ}\text{C}$ , vazão de 30mL/min e pH 6,5. As cargas enzimáticas foram: 6, 11, 20 e 37UI/gss.

Foram realizados testes para verificar a sensibilidade do modelo frente aos parâmetros  $k_c$  (resistência externa) e  $D_{ax}$  (dispersão axial). Parâmetros cinéticos e difusividade efetiva nos poros do catalisador, já estimados em outros trabalhos do grupo, foram mantidos invariantes. A Figura 4.18 dá uma indicação da capacidade preditiva do modelo. A Figura 4.19 exemplifica uma simulação. Pode-se observar que o padrão da resposta do modelo é adequado. Pode-se observar que o perfil do modelo é subestimado, isso se deve a expressão de velocidade utilizada, que não é adequado quando as concentrações dos componentes se elevam ou quando as cargas enzimáticas são altas.



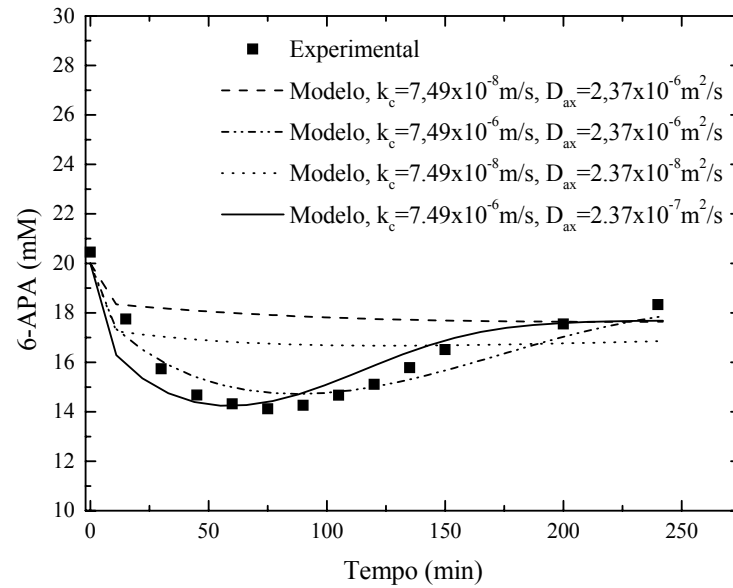


Figura 4.18: Teste de sensibilidade paramétrica do modelo. Atividade 120UI/g<sub>ss</sub>.  $V_{az}=25 \text{ mL/min}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$  e pH 6,5.

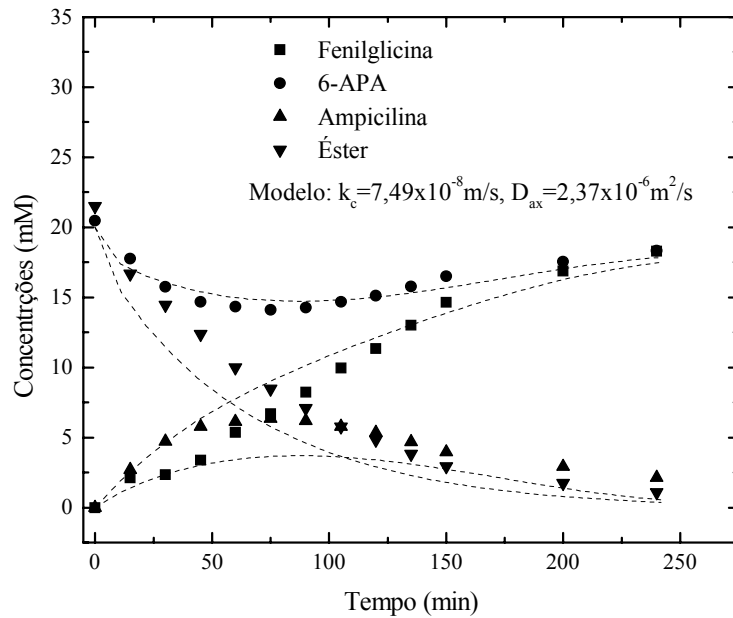


Figura 4.19: Exemplo de resultado da simulação do reator de leito fixo, com reciclo total. Atividade 120 UI/g<sub>ss</sub>.  $V_{az}=25 \text{ ml/min}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$  e pH 6,5.

#### 4.5 USO DE REDES NEURAIIS NA MODELAGEM CINÉTICA DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA

A síntese enzimática de ampicilina a partir de EMFG e 6-APA é um sistema de reações série-paralelo (com reações indesejadas de hidrólise de ampicilina e de EMFG). Um modelo mecanístico dessas três reações, levando em conta efeitos inibitórios e alostéricos de reagentes e/ou produtos, mostrou-se complexo, com número intratável de parâmetros cinéticos <sup>74</sup>. Simplificações desse modelo, diminuindo o número de parâmetros ajustáveis, não conseguiram representar os dados experimentais em toda faixa de interesse. Uma alternativa foi utilizar modelo híbrido-neural. Redes neurais artificiais (RNAs) foram treinadas para prever velocidades de reação, e por sua vez utilizadas nas equações de balanço de massa.

Há na literatura diferentes modelos cinéticos para as reações de síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, porém todos vêm acompanhados de numerosas simplificações. Paralelamente aos testes realizados com a sílica, resolveu-se avaliar o potencial das redes neurais para modelar a síntese enzimática de ampicilina. Nos ensaios selecionados para treinamento da rede neural foram os dados solúveis de concentração ao longo do tempo (sistema homogêneo). As concentrações são mostradas na Figura 4.21. Todos os experimentos de síntese a 25 °C foram realizados em batelada usando reator encamisado de 50 mL, sob agitação mecânica de pás. Nestes ensaios, utilizaram-se PGA imobilizada em gel de agarose como catalisador, pois, à época, os ensaios com o suporte sílica ainda não tinham sido finalizados e não se mostravam promissores.

Muitos fenômenos influenciam a velocidade de reações enzimáticas, tais como inibição/ativação por produtos e/ou reagentes. Nesta etapa do trabalho, aspectos do problema que são bem conhecidos serão descritos fenomenologicamente: assim, balanços de massa de cada reagente serão resolvidos, enquanto RNAs descrevem a cinética das reações. Um modelo híbrido-neural foi, portanto, desenvolvido para modelar a síntese de ampicilina.

#### 4.5.1 Treinamento da Rede Neural

Existem muitos parâmetros que controlam o desempenho e capacidade preditiva de uma RNA. A primeira etapa para utilização de RNAs é a escolha de sua estrutura. Escolheu-se uma rede do tipo “*feedforward*” com uma camada oculta, já que essa estrutura pode aproximar qualquer função contínua <sup>61</sup>. Escolheu-se, entre as configurações de redes neurais, a rede multicamadas (MLP, “multi-layer perceptrons”), usando para seu treinamento o algoritmo de retropropagação. A rede utilizada possui uma camada de entrada (concentração de substratos e produtos), uma camada oculta e uma camada de saída (velocidade de formação ou consumo dos produtos); empregou-se a função sigmoideal para ativação dos neurônios. A topologia da rede é mostrada na Figura 4.20.

Utilizou-se um treinamento estático para a rede, ou seja, o algoritmo não alterou a sua estrutura, variando apenas os valores dos pesos. A função-objetivo escolhida como critério de treinamento foi a soma do quadrado dos desvios entre os valores experimentais e simulados. O número de neurônios ( $\phi$ ) da camada oculta foi determinado por tentativa e erro, minimizando-se o erro na validação do modelo híbrido. Outro parâmetro a ser determinado foi o termo de momento ( $\alpha$ ), que, ao atualizar o vetor peso, pode contornar mínimos locais, além de acelerar o treinamento em regiões da superfície de erro com gradiente pequeno.

Foram selecionados 6 ensaios (para condições experimentais dos ensaios ver item 3.5.2) para serem usados no treinamento da rede. Os ensaios selecionados continham as combinações tidas como essenciais na elaboração da base de treinamento, dentro do domínio das concentrações estudado. A Figura 4.21 mostra esse domínio, com as concentrações em seu nível superior e inferior; o ponto central foi usado para validação da rede. Observando a Figura 4.21 vê-se que há uma diferença entre as concentrações iniciais de até seis vezes, por isso os dados de entrada e saída foram normalizados de acordo com a equação 4.8.

$$x_{i,norm} = \frac{x_i - x_{i,min}}{x_{i,max} - x_{i,min}} \quad (4.8)$$

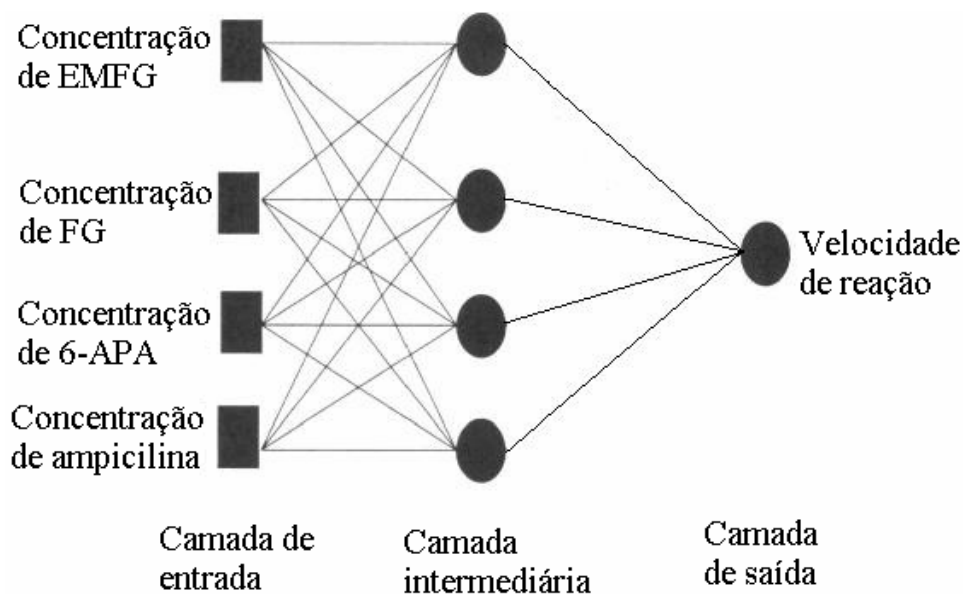


Figura 4.20: Topologia de rede neural MLP usada neste trabalho.

O número de neurônios da camada oculta é um parâmetro importante no desempenho de uma rede neural; entretanto, não há nenhum método universal para determinar seu ótimo. O uso de poucos neurônios limita a habilidade da rede para modelar o processo desejado. Já o uso de um número excessivo de neurônios permite maior liberdade para o ajuste de pesos, o que pode levar ao aprendizado do ruído (*overfitting*). Desta forma, o número ótimo de neurônios na camada oculta foi selecionado a partir da configuração com menor número de neurônios que minimizava a raiz do erro quadrático médio, RMS (“root mean-squares”). A Figura 4.22 mostra o gráfico do erro *versus* número de iterações para diferentes números de neurônios da rede, para  $v_{amp}$ . Foram escolhidos 15 neurônios para a camada oculta, com 10.000 iterações para treinamento. A taxa de aprendizado ( $\eta$ ) e o termo de momento ( $\alpha$ ) foram respectivamente 1,0 e 0,8. Utilizou-se a função sigmoideal para excitação dos neurônios.

As Figuras 4.23 e 4.24 mostram os resultados para as velocidades de produção de ampicilina e consumo de EMFG, obtidos após a fase de treinamento. Foram escolhidos 6 ensaios com 64 pares de  $(x, f(x))$ , em que  $x$  representa as concentrações de reagentes e produtos e  $f(x)$  a respectiva velocidade para o treinamento da RNA. Pode-se observar que a rede apresentou bom desempenho, pois os dados das velocidades estão bem dispersos entre os valores esperados e os valores calculados pela rede. Uma possível tendência para baixas velocidades,

com a rede superestimando seus valores, não deve acarretar consequências maiores para a simulação do reator, pois essa é região correspondente ao trecho final da batelada.

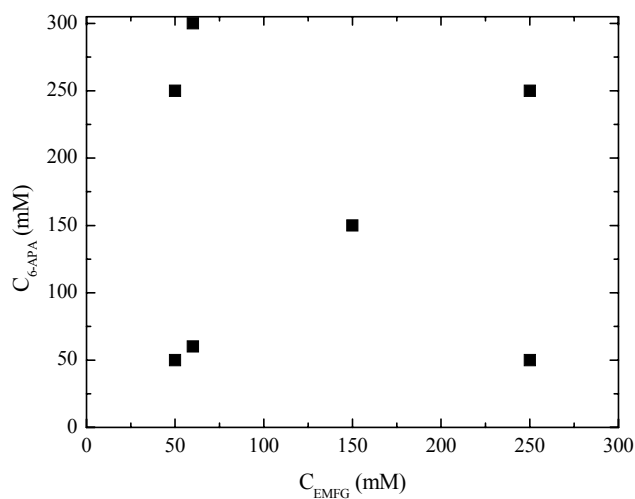


Figura 4.21: Domínio de treinamento da RNA para obtenção de modelo cinético da síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5. Concentrações iniciais de éster e 6-APA, para ensaios em batelada.

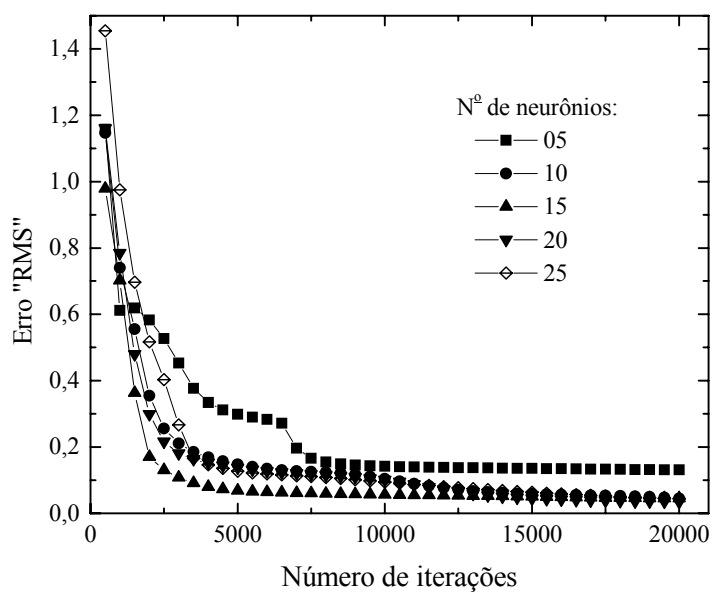


Figura 4.22: Comparação da raiz do erro quadrático médio (RMS) no treinamento de RNA para síntese de ampicilina com diferentes nº de neurônios. Todos os conjuntos de dados de treinamento foram considerados.

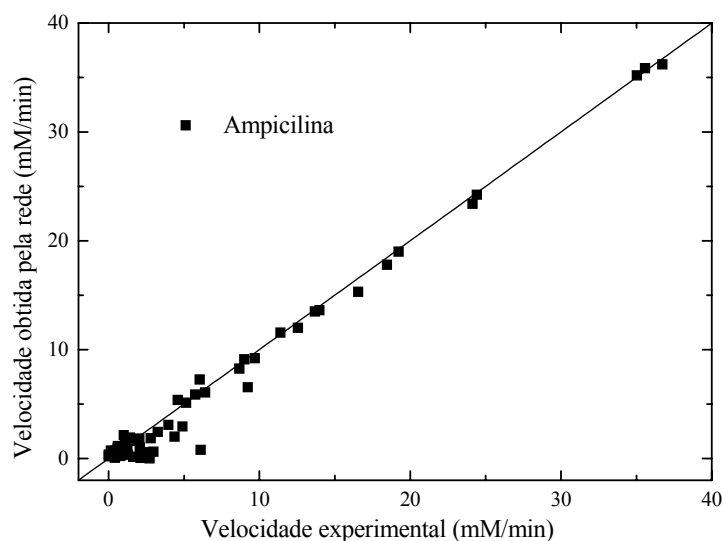


Figura 4.23: Teste da qualidade do ajuste da rede. Dispersão das velocidades de produção de ampicilina: experimental e simulada (RNA); base de dados utilizada no treinamento.

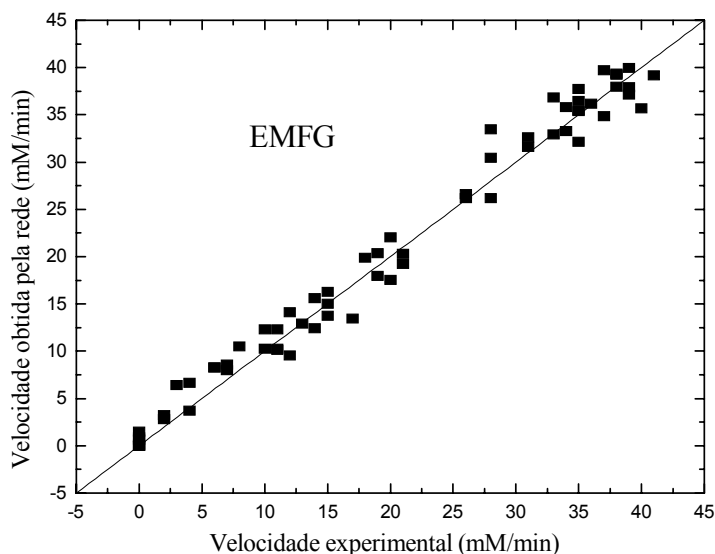


Figura 4.24: Teste da qualidade do ajuste da rede. Dispersão das velocidades de consumo de éster: experimental e simulada (RNA); base de dados utilizada no treinamento.

#### 4.5.2 Validação das Redes Neurais

Um conjunto experimental com 11 pares de  $(x, f(x))$  foi escolhido para a validação da RNA treinada. Este conjunto de pontos está dentro do domínio de treinamento da rede (ver Figura 4.21): concentrações iniciais de 150 mM. As

Figuras 4.25 e 4.26 ilustram a qualidade do ajuste dos experimentos de validação, lembrando que os dados de validação não foram usados no treinamento da RNA. Pode-se observar leve tendência para superestimar a velocidade de desaparecimento do éster. Veremos, a seguir, se esse fato degrada a predição do comportamento do reator.

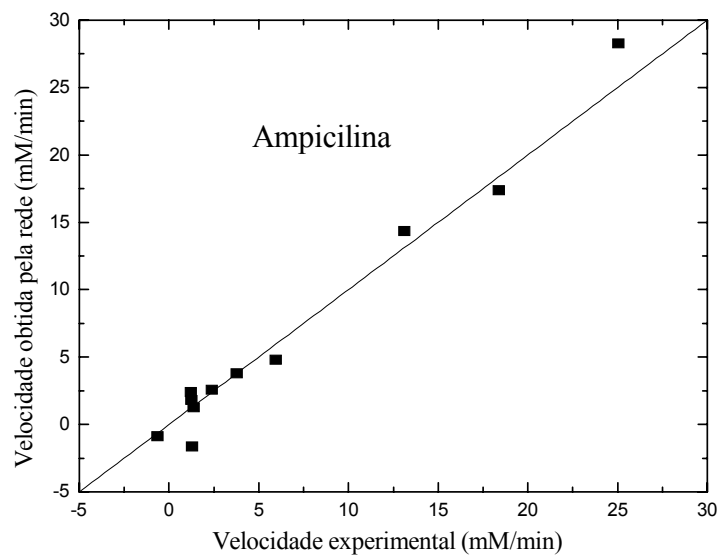


Figura 4.26: Dispersão das velocidades de produção de ampicilina: Ensaio de validação.

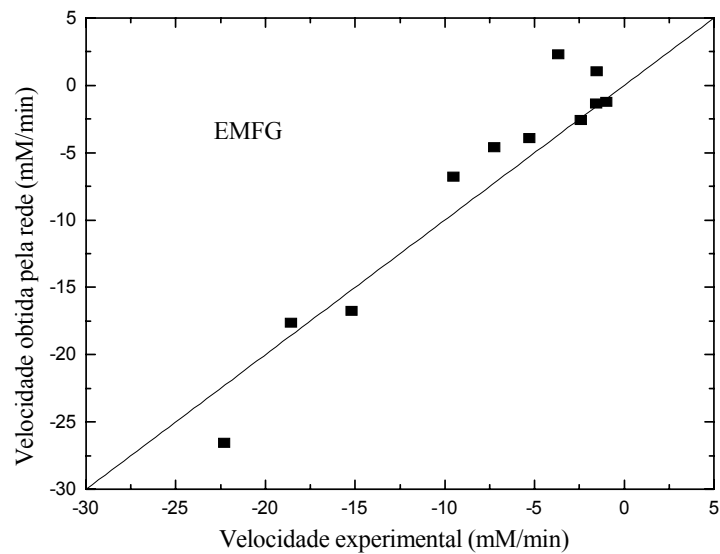


Figura 4.25: Dispersão das velocidades de hidrólise do EMFG: Ensaio de validação.

### 4.5.3 Modelo Híbrido-Neural

No modelo híbrido considerou-se que as RNAs estimam a velocidade de desaparecimento de EMFG,  $v_{EMFG} = v_S + v_{h1}$  e velocidade global de formação de ampicilina,  $v_{Amp} = v_S - v_{h2}$  (ver Fig. 2.13). Com duas velocidades de reação, o sistema está determinado. O objetivo foi modelar a cinética inerente de reação e não a cinética de precipitação (em alguns ensaios houve precipitação de produtos). Assim, as velocidades basearam-se nas concentrações em fase líquida. Quando os produtos alcançavam seus limites de solubilidade, admitia-se que a precipitação fosse instantânea, sem supersaturação.

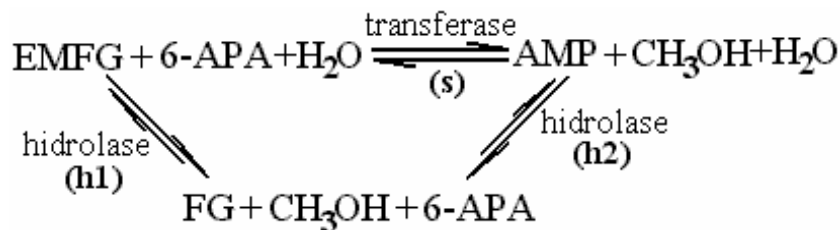


Figura 2.13: Reações envolvidas na síntese enzimática de ampicilina a partir de EMFG.

As redes foram treinadas com dados de velocidades, obtidas a partir da diferenciação de curvas concentração  $\times$  tempo de ensaios em batelada. O modelo híbrido é composto pelas seguintes equações de balanço de massa:

$$\frac{dC_{EMFG}}{dt} = -v_{EMFG} \quad (4.12)$$

$$\frac{dC_{AMP}}{dt} = v_{AMP} \quad (4.13)$$

$$C_{6\text{-APA}} = C_{6\text{-APA}}^{inic} - C_{AMP} \quad (4.14)$$

$$C_{FG} = C_{EMFG}^{inic} - C_{EMFG} - C_{AMP} \quad (4.15)$$

As equações 4.12 a 4.15 foram resolvidas numericamente.

A Figura 4.27 mostra o resultado obtido pelo modelo híbrido-neural para síntese de ampicilina em batelada com concentração inicial de 6-APA de 250 mM e concentração inicial de EMFG de 250 mM. A Figura 4.28 também mostra o resultado da simulação para concentração inicial de EMFG de 60 mM e concentração inicial de 6-APA de 300 mM, situação essa em que o 6-APA está próximo ao seu limite de solubilidade. A condição de síntese da Figura 4.28



(excesso de 6-APA) faz com que a seletividade da ampicilina em relação ao EMFG seja elevada, diminuindo, assim, a perda de EMFG para a reação de hidrólise (h1, Figura 2.13). A Figura 4.29 indica o resultado para o ponto de 150/150 mM, condição usada para validação da RNA. O modelo híbrido apresentou bom desempenho em todas as situações testadas, indicando a condição que favorece produção de ampicilina com menor perda de reagentes nas reações laterais.

Examinando-se a Figura 4.29, uma interessante característica do modelo se evidencia. Os últimos pontos experimentais deste ensaio específico apresentaram um erro sistemático; o balanço de massa não fecha, pois as concentrações experimentais de EMFG estão claramente superestimadas. O modelo híbrido, entretanto, obedece a estequiometria e, as velocidades previstas pelas RNAs permitiram que o comportamento qualitativo de um sistema “sem erros” fosse reproduzido. Assim, a Figura 4.29 na verdade pode ser encarada como um teste de consistência, que detectou uma falha nas medições. Sob esse aspecto, o resultado obtido foi excelente.

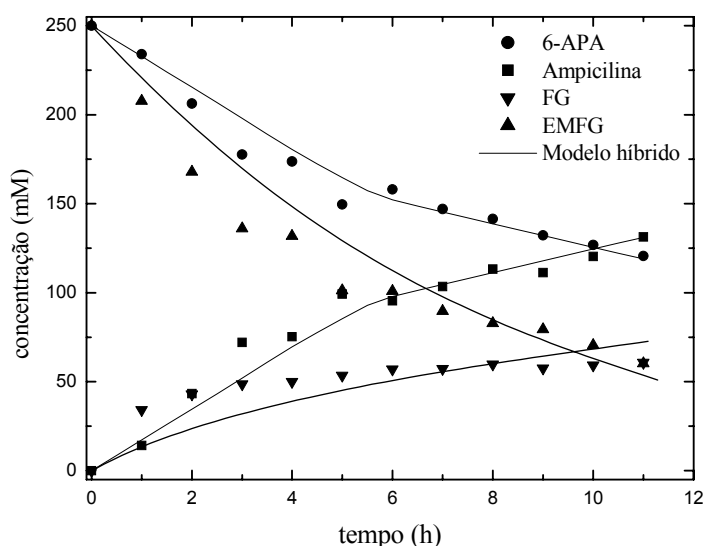


Figura 4.27: Modelo híbrido para síntese de ampicilina,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5$ .

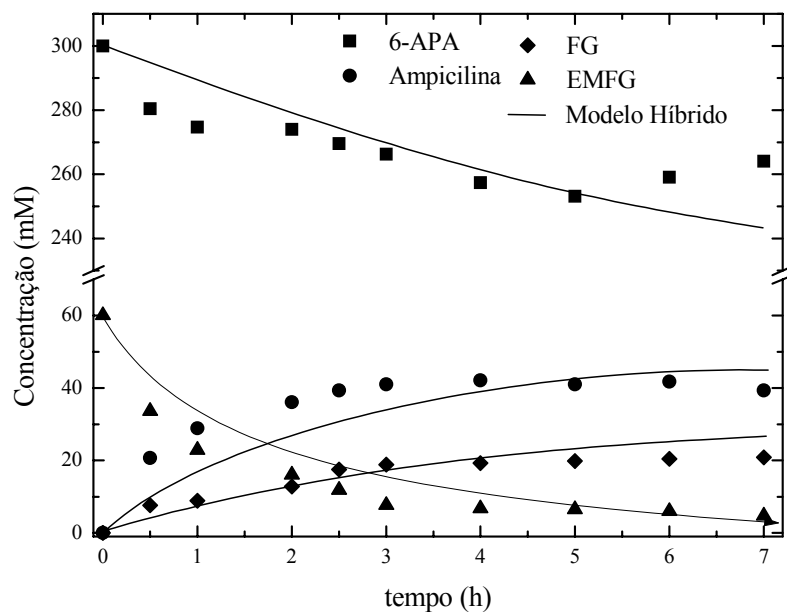


Figura 4.28: Modelo híbrido para síntese de ampicilina,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5$ .

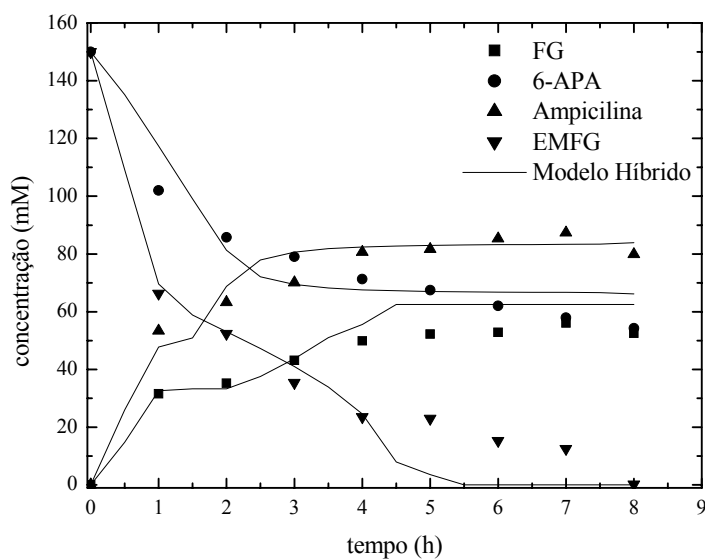


Figura 4.29: Validação do modelo híbrido para síntese de ampicilina,  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5$ .

Durante a realização dos ensaios que seriam usados para o treinamento da rede neural ocorreu a precipitação do antibiótico e da FG no meio reacional.

Inicialmente o trabalho experimental foi aumentado, pois para medir a concentração do meio tomavam-se duas amostras em um único tempo. Com uma amostra se media a concentração total do meio e a outra era filtrada e então se media a concentração da parte solúvel; assim, por diferença, obtinha-se a concentração de ampicilina precipitada. Após a realização dos cálculos de seletividade, rendimento e produtividade, viu-se que a precipitação do antibiótico era um resultado interessante para a reação de síntese, já que todo antibiótico precipitado não estava envolvido na reação homogênea e não estava sofrendo hidrólise. Portanto, um aumento do rendimento e seletividade da reação foi alcançado. O uso do leito fixo com a PGA imobilizada em sílica, nesta etapa do trabalho não se mostrou conveniente, pois neste ponto era interessante investigar as regiões nas quais se pudesse precipitar a maior massa de antibiótico possível. E em um leito fixo, a precipitação dos produtos acarretaria problemas de percolação e aumentaria a perda de carga no leito, além de inviabilizar a separação do produto sólido diretamente do reator. Assim, o estudo da síntese de ampicilina em leito fixo foi finalizado.

Outro aspecto importante a ser destacado para o suporte sílica é que não se conseguiu imobilizar altas cargas de enzima. Várias cargas enzimáticas foram testadas, varreram-se cargas de 5 a 200 UI/gss e os resultados de sucesso são mostrados na Tabela 4.12. Esses derivados comparados aos derivados de gel de agarose mostraram-se bem inferiores, já que se conseguiu imobilizar cargas de até 400 UI/g<sub>gel</sub> na agarose. A sílica imobilizou no máximo 120 UI/gss, embora atrasos difusionais tenham sido detectados em ambos suportes<sup>21,51</sup>. Além disso, a estabilidade da sílica foi muito inferior à estabilidade alcançada com o gel de agarose. E a perda de atividade enzimática é um fator econômico muito importante para a viabilização da produção enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

#### 4.6 SÍNTESE DE AMPICILINA COM ALTA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE REAGENTES EM REATOR DE MISTURA

Lembremos que a síntese enzimática cineticamente controlada de ampicilina foi realizada a partir de éster metílico de fenilglicina (EMFG) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). O uso de EMFG para acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico, 6-APA, resulta num sistema reativo série-paralelo, cujas reações indesejadas de hidrólise (do EMFG e do antibiótico) ocorrem simultaneamente à de formação do antibiótico (ver Figura 2.13). Após a realização de ensaios que variavam diversas condições experimentais como estratégia para aumentar o rendimento, seletividade e produtividade da síntese de ampicilina, passou-se a estudar uma estratégia complementar. Para minimizar a perda por hidrólise do EMFG e do antibiótico, foram realizados experimentos com diferentes concentrações iniciais dos reagentes altas o suficiente para que houvesse precipitação de ampicilina. Com isso, seria reduzida sua hidrólise, e aumentado o rendimento de síntese.

Todos os experimentos de síntese a 25 °C foram realizados em batelada usando reator encamisado de 50 mL, sob agitação mecânica de pás. Para analisar a concentração do meio reacional, um filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  foi usado para separar a amostra solúvel (sistema homogêneo) do meio reacional (heterogêneo). Utilizou-se PGA imobilizada em gel de agarose como catalisador. O derivado tinha carga enzimática de 45 UI/g<sub>gel</sub>. A Tabela 4.14 mostra os resultados obtidos para o rendimento de síntese, seletividade e produtividade. Em que:

$$R = \frac{C_{amp}^{\max}}{C_{6-APA}^{\text{inicial}}} \quad (4.1)$$

$$P = \frac{C_{amp}^{\max}}{t_{\max}} \quad (4.2)$$

$$S = \frac{C_{amp}}{C_{FG}} \quad (4.3)$$

Tabela 4.14: Resultado dos ensaios realizados em diferentes concentrações iniciais de reagentes

$C_{EMFG}$ (mM)	$C_{6-APA}$ (mM)	R (%)	S	$P \times 10^3$ (mM/min)
250	250	52,5	2,16	199,0
50	50	41,4	2,40	49,4
250	50	79,3	0,74	110,1
50	10	29,7	0,09	8,2
50	250	14,2	4,07	98,4
60	300	10,3	3,90	94,5

Pode-se observar que, ao se aumentarem as concentrações iniciais dos reagentes, mantendo-se a mesma proporção 6-APA/EMFG; rendimento, produtividade e seletividade aumentaram consideravelmente. Esses resultados direcionaram o trabalho de modo que a síntese de ampicilina fosse maximizada com vista numa produção em escala industrial. As Figuras 4.30 a 4.32 mostram os gráficos das concentrações totais de alguns ensaios. A Figura 4.30 também mostra a evolução da ampicilina e FG cristalizadas.

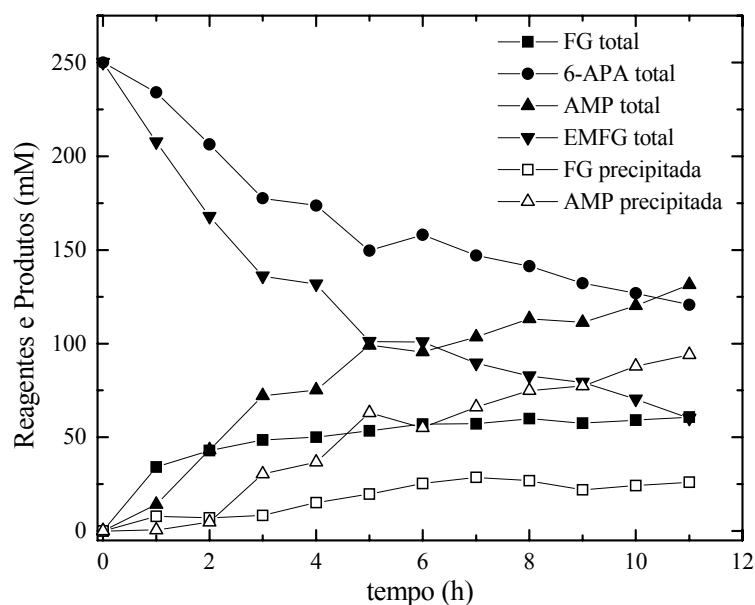


Figura 4.30: Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5,  $C_{inicial}$  de 6-APA = 250mM,  $C_{inicial}$  de EMFG = 250mM.

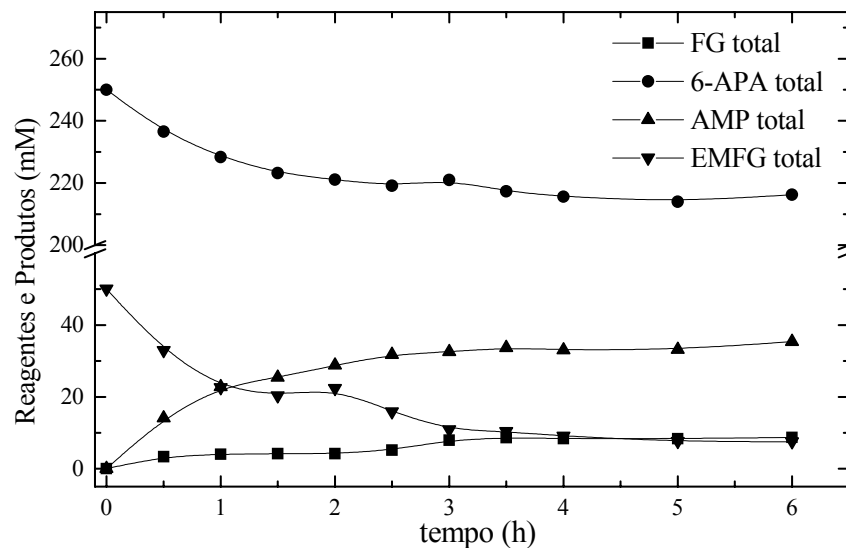


Figura 4.31: Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25°C, pH 6,5,  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA = 250mM,  $C_{\text{inicial}}$  de EMFG = 50mM.

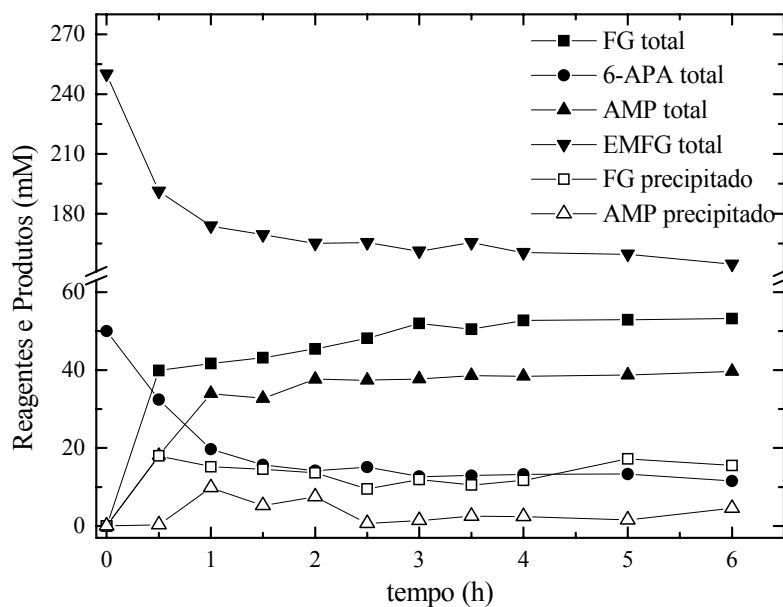


Figura 4.32: Síntese de ampicilina catalisada por PGA imobilizada em agarose a 25 °C, pH 6,5,  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA = 50 mM,  $C_{\text{inicial}}$  de EMFG = 250 mM.

A partir dos ensaios em que o antibiótico precipitava no meio reacional, outro aspecto da produção de ampicilina mostrou-se importante: era necessário aumentar a produtividade da reação. Resolveu-se aumentar a um máximo possível

a carga enzimática dentro do suporte; assim, ter-se-ia uma maior quantidade de enzima por volume de reator. Para isso, derivados com alta carga enzimática foram produzidos.

#### 4.7 ATIVIDADE DO BIOCATALISADOR DE ALTA CARGA ENZIMÁTICA

Devido à alta concentração de reagentes e produtos no meio reacional (eventualmente em estado sólido), um biocatalisador conveniente foi desenvolvido <sup>64</sup> para permitir uma fácil separação dos cristais da enzima imobilizada, pois durante os ensaios em que houve a precipitação do antibiótico. Observou-se que ampicilina sólida ficava dentro das partículas do derivado, e sua retirada de dentro do gel de agarose era lenta e ainda fragilizava as partículas de agarose. Além disso, o antibiótico que ficava dentro do derivado era mais uma perda de rendimento de síntese.

Tabela 4.15: Atividade enzimática do sobrenadante na imobilização da PGA.

Tempo de imobilização (h)	Atividade do sobrenadante (UI)
0,0	400,5
1,0	256,5
2,0	182,3
4,0	53,3
6,0	15,0
7,0	11,0
7,5	1,02

Gel de agarose foi tratado adequadamente e nele imobilizou-se a PGA com uma carga de 400 UI/ggel. O método de imobilização seguiu o item 3.3 e a Tabela 4.15 mostra os resultado da imobilização. Foram necessárias aproximadamente oito horas para que a concentração enzimática na solução sobrenadante fosse

desprezível. Após a imobilização, tinha-se um derivado (lembrando: PGA + suporte) com carga enzimática teórica de 400 UI/ggel. Após todo tratamento de lavagem e armazenamento do derivado, mediu-se sua atividade pelo método PDAB (item 3.4). Utilizaram-se três amostras do derivado e elas apresentaram atividade de 241, 244 e 266 UI/ggel portanto, o derivado apresentou uma atividade aparente de 250 UI/ggel. Desejava-se obter um derivado com carga enzimática a mais alta possível para que, após o tratamento realizado com pectina para aumentar sua estabilidade, ainda fosse mantido um biocatalisador com carga enzimática razoavelmente alta. Com este trabalho foi desenvolvida a patente <sup>64</sup>.

Com esse novo biocatalisador testado e armazenado, iniciou-se um conjunto de ensaios de síntese de ampicilina. Após cada ensaio a atividade deste biocatalisador foi medida. Foram realizados seis ensaios, que tinham duração entre dez e doze horas. Após um total de mais de 60 horas de operação com o mesmo biocatalisador, este não sofreu qualquer desativação, nem a integridade das partículas foi afetada pela cristalização dos produtos ou pela agitação do reator. Esse biocatalisador foi armazenado por aproximadamente um mês e em seguida, realizaram-se mais dois ensaios: uma síntese de treze horas com alimentação intermitente dos dois reagentes sólidos; testou-se a atividade do derivado antes e depois desta síntese e não se observou perda de sua atividade. Outro ensaio foi uma síntese com duração de vinte e oito horas. Após esta síntese a atividade do derivado foi testada e se verificou que ela estava um pouco maior que a atividade anterior. Ao se analisar as partículas do biocatalisador, observou-se (o biocatalisador tem diâmetro médio de  $0,25 \text{ cm} \pm 0,06$ ) que algumas delas estavam rompidas. Assim, explica-se o porquê da maior atividade deste derivado após esse ensaio. Como o suporte recebeu uma alta carga enzimática, muitas enzimas não eram alcançadas durante a reação, e quando essas partículas foram rompidas mais enzimas puderam entrar em contato com o substrato para reagir. A maioria das partículas do biocatalisador estava intacta; assim tentou-se separá-las com pinça, porém esta tarefa mostrou-se infrutífera, pois a atividade medida do derivado ainda era superior à atividade medida antes do ensaio de síntese. Observou-se que algumas das pequeninas partículas rompidas ainda estavam juntas das outras não rompidas; isso se deveu ao fato do biocatalisador ficar em



solução sendo muito difícil separá-lo com pinça ou com peneira. Esse biocatalisador mostrou-se muito estável durante todos os ensaios de síntese realizados. Só apresentou desgaste após drástico ensaio de 28 horas ininterruptas em que houve a precipitação dos produtos e a adição de reagentes sólidos.

Análises da estrutura desses biocatalisadores foram realizadas utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 4.33 mostra um exemplo do biocatalisador antes e após ensaios de síntese. Pode-se observar que o biocatalisador manteve sua estrutura bem definida. Teve-se uma certa dificuldade para determinar a melhor técnica para desidratação da amostra. A técnica usada na análise mostrada nesta Figura está detalhada no Apêndice D.

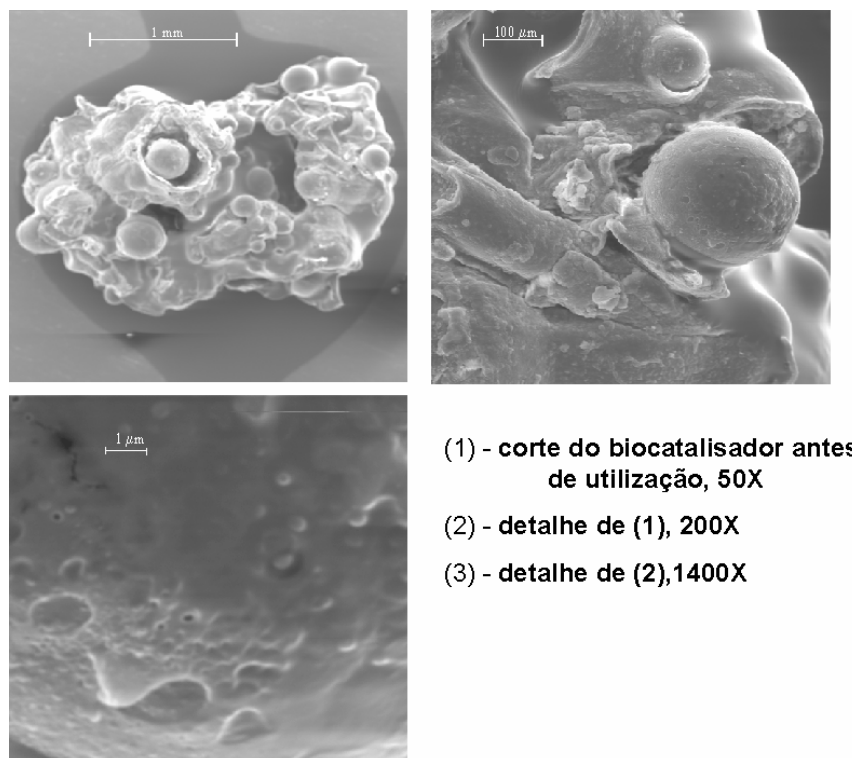
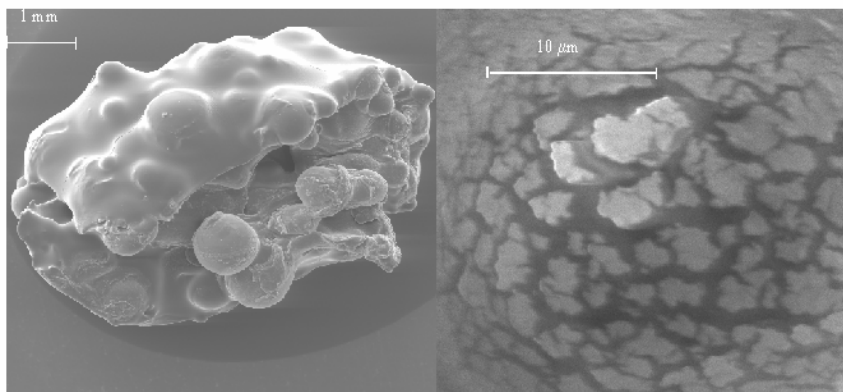


Figura 4.33 (A): Corte do biocatalisador logo após ser preparado, antes de ser utilizado em sínteses.



(1) - corte do biocatalisador após utilização, 50X  
 (2) - detalhe de (1), 3500X

Figura 4.33 (B): Corte do biocatalisador após ser utilizado em sínteses.

A estrutura do biocatalisador é altamente porosa e ele é armazenado em meio aquoso. Para se fazer análise de MEV é necessário a retirada de toda essa água, porém sem quebrar a estrutura do biocatalisador. A técnica utilizada mostrou-se satisfatória, porém requer várias etapas e faz uso de muitos reagentes químicos. Uma nova técnica foi testada (também no Apêndice D) e se mostrou muito mais simples já que não utilizou reagente químico para desidratação da amostra. Primeiro resfriou-se a amostra a 5 °C, em seguida em congelador e por último a -30 °C em ultrafreezer. A amostra foi para um liofilizador que sob essas condições retirou-se água da amostra sem destruir sua estrutura.

Testes com outra enzima, doada pela empresa Prodotti Laboratório Farmacêutico Ltda da cidade de São Paulo, foram realizados e os resultados com as atividades antes e após utilização são mostrados na tabela 4.16. A enzima já estava imobilizada em material inerte, sua atividade foi medida pelo método PDAB e apresentou atividade de 335UI/g. Do mesmo modo, desejava-se obter um derivado com carga enzimática a mais alta possível e que ao mesmo tempo sua resistência e estabilidade fossem aumentadas. Com esse derivado testado e armazenado iniciou-se um conjunto de ensaios de resistência e estabilidade. Testaram-se diferentes concentrações e proporções de pectina/enzima imobilizada. Também foi analisado o diâmetro do biocatalisador formado. Como era de se esperar, ao se diminuir o tamanho das partículas, aumentou-se a área superficial e a atividade do biocatalisador. O catalisador de partícula grande tem diâmetro médio de  $2,48 \text{ mm} \pm 0,06$  e o de partícula pequena tem  $1,06 \text{ mm} \pm 0,07$ .

Biocatalisadores com diâmetro de partícula diferente também foram testados e os dois resultados mais representativos estão mostrados na Tabela 4.16. Com esse derivado testado e armazenado, iniciou-se um conjunto de ensaios de síntese de ampicilina. Após cada ensaio a atividade do derivado foi medida e este não sofreu desativação, nem a integridade das partículas foi afetada pela cristalização dos produtos ou pela agitação do reator.

Tabela 4.16: Atividade da enzima doada da indústria pré e pós-tratamento,  $\phi$  é o diâmetro do derivado (enzima + suporte).

Enzima imobilizada	Enzima pós-pectina de $\phi = 2,48$	Enzima pós-pectina de $\phi = 1,06$
314,58 UI/g	81,45 UI/g	126,90 UI/g
337,66 UI/g	67,42 UI/g	115,32 UI/g
353,66 UI/g	71,59 UI/g	120,61 UI/g
<b>335 UI/g <math>\pm</math> 20</b>	<b>74 UI/g <math>\pm</math> 7</b>	<b>121 UI/g <math>\pm</math> 6</b>

#### 4.8 SÍNTESE DE AMPICILINA EM REATOR EM VÓRTICES

Após a realização dos ensaios de síntese com concentração inicial alta dos reagentes, vista na seção 4.6, realizaram-se ensaios em reator em vórtices com o objetivo de integrar a síntese de ampicilina com a separação do produto e adequar o uso do novo biocatalisador, o que implicou trabalhar em condições reacionais em que a solubilidade do antibiótico fosse a mais baixa possível. Os resultados obtidos indicaram que em valores de pH menores, o desempenho do reator integrado era melhor. Por outro lado, é importante ressaltar que o melhor valor de pH é um balanço entre a solubilidade da ampicilina e a atividade da enzima. Os ensaios mostrados a seguir foram realizados em pH 6,5 e 7,5 e nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.

Resultados obtidos em nosso grupo de trabalho mostraram que em pH 6,5 a ampicilina é ligeiramente mais solúvel que FG. A solubilidade da ampicilina aumenta com o pH, este comportamento pode ser explicado pelos valores dos pKs (grupo ácido 2,66 e grupo amino 7,24 e ponto isoelétrico 4,95). Portanto, acima

do seu ponto isoelétrico, as moléculas de ampicilina com carga neutra (forma mais insolúvel) decrescem, levando a valores de solubilidade mais altos. Este efeito torna-se mais importante em valores de pH acima de 7,0. O efeito da temperatura na solubilidade também foi investigado pelo grupo. Observou-se que a solubilidade da ampicilina decrescia ligeiramente a 4°C, mas não o suficiente para justificar operar o reator com produtividade baixa. Esses valores de solubilidade são importantes para balancear menor solubilidade do antibiótico e, ao mesmo tempo, melhor rendimento e seletividade da reação.

A Tabela 4.17 mostra os resultados dos diferentes experimentos. Nela, os valores de produtividade (P), S/H, tempo de reação e razão EMFG/6-APA podem ser comparados em dois diferentes instantes de reação: o ponto máximo de produtividade e o ponto de concentração máxima de ampicilina. Os resultados da seção 4.6 indicaram que razões baixas entre EMFG e 6-APA favoreceriam a seletividade da reação. Este comportamento sugere um mecanismo de reação em que a ocorrência da síntese necessitaria da adsorção prévia do 6-APA na enzima. Quando o complexo acil-enzima é formado antes da adsorção do anel  $\beta$ -lactâmico, a transferência do grupo acil ocorreria para água, e a reação de hidrólise do EMFG aconteceria. Com base nestas conclusões, ensaios em batelada alimentada, minimizando a razão EMFG/6-APA foram tentados, na mesma temperatura e pH (25 °C and pH 6,5), ver Figura 4.34 e comparar com Figura 4.30. O desempenho do reator foi melhorado, como mostram os dados da Tabela 4.17. Produtividade e seletividade aumentaram, e as concentrações de ampicilina alcançaram 270mM no reator.

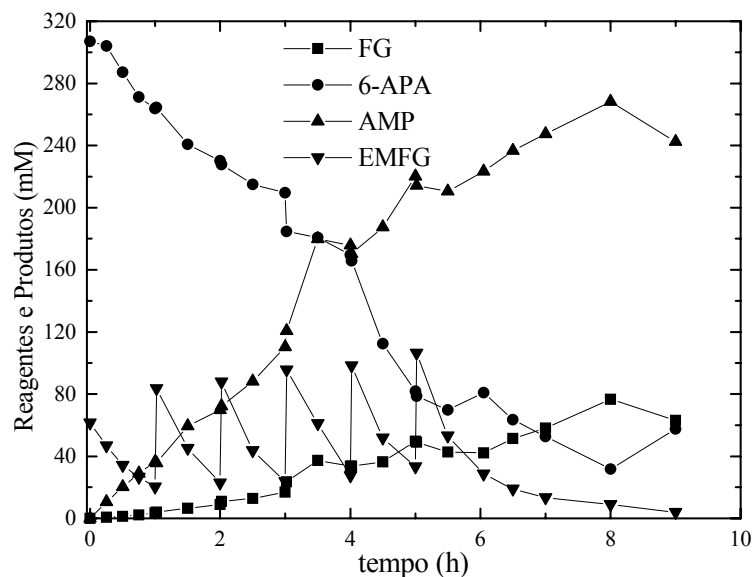


Figura 4.34: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25°C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300 mM e EMFG, 60 mM. Adição só de um substrato (EMFG).

Já que a enzima é imobilizada em um suporte poroso, espera-se que ocorra um gradiente de pH no interior do biocatalisador. Em pH 7,5 velocidades de reação mais altas são esperadas, mas a seletividade seria prejudicada. Entretanto, o pH no centro do catalisador seria mais baixo que o pH do meio reacional. Assim, realizaram-se ensaios em pH 7,5 apesar de os resultados do planejamento indicarem um menor rendimento neste pH (ver Tabela 4.17). Os resultados mostraram que a compensação do gradiente de pH intrapartícula não foi efetiva.

Outra tentativa para melhorar o desempenho do reator foi diminuir ainda mais a razão EMFG/6-APA (para 0,08 em  $t = 0$ ) com ambos reagentes sendo alimentados no reator. Um resultado típico, a 25°C e pH 6,5, é mostrado na Figura 4.35. Um ligeiro aumento na produtividade pode ser observado, de 0,86 mM/min para 0,90 mM/min (ver Tabela 4.17). Ocorreu uma queda na seletividade ( $S/H = 4,82$  quando  $EMFG/6-APA = 0,20$  em  $t = 0$ , e  $S/H = 3,69$  quando  $EMFG/6-APA = 0,08$ , calculado no ponto de produtividade máxima), mas esta condição forneceu o mais alto valor de concentração de ampicilina: 300 mM. Os diferentes tipos de alimentação adotados neste trabalho tiveram como objetivo manter a velocidade

de produção de ampicilina constante, prevendo uma produção em escala industrial.

Tabela 4.17: Desempenho do reator integrado para a síntese enzimática de ampicilina em diferentes condições operacionais.

		pH 6,5	pH 7,5
Batelada	T=25°C EMFG/6-APA <sub>0</sub> = 250/250=1,00 <sup>a</sup>	Condição de máxima produtividade (5h): P = 0,33 S/H = 1,86 EMFG/6-APA = 0,68	---
		Condição de concentração máxima de AMP (11h): P <sub>max</sub> = 0,20 S/H <sub>max</sub> = 2,18 EMFG/6-APA <sub>max</sub> = 0,50	---
Batelada alimenta: EMFG	T=20°C EMFG/6-APA <sub>0</sub> = 25/300=0.08 <sup>a</sup>	Condição de máxima produtividade (5h): P = 0,52 S/H = 4,50 EMFG/6-APA = 0,41	Condição de máxima produtividade (3,5h): P = 0,53 S/H = 3,210 EMFG/6-APA = 0,26
		Condição de concentração máxima de AMP (10h): P <sub>max</sub> = 0,45 S/H <sub>max</sub> = 3,56 EMFG/6-APA <sub>max</sub> = 0,13	Condição de concentração máxima de AMP (7,5h): P <sub>max</sub> = 0,39 S/H <sub>max</sub> = 3,21 EMFG/6-APA <sub>max</sub> = 0,02
Batelada alimenta: EMFG e 6-APA	T=25°C EMFG/6-APA <sub>0</sub> = 60/300=0.20 <sup>a</sup>	Condição de máxima produtividade (3,5h): P = 0,86 S/H = 4,82 EMFG/6-APA = 0,33	Condição de máxima produtividade (2,5h): P = 0,76 S/H = 2,32 EMFG/6-APA = 0,18
		Condição de concentração máxima de AMP (8h): P <sub>max</sub> = 0,56 S/H <sub>max</sub> = 3,50 EMFG/6-APA <sub>max</sub> = 0,28	Condição de concentração máxima de AMP (4h): P <sub>max</sub> = 0,51 S/H <sub>max</sub> = 1,48 EMFG/6-APA <sub>max</sub> = 0,04
Batelada alimenta: EMFG e 6-APA	T=25°C (EMFG/6- APA) <sub>0</sub> = 25/300=0.08 <sup>a</sup>	Condição de máxima produtividade (4h): P = 0,90 S/H = 3,69 EMFG/6-APA = 0,11	Condição de máxima produtividade (1,5h): P = 0,55 S/H = 1,26 EMFG/6-APA = 0,02
		Condição de concentração máxima de AMP (7h): P <sub>max</sub> = 0,71 S/H <sub>max</sub> = 1,75 EMFG/6-APA <sub>max</sub> = 0,04	Condição de concentração máxima de AMP (2,5h): P <sub>max</sub> = 0,43 S/H <sub>max</sub> = 0,93 EMFG/6-APA <sub>max</sub> = 0,03

<sup>a</sup> Condições em t = 0h

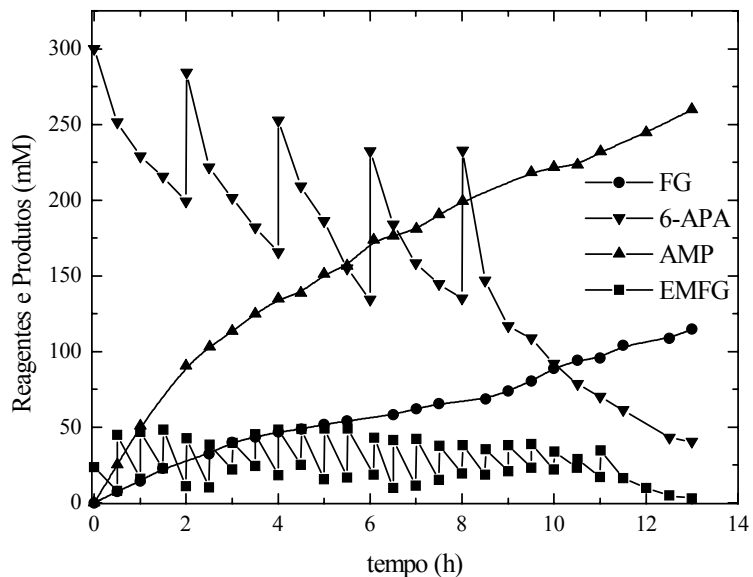


Figura 4.35: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25°C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300mM e EMFG, 25mM. Adição de 6-APA e EMFG.

Quando as sínteses foram realizadas a 20 °C, as velocidades de reação obviamente foram mais lentas. Isso, eventualmente, poderia ser compensado por um aumento na seletividade da reação, porém não foi o caso. Como mostra a tabela 4.16, a temperatura não afetou significativamente os valores de S/H. As Figuras 4.36 e 4.37 ilustram os ensaios realizados no pH 7,5 com os diferentes tipos de alimentação. As Figuras 4.38 e 4.39 mostram os ensaios realizados a 20 °C com o pH 7,5 e 6,5 respectivamente.

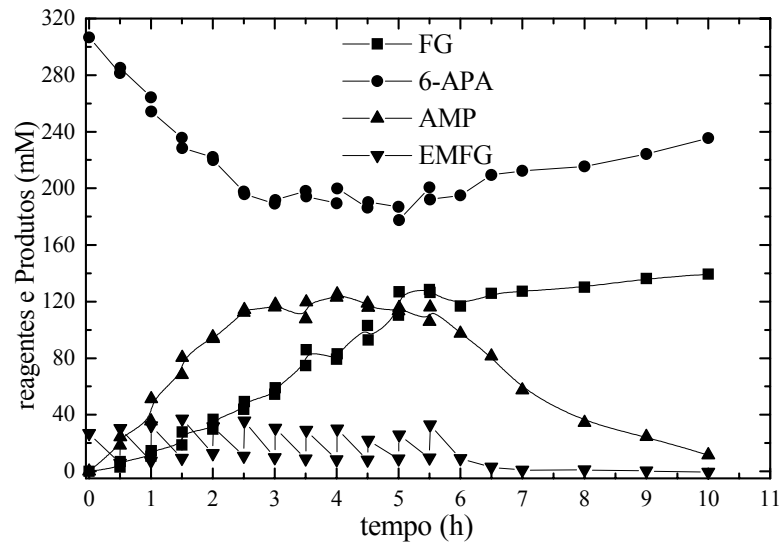


Figura 4.36: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25 °C e pH 7,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300 mM e EMFG, 25 mM. Adição de EMFG.

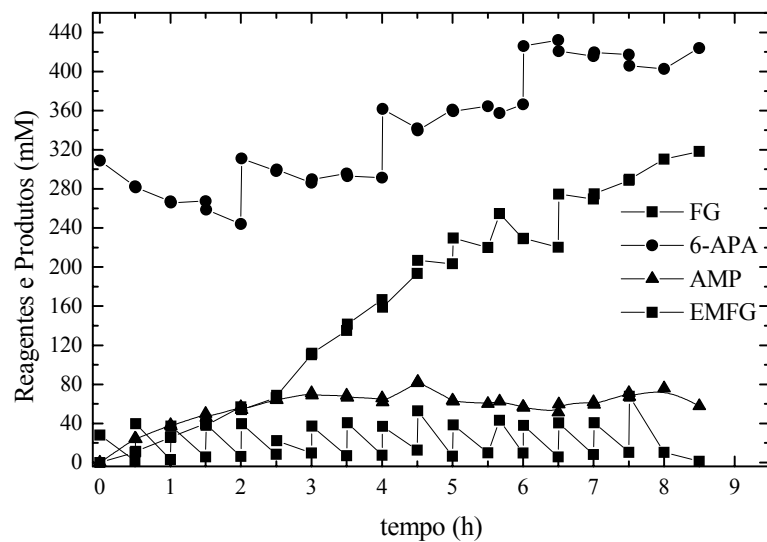


Figura 4.37: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25 °C e pH 7,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300 mM e EMFG, 25 mM. Adição de 6-APA e EMFG.



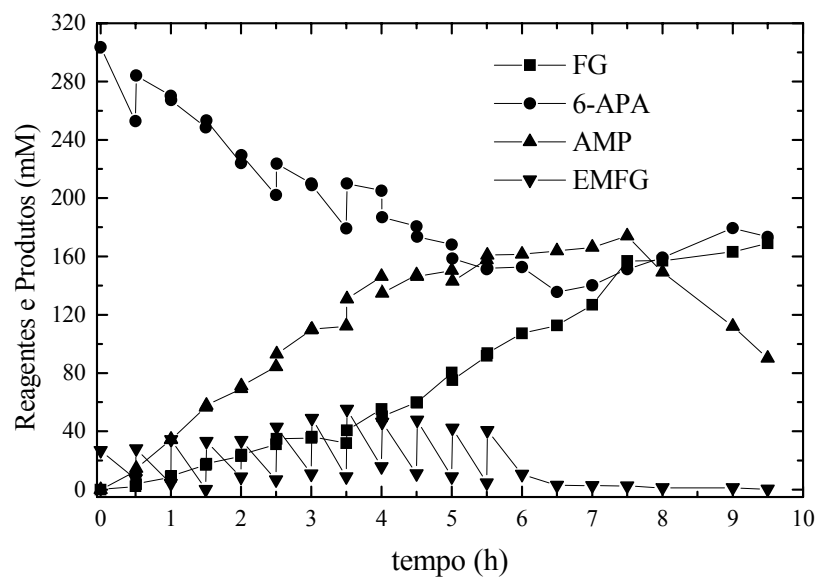


Figura 4.38: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 20 °C e pH 7,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300 mM e EMFG, 25 mM. Adição de EMFG.

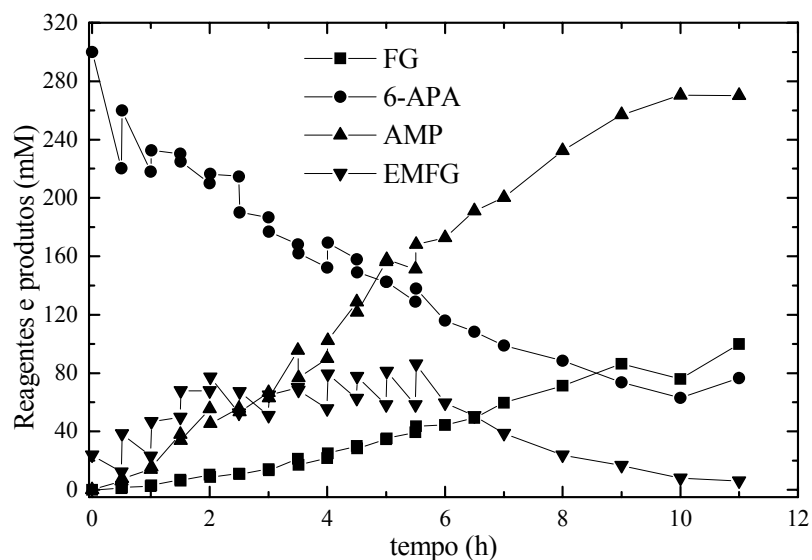


Figura 4.39: Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 20 °C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300 mM e EMFG, 25 mM. Adição de EMFG.

A Figura 4.40 resume o comportamento do reator com respeito às seletividades. Pode-se ver que em pH 6,5; o perfil de S/H sempre é o melhor,

variando numa faixa de nove a valores menores que um. A Figura 4.41 mostra o ensaio realizado durante 28 horas, com pH 6,5;  $T = 25^{\circ}\text{C}$  alimentando EMFG a cada 30 minutos e a parte (b) mostra detalhe das 10 primeiras horas de reação com a FG e o antibiótico solúvel no meio reacional. Deve-se ressaltar também que a atividade do biocatalisador foi medida após cada ensaio, e que nenhuma desativação foi observada depois de 60 h de operação. A integridade das partículas não foi afetada pela cristalização dos produtos da reação.

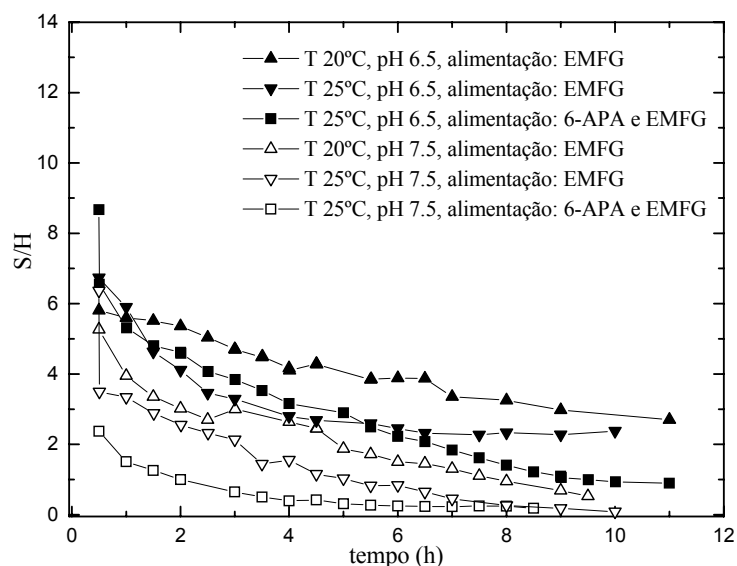


Figure 4.40: Seletividade (S/H) ao longo da reação para diferentes estratégias de operação do reator.

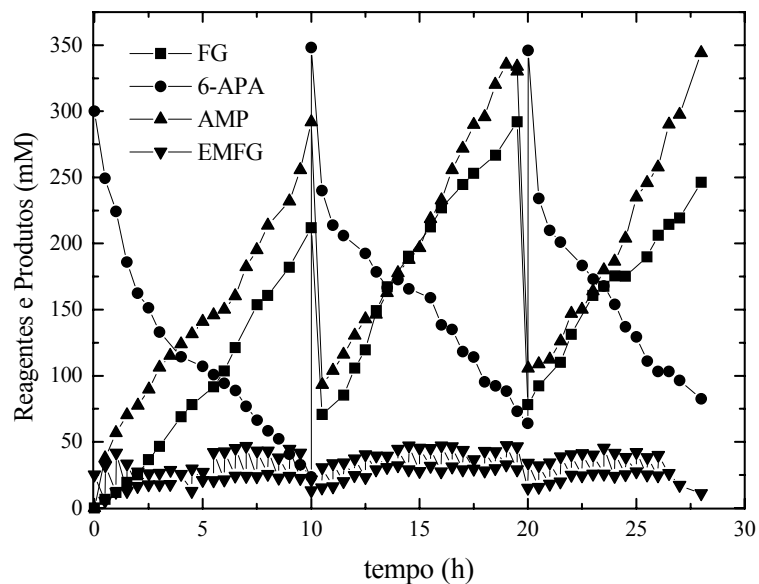


Figure 4.41(a): Síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP a 25 °C e pH 6,5. Ensaio em batelada alimentada, concentrações iniciais de substratos: 6-APA, 300 mM e EMFG, 25 mM. Adição de EMFG.

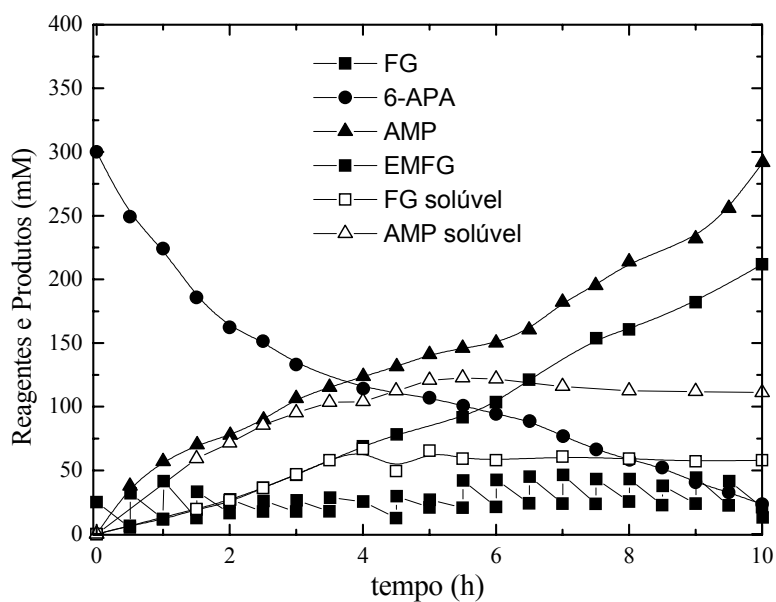


Figure 4.41(b): Detalhe das 10 primeiras horas da síntese de ampicilina da Figura 4.41(a) com a curva de concentração de ampicilina e FG solúveis no meio reacional.

Após a realização desses ensaios, um novo esquema experimental foi testado para facilitar a separação do antibiótico precipitado do meio reacional. A síntese enzimática cineticamente controlada de ampicilina a partir de EMFG e 6-APA foi realizada usando reator em batelada alimenta com precipitação do produto no fundo do reator. O produto precipitado foi separado do meio reacional por uma peneira na base do reator encamisado. Quando a base do reator estava completamente preenchida pelo precipitado, abria-se a válvula e o produto escoava. Filtrava-se essa mistura, a solução retornava ao reator e a massa sólida era matéria-prima para purificação do antibiótico.

Como etapa final dos ensaios de síntese de ampicilina, usando a enzima doada pela indústria, diversas estratégias de alimentação e retirada do produto foram testadas, mais uma vez, com o objetivo de minimizar a perda por hidrólise do EMFG e do antibiótico e, assim, aumentar o rendimento, seletividade e produtividade da síntese. As Figuras 4.42 e 4.43 exemplificam esses ensaios. A Figura 4.42 mostra o ensaio realizado com alimentação dos reagentes sólidos. Obteve-se uma seletividade de 2,2 e uma produtividade de 0,63 mM/min. O reagente 6-APA iniciou a reação em forma solúvel e, à medida que a reação caminhava adicionavam-se os reagentes sólidos. Essa estratégia mostrou-se de difícil controle, o 6-APA tinha uma dissolução lenta no pH de trabalho, e claramente via-se que algum reagente sólido, mesmo adicionado lentamente, estava indo para o fundo do reator, abaixo da peneira. Isto representava uma perda de reagente e ainda seria um fator a mais a dificultar a separação do antibiótico que estava precipitando. O controle do pH desse sistema também era difícil, pois uma grande quantidade de NaOH era adicionada pelo pHstato no momento que se adicionavam os reagentes sólidos, ou seja obtinha-se picos ácidos que comprometiam a integridade da enzima e a solubilidade do sistema reacional. Mesmo com a obtenção de uma produtividade muito boa, essa estratégia foi abandonada pelo difícil controle do experimento.

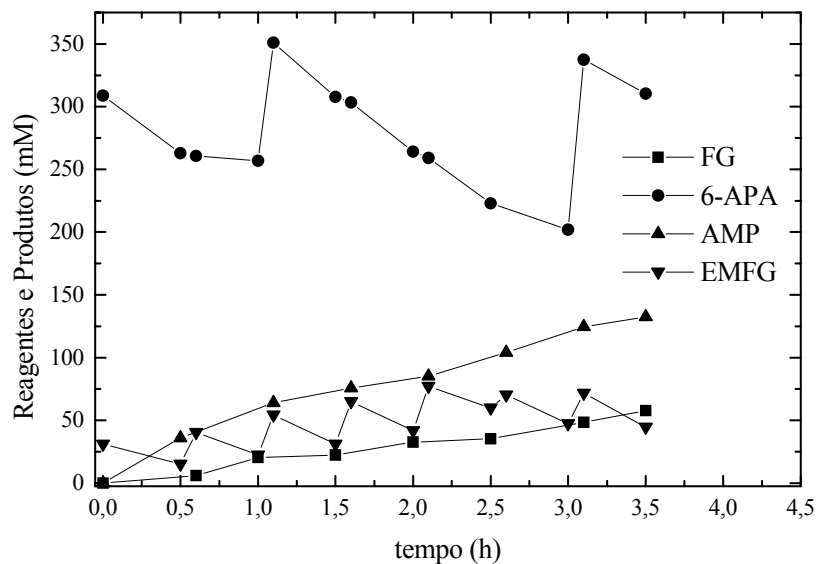


Figura 4.42: Síntese enzimática de ampicilina com adição dos reagentes sólidos ao longo da reação, pH 6,5 e temperatura 25 °C.

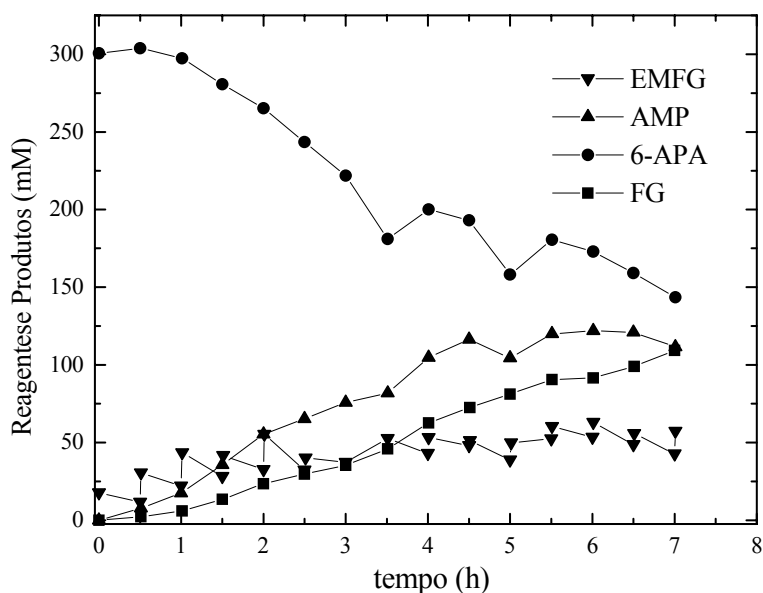


Figura 4.43: Síntese enzimática de ampicilina com adição de 6-APA em solução e de EMFG sólido ao longo da reação, pH 6,5 e temperatura 25°C.

Uma outra estratégia foi testada. O reagente 6-APA foi dissolvido em um valor de pH alto (~ 10), de modo que sua concentração fosse alta e a queda no pH durante a adição de EMFG fosse compensada. A Figura 4.43 ilustra um dos

ensaios realizados com esta estratégia. Obteve-se uma seletividade de 1,89 e uma produtividade de 0,39 mM/min. Mais uma vez o controle do pH do sistema foi difícil, pois grande quantidade de NaOH foi adicionada ao sistema aumentando a variação de volume prevista pela adição de 6-APA solúvel. Nesses ensaios houve um atraso na precipitação dos produtos devido à grande variação de volume do reator. Também, esta estratégia foi abandonada, mesmo com os bons níveis de seletividade e produtividade alcançados. Esse modelo de reator com separação do biocatalisador e do precipitado se mostrou de difícil controle. Portanto, tendo em conta esses resultados, a utilização de reator em vórtices em batelada sem a peneira no fundo foi escolhida como a melhor configuração até aqui para a realização da síntese enzimática de ampicilina. Deve-se acrescentar que o biocatalisador desenvolvido suportou muito bem o atrito com as partículas no meio reacional sendo necessário após algumas horas de ensaios regenerar o biocatalisador sem perdas em sua atividade<sup>64</sup>.

## 5 CONCLUSÕES

- A imobilização da PGA em agarose apresentou melhor rendimento e estabilidade que a imobilização em sílica. O derivado (PGA + agarose) não perdeu sua atividade ao longo do tempo (três anos).
- A imobilização da PGA em sílica apresentou um bom rendimento para carga enzimática até 20 UI/gss. Acima desta quantidade de enzima, observaram-se limitações difusionais. A imobilização da enzima com carga enzimática de 200 UI/gss não alcançou 100 % de rendimento. Mesmo após 7,5 horas de reação com suporte ativado, ainda observava-se enzima no meio reacional (sobrenadante).
- Os biocatalisadores apresentaram limitações difusionais em seus poros, porém não a ponto de comprometer o rendimento da síntese do antibiótico.
- O planejamento fatorial mostrou que a síntese cineticamente controlada de ampicilina foi influenciada por diversos fatores muito relacionados. Para ensaios partindo de 50 mM de EMFG, em sistemas homogêneos (sem precipitação do produto) chegou-se as seguintes conclusões;
  - ◆ O melhor rendimento de síntese (56,9 %) com relação ao 6-APA foi obtido na temperatura de 4 °C e pH 6,5.
  - ◆ A melhor produtividade de ampicilina ocorreu quando não se usou metanol no meio reacional e a uma temperatura de 25 °C.
  - ◆ A melhor seletividade ocorreu à temperatura de 25 °C, pH 6,5 e concentração inicial de 6-APA alta.
- A condição operacional escolhida foi uma relação de compromisso entre produtividade, rendimento e seletividade do antibiótico para otimização do reator industrial.
- As sínteses de ampicilina realizadas com PGA imobilizada em sílica (usando reator de leito fixo) apresentaram rendimentos comparáveis aos obtidos com as sínteses de ampicilina usando PGA imobilizada em gel de agarose. O reator de leito fixo operado com velocidades intersticiais

de escoamento de 35 cm/min não apresenta limitações ao transporte de massa extrapartícula.

- As sínteses enzimáticas de ampicilina realizadas com altas concentrações iniciais de reagentes apresentaram maiores rendimentos de síntese, melhores seletividades e produtividades para todas as relações (6-APA:EMFG) usadas, quando comparadas com as sínteses realizadas com baixas concentrações iniciais de reagentes nas mesmas relações 6-APA:EMFG.
- O modelo neural híbrido apresentado reproduziu de maneira satisfatória o comportamento da síntese enzimática de ampicilina em reator em batelada, mostrando-se uma alternativa promissora para prever o comportamento do reator. Sua capacidade preditiva foi testada com sucesso frente a um conjunto de dados com erros experimentais sistemáticos.
- Reator integrado em batelada alimentada para a síntese de ampicilina onde a cristalização dos produtos ocorria durante a reação foi desenvolvido. Condições operacionais foram estabelecidas, nas quais uma melhora no desempenho do reator com respeito a produtividade e seletividade em direção a síntese do antibiótico foi alcançada.
- O reator em vórtice mostrou-se satisfatório, melhorando a produtividade (0,9 mM/min) e a seletividade (3,7) da reação de síntese nas condições de  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 6,5, sem metanol e sem tampão fosfato no meio reacional, e mantendo-se a concentração de 6-APA alta em relação a concentração de EMFG.



## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALENCAR, J.R.B.; SOUZA, M.B. – Identificação e controle preditivo baseado em modelo híbrido-neuronal de fermentação alcoólica contínua. – In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Anais do XIII COBEQ, Águas de São Pedro, SP, 2000.
2. ALKEMA, W.B.L.; DE VRIES, E.J.; HENSGENS, C.M.H.; TIJMS, J.J.; DIJKSTRA, B.W.; JANSSEN, D.B. – Synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics – Kluwer Academic Publishers, Holanda, 2001, cap. 6.
3. ANDERECK, C.D.; LIU, S.S.; SWINNEY, H.L. – Flow regimes in a circular Couette system with independently rotating cylinders – Journal Fluid Mech., v. 164, p. 155-183, 1986.
4. ATKINSON, B.; MAVITUNA, F. – Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2a edição, M Stockton Press, Nova Iorque, 1991, cap. 9, 10 e 20.
5. BALASINGHAM, K.; WARBURTON, P.D.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D. – The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. coli* – Biochim. Biophys, p. 250-256, 1972.
6. BARBER, M. The penicillins business. Michael Barber and Associates, 18 Croydon Road, Catterham, Surrey, Inglaterra, 1996.
7. BARROS NETO, B.N.; SCARMINIO, I.P.; BRUNS, R.E. – Planejamento experimental e otimização de experimentos. – 3ª ed., Editora da Unicamp, 1995.
8. BAUGHMAN, D.R.; LIU, Y.A. – Neural networks in bioprocessing and chemical engineering – Academic Press, Inc, Califórnia, EUA, 1ª Edição, 1995.
9. BIANCHI, D.; GOLINI, P.; BORTOLO, R.; CESTI, P. – Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports – Enz. and Mic. Tech., vol. 18, p. 592-596, 1996.
10. BIRD, R.B.; STEWART, W.E. e LIGHFOOT, E.N. – Transport phenomena, John Wiley, 1960.
11. BLINKOVSKY, A.M.; MARKARYAN, A.N. – Synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics containing  $\alpha$ -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-(-)-phenylglycyl- $\beta$ -lactamide amidohydrolase – Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 965-973, 1993.
12. BOCCU, B.; EBERT, C.; GARDOSI, L.; GIANFERRARA, T.; ZACCHIGNA, M.; LINDA, P. – Enzymatic synthesis of ampicillin: a chemometric optimization – Il Farmaco, v. 46, no 4, p. 565-577, 1991.
13. BOCK, A.; WIRTH, R.; SCHMID, G.; SHUMACHER, G.; LANG, G.; BUCKEL, P. – The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105 consists of two dissimilar subunits – FEMS Microbiology Letters, v. 20, p. 135-139, 1983.

14. BRAGA, A.P.; LUDERMIR, T.B.; CARVALHO, A.C.P.L.F. – Redes neurais artificiais - Teoria e aplicações – p. 49-68, Editora LTC, Livros técnicos e científicos, Rio de Janeiro, 2000.
15. BRAUN, J.; CHANU, P.L.; GOFFIC, F.L. – The immobilization of penicillin G acylase on chitosan – *Biotech. and Bioeng.*, v. 33, p. 242-246, 1988.
16. BRUGGINK, A.; ROY, P.D; SHELDON, R.A.; VAN RANTWIJK, F.; WEGMAN, M.A.; CAO, L.; JANSSEN, M.H.A. – Synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics – Kluwer Academic Publishers, p. 12-55, 102-205, Holanda, 2001.
17. BRUGGINK, A.; ROSS, E.C.; VROOM, E. – Penicillin Acylase in the industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics – *Org. Process Research & Development*, v. 2, no 2, p. 128-133, 1998.
18. BRYJAK, J.; NOWORYTA, A. – Kinetic behavior of penicillin G acylase immobilized on acrylic carrier – *Bioprocess Engineering*, v. 9, p. 37-42, 1993.
19. CALDAS, M. M. – Síntese enzimática de ampicilina utilizando penicilina G acilase imobilizada em suporte sílica – Relatório de Iniciação Científica, projeto FAPESP n. 01/05816-1, janeiro de 2002.
20. CARDIAS, H.T.C. – Estudo da síntese de antibióticos ( $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos catalisada por diferentes derivados de penicilina G acilase. – São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2000, (tese).
21. CARDIAS, H.T.C.; FERREIRA, A.L.O.; GIORDANO, R.L.C. – Efeitos difusivos na hidrólise de penicilina G catalisada por penicilina G acilase imobilizada em sílica – In: Simpósio Nacional de Fermentações. Anais do XIII SINAFERM, Teresópolis, RJ, 2000.
22. CARDIAS, H.T. Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com glutaraldeído. – São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 1996, (Dissertação).
23. CHENTOUF, R.; JUTTEN, C.; MAIGNAN, M.; KANEVSKY, M. – Incremental neural networks for function approximation – *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A*, 389, p. 268-270, 1997.
24. CIOLA, R. – Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – Editora Edgard Blücher, 1ª Edição, São Paulo, 1998.
25. CLARIDGE, C.A.; GOUREVITCH, A.; LEAN, J. – Formation of 6-APA from penicillin by enzymatic hydrolysis – *Nature*, v. 187, p. 236-238, 1960.
26. CLAUSEN; KIM; DEKKERS; ROCUS, M. – Process for preparation of  $\beta$ -lactams at constantly high concentration of reactants – United States Patent, n. 6.048.708, 11 de abril de 2000.

27. CLAUSEN, K.; NIELSEN, A.; PETERSEN, N.; NIKOLOV, A. – Acylation method for penicillins and cephalosporins – United States Patent, n. 5.753.458, 19 de maio de 1998.
28. COLE, M. – Penicillins and other acylamino compounds synthesized by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli* – *Biochem. Journal*, v. 115, p. 747-756, 1969.
29. COLE, M. – Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxyphenicillins by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli* – *Biochem. Journal*, v. 115, p. 757-764, 1969.
30. COWLEY, B.R.; MARTIN, D.G. – Process for preparing penicillin antibiotics – United States Patent, n. 3.971.775, Glaxo Laboratories Limited, Inglaterra, 27 de julho de 1976.
31. CROCI, M.; COTTI, G. – Manufacture of semi-synthetic penicillin antibiotics - United States Patent, parte (a): n. 4.181.656, parte (b): n. 4.182.709, Glaxo Group Limited, Inglaterra, 1980.
32. DAUMY, G.O.; DANLEY, D.; MCCOLL, A.S. – Role of protein subunits in *Proteus rettigeri* penicillin acylase – *Journal of Bacteriology*, v. 163, n. 3, p. 1279-1285, 1985.
33. DEMAİN, A.L.; ELANDER, R.P. – The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present and future. – *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 75, p. 5-19, 1999.
34. DESMET, G.; VERELST, H.; BARON, G.V. – Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow – I. Description and modeling of the dispersion effects – *Chem. Engng. Science*, v. 51, p. 1287-1298, 1996.
35. DE VROOM, E. Penicillin G acylase immobilized with a crosslinked mixture of gelled gelatin and amino polymer. United States Patent n. 6.060.268, Gist-Brocades B.V., 2000.
36. DIAGO, J.; LUDESCHER, J. – Beta lactam production – United States Patent, n. 5.719.276, 17 de fevereiro de 1998.
37. DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J.; DOES, T.; ZOMERDIJK, M.; HEIJNEN, J.J. – Course of pH during the formation of amoxicillin by a suspension-to-suspension reaction – *Enz. and Microbial Tech.*, v. 27, p. 576-582, 2000.
38. DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J.; VAN DER WIELEN L.A.M.; HEIJNEN, J.J. – Feasibility of the thermodynamically controlled synthesis of amoxicillin – *Journal Mol. Catal. B: Enz.*, v.5, p. 249-253, 1998.
39. DUGGLEBY, H.J.; TOLLEY, S.P.; HILL, C.P.; DODSON, E.J.; DODSON, G.; MOODY, P.C. – Penicillin acylase has a single amino-acid catalytic centre – *Nature*, v. 373, p. 264-268, 1995.

40. EBERT, C.; GARDOSI, L.; LINDA, P. Control of enzyme hydration in penicillin catalysed synthesis of amide bond. *Tetrahedron Letters*, vl. 37, no 52, p. 9377-9380, 1996.
41. ELANDER, R.P. – Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics – *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 61, p. 385-392, 2003.
42. ELDIN, M.S.M.; SCHROËN, C.G.P.H.; JANSSEN, A.E.M.; MITA, D.G.; TRAMPER, J. – Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles – *J. of Molecular Catalysis*, v. 10, p. 445-451, 2000.
43. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. F.; ROSSEL, C. M.; GUISÁN, J. M. – Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents – *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, p. 898-905, 1991.
44. FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ALVARO, G.; BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M – Equilibrium controlled synthesis of cephalotin in monophasic water-cosolvents systems catalyzed by stabilized derivatives of penicillin G acylase – *Appl. Biochem. Biotech*, v. 27, p. 277-290, 1991b.
45. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos sintetizada por derivados inmovilizados-estabilizados de penicilina G acilasa, Madri, Instituto de catalisis y petroleoquímica. C.S.I.C., 1992, (tesis doctoral).
46. FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ROSSEL, C.M.; GUISAN, J.M. – The use of stabilized penicillin acylase derivatives improves the design of kinetically controlled synthesis. *J. Mol. Catalysis A* v. 101, p. 91-97, 1995.
47. FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSSEL, C.M.; GUISÁN, J.M. – The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized penicillin G acylase – *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 305-310, 1998.
48. FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ARMINSEN, P.; SABUQUILLO, P.; GUISÁN, J.M. – Tabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques – *J. of Molecular Catalysis*, v. 7 p. 173-179, 1999.
49. FERREIRA A.A.; SUAZO, C.A.T.; CRUZ, A.J.G.; PULITANO, V.M.S. – Planejamento fatorial e redes neuronais: hibridização para simplificar a otimização do crescimento de um fungo. In: *Simpósio Nacional de Fermentações – Anais do XIII SINAFERM*, Teresópolis, RJ, 2000.
50. FERREIRA, A.L.O. – Estudo da síntese enzimática de ampicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em gel de agarose – São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 1999, (dissertação).

51. FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.C. – Efeitos difusivos na síntese de ampicilina catalisada por derivados imobilizados de penicilina G acilase. In: Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados – Anais do XXVII ENEMP, Campos de Jordão, SP, 1999.
52. FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. – Modelo cinético da síntese enzimática de ampicilina usando penicilina G acilase imobilizada em agarose. In: Simpósio Nacional de Fermentações – Anais do XIII SINAFERM, Teresópolis, RJ, 2000.
53. FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES, 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 – Brazilian Journal of Chem. Engineering, v. 17 n. 4, p. 835-839, dezembro, 2000.
54. FERREIRA A.L.O., GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.C. – A neural network kinetic model for the ampicillin synthesis catalyzed by immobilized penicillin G acylase. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Anais do XIV COBEQ, Natal, RN, 2002.
55. FERREIRA A.L.O., GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C – Reaction conditions that improve selectivity and productivity of the enzymatic synthesis of ampicillin with immobilized penicillin g acylase. *no prelo*.
56. FERREIRA, T.F.; CASTRO, L.A. F.; KALID, R.A. – Simulação e otimização de um reator de DCPD utilizando redes neurais híbridas. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ, Águas de São Pedro, SP, 2000.
57. FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of  $\beta$ -influenze. Brit. J. Exp. Path., v. 10, p. 226-234, 1929.
58. FOGG, A.G.; FAYAD, N.M. – Differential pulse polarographic study on the degradation of ampicillin – Anal. Chim., Acta 113, p. 91-96, 1980.
59. FOGLER, H.S. – Elements of chemical reaction engineering – PTR Editora, 3a Edição, Nova Jersey, 1999.
60. FORD, J.R.; LAMBERT, A.H.; COHEN, W.; CHAMBERS, R.P. – Recirculation reactor system for kinetic studies of immobilized enzymes – The J. of Biol. Chem., n. 3, p. 267-284, 1972.
61. FUNAHASHI, K.I. – On the approximate realization of continuous mapping by neural networks – Neural Network, v. 2, 1989.
62. GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; PRAZERES, D.M.F.; COONEY, C.L. – Analysis of a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor – I: flow patterns and mass transfer characteristics – Chemical Engineering Science, v. 53, n. 20, p. 3635-3652, 1998.
63. GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C.; PRAZERES, D.M.F.; COONEY, C.L. – Analysis of a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor – II: reactor modeling and performance assessment using glucose-fructose

- isomerization as test reaction – *Chemical Engineering Science*, v. 55, p. 3611-3626, 2000.
64. GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; FERREIRA, A.L.O. – Process for protection of insoluble enzymatic biocatalysts, biocatalyst obtained thereof and bioreactor with the immobilized biocatalyst. – PCT/Br03/00173. E registro INPI (PI 0205242-31) de 09 de novembro de 2002, intitulado: Processo para proteção de biocatalisadores enzimáticos isolúveis, biocatalisador obtido e biorreator com o biocatalisador imobilizado.
  65. GHOSH, A. C.; BORA, M.M.; DUTTA, N.N. – Developments in liquid membrane separation of beta-lactam antibiotics, *Bioseparation*, v. 6, p. 91-105, 1996.
  66. GOH, A.T.C. – Back-propagation neural networks for modeling complex systems – *Artificial Intelligence in Engineering*, v. 9, p. 143-151, 1995.
  67. GONÇALVES, L.R.B. – Estudo do processo de produção de etanol a partir de amido liqüefeito, com enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina – São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 1996, (Dissertação).
  68. GONÇALVES, 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. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 14, n. 4, p. 341-346, 1997.
  69. GONÇALVES, L.R.B., FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. – Influência do pH e da temperatura na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em gel de agarose – *Ciência & Engenharia*, v. 7, n. 2, p. 45-48, 1998.
  70. GONÇALVES, A.M.; SCHACHT, E.; MATTHIJS, G.; AIRES BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S.; GIL, M.H. – Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports – *Enz. and Microbial Technology*, v. 24, p. 60-66, 1999.
  71. GONÇALVES L.R.B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R., GUIÁN J.M.; GIORDANO R.L.C. – A kinetic study of the synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose – *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 84-86, p. 931-945, 2000.
  72. GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.C.; GUIÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. – Efeitos de transporte de massa intrapartícula na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em agarose. In: *Simpósio Nacional de Fermentações – Anais do XIII SINAUFERM*, Teresópolis, RJ, 2000.
  73. GONÇALVES, L.R.B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. – Efeito da concentração de ácido 6-aminopenicilânico no processo de síntese de amoxicilina catalisada em agarose. In: *Simpósio Nacional de Fermentações – Anais do XIII SINAUFERM*, Teresópolis, RJ, 2000.

74. GONÇALVES, 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 – *Applied Bioch. and Biotech.*, v. 91-93, p. 691-702, 2001.
75. GONÇALVES, L.R.B. – Produção de amoxicilina catalisada por derivados imobilizados de penicilina G acilase – São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2001, (tese).
76. GONÇALVES, L.R.B.; SOUSA JR., R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. Enzymatic synthesis of amoxicillin: avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics – *Biotechnol. Bioeng.* v. 80, p. 622-631, 2002.
77. GONÇALVES, L.R.B., FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. The role of 6-aminopenicilanic acid on the kinetics of the enzymatic synthesis of amoxicillin catalyzed by penicillin G acylase immobilized on glyoxyl-agarose – *Enzyme and Microb. Technol.* v. 31, p. 464-471, 2002.
78. GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SÁN, J.M.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. – Inhibitory effects in the side reactions occurring during the enzymatic synthesis of amoxicillin: p-hydroxyphenylglycine methyl ester and amoxicillin hydrolysis – *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 38, p. 77-85, 2003.
79. GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SÁN, J.M.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. – Modeling batch and semibatch reactors for the enzymatic synthesis of amoxicillin. In: *International Symposium on Chemical Reaction Engineering*. – Anais do XVII ISCRE, Hong Kong, China, 2002.
80. GONTARSKI, C.A.; RODRIGUES, P.R.; MORI, M.; PRENEN, L.F. – Avaliação das condições de um sistema de tratamento de efluentes com auxílio de redes neuronais. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ*, Águas de São Pedro, SP, 2000.
81. GUI SÁN, J. M. – Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes – *Enzyme and Microbiological Technology*, v. 10, p. 375-382, 1988.
82. HAIM, D.; PISMEN, L.M. – Performance of a photochemical reactor in the regime of Taylor-Görtler vortical flow - *Chem. Engng. Science*, v. 49, p. 1119-1129, 1994.
83. HANISCH, W. S.; PIRES, E. C.; CARVALHO, A. C. P. L. F. – Modelo de redes neurais para o processo de lodos ativados de tratamento de esgotos domésticos. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ*, Águas de São Pedro, SP, 2000.
84. HARADA, L. H. P.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. – Hybrid neural modelling of na alcoholic fermentation process. In: *Congresso Brasileiro*

- de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ, Águas de São Pedro, SP, 2000.
85. HARIK-KHAN, R.; MOATS, W. A. – Identification and measurement of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk: integration of screening kits with liquid chromatography – J. of AOAC International, v.78, n. 4, 1995.
  86. HE, J.; LI, X.; EVANS, D. G.; DUAN, X.; LI, C. – A new support for the immobilization of penicillin G acylase – J. of Molecular Catalysis, v. 11, p. 45-53, 2000.
  87. HERNÁNDEZ JÚSTIZ, O. A. – Ingeniería y diseño de biocatalizadores y bioprocesos de síntesis enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactámicos – Madrid, Universidad politécnica de Madrid, 1996, (tesis doctoral).
  88. HIMMELBLAU, D.M. – Process analysis by statical methods – John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 1970.
  89. HOU, J.P.; POOLE, J.W. – The amino acid nature of ampicillin and related penicillins – Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 58, n. 12, p. 1510-1515, 1969.
  90. HUSSAIN, M.A. – Review of the applications of neural networks in chemical process control – simulation and on line implementation – Artificial Intelligence in Engineering, v. 13, p. 55-68, 1999.
  91. ILLANES, A.; FAJARDO, A. – Kinetically controled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic solvents – J. of Molecular Catalysis, v. 11, p. 587-595, 2001.
  92. IMAMURA, T.; SAITO, K.; ISHIKURA, S. – A new approach to continuous emulsion polymerization – Polymer International, v. 30, p. 203-206, 1992.
  93. KAASGAARD; S.G.; VEITLAND; ULLA – Process for preparation of  $\beta$ -lactams utilizing a combined concentration of acylation agent plus  $\beta$ -lactam derivative of at least 400mM – United States Patent, n. 5.525.483, 11 de junho de 1996.
  94. KARIM, M.; YOSHIDA, N. T.; RIVERA, S. L.; SAUCEDO, V. M.; EIKENS, B.; OH, G. S. – Review: Global and local neural network models in biotechnology: application to different cultivation processes – Journal Ferm. Bioeng., v. 83, p. 1-11, 1997.
  95. KASCHE, V.; HAUFLER, U.; ZÖLLNER, R. – Kinetic studies on the mechanism of the penicillin amidase-catalysed synthesis of ampicillin and benzylpenicillin – Hoppe-Seyler's Physiol. Chem., v. 365, p. 1435-1443, 1984.
  96. KASCHE, V. – Ampicillin and cephalixin synthesis catalysed by E. coli penicillin amidase. Yield increase due to substrate recycling – Biotechnonol. Lett., v. 7, n. 12, p. 877-882, 1985.
  97. KASCHE, V. – Mechanism and yields in enzyme catalyzed equilibrium and kinetically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics, peptides and



- other condensation products - *Enzyme and Microbial Technology*, v. 8, n. 4, p. 4-16, 1986.
98. KASCHE, V.; HAUFLER, U.; RIECHMANN, L. – Equilibrium and kinetically controlled synthesis with enzymes: semisynthesis of penicillins and peptides – *Methods in Enzymology*, v. 136, p. 280-292, 1987.
99. KASCHE, V.; GALUNSKY, B. – Enzyme catalyzed biotransformations in aqueous two-phase systems with precipitated substrate and/or product – *Biotech. Bioeng.*, v. 45, p. 261-267, 1994.
100. KATAOKA, K.; OHMURA, N.; KOUZU, M.; SIMAMURA, Y.; OKUBO, M. – Emulsion polymerization of styrene in a continuous Taylor vortex flow reactor - *Chem. Engng. Science*, v. 50, p. 1409-1416, 1995.
101. KATAOKA, K.; TAKIGAWA, T. – Intermixing over cell boundary between Taylor vortices – *A.I.Ch.E. Journal*, v. 27, p. 504-508, 1981.
102. KATAOKA, K.; DOI, H.; KOMAI, T.; FUTAGAWA, M. – Ideal plug flow properties of Taylor vortex flow – *Journal Chem. Engng. Japan*, v. 8, p. 472-476, 1975.
103. KATO, K.; KAWAHARA, K.; TAKAHASHI, T.; IGARASI, S. – Enzymatic synthesis of amoxicillin by the cell-bound  $\alpha$ -amino acid ester hydrolase of *Xanthomonas citri* – *Agric. Biol. Chem.*, v. 44, n. 4, p. 821-825, 1979.
104. KAZAN, D.; ERTAN, H.; ERARSLAN, A. Stabilization of penicillin acylase against pH by chemical cross-linking . *Process Biochemistry*, v. 31, n. 2, p. 135-140, 1996.
105. KAZAN, D.; ERARSLAN, A. Influence of polyhydric compounds on the pH stability of the penicillin G acylase obtained from a mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 7, p. 691-697, 1996.
106. KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A.; MELO, E.H.M. – The immobilization of enzymes and cells – *Chimicaoggi*, p. 21-29, maio, 1988.
107. 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 – *Journal of Molecular Catalysis*, p. 201-211, 1996.
108. KLIBANOV, A.M. – Why are enzymes less active in organic solvents than in water? – *Tibtech*, v. 15, p. 97-101, março de 1997.
109. KONECNY, J.; SCHNEIDER, A.; SIEBER, M. – Kinetics and mechanism of acyl transfer by penicillin acylase – *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, p. 451-467, 1983.
110. KOSCHMIEDER, E.L. *Béarnard Cells and Taylor Vortices*, 1.ed., Nova Iorque, Cambridge Univ. Press, 1993.

111. LEE K.C.; HAN, I.; KWON, Y – Hybrid neural network models for bankruptcy predictions – *Decision Support Systems*, v. 18, p. 63-72, 1996.
112. LEE, D.C.; KIM, H.S. – Optimization of a heterogeneous reaction system for the production of optically active D-amino acids using thermo-stable D-hydantoinase – *Biotechnology Bioeng*, v. 60, p. 729-738, 1998.
113. LEGRAND, J.; COEURET, F. – Circumferential mixing in one-phase and two-phase Taylor vortex flows – *Chem. Engng. Science*, v. 41, p. 47-53, 1986.
114. LEHNINGER, A.L. – *Bioquímica, componentes moleculares das células*, Editora Edgard Blücher LTDA, 2a edição, v. 1, 1977, cap. 8 e 9.
115. LEITNER, N.K.V.; LE BRAS, E.; FOULCAULT, E.; BOUGARBIES, J. –L. – A new photochemical reactor design for the treatment of absorbing solutions – *Water science technology*, v. 35, n. 4, p. 215-222, 1997.
116. LEVATI, D.C. Obtenção de penicilinas semi-sintéticas. – São Paulo, Universidade de São Paulo, 1987, (Dissertação).
117. LINKO, S.; LUOPA, J.; ZHU, Y.H. – neural networks as ‘software sensors’ in enzyme production – *J. of Biotechnology*, v. 52, p. 257-266, 1997.
118. LINKO, S. – Expert systems – What can they do for the food industry? – *Trends in Food Science and Technology*, v. 9, p. 3-12, 1998.
119. LINKO, S.; ZHU, Y.-H.; LINKO, P. – Applying neural networks as software sensors for enzyme engineering – *Trends in Biotechnology*, v. 17, Issue 4, p. 155-162, 1999.
120. LUEPTOW, R. M.; HAJILOO, A. – Flow in a rotating membrane plasma separator – *A.S.A.I.O. Journal*, v. 41, p. 182-188, 1995.
121. MACVEY, C.E.; WALSH, M.A.; DODSON, G.G.; WILSON, K.S. e BRANNIGAN, J.A. Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* v. 313, p. 139-150, 2001.
122. MARGOLIN, A.L.; SVEDAS, V.K.S.; BEREZIN, I.V. – Substrate specificity of penicillin amidase from *Escherichia coli* – *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 616, p. 283-289, 1980.
123. MARQUARDT, D.W. – An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters – *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, v. 11, p. 431-441, 1963.
124. MATEO, C.; ABIAN, O. FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. – Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment – *Enz. and Microbial Technology*, v. 26, p. 509-515, 2000.

125. MATTHIJS, G.; SCHACHT, E. – Comparative study of methodologies for obtaining  $\beta$ -glucosidase immobilized on dextran-modified silica – *Enz. and Microbial Technology*, v. 19, p. 601-605, 1996.
126. MESSING, R. A. – Immobilized enzymes for industrial reactors – Academic Press, Inc. LTD, Londres, 1984.
127. MOATS, W. A.; HARIK-KHAN, R. – Liquid chromatographic determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk: a multiresidue approach – *J. of AOAC International*, v.78, n. 1, 1995.
128. MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. – Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. Segunda edição, editora LTC, Rio de Janeiro, 2003.
129. MOODY, H., HOGENBOOM, A., LANGE, B., HEEMSKERK, D., DOOREN, T.V., BOESTEN, W.; ROOS, E. – Enzymatic production of cephadroxyl. Abstract book of 10th European Congress on Biotechnology, CAT 12, 2001.
130. MOORE, C.M.V.; COONEY, C.L. – Axial dispersion in Taylor-Couette flow – *A.I.Ch.E. Journal*, v. 41, p. 723-727, 1995.
131. MOZHAEV, V.V.; BEREZIN, I.V.; MARTINEK, K. Reactivation of immobilized enzymes. *Methods in Enzymology*. v. 135, p. 586-596, 1987.
132. NATHWANI, D.; WOOD, M.J. Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, v. 45, n. 6, p. 866-894, 1993.
133. OHMURA, N.; KATAOKA, K.; SHIBATA, Y.; MAKINO, T. – Effective mass diffusion over cell boundaries in a Taylor-Couette flow system – *Chemical Engineering Science*, v. 52, p. 1757-1765, 1997.
134. OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O.T.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. – Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin: a whole cell *E. coli* recombinant penicillin amidase biocatalyst – *Prog. Biotechnol.*, v. 11, p. 464-471, 1996.
135. OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O.T.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. – Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase – *Enz. and Microbial Technology*, v. 19, p. 462-469, 1996.
136. PAINTER, T.J. The polysaccharides, algal polysaccharides, vol. 2, G Aspinall Editora, Academic Press, Flórida, EUA, 1985.
137. PARISI, D.R.; LABORDE, M.A. – Modeling steady-state heterogeneous gas-solid reactors using feedforward neural networks – *Comp. and Chem. Engineering*, v. 25, p.1241-1250, 2001.
138. PARK, J.M.; CHOI, C.Y.; SEONG, B.L.; HAN, M.H. – Effect of mass transfer in a recirculation batch reactor system for immobilized penicillin amidase – *Biotechnology and Bioengineering*, v. 24, p. 2215-2226, 1982.

139. PEREIRA, G.H.A. – Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil – São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 1996, (Dissertação).
140. PETZOLD, L.R., DDASSL code, version 1989, Computing and mathematics research division, Lawrence Livermore National Laboratory, 1989.
141. PLASKIE, A.; ROETS, E.; VANDERHAEGHE, H. – Substrate specificity of penicillin acylase of *E. coli* – *The J. of Antibiotics*, v. 31, n. 8, p. 783-788, 1978.
142. PUDJIONO, P.I.; TAVARE, N.S. – Residence time distribution analysis from a continuous Couette flow device around critical Taylor number – *Can. J. Chem. Engng.*, v. 71, p. 312-318, 1993.
143. PUDJIONO, P.I.; TAVARE, N.S.; GARSIDE, J.; NIGAM, K.D.P. – Residence time distribution from a continuous Couette flow device – *Chem. Engng. Journal*, v. 48, p. 101-110, 1992.
144. RESENDE, M.M.; FERREIRA, A.L.O.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. – Mass transfer and fluid dynamics study of a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ, Águas de São Pedro, SP, 2000.
145. ROBINSON-FUENTES, V.A., JEFFERIES, T.M.; BRANCH, S.K. – Degradation pathways of ampicillin in alkaline solutions – *Pharm. Pharmacol.*, v. 49, p. 843-851, 1997.
146. RODRIGUES, S.; LONA, L.M.F. – Desenvolvimento de redes neurais para a determinação de taxas de reação enzimática, adsorção e dessorção de proteínas em processos biotecnológicos. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ, Águas de São Pedro, SP, 2000.
147. RUDOLPH, E.S.J., ZOMERDIJK, M., LUYBEN, K.C.H.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 Equilibrium*, (158), v. 160, 903-912, 1999.
148. RUMELHART, D.E.; HINTON, G.E.; WILLIAMS, R.J. – Learning representations by back-propagation errors – *Lett. to Nature*, v. 323, p. 533-536, 1986.
149. SADVIGE, T.A. – Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins – *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, v. 22, p. 171-224, 1984.
150. SÁNCHEZ, V.M.F. difusão de aminoácidos e proteínas em partículas de gel de agarose. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2000, (dissertação).
151. SCHROËN, 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 and Microbial Technology*, v. 24, p. 498-506, 1999.
152. SCHROËN, C.G.P.H.; NIERSTRASZ, V.A.; MOODY, H.M.; HOOGSCHAGEN, M.J.; KROON, O.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, p. 171-178, 2001.
  153. SCHULZ, A.R. – *Enzyme kinetics: From diastase to multi-enzyme systems – 1.ed.*, Nova Iorque, Cambridge University Press, 1994.
  154. SCZECHOWSKI, J G.; KOVAL, C.A.; NOBLE, R.D. – A Taylor vortex reactor for heterogeneous photocatalysis – *Chem. Engng. Science*, v. 50, p. 3163-3173, 1995.
  155. SHEWALE, J.G.; DESHPANDE, B.S.; SUDHAKARAN, V.K.; AMBEDKAR, S.S. – Penicillin acylases: applications and potentials – *Process Biochemistry International*, p. 97-103, junho de 1990.
  156. SHEWALE, J.G.; SIVARAMAN, H. – Penicillin acylase: enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA – *Process Biochemical*, p. 146-153, agosto de 1989.
  157. SHULER, M.L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering – Basic concepts*. Prentice Hall editora, Nova Jersey, 1992, cap. 1, 2 e 3.
  158. SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; SANTANA, M.H.A.; ZANIN, G.M. – Imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de proteínas não enzimáticas. Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ, Águas de São Pedro, SP, 2000.
  159. STOICHET, M.S.; LI, R.H.; MELISSA, R.W.; WINN, R.S. Stability of hydrogels used in cell encapsulation: an in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnology Bioengineering*, v. 50, p. 374-381, 1996.
  160. STROHL, W.R. – Secondary metabolites; antibiotics. – *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparations*, v. 5, p. 2348-2365, Wiley, Nova Iorque, 1999.
  161. SVEDAS, V.K.; MARGOLIN, A.L.; BEREZIN, I.V. – Enzymatic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics: a thermodynamic background - *Enzyme and Microbial Technology*, v.2, p. 138-144, 1980.
  162. SVEDAS, V.K.; MARGOLIN, A.L.; BORISOV, I.L.; BEREZIN, I.V. – Kinetics of the enzymatic synthesis of benzylpenicillin – *Enzyme and Microbial Technology*, v.2, p. 138-144, 1980.
  163. TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Funoran from the red seaweed, *Gloiopeltis complanata*: polysaccharides with sulphated agarose structure and their precursor structure, *Carbohydrate Polymers*, v. 27, p. 305-311, 1995.
  164. TAM, W.Y.; SWINNEY, H.L. – Mass transport in turbulent Couette-Taylor flow – *Phys. Ver. A.*, v. 36, p. 1374-1381, 1987.

165. TAYLOR, G.I. Stability of a viscous liquid contained between two rotating cylinders. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. v. 223, p. 289-343, 1923.
166. TEIXEIRA, J.F. – *Mentes e máquinas: uma introdução à ciência cognitiva* – Editora Artes Médicas, 1a Edição, Porto Alegre, 1998.
167. TERRINI, M.; PAGANI, G.; UBIALI, D.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MATEO, C.; GUIBAN, J.M. – Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic synthesis of cephamandole from cephalosporin c – *Bioorganic and Medicinal Chemistry Lett.*, v. 11, p. 2429-2432, 2001.
168. TISCHER, W.; KASCHE, V. – *Immobilized enzymes: crystals or carriers?* – *Tibtech*, v. 17, p. 326-335, 1999.
169. TREVISAN, H.C.; MEI, L.H.I.; ZANIN, G.M. – Preparation of silica with controlled pore sizes for enzyme immobilization – *Braz. J. of Chem. Engineering*, v. 17, n. 1, p. 71-77, 2000.
170. VAN DER BECK, C.P.; ROELS, J.A. – Penicillin production: biotechnology at its best. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 50, p. 625-639, 1984.
171. VAN DER WIELEN, L.A.M.; VAN BUEL, M.J.; STRAATHOF, A.J.J.; LUYBEN, K.C.A.M. – Modelling the enzymatic deacylation of penicillin G: equilibrium and kinetic considerations – *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 15, p. 121-146, 1997.
172. VILLADSEN, J.V.E.; MICHELSEN, M.L. – *Solution of differential equation models by polynomial approximation* – Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1978.
173. WEGMAN, M.A.; JANSSEN, M.H.A.; VAN RANTWIJK, F. – Towards biocatalytic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics – *Adv. Synth. Catal.*, v. 343, n. 6-7, p. 559-576, 2001.
174. YAO, J.; LI, Y.; TAN, C. L. – Option price forecasting using neural networks – *Omega, The International J. of Management Sci.*, v. 28, p. 455-466, 2000.
175. YOUSHKO, M.I.; LANGEN, L.M.; DE VROOM, E.; MOODY, H.M.; 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. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 509-515, 2000.
176. YOUSHKO, M.I.; SVEDAS, V.K. Kinetics of ampicillin synthesis catalyzed by penicillin G acylase from *E. coli* in homogeneous and heterogeneous systems. Quantitative characterization of nucleophile reactivity and mathematical modeling of the process – *Biochemistry (Moscow)*, v. 65, p. 1367-75, 2000.
177. YOUSHKO, M.I.; LANGEN, L.M.; VROOM, E.; RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A.; SVEDAS, V.K. – Highly efficient synthesis of

- ampicillin in “aqueous solution-precipitate” systems: Repetitive addition of substrates in a semicontinuous process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 73, n. 5, p. 26-430, 2001.
178. YOUSHKO, M.I.; LANGEN, L.M.; VROOM, E.; MOODY, H.M.; RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A.; SVEDAS, V.K. Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: a neq approach to optimization. *Biotechnol. Bioeng.* v. 78, p. 589-93, 2002.

## APÊNDICE A

### A.1 REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

As redes neurais (RNAs) são uma técnica de inteligência artificial cujo ponto forte é apreender as características da resposta de um sistema a partir de conjuntos experimentais de dados de entrada e/ou saída. Esta ferramenta apresenta a capacidade de reproduzir comportamentos não-lineares complexos diretamente a partir de dados do processo e de se adaptar a mudanças no comportamento dinâmico do mesmo, através de um procedimento de treinamento ou aprendizado<sup>1</sup>. Portanto, RNAs podem substituir ou complementar modelos determinísticos. A aplicação de RNAs em processos biotecnológicos vem aumentando nos últimos anos. Elas têm sido utilizadas para estimar variáveis de estado, para determinar fases biológicas em conjunto com sistemas especialistas, monitorando reatores bioquímicos<sup>94</sup>.

Uma RNA é composta por um conjunto de neurônios com capacidade de processamento, e sua topologia define a forma como estes neurônios estão conectados. Seja  $x$  um conjunto de dados de entrada,  $f(x)$  a função saída. A estimativa da saída  $f(x)$  é  $\underline{f(x)}$ , função do vetor de entrada e dos coeficientes de adaptação da rede (pesos)  $w$ . De uma maneira geral, o que se deseja obter é o valor do incremento  $\Delta w$  a ser aplicado ao vetor  $w$  que faça  $\underline{f(x)}$  aproximar-se de  $f(x)$ . Este procedimento é chamado de treinamento ou aprendizado da rede. Dois eficientes algoritmos para isso são os de Marquardt (1963), para problemas de menores dimensões, e o de retropropagação, que não leva em conta todas as dimensões do erro para o cálculo de seu gradiente com respeito aos pesos a cada iteração, mas às custas de uma convergência mais lenta. Este último algoritmo é mais adequado a redes com maior número de neurônios. Ambos buscam o valor de  $w$  – que, em geral, minimiza o quadrado da norma dos erros,  $\|f(x) - \underline{f(x)}\|^2$ ; usualmente, recai-se em problema de mínimos quadrados.

#### A.1.1 Breve Histórico

O termo “rede neural” é resultado de pesquisas em inteligência artificial (IA), na tentativa de entender e modelar o comportamento do cérebro humano. De



acordo com Barr e Feigenbaum, 1981, IA é um ramo da ciência da computação interessada em projetar sistemas computacionais inteligentes, isto é, sistemas que exibam as características que nós associamos com inteligência no comportamento humano – compreensão de linguagens, aprendizado, raciocínio, resolução de problemas entre outros. As maiores bases tecnológicas da IA com crescimento técnico e significância comercial são: sistemas especialistas, redes neurais e sistemas de lógica fuzzy <sup>8</sup>.

A idéia de que a mente funciona como um computador digital e que este último pode servir de modelo para conceber a mente humana iniciou-se a partir da década de 40, quando o termo “inteligência artificial” sequer havia sido inventado. Naquela época, predominava um movimento chamado “cibernética”. Os ciberneticistas acreditavam que toda atividade psicológica humana poderia um dia ser estudada por meio de modelos matemáticos. A grande intuição que orientou este movimento científico foi à analogia entre sistema nervoso e circuitos elétricos. Sobressaindo-se no cenário da época estava Claude Shannon, o criador da teoria matemática da informação, que publicou, em 1938, a dissertação intitulada *A symbolic analysis of relay and switching circuits* e Warren McCulloch, um psiquiatra e neuroanatomista que junto com o matemático Walter Pitts, desenvolveram o primeiro modelo artificial de um neurônio biológico no trabalho publicado, em 1943, *A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity* <sup>166</sup>.

Passados os anos, ganha força a idéia de que é possível modelar a mente, uma concepção que vai encontrar apoio na visão que existe uma independência entre o *software* e o *hardware* das máquinas utilizadas para simular a inteligência. Marco desta nova tendência são os trabalhos de Newell e Simon, com seu programa para provar teoremas lógicos, o *Logical Theorist*, desenvolvido em meados da década de 50. Este grupo sustentava que seria melhor simular os fenômenos mentais, já que o pensamento nada mais seria do que o resultado da ordenação mecânica de uma série de símbolos e, para obter esta ordenação não seria preciso, necessariamente, um cérebro.

Parte da discussão em RNAs gira em torno dos métodos de aprendizado para que os neurônios possam ser capazes de executar uma determinada função. O

trabalho de McCulloch e Pitts se concentra muito mais em descrever um modelo artificial de um neurônio e apresentar suas capacidades computacionais do que em apresentar técnicas de aprendizado. O primeiro trabalho de que se tem notícia que tem ligação direta com o aprendizado foi apresentado por Donald Hebb em 1949. Ele propôs uma teoria para explicar o aprendizado em neurônios biológicos baseada no reforço das ligações sinápticas entre neurônios excitados. A regra de Hebb, como é conhecida a sua teoria na comunidade de RNAs, traduzida em termos matemáticos e é hoje utilizada em vários algoritmos de aprendizado. Mais tarde, Widrow e Hoff sugeriram uma regra de aprendizado, conhecida como regra de Widrow-Hoff, ou regra delta, que é ainda hoje bastante utilizada. Esta, por sua vez, é baseada no método do gradiente para minimização do erro na saída de um neurônio com resposta linear <sup>14</sup>.

Seguindo os passos de McCulloch e Pitts, Frank Rosenblatt, em 1958, demonstrou, com seu novo modelo, o perceptron, que RNAs poderiam ser treinadas para classificar certos tipos de padrões. O projeto de Rosenblatt foi fortemente criticado por Marvin Minsky e Seymour Papert – dois pesquisadores que lançaram as bases para o aparecimento do paradigma simbólico na Inteligência Artificial. Estes dois pesquisadores chamaram a atenção para algumas tarefas que o perceptron não era capaz de executar, já que este só era capaz de resolver problemas linearmente separáveis.

Nos anos 70, a abordagem conexionista ficou adormecida (em grande parte devido à repercussão do trabalho de Minsky e Papert), apesar de alguns pesquisadores continuarem na área. Sistemas conexionistas e simbólicos são sistemas computacionais, mas há uma grande diferença no tipo de computação que eles realizam. Na perspectiva simbólica, a computação é essencialmente a transformação de símbolos de acordo com regras – regras que estão estabelecidas num programa. A idéia de computação subjacente a um sistema conexionista é diferente: seu princípio é um conjunto de processos causais através dos quais as unidades se excitam ou se inibem, sem empregar símbolos ou regras para manipulá-los. Abandona-se a idéia de uma mente que executa passos algorítmicos discretos e a suposição de que processos mentais seriam uma justaposição

inferencial de raciocínios lógicos. Em vez, o que temos é um conjunto de neurônios artificiais para modelar a cognição <sup>166</sup>.

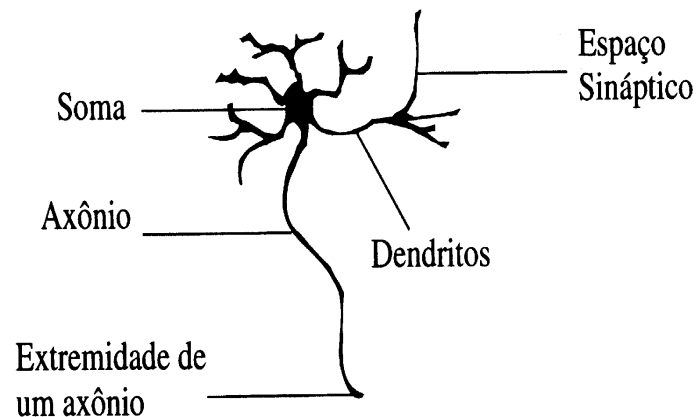
O conexionismo não teve sucesso até o início da década de 80, quando surgiram os trabalhos de Hinton e Anderson (e, posteriormente, de Rumelhart e McClelland), tendo ficado abafado, principalmente, durante os anos 70, quando havia grande entusiasmo pelas possibilidades abertas pela IA simbólica. O conexionismo, funcionalismo neurocomputacional ou processamento paralelo distribuído (PDP, parallel distributed processing) não endossa a visão de que processos mentais possam ser estudados como computações abstratas, independentemente de sua base física e do meio ambiente onde se situa o organismo ou sistema onde elas ocorrem. Conhecimentos acerca do funcionamento do cérebro e conhecimentos sobre computação devem convergir no estudo da natureza dos estados mentais. O cérebro humano é visto como um dispositivo computacional em paralelo que opera com milhões de unidades computacionais chamadas neurônios.

Em 1982, John Hopfield publicou um artigo que chamou a atenção para as propriedades associativas das RNAs. Este artigo foi responsável por parte da retomada das pesquisas na área. O grande feito de Hopfield foi mostrar a relação entre redes recorrentes auto-associativas e sistemas físicos, o que também abriu espaço para a utilização de teorias correntes da Física para estudar tais modelos. Não obstante, a descrição do algoritmo de treinamento *back-propagation* alguns anos mais tarde mostrou que a visão de Minsky e Papert sobre o perceptron era bastante pessimista. As RNAs de múltiplas camadas são, sem dúvida, capazes de resolver “problemas difíceis de aprender”. A partir de meados da década de 80, houve nova explosão de interesse pelas RNAs na comunidade internacional. Dois outros fatores foram responsáveis pela retomada de interesse na área: em primeiro lugar, o avanço da tecnologia, sobretudo da microeletrônica, que vem permitindo a realização física de modelos de neurônios e sua interconexão de um modo antes impensável; em segundo, o fato de a escola simbolista, a despeito de seu sucesso na solução de determinados tipos de problemas, não ter conseguido avanços significativos na resolução de alguns problemas simples para o ser humano <sup>14</sup>.

### A.1.2 Neurônios Biológicos

Para simular o cérebro, é necessário simular a atividade de suas unidades básicas: os neurônios. Sabe-se que os neurônios transmitem impulsos elétricos e que estes são fundamentais para o funcionamento do sistema nervoso, constituído por uma vasta rede de neurônios distribuídos em estruturas com interconexões extremamente complexas. Esta recebe sinais de entrada (inputs) de um grande número de receptores: de dor, frio, tato, os receptores de esforços musculares, as células dos olhos, etc. Estes receptores transformam estes estímulos que provêm do mundo exterior em padrões de estímulos elétricos que fornecem informação para a rede de neurônios. Estes impulsos, por sua vez, interagem com padrões de estímulos elétricos que já se encontram presentes nos neurônios (calcula-se haver cerca de  $10^{11}$  neurônios no cérebro humano) e provocam a emissão de outros impulsos que controlam os músculos e as glândulas, gerando as respostas ou comportamentos.

O neurônio é uma célula e, portanto, tem um núcleo contido em seu corpo (ver Figura A1). Pode-se imaginar os *dentritos* como filamentos muito finos, mais finos que os *axônios* e estes como um cilindro estreito que leva os impulsos do corpo para outras células. O axônio divide-se numa delicada estrutura em forma de árvore cujos ramos terminam num pequeno *bulbo* que quase toca os dentritos de outro neurônio. Estes pontos de “quase-contato” denominam-se *sinapses*. Os impulsos que chegam a uma sinapse estabelecem sinais elétricos nos dentritos sobre os quais incide a sinapse. A transmissão interneuronal se faz por meio de substâncias denominadas neurotransmissores. Um determinado neurônio só dispara um impulso elétrico ao longo do axônio se o número de impulsos que chegam aos bulbos terminais de seus dentritos for suficiente. O tempo que leva para ocorrerem estes impulsos elétricos é chamado de *período de somação latente*. Tais impulsos que chegam podem ajudar ou impedir a ocorrência de um impulso pelo neurônio e se chamam, respectivamente de *excitadores* ou *inibidores*. A condição para a ativação de um neurônio é que a excitação supere a inibição numa quantidade crítica, chamada de *limiar do neurônio* <sup>166</sup>.

Figura A.1: Esquema de um neurônio <sup>14</sup>.

### A.1.3 Componentes de um Neurônio Artificial

Certamente o modelo de neurônio descrito na seção anterior é muito simplificado. Entretanto, foi a partir desta simplificação que se decidiu criar um modelo artificial do cérebro que pudesse simular a atividade mental como sendo a somatória do funcionamento destas unidades básicas. As bases para a construção deste modelo artificial foram lançadas por McCulloch e Pitts em 1943. Sua descrição matemática resultou em um modelo com  $n$  terminais de entrada  $x_1, x_2, \dots, x_n$  (que representam os dendritos) e apenas um terminal de saída  $y$  (representando o axônio). Para emular o comportamento das sinapses, os terminais de entrada do neurônio têm pesos acoplados  $w_1, w_2, \dots, w_n$  cujos valores podem ser positivos ou negativos, dependendo de as sinapses correspondentes serem inibitórias ou excitatórias. O efeito de uma sinapse particular  $i$  no neurônio pós-sináptico é dado por  $x_i w_i$ . Os pesos determinam “em que grau” o neurônio deve considerar sinais de disparo que ocorrem naquela conexão. Uma descrição do modelo está ilustrada na Figura A.2.

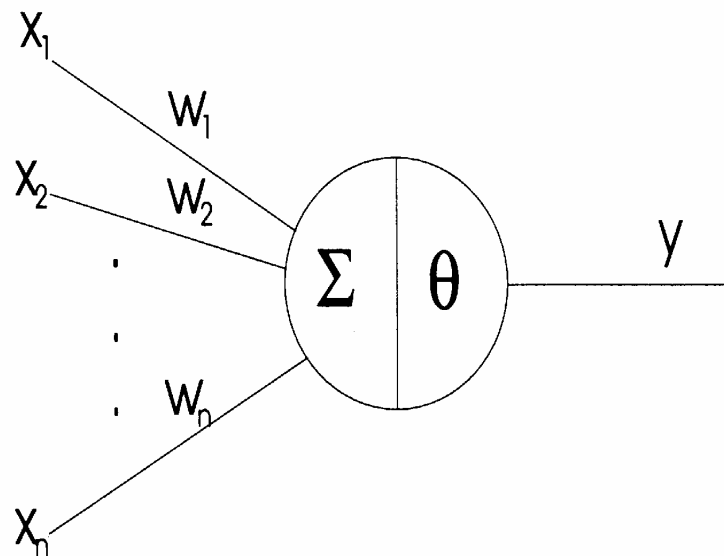


Figura A.2: Neurônio de McCulloch e Pitts <sup>14</sup>.

Os neurônios são a base da rede neural. Os componentes de um neurônio artificial são <sup>8</sup>:

#### 5. Entradas e Saídas

As entradas do  $j$ -ésimo neurônio são representadas por um vetor de entrada,  $\mathbf{X}$ , com componentes  $x_i$ . O neurônio manipula ou ativa estas entradas dando a saída  $Y$ , que pode formar parte da entrada de outros neurônios.

#### 6. Pesos

O que determina a saída de um neurônio? Certamente, o vetor de entrada tem efeito, entretanto, fatores adicionais também afetam, como o fator peso,  $w_{ij}$ , para a  $i$ -ésima entrada,  $a_i$ , correspondente ao  $j$ -ésimo neurônio. Toda entrada é multiplicada por este peso, e os neurônios usam estas novas entradas para realizarem cálculos adicionais.

#### 7. Limiar do Neurônio

Um neurônio biológico dispara quando a soma dos impulsos que ele recebe ultrapassa o seu limiar de excitação (*threshold*). No corpo do neurônio artificial, faz-se a soma dos valores  $x_i w_i$ , em seguida, decide se o neurônio deve ou não disparar (saída igual a 1 ou a 0) comparando a soma obtida com o seu limiar. Assim, o neurônio artificial calcula todos os seus  $x_i w_i$ , soma os termos juntos e então calcula a ativação total pela subtração do valor do limiar:

$$\mathbf{Ativação\ total} = \sum \mathbf{x}_i \mathbf{w}_i \Big|_j - \theta_j \quad (\text{A.1})$$

Se  $\theta_j$  é grande e positivo, o neurônio tem alto limiar que inibe a ativação. Se  $\theta_j$  é zero (ou negativo, em alguns casos), o neurônio tem um baixo limiar que excita a ativação. Não necessariamente todos neurônios têm um limiar.

#### 8. Funções de Transferência

O fator final que governa a saída de um neurônio é a função de transferência. Uma vez que o neurônio calcula o produto do vetor  $\mathbf{x}_i \mathbf{w}_i$  e subtrai do limiar,  $\theta_j$ , passa este resultado para uma função de transferência,  $f(\cdot)$ . Assim, o cálculo completo de um neurônio é:

$$f(\mathbf{w}_i X - \theta_j) = f\left(\sum (x_i w_i) \Big|_j - \theta_j\right) \quad (\text{A.2})$$

Este cálculo é, então, uma função da diferença entre o peso total da entrada e o limiar. A forma da função  $f(\cdot)$  pode, em princípio, ser qualquer. Exemplos de funções utilizadas são: linear, rampa, degrau, tangente hiperbólica e a sigmoideal. A função sigmoideal (S-shape) particularmente útil: semilinear, limitada e monotonicamente crescente. Com esta função os efeitos de inibição e excitação dos pesos são diretos. Além disso, estas funções permanecem finitas até mesmo quando  $x$  (ver Equação A.3) tende a  $\pm \infty$  fornecendo um treinamento para as redes neurais mais eficiente.

$$f(x) = \frac{I}{1 + e^{-x}} \quad (\text{A.3})$$

#### A.1.4 Arquitetura de uma RNA

A arquitetura de uma RNA se refere a como seus neurônios estão interconectados. Fazem parte da definição da arquitetura os seguintes parâmetros: número de camadas da rede, número de neurônios em cada camada, tipo de conexão entre os neurônios. Algumas arquiteturas de RNAs são apresentadas na Figura A.3.

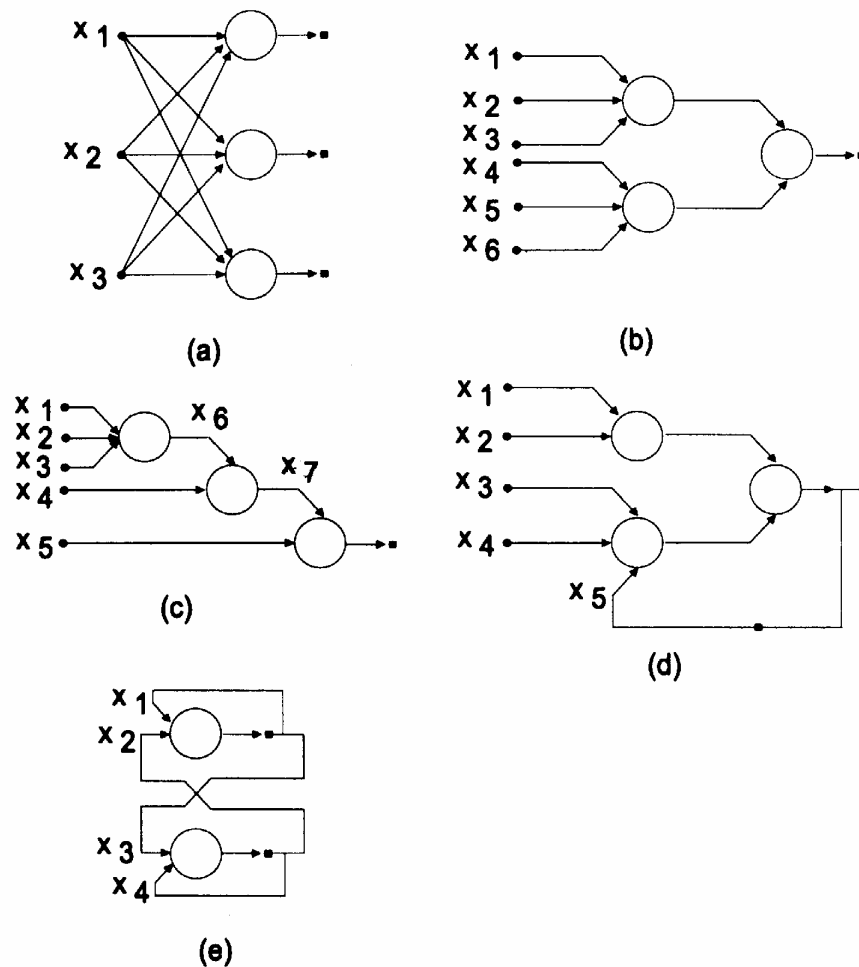


Figura A.3: Exemplos de arquiteturas de RNAs.

Quanto ao número de camadas, pode-se ter:

- Redes de camada única – só existe um nó entre qualquer entrada e qualquer saída da rede (Figura A.3 a, e);
- Redes de múltiplas camadas – existe mais de um neurônio entre alguma entrada e saída da rede (Figura A.3 b, c, d).

Os neurônios podem ter conexões do tipo:

- *Feedforward*, ou acíclica – a saída de um neurônio na  $i$ -ésima camada da rede não pode ser usada como entrada de neurônios em camadas de índice menor ou igual a  $i$  (Figura A.3 a, b, c);
- *Feedback*, ou cíclica – a saída de algum neurônio na  $i$ -ésima camada da rede é usada como entrada de neurônios em camadas de índice menor ou igual a  $i$  (Figura A.3 d, e).



Finalmente, as RNAs podem também ser classificadas quanto à sua conectividade:

- Rede fracamente (ou parcialmente) conectada (Figura A.3 b, c, d);
- Rede completamente conectada (Figura A.3 a, e).

### **A.1.5 Aprendizado ou Treinamento de RNAs**

Treinar uma rede neural consiste em um processo iterativo de ajuste de parâmetros: os pesos das conexões entre as unidades de processamento, que guardam, ao final do processo, o conhecimento que a rede adquiriu do ambiente em que está operando. A fase de treinamento precisa produzir uma rede neural que seja estável e convergente. Uma rede estável mapear qualquer conjunto de entrada para uma saída fixa. A estabilidade garante um resultado, porém não necessariamente um resultado preciso. Por outro lado, uma rede convergente está relacionada a precisão. A amplitude do erro entre os resultados reais e preditos pela rede é uma medida direta da convergência da rede.

Diversos métodos para treinamento de redes foram desenvolvidos, podendo ser agrupados em dois grupos principais: aprendizado supervisionado e aprendizado não supervisionado. Outros dois grupos bastante conhecidos são os de aprendizado por reforço (caso particular de aprendizado supervisionado) e aprendizado por competição (caso particular de aprendizado não-supervisionado).

- Aprendizado supervisionado – um professor externo controla o aprendizado. O objetivo é ajustar os parâmetros da rede, de forma a encontrar uma ligação entre os pares de entrada e saída fornecidos;
- Aprendizado não-supervisionado – nenhum professor externo é usado. Para este algoritmo, somente os padrões de entrada estão disponíveis para a rede. A partir do momento em que a rede estabelece uma harmonia com as regularidades estatísticas da entrada de dados, desenvolve-se nela uma habilidade de formar representações internas para codificar características da entrada e criar novas classes automaticamente.

O método de correção de erros é um método de treinamento primário. Ele é uma forma de treinamento supervisionado e procura minimizar a diferença entre a soma ponderada das entradas pelos pesos (saída calculada pela rede) e a saída

desejada, ou seja, o erro da resposta atual da rede. O termo  $e(t)$  do erro deve ser escrito como:  $e(t) = d(t) - y(t)$ , em que  $d(t)$  é a saída desejada e  $y(t)$  é a resposta atual (calculada) no instante de tempo (ou interação do treinamento supervisionado)  $t$ . Uma forma genérica para alteração dos pesos por correção de erros é apresentada na equação A.4, em que  $\eta$  é a taxa de aprendizado e  $x_i(t)$  é a entrada para o neurônio  $i$  em  $t$ . Segundo a equação 2.4, o ajuste dos pesos deve ser proporcional à função  $g$ :

$$w_i(t + 1) = w_i(t) + \eta g(e(t)x_i(t)) \quad (\text{A.4})$$

Existem vários algoritmos para treinar redes. De acordo com os parâmetros que eles utilizam, os algoritmos podem ser classificados em:

- Estáticos;
- Dinâmicos.

Enquanto os algoritmos estáticos não alteram a estrutura da rede, variando apenas os valores de seus pesos, os algoritmos dinâmicos podem tanto reduzir quanto aumentar o tamanho da rede (número de camadas, número de neurônios nas camadas intermediárias e número de conexões).

### A.1.6 Treinamento com Algoritmo de Retropropagação

Uma das formas mais comuns de treinamento de redes neurais atualmente é o método de correção de erros. Uma das técnicas dessa classe é conhecida como *back-propagation* (retropropagação) <sup>8</sup>.

O trabalho original de McCulloch e Pitts enfocou o modelamento de um neurônio biológico e sua capacidade computacional de execução de funções booleanas. Naquela época surgiram os primeiros computadores digitais. A associação de um modelo artificial de neurônio biológico com funções booleanas estava provavelmente ligada ao pensamento então vigente de que era possível construir uma máquina inteligente por meio de operadores lógicos básicos. Foi somente com o trabalho de Rosenblatt, em 1958, que o conceito de aprendizado em RNAs foi introduzido. O modelo proposto por Rosenblatt, conhecido como perceptron, era composto por uma estrutura de rede, tendo como unidades básicas neurônios, e por uma regra de aprendizado. Embora a topologia do perceptron

possua três níveis (unidades de entrada, intermediária e saída), ela é conhecida como perceptron de uma única camada, já que somente o nível de saída possui propriedades adaptativas <sup>14</sup>.

Apesar de ter causado grande euforia na comunidade científica da época, o perceptron sofreu duras críticas e ficou praticamente esquecido pela área durante os anos 70 e início dos anos 80. Esta visão pessimista da capacidade do perceptron e das RNAs de uma maneira em geral mudou com as descrições da rede de Hopfield em 1982 e do algoritmo *back-propagation* em 1986.

Outro modelo que apareceu quase simultaneamente ao perceptron foi o modelo Adaline (ADaptive LNear NEuron). Ambos os modelos são baseados na idéia de ter-se elementos de processamento executando operações de soma ponderada e posterior comparação com um valor de limiar, porém esses trabalhos surgiram em áreas diferentes com enfoques diferentes. Rosenblatt era psicólogo, enquanto Bernard Widrow trabalhava dentro do contexto de processamento de sinais. O algoritmo de treinamento descrito por Widrow e Hoff é conhecido como regra delta e tem extrema importância na área de RNAs, já deu origem ao algoritmo de retropropagação para treinamento de perceptrons de múltiplas camadas <sup>14</sup>.

O algoritmo de retropropagação é supervisionado que utilizam pares (entrada, saída desejada) para, por meio de um mecanismo de correção de erros, ajustar os pesos da rede. O treinamento ocorre em duas fases, chamadas de fase *forward* e fase *backward*. A fase *forward* é utilizada para definir a saída da rede para um dado padrão de entrada. A fase *backward* utiliza a saída desejada e a saída fornecida pela rede para atualizar os pesos de suas conexões.

As RNAs “*feedforward*” (ver Figura A.3 a, b, c) multicamadas treinadas pelo algoritmo de retropropagação, popularizaram-se a partir do trabalho de Rumelhart, *et al.*, 1986. Uma das vantagens deste tipo de rede é sua capacidade de aproximação de funções não-lineares. Cybenko, 1989, *apud* <sup>90</sup> investigou o número de camadas intermediárias necessárias para a implementação de funções em uma RNA “*feedforward*” e mostrou que RNA com uma camada intermediária é suficiente para aproximar qualquer função contínua e duas camadas são suficientes para aproximar qualquer função matemática.

### A.1.7 Parâmetros de Treinamento da Rede Neural

Existem muitos parâmetros que controlam o desempenho e capacidade preditiva de uma RNA. Para se obter uma rede eficiente, deve-se levar em conta vários aspectos. No caso da RNA escolhida neste trabalho, eles são: (1) seleção do número de camadas ocultas e do número de neurônios nelas contidos; (2) normalização do conjunto de dados de entrada/saída; (3) inicialização dos pesos; (4) determinação da taxa de aprendizado e do termo de momento; (5) seleção de uma função de transferência apropriada e (6) realização de testes sobre-treinamento e de validação <sup>8</sup>.

1. Seleção do número de camadas ocultas e do número de neurônios nelas contidos:

Para determinar o número ótimo de camadas ocultas e o número ótimo de neurônios em cada camada, a rede deve ser treinada usando várias configurações, então é selecionada a configuração com menor número de camadas e neurônios que minimizassem rapidamente e eficientemente a soma dos quadrados dos erros, RMS (“root mean-squares”).

2. Normalização do conjunto de dados de entrada/saída:

A normalização dos dados é um fator muito crítico; se o conjunto de dados de entrada e saída não está na mesma ordem de grandeza, algumas variáveis podem aparecer tendo mais significância que elas realmente têm. O algoritmo de treinamento faz a compensação da diferença de ordem de grandeza pelo ajuste dos pesos da rede, porém esse não é procedimento muito eficiente para muitos algoritmos, por exemplo, o algoritmo de retropropagação. Existem diversos tipos de normalização. Os dados de entrada e saída deste trabalho foram normalizados de acordo com a seguinte regra:

$$x_{i,norm} = \frac{x_i - x_{i,min}}{x_{i,max} - x_{i,min}} \quad (A.5)$$

Em que:  $x_{i,norm}$  é a variável  $x_i$  normalizada com os seus valores mínimo e máximo. Este método usa toda a faixa da função de transferência e com ele todo o conjunto de dados de entrada tem uma faixa de distribuição semelhante, que aumenta a eficiência do treinamento.

### 3. Inicialização dos pesos:

Para iniciar o treinamento da rede neural, primeiramente deve-se estabelecer os valores iniciais para os pesos  $w_{ij}$  entre os neurônios da camada oculta. Tipicamente, os pesos são escolhidos aleatoriamente usando uma distribuição uniforme ou gaussiana.

### 4. Determinação da taxa de aprendizado e do termo de momento:

A taxa de aprendizado e o termo de momento são dois parâmetros muito importantes que controlam quão eficientemente o algoritmo retropropagação treina a rede neural. A taxa de aprendizado  $\eta$  é uma constante positiva, que controla a velocidade do ajuste dos novos pesos baseada no cálculo do gradiente descendente <sup>14</sup>. Entre as várias técnicas utilizadas para acelerar o processo de treinamento e evitar mínimos locais, a adição de um termo de momento é uma das mais freqüentes. O termo de momento é representado pela equação A.6.

$$\psi = \alpha(w_{ji}(t) - w_{ji}(t-1)) \quad (\text{A.6})$$

A fórmula completa de ajuste de pesos utilizando o termo de momento passa então a ser:

$$w_{ji}(t+1) = w_{ji}(t) + \eta \delta_j(t) x_i(t) + \alpha (w_{ji}(t) - w_{ji}(t-1)) \quad (\text{A.7})$$

### 5. Seleção de uma função de transferência apropriada:

Processos biológicos e químicos são complexos e não-lineares, por isso é vantajosa a escolha de uma adequada função de transferência. A escolha da função de transferência tangente hiperbólica, por exemplo, ela tem uma inclinação maior que a função sigmoideal e por isso mostra uma resposta maior para pequenos desvios da variável de entrada.

### 6. Realização de testes sobre-treinamento e de validação:

Um dos mais importantes aspectos no desenvolvimento de uma rede neural é determinar o quão bem a rede realiza um treinamento completo. Verificar o desempenho de treinamento de uma rede envolve dois critérios principais: (1) quão bem a rede prediz a resposta atual (calculada) do conjunto de dados usado para treinar a rede; e (2) quão bem a rede prediz respostas a partir de conjuntos de dados que não foram usados no treinamento.

### A.1.8 Vantagens do Uso de Redes Neurais

Redes neurais têm inúmeras propriedades que dão a elas vantagens sobre outras técnicas computacionais. Na rede neural <sup>8</sup>:

1. A informação é distribuída sobre um campo de neurônios;
2. Tem a habilidade para aprender;
3. Tem habilidade para estocar grande quantidade de informação e acessá-la facilmente;
4. É apropriada para processar dados com ruídos, incompletos, ou inconsistentes. Se o valor de uma variável é apagado, o modelo não irá ser afetado substancialmente. A rede minimiza os ruídos, o sinal enviado para, e a partir dos neurônios são funções contínuas;
5. Redes neurais imitam o processo de aprendizagem humano;
6. Possui abstração automática – pode determinar as relações essenciais de entrada e saída automaticamente. A base de conhecimento é simplesmente uma coleção de fatos, regras e heurísticas em um domínio específico de aplicação. Através de treinamento com dados numéricos diretos (às vezes imprecisos), a rede pode automaticamente determinar relações de causa e efeito.
7. Tem potencial de uso em tempo real – pode levar muito tempo para ser treinada, mas uma vez treinada calcula resultados muito rapidamente. Ela tem o potencial para ser usada *on line* em um sistema de controle.

A rede neural é uma ferramenta de modelo empírico e opera por ajuste de curva. É paralela, pois cada neurônio trabalha independentemente dos outros. Por causa do paralelismo, redes neurais têm uma melhor capacidade de filtração de dados com ruídos ou incompletos. Chentouf *et al.*, 1997, <sup>23</sup> apresentaram RNAs *feedforward* multicamada, denominadas incrementais, e usaram dados reais para estudar sua capacidade de filtrar ruídos e evitar *overfitting* no sistema.

Porém, a rede neural tem algumas limitações, pois necessita de longos tempos de treinamento, grandes quantidades de dados para o treinamento e não tem nenhuma garantia de bom resultado e credibilidade. A rede neural pode cair em mínimos locais, ser precisa em determinadas regiões e imprecisas em outras.

A explosão do uso de redes neurais aplicadas a engenharia pode ser atribuída a algumas razões <sup>90</sup>:

6. O tremendo avanço de *hardware* que possibilitou que o treinamento das redes fosse econômico, relativamente fácil e rápido;
7. O sucesso na aplicação de RNAs que utilizam técnicas algorítmicas ou sistemas especialistas para sensores;
8. A capacidade de extrair informações das plantas industriais de maneira eficiente;
9. Alguns profissionais sustentam que RNAs são mais fáceis de usar e aplicar a processos reais quando comparadas a aproximações de modelos;
10. Finalmente a versatilidade na estrutura e aplicação das RNAs que possibilita seu uso com modelos convencionais (sistemas híbridos).

## A.2 SISTEMA HÍBRIDO NEURAL

Embora RNAs tenham se mostrado uma técnica eficiente para a solução de um grande número de problemas, é um grave erro afirmar que elas são suficientes para resolver qualquer tipo de problema. RNAs apresentam várias limitações que não permitem seu uso exclusivo. Sistemas híbridos combinam dois ou mais tipos diferentes de enfoques de modelagem matemática, podendo um deles ser uma RNA, para formar um sistema heterogêneo com características inteligentes <sup>14</sup>.

A utilização de redes neurais em modelos híbridos é prática difundida em vários campos <sup>111</sup>. Modelos híbridos são constituídos de modelos fenomenológicos acoplados a redes neurais, cuja função é fornecer parâmetros ou substituir equações constitutivas do modelo. A idéia por trás do desenvolvimento de sistemas híbridos é a de que uma única técnica, devido às suas limitações e/ou deficiências, pode não ser capaz, por si só, de resolver um dado problema. Neste caso, a combinação de duas ou mais técnicas pode levar a uma solução mais robusta e eficiente. É importante ressaltar, porém, que a utilização de sistemas híbridos não leva necessariamente a uma melhora do desempenho do sistema como um todo sobre aquele obtido individualmente pelas técnicas que foram combinadas para gerá-los.

Um importante foco de pesquisas em sistemas híbridos tem sido o de combinar técnicas fortemente baseadas em dados (RNAs, por exemplo) com técnicas que utilizam de conhecimento. Algumas abordagens têm sido propostas para integrar RNAs com:

- Estatística;
- Lógica fuzzy;
- Sistemas baseados em conhecimento;
- Algoritmos genéticos;
- Raciocínio baseado em casos;
- Lógica matemática;
- Linguagens formais;
- Agentes inteligentes;
- Sistemas tutores;
- Linguagem natural.

Montecino, 1995, *apud*<sup>1</sup> descreveu uma metodologia geral para formulação de um modelo híbrido-neural:

- Estabelecer as equações de balanço que junto com relações termodinâmicas e de transporte, permitem relacionar as variáveis de entrada e saída com parâmetros do modelo;
- Determinar quais os parâmetros do modelo que serão estimados pela rede neural e estabelecer a dependência com as variáveis de entrada;
- Determinar a estrutura e o treinamento das redes neurais usando dados obtidos do processo;
- Avaliar a qualidade do ajuste e a capacidade de predição do modelo final usando dados não incluídos no ajuste.

Em reações enzimáticas, muitos efeitos podem influenciar a velocidade de reação, tais como inibição/ativação por produtos e/ou reagentes. A obtenção de modelos que representem adequadamente o comportamento dos dados experimentais não é uma tarefa fácil. Para poder reduzir o número de parâmetros que decorrem do modelo mecanístico usado, geralmente se fazem hipóteses muito simplificadoras. Esses modelos tornam-se restritos e a cinética da reação pouco generalizável.



A aplicação de modelos híbridos usando RNAs em processos biotecnológicos vem aumentando nos últimos anos. Os aspectos do problema que são bem conhecidos são descritos por equações matemáticas, enquanto RNAs descrevem os termos desconhecidos do modelo <sup>79</sup>, no nosso caso a cinética de síntese de ampicilina. Ferreira e Kalid, 2000, <sup>56</sup> usaram um sistema híbrido para simular e otimizar a produção de uma planta industrial de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Os autores usaram uma rede neural *feedforward* para estimar a cinética da reação com função de transferência sigmoidal. Harada *et al.*, 2000, <sup>84</sup> usaram um sistema híbrido-neural para descrever a velocidade específica de crescimento celular numa fermentação alcoólica. A rede neural usou um algoritmo de Levenberg Maquardt em FORTRAN 90. A rede era do tipo *feedforward* com 6 neurônios na camada oculta. Alencar *et al.*, 2000, <sup>1</sup> usaram o sistema híbrido neural para controle preditivo em uma fermentação alcoólica contínua. As velocidades específicas de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato foram dadas pela rede neural.

### A.3 APLICAÇÕES

Pelo fato das RNAs serem aptas a resolver problemas de cunho geral, tais como aproximação, classificação, categorização, predição, etc., a gama de áreas onde estas podem ser aplicadas é bastante extensa. Em processamento de sinais e imagens, as RNAs ganharam grande popularidade nos últimos anos como ferramenta alternativa e às vezes complementar às técnicas clássicas. Nessas áreas, as aplicações das RNAs envolvem reconhecimento de caracteres a mão, compactação de dados, reconhecimento da fala, entre outras <sup>14</sup>.

RNAs são usadas em problemas de classificação tais como, reconhecimento de imagens (classificação de caracteres, reconhecimento de faces e assinaturas); reconhecimento de sons e classificação financeira (análise de crédito, previsão de falências). Lee *et al.*, 1996, <sup>111</sup> usaram um sistema híbrido neural para fazer previsões de falência em empresas de um sistema financeiro. Numerosos modelos que fazem a previsão de preços são criados e estudados. Yao *et al.*, 2000, <sup>174</sup> usaram RNAs como ferramenta para prever preços no mercado financeiro com precisão e eficiência.

Em sistemas complexos de engenharia, relações empíricas geralmente são empregadas para estimar parâmetros. Geralmente, um sistema complexo é caracterizado por um número de interações cujas correlações cruzadas não são inteiramente conhecidas. Além disso, os dados associados a esses parâmetros geralmente são incompletos e com ruídos. Extrair informação desses dados para desenvolver relações empíricas é uma tarefa difícil que requer sofisticada técnica de modelagem bem como intuição e experiência. O uso de redes neurais vem aliviar este problema<sup>66</sup>. RNAs foram utilizadas<sup>146</sup> para obtenção da velocidade de reação enzimática para a síntese *in vitro* de dextrana e velocidade de adsorção e dessorção para a dextranasacarase. Foram treinadas duas redes, com algoritmo de retropropagação, uma para a síntese e outra para a adsorção.

Recentemente o interesse no desenvolvimento e aplicação de metodologias de sistemas não-lineares emergiu e numerosos artigos nessa área foram publicados. Entretanto, em muitos sistemas não-lineares é extremamente difícil e caro obter um modelo preciso do processo. Esta dificuldade limitou o uso de modelos não-lineares a regiões e sistemas em que o modelo obtido é seguro. Uma das barreiras no uso desses modelos na indústria química/petroquímica é o custo do desenvolvimento do modelo e sua validação<sup>90</sup>.

Devido às características não-lineares inerentes ao mapeamento entre camadas de RNAs *feedforward*, estas são como ferramentas de modelamento bastante apropriadas para esses sistemas<sup>14</sup>. A aplicação de RNAs em processos biotecnológicos vem aumentando nos últimos anos. Elas têm sido utilizadas para estimar variáveis de estado, para determinar fases biológicas em conjunto com sistemas especialistas<sup>94</sup>. Os processos fermentativos, por exemplo, são de difícil controle porque envolvem microrganismos vivos. Ferreira *et al.*, 2000,<sup>49</sup> estudaram a influência das variáveis na otimização de crescimento do fungo *penicillium chrysogenum* para produção de antibiótico. Os autores usaram redes neurais como ferramenta para reduzir um número de experimentos a ser realizado em um planejamento fatorial. Linko *et al.*, 1997,<sup>117</sup> usaram RNAs em sensores no controle *on-line* da produção de enzimas. Os programas de rede usaram o algoritmo de retropropagação em visual C++. Em 1998, Linko<sup>118</sup> mostrou que a lógica fuzzy associada à RNA é uma valiosa ferramenta no processo de controle

da indústria alimentícia. Sistema híbrido neuro-fuzzy foi usado, em escala industrial, para controle de nível na refinaria de óleo Idemitsu Chiba no Japão <sup>119</sup>. Hanisch *et al.*, 2000, <sup>83</sup> simularam reatores biológicos para processo de tratamento de esgotos domésticos utilizando redes neurais. Os autores utilizaram a função de ativação tangente hiperbólica e os algoritmos de retropropagação padrão e retropropagação com o termo de momento. As redes foram implementadas no *software* MATLAB 5.2.

Parisi *et al.*, 2001, <sup>137</sup> compararam RNA e modelo difusional para o cálculo de taxa de reações heterogêneas gás-sólido em estado estacionário. Os autores concluíram que ambas velocidades (aproximações da RNA e calculadas do balanço de massa na partícula) eram semelhantes, entretanto, o tempo de processamento da rede neural era cerca de vinte vezes mais rápido. Assim, essa metodologia seria útil quando a cinética da reação fosse desconhecida ou quando os dados cinéticos não pudessem ser usados num modelo convencional.

## APÊNDICE B

### B.1 Reator de Escoamento em Vórtices (REV)

O escoamento que aparece no espaço anular entre dois cilindros, sendo que ao menos um deles seja rotatório, é a base de numerosos estudos de fluidodinâmica. Observando a Figura 2.15 vê-se um esquema de dois cilindros concêntricos com a formação de pares de vórtices com sentidos alternados de rotação, pela rotação do cilindro interno. A partir de uma rotação crítica, inicia-se a formação de vórtices toroidais sobrepostos ao fluxo principal de Couette.

G. I. Taylor (1923) <sup>165</sup> determinou a velocidade de rotação crítica dos cilindros para a formação de vórtices no espaço anular. A rotação do cilindro interno impõe uma força centrífuga mais alta ao fluido adjacente do que àquele mais distante. Até certo limite, a força viscosa consegue compensar esse efeito, mas a partir da rotação chamada de crítica, o escoamento de Couette torna-se instável. Surgem, então, pares de vórtices girando em sentidos opostos. A amplitude axial do vórtice é aproximadamente igual ao tamanho da abertura anular. A energia que é transmitida para o fluido pela rotação do cilindro interno produz dois movimentos rotacionais: uma rotação tangencial global e uma rotação secundária (com componente axial e radial) dentro dos vórtices.

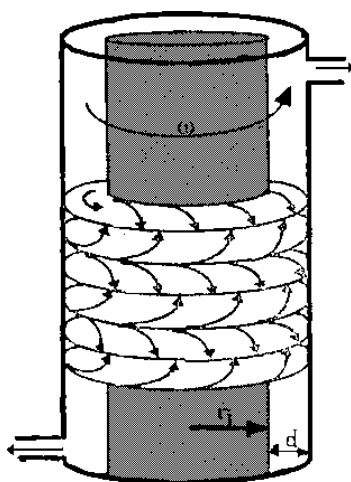


Figura 2.15 Reator de escoamento em vórtice de Taylor-Poiseuille.

Taylor calculou teoricamente e confirmou experimentalmente o critério para a formação de vórtices em um anel estreito, baseado no número de Taylor ( $Ta$ ),

assim chamado “*a posteriori*” por outros autores. Este autor descartou os termos não lineares das equações de Navier-Stokes e conseguiu solucioná-las, antecipando a rotação crítica para o início da instabilidade. O escoamento de Couette é facilmente reproduzível sendo, portanto, muito adequado para o estudo das conseqüências de distúrbios infinitesimais em seu campo de velocidades.

O escoamento de Couette, entre dois cilindros em rotação, tem um campo de velocidades na direção  $\theta$ , função apenas do raio  $r$ , dado por  $V(r) = Ar + B/r$ .<sup>10</sup> Se  $\Omega_1$  for a velocidade de rotação do cilindro interno de raio  $r_1$  e  $\Omega_2$  a velocidade de rotação do cilindro externo com raio  $r_2$ , tem-se:

$$A = \frac{r_1^2 \Omega_1 - r_2^2 \Omega_2}{r_1^2 - r_2^2} \quad (\text{B.1})$$

$$B = \Omega_1 \frac{r_1^2 (1 - \Omega_2 / \Omega_1)}{1 - (r_1/r_2)^2} \quad (\text{B.2})$$

As variáveis  $u_1$ ,  $u_2$ , e  $u_3$ , denominadas perturbações do campo de velocidades, são definidas como a diferença entre os componentes da velocidade do escoamento real e da velocidade de Couette, respectivamente nas direções  $r$ ,  $\theta$  e  $z$ . A variável  $p'$  é a perturbação da pressão, ou seja, a diferença entre a pressão real e a de Couette (que varia com  $r$  e  $z$ , na ausência de vórtices). As perturbações  $u_1$ ,  $u_2$ , e  $u_3$  são pequenas comparadas com  $V(r)$ ; assim, Taylor linearizou as equações de Navier-Stokes; em coordenadas cilíndricas, desprezando seus quadrados e produtos:

$$\frac{\partial u_1}{\partial t} - \frac{\partial V u_2}{r} = \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{p'}{\rho} \right) + \nu \left( \nabla^2 u_1 - \frac{u_1}{r^2} \right) \quad (\text{B.3})$$

$$\frac{\partial u_2}{\partial t} + \left( \frac{dV}{dr} + \frac{V}{r} \right) u_1 = \nu \left( \nabla^2 u_2 - \frac{u_2}{r^2} \right) \quad (\text{B.4})$$

$$\frac{\partial u_3}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left( \frac{p'}{\rho} \right) + \nu \nabla^2 u_3 \quad (\text{B.5})$$

em que  $\nu$  é a viscosidade cinemática e

$$\nabla^2 = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2}{\partial z^2}. \quad (\text{B.6})$$

As condições de contorno são:

$$u_1 = u_2 = u_3 = 0 \quad \text{em} \quad r = r_1 \text{ e } r = r_2. \quad (\text{B.7})$$

A equação da continuidade para o caso axissimétrico é:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (u_1 r) + \frac{\partial u_3}{\partial z} = 0 \quad (\text{B.8})$$

Os cilindros são considerados de comprimento infinito. Taylor propôs uma solução das equações (B.3)-(B.5) e (B.8) na seguinte forma:

$$\begin{aligned} u_1 &= u_1(r) \cos kz e^{st} \\ u_2 &= u_2(r) \cos kz e^{st} \\ u_3 &= u_3(r) \sin kz e^{st} \end{aligned} \quad (\text{B.9})$$

Em que  $s$  é a velocidade de crescimento das perturbações com o tempo e  $k$  o número de onda axial, adimensional (o valor de  $z$  é dado pela distância axial dividida pelo espaçamento entre os cilindros). Assim, o campo de velocidades irá repetir-se periodicamente na direção axial ( $z$ ) a intervalos  $\lambda = 2\pi/k$ . Taylor deduziu, a partir do conjunto de hipóteses já descrito, que  $\lambda$  corresponde à altura de um par de vórtices e é igual ao dobro do espaço anular,  $d = r_2 - r_1$ . Em outras palavras, cada vórtice tem altura igual ao espaçamento entre os cilindros. Os padrões da periodicidade axiais são pares de vórtices, um girando no sentido horário e outro no anti-horário.

Depois de cálculos laboriosos, Taylor chegou a uma expressão que antecipa a rotação crítica para o início da instabilidade como uma função da velocidade de rotação dos cilindros, dos raios dos cilindros e da viscosidade do fluido. O número adimensional de Taylor ( $Ta$ ) pode ser facilmente transformado no número de Reynolds tangencial. Em muitos artigos o número de Reynolds é usado como o parâmetro de controle ao invés do número de Taylor. O número de Taylor crítico,  $Ta_c$ , em um determinado equipamento com um certo fluido, indica a velocidade para o surgimento dos vórtices:

$$Ta_c = \frac{\Omega_i R_i d}{\nu} \left( \frac{d}{R_i} \right)^{1/2} = 41,2 \quad (\text{B.10})$$

em que:  $Ta_c$  é o valor do número de Taylor crítico,  $\Omega_i$  é a rotação do cilindro interno,  $R_i$  é o raio do cilindro interno,  $d$  é o espaço anular e  $\nu$  é a viscosidade cinemática.

Quando  $Ta$  fica significativamente maior que  $Ta_c$ , surgem outros padrões de escoamento: vórtices ondulados e vórtices espiralados aparecem entre  $Ta = 15Ta_c$  e  $30Ta_c$ . O escoamento fica turbulento, mas retém o movimento em vórtices entre  $Ta = 30Ta_c$  e  $160Ta_c$ . O escoamento completamente turbulento acontece a aproximadamente  $Ta = 250Ta_c$ .<sup>3,102</sup> A teoria linear de estabilidade, desenvolvida por Taylor, pode prever o perfil de velocidades no vórtice perto de  $Ta_c$ .

O escoamento de Taylor provavelmente é um dos fenômenos mais estudados no campo da fluidodinâmica. Apesar do número de publicações, a complexidade inerente do sistema está longe de um completo entendimento<sup>110</sup>. Enquanto a aproximação linear de Taylor fornece previsões razoavelmente boas perto de  $Ta_c$  para cilindros de comprimento infinito, é inadequada quando aplicada a rotações maiores, já que a aproximação linear prevê incorretamente um crescimento exponencial do tamanho dos vórtices depois do início do fluxo secundário. Nesta região os termos não lineares das equações de Navier-Stokes devem ser considerados.

Quando combinamos ao escoamento rotacional de Taylor-Couette um escoamento contínuo axial de Poiseuille, aumentamos a complexidade do problema. As características fluidodinâmicas desse escoamento favorecem sua aplicação em reações catalisadas por enzimas imobilizadas, já que combina alta agitação devido aos vórtices (melhorando o transporte de massa sem danificar as enzimas imobilizadas) com um baixo escoamento axial. Assim, o escoamento de Taylor-Couette-Poiseuille (ETCP) pode, devido a sua estrutura celular, combinar características de escoamento tubular ideal (“plug-flow”), com o comportamento local de tanque de mistura ideal<sup>100,101</sup>.

A superposição do escoamento axial de Poiseuille tem um efeito estabilizador na formação dos vórtices, atrasando-os até rotações mais altas. Para este tipo de fluxo, o volume do vórtice é perfeitamente misturado na direção tangencial e radial<sup>102</sup>. Assim, a dispersão no sistema de Taylor-Couette é basicamente independente da velocidade do fluxo. Esta característica é útil para controle do reator que ajusta a reação independentemente da velocidade de escoamento<sup>130</sup>.

Vários trabalhos apresentam experimentos de transferência de massa para o REV. O grupo de Kataoka <sup>100,133</sup> usa a suposição do empilhamento, em que os vórtices caminham empilhados uns sobre os outros, bem ordenados, e adota um duplo vórtice bem agitado como modelo de célula básica. No reator, os vórtices estão bem organizados, como se vê na Figura 2.16, que mostra um corte longitudinal do reator.

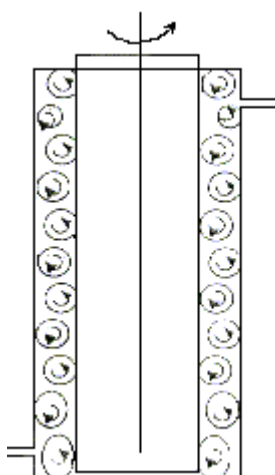


Figura B.1: Corte longitudinal do reator de fluxo de vórtice. <sup>62</sup>

A aproximação geral de “vórtices empilhados” também foi usada por outros autores <sup>113,130,141,164</sup>, mas muitos deles ressaltaram que os vórtices não seriam bem misturados, ou se restringiram à região turbulenta <sup>113,164</sup>. O modelo de dispersão axial clássica foi aplicado para a transferência de massa em uma ampla faixa de números de Reynolds axial e rotacional, porém nestes trabalhos não se detalhou a estrutura do vórtice <sup>130,143</sup>. Todos esses trabalhos têm uma característica em comum: um único parâmetro de transporte de massa seria suficiente para a descrição do sistema.

Ainda com a teoria de que os vórtices não seriam bem misturados, principalmente na região laminar, surgiu a necessidade de dois parâmetros, os coeficientes inter e intravórtice de transferência de massa para modelar os experimentos <sup>34</sup>.

Simulações utilizando fluidodinâmica computacional, realizadas com o REV, claramente mostraram a possibilidade de existir um “by-pass” de fluxo convectivo ao redor dos vórtices <sup>82</sup>. Então, resultados experimentais



contradisseram a suposição do “empilhamento” de vórtices para uma ampla faixa de rotação e fluxo axial <sup>62</sup>. Todos esses dados experimentais mostraram um comportamento similar, com uma zona de transição entre o padrão “*plug flow*” e o perfeitamente agitado. Durante seus experimentos, os autores observaram uma configuração de fluxo estável e reproduzível. A velocidade  $V_d$  (relação entre a velocidade com que os vórtices caminhavam ao longo do reator e a velocidade axial média) era significativamente menor que um, numa região de número de Reynolds axial baixo. Também foi observado que essa velocidade decrescia com o aumento de rotação. Observaram a existência de um “*by-pass*” ao redor dos vórtices, como mostra a Figura B.2. Em (a) os vórtices ficam mais lentos e aparece um escoamento de fluido circundando-os. O tempo de residência dentro do vórtice fica maior que o tempo de residência do reator. Tem-se um fluxo com o valor de  $V_d$  menor que um. Em (b) tem-se vórtices empilhados com  $V_d$  aproximadamente igual um.

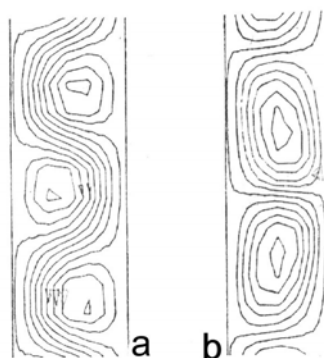


Figura B.2: Comparação de correntes de fluxo a) com “*by-pass*”, b) com “empilhamento” <sup>120</sup>.

A Figura B.3 mostra a velocidade  $V_d$  como uma função dos números de Reynolds axial e rotacional. Supondo que o número de Reynolds axial seja fixado, um aumento na rotação retardará o andamento dos vórtices, e aumentará o fluxo pelo “*by-pass*” ao redor deles. Ao mesmo tempo, a transferência de massa vórtice/“*by-pass*” também será acentuada, bem como a mistura intravórtice.

Reduzindo a rotação, a velocidade  $V_d$  aproxima-se da unidade, e a hipótese do “empilhamento de vórtices” ( $V_d = 1$ ) fica mais consistente. O sistema se aproximaria de um reator “*plug flow*”. Experimentos de determinação da distribuição de tempos de residência após a injeção de traçador, permitem estimar

coeficientes de transferência de massa do REV. Uma correlação para  $V_d$  foi, também, estabelecida<sup>144</sup>.

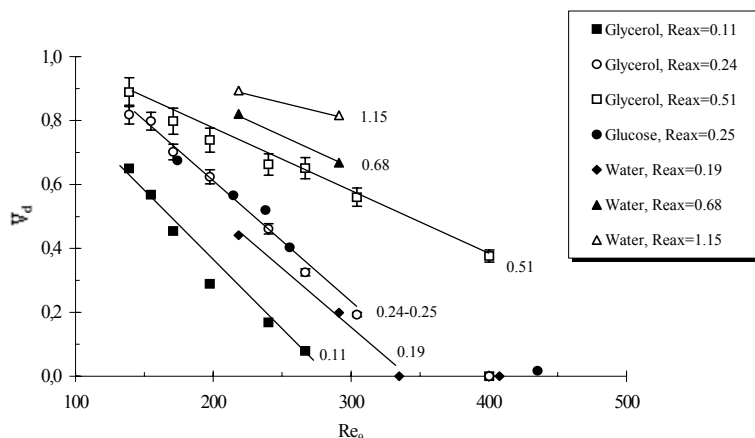


Figura B.3: Velocidade de arraste em função dos números de Reynolds rotacional e axial para diversos fluidos<sup>62</sup>.

O interesse no uso das estruturas do fluxo em vórtices para melhorar o desempenho de reatores tem sido apresentado por vários autores. Podemos citar:

- (1) Um reator fotocatalítico, onde os autores usaram o REV com algas para converter  $\text{CO}_2$  eficazmente a  $\text{O}_2$ <sup>154</sup>. Vórtices moviam as algas para dentro e fora da porção iluminada do reator. As algas periodicamente iluminadas convertiam  $\text{CO}_2$  mais eficazmente a  $\text{O}_2$ .
- (2) Um REV fotoquímico, com uma lâmpada de UV em posição axial dentro do cilindro interno, feito de material transparente. A limitação maior do processo fotoquímico para a remoção de micropoluentes ocorre quando a absorvância da água a ser tratada é elevada. Considerando as baixas concentrações de poluente em soluções, só uma camada muito pequena absorve os fótons neste caso. Assim, as condições de mistura são de importância extrema para a eficiência do reator. O escoamento em vórtices foi empregado para renovar continuamente a camada líquida próxima da lâmpada de UV. O fluxo de Couette-Taylor melhorou a eficiência do processo fotolítico, aumentando o rendimento do processo<sup>115</sup>.
- (3) Um filtro com escoamento de Couette-Taylor-Poiseuille para a separação de protoplasma de sangue. O sangue era alimentado no topo do anel entre os cilindros coaxiais. Protoplasma atravessava a membrana porosa rotatória que

formava o cilindro interno, saindo pelo fundo do equipamento com a vantagem dos vórtices reduzirem a tensão de cisalhamento e não danificarem os eritrócitos<sup>120</sup>.

- (4) Um reator com escoamento de Couette-Taylor contínuo para polimerização de emulsão de látex<sup>92</sup>.
- (5) Um REV para polimerizar o estireno<sup>100</sup>.
- (6) Uma simplificação linear das equações de Navier-Stokes para modelar o ETCP em reator fotoquímico<sup>82</sup>.
- (7) Modelo com parâmetros de transferência de massa para reação de isomerização enzimática de glicose, além dos resultados experimentais do REV com a presença de uma reação<sup>64</sup>.

Embora agora seja óbvio que o REV não combine o escoamento “*plug flow*” perfeito com a mistura intravórtice perfeita, ele ainda tem vantagens: a habilidade para produzir um dado grau de micromistura com uma dispersão axial relativamente menor que tipos convencionais de fluxo. O ganho no desempenho do reator resulta do fato de que a mistura local pode, dentro de certos limites, ser aumentada independentemente do fluxo axial aplicado. A importância de um modelo adequado de escoamento, para prever corretamente o comportamento deste sistema, é evidente. É importante reconhecer e tentar prever o fluxo padrão que ocorre. Esse conhecimento é essencial para confiar na previsão do desempenho do REV e ter uma base para decidir numa conveniente aplicação em processos reais.

## APÊNDICE C

### C.1 MÉTODO DE ANÁLISE EM HPLC DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE AMPICILINA

Cromatografia é o nome dado a uma família particular de técnicas de separação, que foram pela primeira vez usadas em 1903 por Tswett<sup>24</sup> para separar substâncias coradas donde, aliás, lhe vem o nome. Atualmente a técnica é usada para uma grande variedade de misturas que só ocasionalmente têm cor. O método de cromatografia líquida de alta eficiência foi usado para analisar as sínteses realizadas nesse trabalho. Para acompanhar a síntese de ampicilina, obter uma melhor resolução dos reagentes e produtos da síntese e trabalhar com soluções menos tóxicas e mais simples foram testadas quatro fases móveis.

Usou-se dois cromatógrafos líquido de alto desempenho, um da marca Waters, outro marca Shimadzu. Utilizou-se coluna adequada a análise de fármacos: coluna Nova-Pak, C18, 60 Å, 4 µm, 3,9 × 150 mm da Waters. Os componentes das fases móveis usadas eram todos de grau analítico para uso em HPLC. Todas as fases móveis testadas estão de acordo com as encontradas na literatura.

#### C.1.1 – FASE MÓVEL 1

Preparou-se uma fase móvel composta por 250 mM de fosfato de amônio, 20 % de etanol, não sendo necessário ajustar o pH. As condições de operação em modo isocrático foram:

- Vazão: 1,5 mL/min
- Temperatura: 30 °C
- $\lambda = 220$  nm

Os cromatogramas obtidos quando se analisou o padrão contendo fenilglicina e outro padrão contendo ampicilina tinham tempos de residência muito próximos, aproximadamente 2,1 e 2,5 minutos respectivamente. Este comportamento inviabilizou a utilização desta fase móvel, pois a seletividade estava próxima da unidade.

### C.1.2 – FASE MÓVEL 2

Esta fase móvel era composta por tampão fosfato de amônio 50 mM e 20 % de metanol. As condições de operação do HPLC foram:

- Vazão: 1,5 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- $\lambda = 220$  nm

Nestes cromatogramas o padrão de ampicilina apresentou tempo de residência de 4,7 minutos, enquanto o padrão de fenilglicina o tempo de residência de 2,5 minutos. Ao se testar o padrão contendo 6-APA esta fase móvel foi descartada, pois o tempo de residência deste padrão era de 3,0 minutos. Novamente, não se obteve resolução nos cromatogramas.

### C.1.3 – FASE MÓVEL 3

Preparou-se uma fase móvel contendo 25 % de metanol e 20 % de acetonitrila (v/v), Com o pH igual a 2,4. Observou-se que aumentando a apolaridade da fase móvel conseguia-se uma melhora na resolução. Injetava-se 20  $\mu$ L de amostra. As condições de operação do HPLC foram:

- Vazão: 1,5 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- $\lambda = 210$  nm

Esta fase móvel foi descartada, pois os tempos de residência da fenilglicina e do 6-APA eram praticamente idênticos, além disso, o tempo de residência do último componente (EMFG) chegava a 25 minutos.

### C.1.4 – FASE MÓVEL 4

Fez-se um gradiente de metanol de 10 % a 65 % em 7 minutos com solução B de 67 mM de fosfato de potássio com pH igual a 4,7. Injetava-se 20  $\mu$ L de amostra.

- Vazão: 1,5 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- $\lambda = 210$  nm

O tempo de residência do EMFG também era alto, 20 minutos, e a resolução obtida também não foi boa. A fase móvel usada foi a que forneceu a melhor resolução entre a FG e o 6-APA, mas ainda apresenta um tempo de retenção das amostras alto, cerca de 17 minutos, além disso, usou-se uma concentração alta de acetonitrila. Assim, ainda serão testadas outras fases móveis seguindo a metodologia sugerida por Ciola, 1998. Mais detalhes sobre as fases móveis testadas consultar Harik-Khan, 1995; Moats, 1995 e Sorensen *et al.*, 1997. A fase móvel é composta por 10mM de  $H_3PO_4$  5 mM de  $KH_2PO_4$ , 5 mM de lauril sulfato sódico (SDS) e 35 % de acetonitrila (v/v). Injetava-se 20  $\mu$ L de amostra com 1,5 mL/min, 25 °C e 210 nm.

## APÊNDICE D

### D.1 PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DE FOTOGRAFIAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A metodologia consiste na fixação, desidratação e secagem das células para observação em microscópio eletrônico de varredura (DSM 920). Algumas modificações foram propostas por Araújo, 1995. As amostras contendo os biocatalisadores são fixadas em glutaraldeído (solução a 25%) diluído em solução tampão fosfato (0,1 M) em pH 6,5. As proporções das diluições estão ilustradas na Tabela D.1.

Tabela D.1: Diluições das soluções empregadas

Glutaraldeído 25 % (mL)	Tampão fosfato 0,1 M (mL)	Volume final (mL)
12,0	88,0	100,0
9,0	66,0	85,0
6,0	44,0	50,0
3,0	22,0	25,0
1,2	8,8	10,0

O procedimento utilizado para a preparação do biocatalisador foi executado através das seguintes etapas:

1. Cobrir as amostras com solução de glutaraldeído 25%, de 8 a 12 horas antes da sua manipulação. Usar para isso, tubo de ensaio pequeno, e tampa-lo com filme plástico. Armazenar a amostra a temperatura de 4 a 10 °C;
2. Após o tempo de incubação das amostras, retirar a solução de glutaraldeído com auxílio de uma pipeta e, realizar a lavagem das amostras com a solução de tampão fosfato preparada por 10 minutos. Repetir o procedimento por três vezes. Entre as lavagens deve-se agitar o tubo de ensaio para homogeneização;

3. Desidratar as amostras na seqüência indicada em soluções de álcoois:
  - álcool 50 % durante 10 minutos;
  - álcool 70 % durante 10 minutos;
  - álcool 80 % durante 10 minutos;
  - álcool 90 % durante 10 minutos;
  - álcool 95 % durante 10 minutos;
  - álcool 100 % durante 10 minutos;
4. Em seguida, colocar as amostras em vidro de relógio e proceder a secagem com hexametildisilazane (HMDS) durante 30 segundos. Essa operação deverá ser realizada em capela devido à toxicidade do HMDS;
5. Após a secagem deste material por aproximadamente 10 minutos, proceder a colagem em suportes metálicos (apropriados para a realização de microscopia) com “cola de prata” (prata condutora 200-B, Degussa, S.A.);
6. Colocar os suportes onde as amostras foram colocadas em estufa a 30 °C por aproximadamente 1 hora. Esse tempo poderá ser maior, entretanto deve-se evitar o ressecamento das amostras, para não alterar a estrutura do biocatalisador;
7. As amostras preparadas são então recobertas com banho de ouro (99,99 %) em um metalizador (SDS – 050 Balzers), sendo em seguida analisadas em microscópio eletrônico de varredura.

## D.2 REFERÊNCIAS

- ARAUJO, J. C. Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leite fluidizado alimentado com esgoto sanitário sintético. São Carlos, SP, Escola de engenharia de São Carlos, USP, 1995. (Dissertação)
- NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, v. 58(6), p. 347-351, 1983.



## APÊNDICE E

### E.1 RESULTADOS DO PROGRAMA

A seguir estão listados os resultados do programa fatorial usado para obtenção dos gráficos normal das estimativas, semi-normal dos valores absolutos das estimativas, uma lista dos efeitos incluídos na modelagem do planejamento e, finalmente, a resposta prevista pelo modelo e o resíduo para o rendimento de síntese de ampicilina com relação ao 6-APA e ao EMFG, para a produtividade, para a seletividade e para as velocidades iniciais de síntese de ampicilina.

Observou-se que todos os modelos aproximados apresentados foram satisfatórios, pois os gráficos dos resíduos contra as respostas têm aparência aleatória e os gráficos normais dos resíduos têm aparência mais ou menos retilínea. Como já citado anteriormente, a identificação dos valores dos efeitos é representada por uma combinação de letras, em que cada letra representa um sinal positivo na matriz de planejamento. Os sinais negativos não são representados. As letras, em ordem alfabética, representam os diversos fatores. Assim, por exemplo, se há três fatores, os níveis superiores foram representados pelas letras **a**, **b** e **c**, nessa ordem. O segundo ensaio que corresponde aos níveis (+ - -), foi representado simplesmente pela letra **a**.

As fórmulas utilizadas nos cálculos dos rendimentos, produtividade, seletividade estão a seguir:

$$R = \frac{C_{amp}^{max}}{C_{6-APA}^{inicial}} \quad (4.1)$$

$$P = \frac{C_{amp}^{max}}{t_{max}} \quad (4.2)$$

$$S = \frac{C_{amp}}{C_{FG}} \quad (4.3)$$

### DADOS PARA PRODUTIVIDADE

GRAFICO NORMAL DAS ESTIMATIVAS

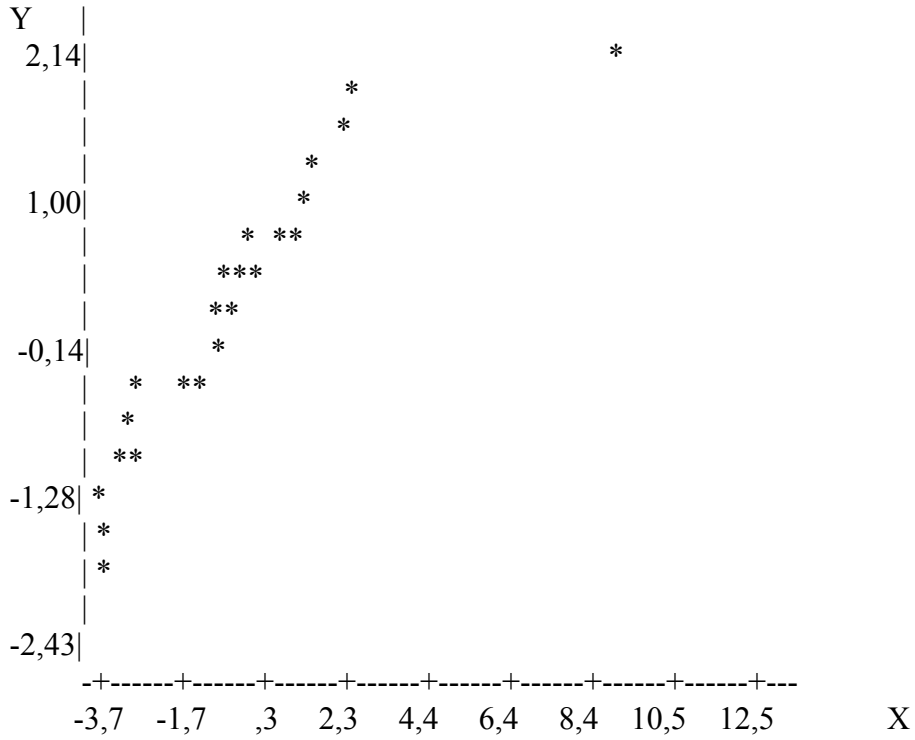
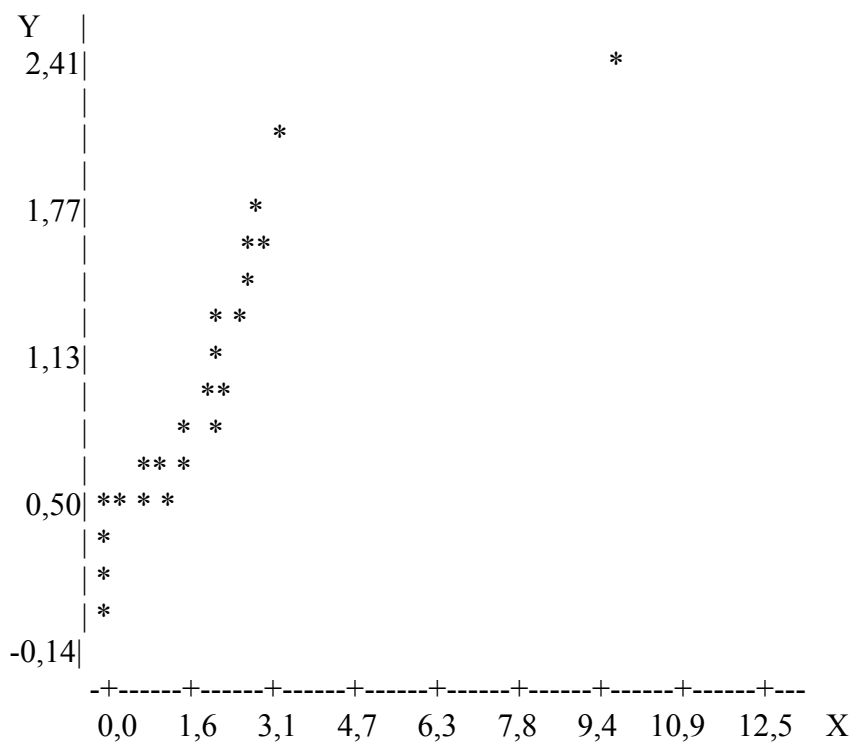


GRAFICO SEMI-NORMAL DOS VALORES ABSOLUTOS DAS ESTIMATIVAS



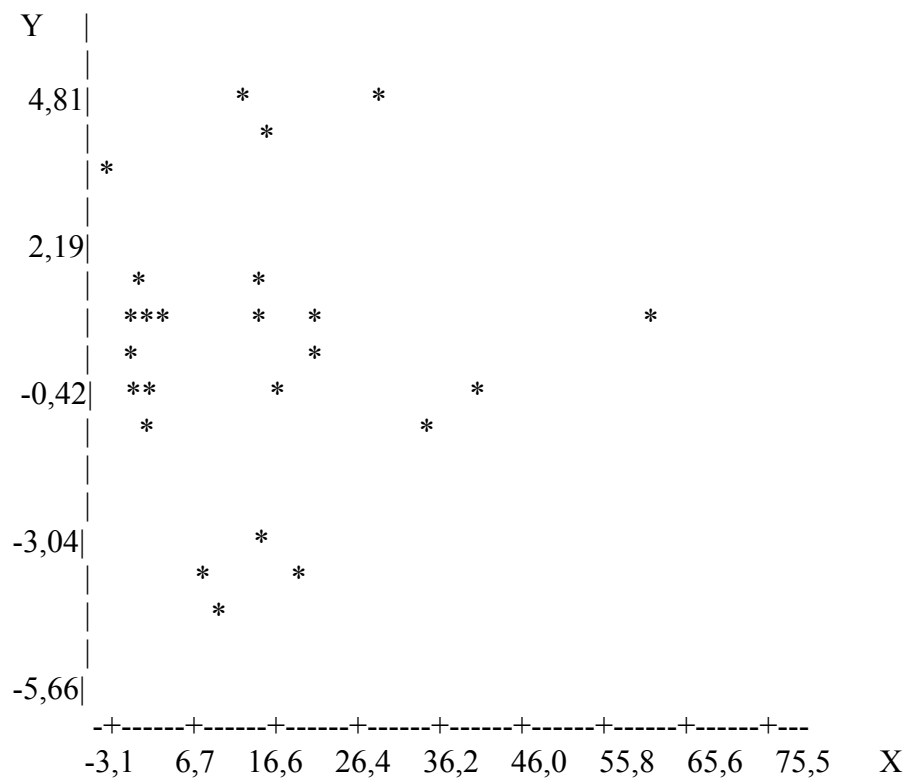
## VALORES DOS EFEITOS QUE SERAO INCLUIDOS NA MODELAGEM:

I = 14,3618  
 A = -2,8751  
 B = 3,9057  
 AB = 0,0000  
 C = 2,0474  
 AC = -3,2007  
 BC = 2,8601  
 ABC = -2,9381  
 D = -3,7488  
 AD = 0,0000  
 BD = 0,0000  
 ABD = 0,0000  
 CD = 0,0000  
 ACD = 0,0000  
 BCD = 0,0000  
 ABCD = 2,6563  
 E = 2,7469  
 AE = 0,0000  
 BE = 0,0000  
 ABE = 0,0000  
 CE = 0,0000  
 ACE = 0,0000  
 BCE = 0,0000  
 ABCE = -3,5632  
 DE = -2,6274  
 ADE = 2,9094  
 BDE = -3,6213  
 ABDE = 1,7331  
 CDE = 0,0000  
 ACDE = 4,3151  
 BCDE = -2,8632  
 ABCDE = 12,4824

ENSAIO	RESPOSTA	RESPOSTA PREVISTA	RESIDUO
(1)	3,9500	2,7631	1,1869
a	22,8500	18,0395	4,8105
b	20,1100	20,7745	-0,6645
ab	1,7800	1,1781	0,6019
c	21,6200	25,5380	-3,9180
ac	2,3700	3,4669	-1,0969
bc	1,0400	1,7319	-0,6919
abc	28,1700	28,3980	-0,2280
d	8,2500	12,3790	-4,1290
ad	,5600	,9056	-0,3456
bd	,8100	1,0506	-0,2406

abd	20,8500	19,4490	1,4010
cd	1,9200	1,6569	0,2631
acd	0,3880	-3,0755	3,4635
bcd	49,2900	50,0255	-0,7355
abcd	1,8800	1,5569	,3231
e	42,1300	37,8095	4,3205
ae	1,1700	1,4581	-0,2881
be	1,2100	1,6031	-0,3931
abe	43,6700	44,8795	-1,2095
ce	2,5800	2,2094	0,3706
ace	18,7000	22,3550	-3,6550
bce	46,0000	45,4560	0,5440
abce	2,4200	2,1094	0,3106
de	2,0200	2,5731	-0,5531
ade	9,2200	14,2220	-5,0020
bde	17,4300	16,9570	0,4730
abde	1,0200	,9881	,0319
cde	25,8300	21,7205	4,1095
acde	3,7400	3,2769	0,4631
bcde	1,6000	1,5419	0,0581
abcde	25,0000	24,5805	0,4195

GRAFICO DOS RESIDUOS CONTRA AS RESPOSTAS PREVISTAS





## DADOS PARA RENDIMENTO DE SÍNTESE COM RELAÇÃO AO 6-APA INICIAL

GRAFICO NORMAL DAS ESTIMATIVAS

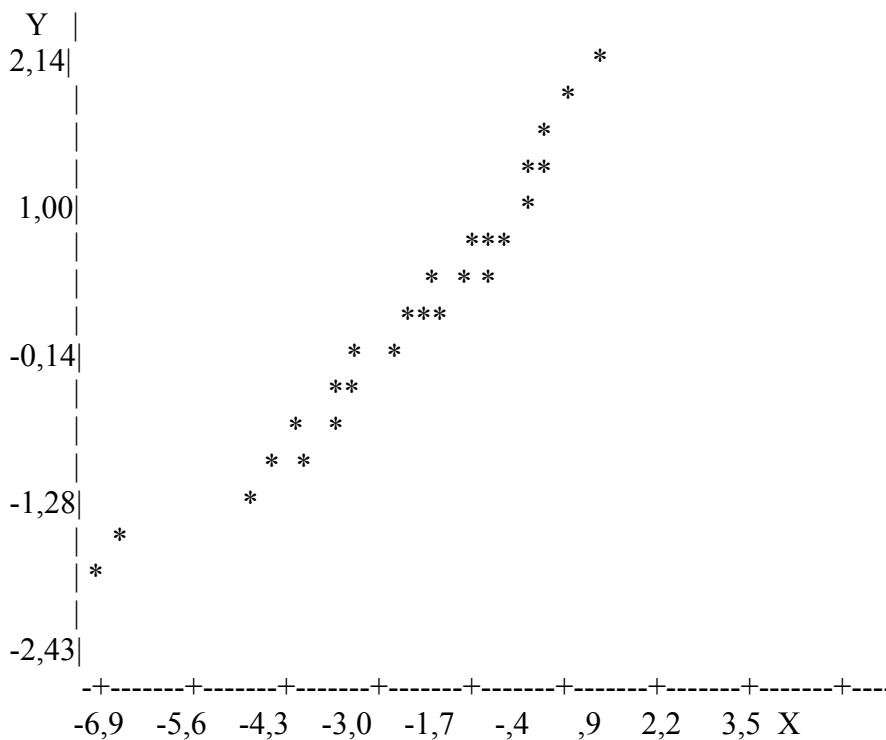
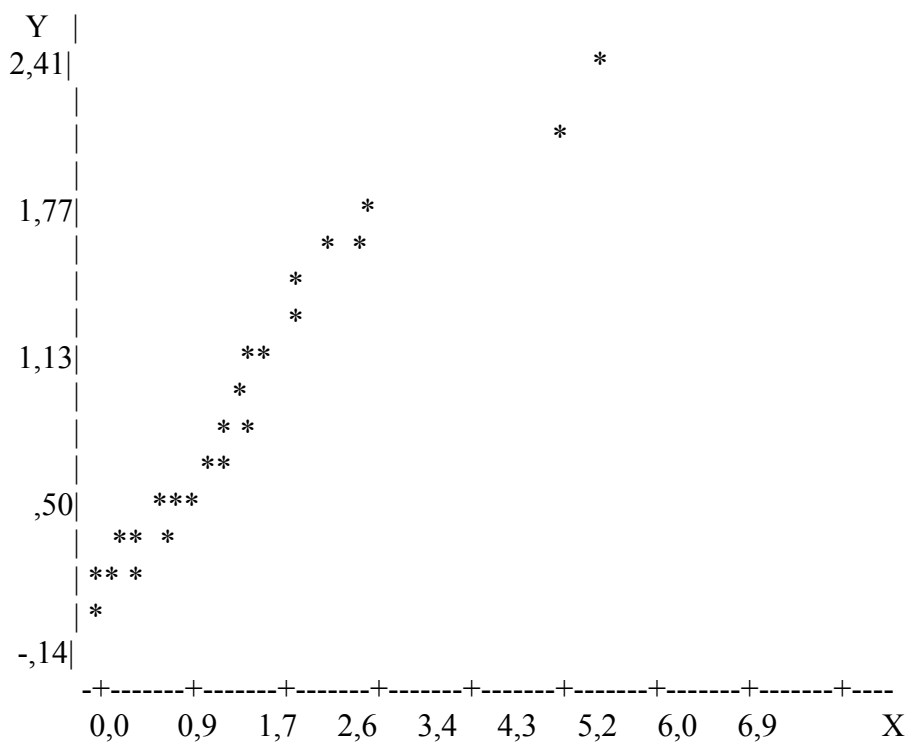


GRAFICO SEMI-NORMAL DOS VALORES ABSOLUTOS DAS ESTIMATIVAS



## VALORES DOS EFEITOS QUE SERAO INCLUIDOS NA MODELAGEM:

I	=	28,7456
A	=	-6,2375
B	=	-6,8644
AB	=	0,0000
C	=	0,0000
AC	=	-1,5406
BC	=	0,0000
ABC	=	0,0000
D	=	-1,6988
AD	=	0,0000
BD	=	1,9950
ABD	=	-2,0281
CD	=	0,0000
ACD	=	0,0000
BCD	=	-2,7306
ABCD	=	1,9575
E	=	-3,1988
AE	=	2,2119
BE	=	0,0000
ABE	=	2,1331
CE	=	-3,6919
ACE	=	3,4950
BCE	=	0,0000
ABCE	=	0,0000
DE	=	0,0000
ADE	=	-1,9725
BDE	=	-1,5306
ABDE	=	1,9800
CDE	=	-1,8375
ACDE	=	2,7919
BCDE	=	0,0000
ABCDE	=	-2,7831

## RESULTADOS DA MODELAGEM

ENSAIO	RESPOSTA	RESPOSTA PREVISTA	RESIDUO
(1)	56,9200	59,7031	-2,7831
a	29,6700	30,1156	-0,4456
b	18,8600	20,2306	-1,3706
ab	16,5900	17,1056	-0,5156
c	50,3400	52,9569	-2,6169
ac	33,8400	33,3569	0,4831
bc	44,5400	43,3694	1,1706
abc	15,1800	12,3069	2,8731
d	42,6200	43,0919	-0,4719
ad	36,2300	37,5569	-1,3269

bd	24,4600	23,6394	0,8206
abd	13,0600	14,5769	-1,5169
cd	55,4200	54,7481	0,6719
acd	27,9100	28,9406	-1,0306
bcd	49,9900	45,4106	4,5794
abcd	15,4800	14,0006	1,4794
e	41,0600	41,7306	-0,6706
ae	41,4100	36,5881	4,8219
be	17,0200	18,9006	-1,8806
abe	15,0000	19,1806	-4,1806
ce	36,5200	35,8869	0,6331
ace	24,6700	24,0919	0,5781
bce	20,2000	20,6769	-0,4769
abce	25,2900	20,9094	4,3806
de	46,6200	46,7019	-0,0819
ade	31,6100	29,3919	2,2181
bde	32,3700	33,5419	-1,1719
abde	11,2100	17,8744	-6,6644
cde	32,4000	29,9606	2,4394
acde	22,5200	24,9381	-2,4181
bcde	10,3900	9,1806	1,2094
abcde	10,4600	9,1956	1,2644

GRAFICO DOS RESIDUOS CONTRA AS RESPOSTAS PREVISTAS

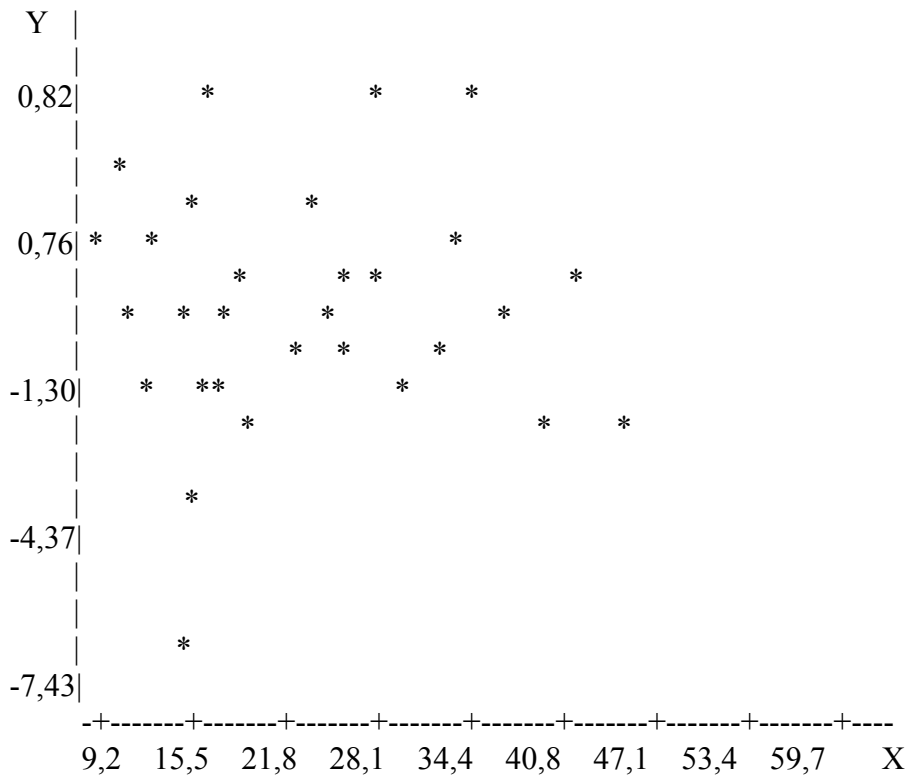
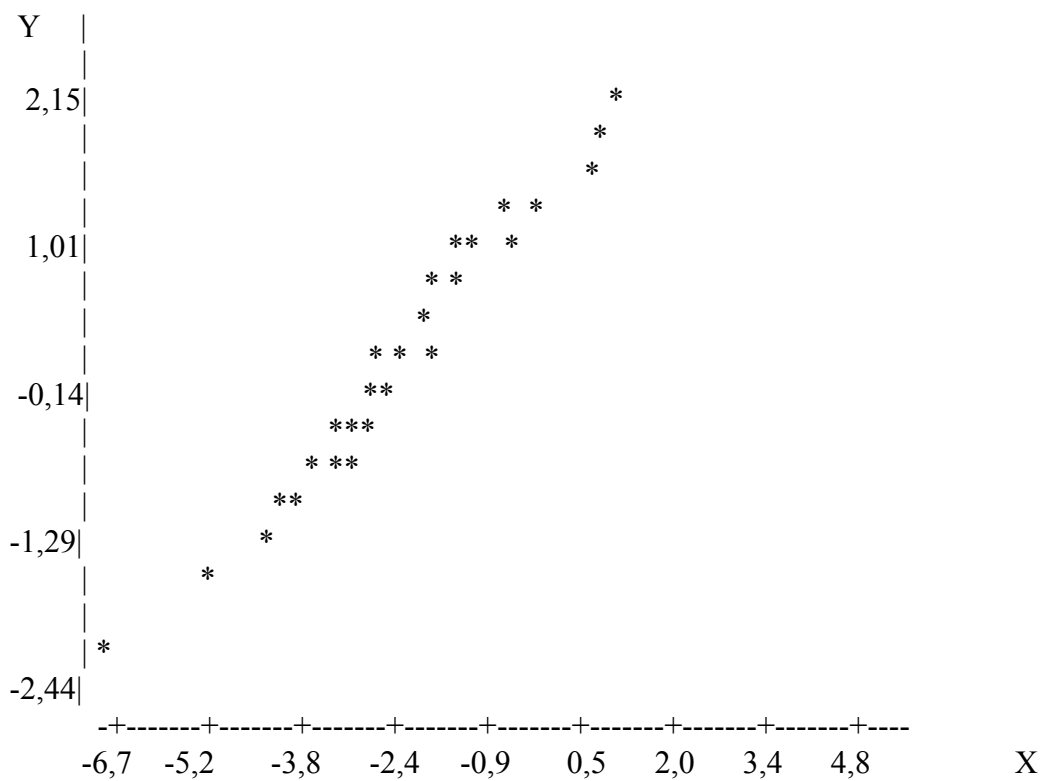




GRAFICO NORMAL DOS RESIDUOS



### DADOS PARA A SELETIVIDADE

GRAFICO NORMAL DAS ESTIMATIVAS

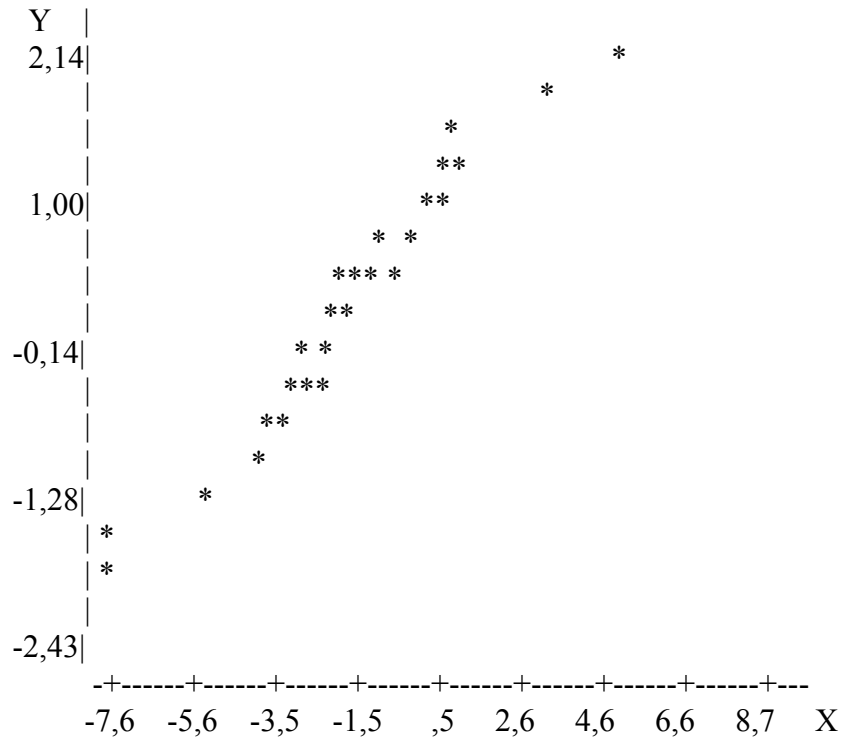
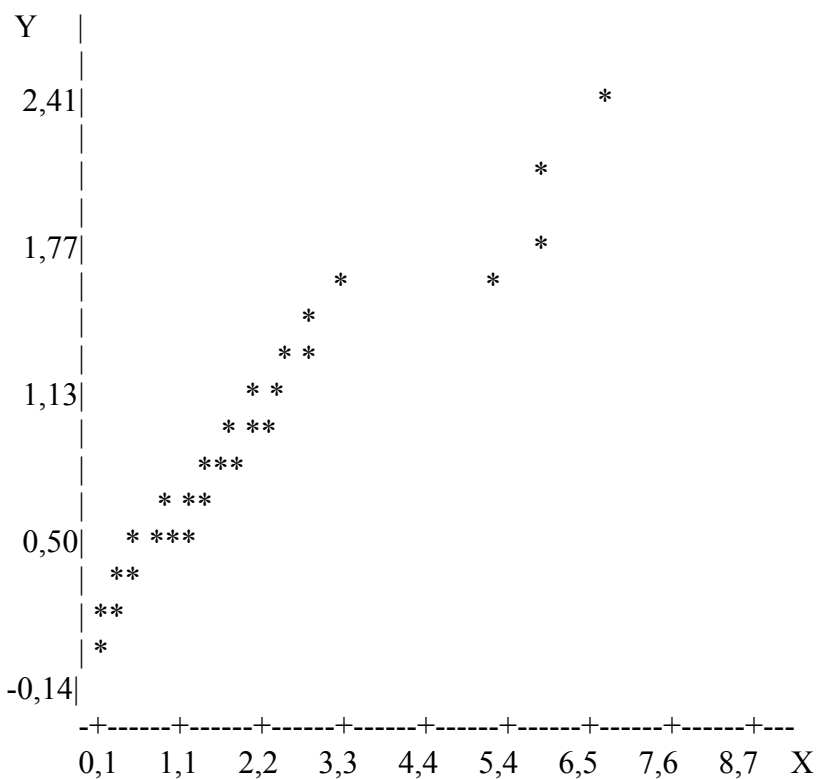


GRAFICO SEMI-NORMAL DOS VALORES ABSOLUTOS DAS ESTIMATIVAS



## VALORES DOS EFEITOS QUE SERAO INCLUIDOS NA MODELAGEM:

I = 27,1213  
 A = 0,0000  
 B = 0,0000  
 AB = 2,8944  
 C = 3,4694  
 AC = 0,0000  
 BC = 3,2494  
 ABC = 0,0000  
 D = -1,5450  
 AD = 0,0000  
 BD = 6,5650  
 ABD = ,0000  
 CD = 2,0356  
 ACD = ,0000  
 BCD = ,9819  
 ABCD = -7,5800  
 E = -1,1881  
 AE = -2,5775  
 BE = -2,7244  
 ABE = 3,5675  
 CE = -1,0438  
 ACE = 8,6569  
 BCE = ,0000  
 ABCE = ,0000  
 DE = -1,4431  
 ADE = 2,6963  
 BDE = -7,4681  
 ABDE = -2,3275  
 CDE = -4,1613  
 ACDE = 1,2406  
 BCDE = -2,0925  
 ABCDE = 1,8081

ENSAIO	RESPOSTA	RESPOSTA PREVISTA	RESIDUO
(1)	18,0800	16,5000	1,5800
a	65,7500	66,6575	-0,9075
b	18,5000	18,3100	0,1900
ab	18,0500	18,9125	-0,8625
c	47,8300	46,3913	1,4387
ac	29,2200	29,3313	-0,1113
bc	9,7000	11,3488	-1,6488
abc	20,1600	19,8388	0,3212
d	8,6000	8,3275	0,2725
ad	6,2000	5,8000	0,4000
bd	8,4700	7,1100	1,3600

abd	46,7200	48,7525	-2,0325
cd	18,6000	18,1188	0,4812
acd	14,4000	13,5538	0,8463
bcd	79,6200	79,7488	-0,1287
abcd	43,0500	44,2488	-1,1988
e	49,2800	46,2588	3,0213
ae	13,1500	14,8437	-1,6937
be	26,6100	27,8612	-1,2512
abe	8,4400	8,5162	-0,0762
ce	43,3500	43,3525	-0,0025
ace	19,1900	18,5150	0,6750
bce	19,1000	19,3075	-0,2075
abce	52,2500	52,7150	-0,4650
de	49,8100	48,0963	1,7138
ade	8,3400	8,7263	-0,3863
bde	16,6700	16,7513	-0,0813
abde	15,7600	17,0063	-1,2462
cde	12,1200	13,0800	-0,9600
acde	38,0200	36,3875	1,6325
bcde	14,6900	13,3775	1,3125
abcde	28,1500	30,1350	-1,9850

GRAFICO DOS RESIDUOS CONTRA AS RESPOSTAS PREVISTAS

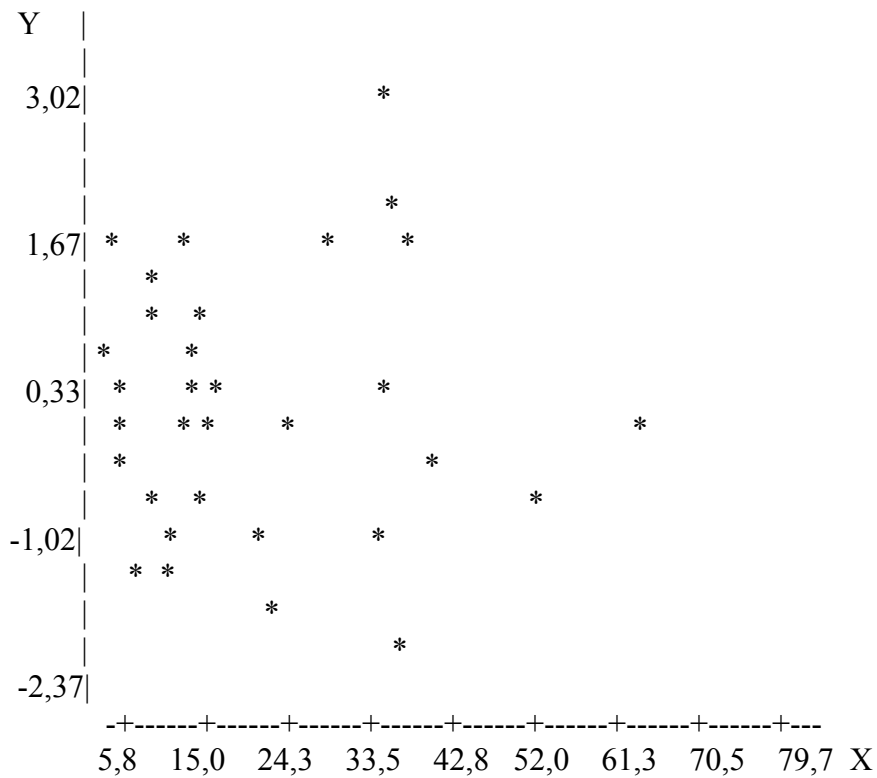


GRAFICO NORMAL DOS RESIDUOS

