

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

**INOVAÇÕES NA PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS  
β-LACTÂMICOS**

Dasciana de Sousa Rodrigues

**SÃO CARLOS  
2009**

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

**INOVAÇÕES NA PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS  
β-LACTÂMICOS**

Dasciana de Sousa Rodrigues

Tese de Doutorado submetida 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.

Orientador (a): Raquel de Lima Camargo Giordano

Co-orientador: Antônio José Gonçalves da Cruz

SÃO CARLOS  
2009

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

R696ip

Rodrigues, Dasciana de Sousa.

Inovações na produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos /  
Dasciana de Sousa Rodrigues. -- São Carlos : UFSCar,  
2009.

163 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2009.

1. Biotecnologia. 2. Penicilina G acilase. 3. Enzimas -  
purificação. 4. Imobilização. 5. Ácido 6-aminopenicilânico. 6.  
Adsorção. I. Título.

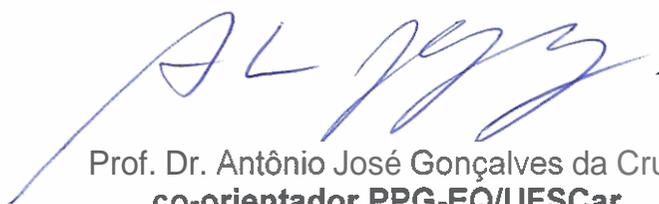
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE DASCIANA DE SOUSA RQDRIGUES, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 02 DE ABRIL DE 2009.

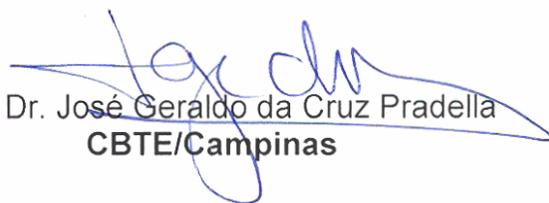
BANCA EXAMINADORA:



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel de Lima Camargo Giordano  
**orientadora, PPG-EQ/UFSCar**



Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz  
**co-orientador, PPG-EQ/UFSCar**



Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella  
**CBTE/Campinas**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves  
**DEQUIFC**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Andrade Santana  
**FEQUINICAMP**



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior  
**PPG-EQ/UFSCar**

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Raimundo e Graça, aos meus irmãos Dárcia, Dariana e Denílson, aos meus sobrinhos Débora, Douglas, Isabele e Isaiane, a Maria Antônia e Natanael.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as providências ao longo do caminho (a família, amigos verdadeiros, a bolsa, a orientadora-mãe, os resultados, saúde....enfim, tudo);

À família, pelo impulso para que eu chegasse aqui;

À professora Raquel, pela formação excelente que me foi dada, como profissional e pessoa.

Ao professor Antônio pela paciência e persistência no desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Roberto por disponibilizar o laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos;

Ao professor Guisán e todo o grupo do ICP da Universidad Autonoma de Madrid, pelos ensinamentos e acolhida carinhosa;

Ao professor Francisco Rodrigues pelo grande exemplo de vida;

Aos amigos cearenses, James, Juliana, Wellington, Cássia, Luíza, Karol, Geísa e Bete, que passaram por aqui e aliviaram a saudade do sotaque lindo do Ceará;

À Alcinéia pelas palavras doces nas horas difíceis;

À Dona Gerarda (mãe da Luíza), e Dona Fátima (mãe da Francimeire) pelas orações;

Aos amigos de sempre (Virna, Cícero, Fabiana (*in memorian*), Anário, Isabel, Leonildes, Elisângela), por orarem por mim;

Aos amigos do DEQ-UFSCar, André (Morcegaum), Aline, Anny, Andréa, Alice, Ana Maria, Adilson, Adriano, Álvaro, Amadeus, Inti, Carlos, Mônica, Marcelo Ribeiro, Tiago (técnico), Dani, Edson, Gian, KK, Karolzinha, Vanessa, Juliana, Gilson, Rebeca, William, Sandrinha, Bia e tantos outros, pela ajuda com o trabalho e pelo carinho;

Às amigas de república: Geísa, Karol, Leticia, Patrícia e todos os agregados (Fábio – Pé, Gleice, Moniquinha, Bete, James) pela boa convivência e amizade;

À Leticia Marciniuk (PI), em especial, serei eternamente grata por disponibilizar o seu computador exclusivamente para a escrita desta tese;

Ao André (morcegaum), por ser tão prestativo, amigo e atencioso.

Ao Edson, Gian e KK, por me ajudarem com os experimentos em bioreator;

Ao Sr. Rubens Leidinger, pela ajuda com o revestimento da chapa perfurada, também pelas palavras de incentivo;

Aos funcionários da Prodotti, Suzana, Nilo e Neide pelas informações e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários do departamento de Engenharia Química: Oscar, Adilson, Juliana, Edilson, Amadeus, Espanhol e Tiago, pelo apoio técnico;

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pela dedicação, atenção e orientação das atividades do doutorado;

Ao Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDPEE) pela bolsa concedida para o estágio no exterior; à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para frente."

Soren Kierkegaard

## RESUMO

A produção industrial de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) inclui etapas de cultivo de *Penicillium chrysogenum*, extração com solvente orgânico, cristalização, hidrólise enzimática e precipitação. O interesse industrial e científico em reduzir o número de etapas deste processo tem motivado pesquisadores a buscar processos alternativos para obtenção de 6-APA. Neste trabalho, um novo processo é apresentado para a produção de 6-APA, cujas inovações envolvem a hidrólise de penicilina durante o cultivo de *P. chrysogenum*, a recirculação de ácido fenilacético (AFA) e extração de 6-APA ao final do cultivo utilizando adsorvente iônico. Para atender aos requerimentos do novo processo, foi desenvolvido um biocatalisador para atuar no complexo meio de cultivo. O preparo deste biocatalisador exigiu o uso de extrato enzimático purificado e uma metodologia para purificação de penicilina G acilase (PGA) foi investigada. Um fator de purificação aparente de 4,5 vezes foi obtido e a enzima foi ligada a agarose utilizando a técnica de imobilização covalente multipontual. O biocatalisador obtido apresentou boa estabilidade química em condições de esterilização e aplicação em biorreator. Entretanto, sua estabilidade mecânica sob condições rigorosas de agitação em biorreatores tipo tanque agitado e aerado não foram satisfatórias. Para solucionar este problema três estratégias foram avaliadas: (1) utilizando-se uma peça em forma de hélice envolvendo os impelidores, (2) adicionando-se o biocatalisador ao biorreator após a concentração de células atingir seu valor máximo e utilizando velocidade de agitação constante de 300 rpm, (3) usando um biorreator tipo “air lift”. As três estratégias permitiram manter a integridade do biocatalisador. Hidrólise completa de penicilina (30 g/L) foi obtida em 120 h de cultivo e a extração de 6-APA em coluna de troca iônica foi estudada. O método de extração de 6-APA através de interação iônica utilizando quitosana-arginina apresentou resultados promissores, entretanto, um aperfeiçoamento do método ainda faz-se necessário para atingir a recuperação de 6-APA em níveis satisfatórios para a indústria farmacêutica. Os resultados obtidos indicam que é possível eliminar o uso de solventes orgânicos na produção de 6-APA, além disso, a redução no número de etapas torna este processo mais simples e conseqüentemente reduz o tempo de produção e custo do produto final. Portanto, o processo desenvolvido neste trabalho é promissor para a aplicação na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: penicilina G acilase, purificação, imobilização, penicilina, hidrólise, ácido 6-aminopenicilânico, adsorção, interação iônica.

## ABSTRACT

The industrial production of 6-APA includes: (1) cultivation of *Penicillium chrysogenum*; (2) extraction with organic solvents, (3) crystallization; (4) penicillin hydrolysis by immobilized penicillin acylase; (5) extraction of phenyl acetic acid (AFA); (6) precipitation of 6-APA at its isoelectric point ( pH ~ 3,6). The scientific community and industry have interest in reducing the number of process steps required for 6-APA production. In this thesis a new method for 6-APA production is presented. In this process, the simultaneous production and hydrolysis of penicillin was carried out. The 6-APA was extracted from culture broth using ionic adsorbent. To demonstrate the technical viability of the process a suitable biocatalysts to perform the hydrolysis of penicillin in the complex media has been developed. The enzymatic extract, containing PGA was partially purified by affinity adsorption on agarose-tryptophan, it was necessary to prepare the biocatalyst. The apparent purification factor obtained was 4,5 and purified PGA was immobilized on agarose-glyoxil by multipoint covalent attachment. The biocatalysts obtained show stability under conditions of sterilization and application in bioreactor. However, their mechanical stability under vigorous conditions of agitation used in stirred tank bioreactors was not satisfactory. Three strategies were used to avoid fragmentation of the biocatalyst. The first strategy was to involve the impellers with a helicoidal structure. In this system the biocatalyst was maintained under agitation in external bulk of the apparatus. In the second strategy, the biocatalyst was introduced into the bioreactor as the biomass density reached a maximum, in this case, the cultivation was carried out under constant agitation speed (300 rpm). An airlift bioreactor was used as third strategy to maintain the pellet structure. These systems were efficient in increasing medium agitation without destroying the pellets. Complete hydrolysis of penicillin (30 g / L) was obtained after five days of cultivation and extraction of 6-APA on ionic exchanger was investigated. The extraction of 6-APA by ionic interaction using chitosan modified with glutaraldehyde and arginine is a good method for recovery it. However, optimization in this method is necessary to achieve the recovery of 6-APA at satisfactory levels for the pharmaceutical industry. The new method for production of 6-APA shows that is possible to eliminate the use of organic solvents and to reduce the number of process steps.

Keywords: penicillin G acylase, purification, immobilization, penicillin, hydrolysis, 6-aminopenicillanic acid, adsorption, ionic interaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura básica da molécula de penicilina (Fonte: Barros, (2008) - dissertação de mestrado).....	5
Figura 3.2: Estrutura básica da molécula de penicilina G (MENEZES, 2000). X= H (benzilpenicilina) e X= K (sal de potássio).....	6
Figura 3.3: Rota para a biosíntese de penicilina G por <i>P. chrysogenum</i> . Fonte: Menezes, 2000. ....	7
Figura 3.4: Estrutura do ácido 6-amino penicilânico (6-APA). Fonte: Barros, 2008 - dissertação de mestrado. ....	11
Figura 3.5: Equilíbrio de dissociação de 6-APA com o aumento de pH.....	12
Figura 3.6: Esquema da formação de cristais de 6-APA na presença de AFA. ....	13
Figura 3.7: Reação da hidrólise de PG. Fonte: Pribyl et al., 2002. ....	26
Figura 4.1: Equilíbrio de dissociação de 6-APA com o aumento de pH.....	29
Figura 4.2: Reação da formação de agarose gliceril.....	33
Figura 4.3: Formação de agarose glioxi .....	33
Figura 4.4: Reação de agarose glioxil com etilediamino.....	34
Figura 4.5: Formação de agarose-glutaraldeído. ....	34
Figura 4.6: Formação do suporte de afinidade. ....	35
Figura 4.7: Desenho esquemático do aparato utilizado para o cultivo de <i>P. chrysogenum</i> . Fonte: Nucci et AL., 2009. ....	43
Figura 4.8: Esquema do princípio de funcionamento de reator “air lift”. Adaptada de <a href="http://www.rcub.bg.ac.yu">www.rcub.bg.ac.yu</a> .....	44
Figura 4.9: Esquema da estrutura química do adsorvente quitosana-arginina .....	46
Figura 5.1: Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, com revelação em prata. Coluna 1: marcadores de peso molecular; 2: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro hidrolisado; 3: caldo fermentativo ultrafiltrado e dialisado uma vez, com soro hidrolisado 4: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro hidrolisado 5: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro integral; 6: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado	

uma vez, com soro integral 7: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro integral.....	52
Figura 5.2: Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, com revelação em coomassie blue. Coluna 1: marcadores de peso molecular; 2: caldo fermentativo inicial ultrafiltrado, com soro integral (pH 8,8); 3: sobrenadante da adsorção em agarose-fenilalanina; 4: sobrenadante da adsorção em agarose-fenilglicina; 5: sobrenadante da adsorção em agarose-triptofano; 6: sobrenadante da dessorção em agarose-fenilalanina; 7: sobrenadante da dessorção em agarose-fenilglicina; 8: sobrenadante da dessorção em agarose-triptofano. ....	57
Figura 5.3:Espectro de absorção em infravermelho de agarose modificada quimicamente: (a) Agarose-O-CH <sub>2</sub> -CHO (agarose-glioxil); (b) Agarose-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (agarose-amino); (c) Agarose-O-CH <sub>2</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> )-N= CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COH (agarose-amino glutaraldeído); (d) (d) agarose amino-gluataraldeído-triptofano.....	58
Figura 5.4: Estrutura química do suporte de afinidade agarose-triptofano. ....	59
Figura 5.5: Esquema de suporte de afinidade. (a) com elevada concentração de grupos de afinidade; (b) com baixa concentração de grupos de afinidade.....	60
Figura 5.6: Eletroforese dos ensaios de dessorção em gel poliacrilamida 15% . Linha 1: B.S.A.; 2: Dessorção com solução de penicilina; 3: Dessorção com solução de triptofano; 4: Dessorção utilizando solução etanol-água. ....	62
Figura 5.7:Efeito do pH na adsorção de proteína presentes em caldo fermentativo. Adsorção por 4h a 4°C em agitação orbital em gel agarose-triptofano na presença de AFA.....	64
Figura 5.8: Efeito do volume de caldo oferecido por grama de suporte na quantidade de proteína adsorvida a pH 9,0.....	66
Figura 5.9: Caldo fermentativo e adsorvente antes e após adsorção de proteínas em agarose-triptofano. Adsorção em pH 5,6, 4 mL caldo fermentativo/ g adsorvente, 4 °C. ....	67
Figura 5.10:Cinética de imobilização de PGA em suportes com diferentes tamanhos de fibra. (■) Toyopearl; (●) Ag10%; (▲) Ag 2%. ....	70
Figura 5.11: Curvas de inativação para PGA imobilizada em suportes com diferentes tamanhos de fibra a 65°C e pH 7. (■) Toyopearl; (▲) Ag 2%; (●) Ag10%. ....	71

- Figura 5.12: Estrutura química de suportes para imobilização de PGA - a) Agarose-Glioxil (glicidol ou epícloridrina), b) Agarose-Glioxil (epícloridrina) parcialmente oxidado; c) Agarose-Glioxil (epícloridrina) totalmente oxidado e parcialmente bloqueado com Glicina. .... 73
- Figura 5.13: Curvas de inativação térmica a 65°C e pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil (AgGx) com diferentes graus de ativação e contendo diferentes grupos funcionais. (●) AgGx (glicidol  $\approx$  200  $\mu$ mol aldeído/g suporte); (◆) Gx total(236 $\mu$ mol aldeído/g suporte); (■) Gx parcial(170  $\mu$ mol aldeído/66  $\mu$ mol dióis por g suporte); (▲) Gx Glicina (236 $\mu$ mol aldeído/g suporte antes de bloqueio com glicina); ..... 73
- Figura 5.14: Esquema de agarose ativada com: a) aldeído/epóxido e b) aldeídos. .... 75
- Figura 5.15: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil. (■) AgEPI-PGA-pH10/pH5-Glicina; (●) AgEPI-PGA-pH10-Glicina; (▲) AgGx (236 aldeído/g suporte). .... 76
- Figura 5.16: Curvas de inativação térmica a 65°C e pH 7 de PGA imobilizada: (■) em agarose glioxil; (▲) em agarose glioxil na presença de DTT; (◆) em agarose glioxil previamente tratado com DTT(incubado com solução de DTT, depois lavado com água destilada); (●) em agarose glioxil com DTT 1mM durante a inativação térmica. .... 77
- Figura 5.17: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7. (●) imobilização em agarose glioxil e derivado não reduzido ao final com NaBH<sub>4</sub>; (▲) imobilização na presença de DTT e derivado não reduzido ao final com NaBH<sub>4</sub>; (■) imobilização na presença de DTT e derivado reduzido ao final com NaBH<sub>4</sub>..... 79
- Figura 5.18: Cinética de imobilização de PGA em agarose glioxil na presença de DTT (50 mM). (■) pH 7; (●) pH 8,5; (◆) pH 10; (▲) pH 10 sem DTT..... 80
- Figura 5.19: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil na presença de DTT. (□) pH 7; (■) pH 7-10; (o) pH 8,5; (●) pH 8,5-10; (▲) pH10; (Δ) pH 10 sem DTT..... 82
- Figura 5.20: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil na presença de DTT. (●) pH 7 ( 3 dias); (◆) pH 8,5 (7 dias); (■) pH 8,5 (1 dia); (▲) pH 7 ( 7 dias). .... 83
- Figura 5.21: Curvas de inativação de PGA imobilizada em agarose glioxil na presença de DTT frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C. (●) PGA imobilizada a pH 7 por três dias;

- (◆)PGA immobilizada a pH 8,5 por sete dias; (■) PGA immobilizada a pH 8,5 por três dias; (▲)PGA immobilizada a pH 7 por sete dias. .... 84
- Figura 5.22: Curvas de inativação a pH 5 e 67 °C de PGA immobilizada em agarose glioxil em diferentes valores de pH. (◆) pH 7 na presença de DTT; (▲) pH 10 na presença de DTT; (■) pH 7-10; (●) pH 10. .... 85
- Figura 5.23: Curvas de inativação frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C de PGA immobilizada em agarose glioxil: (■) a pH 10 na presença de DTT; (▲) a pH 7-10 na presença de DTT; (●) a pH 10; (◆) a pH 7 na presença de DTT. .... 86
- Figura 5.24: Esquema da modificação química do suporte com aminoácidos: (a) ácido aspártico, (b) fenilalanina e (c) glicina. .... 87
- Figura 5.25: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA immobilizada. (■) a pH 8,5; (▲) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (●) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando fenilalanina; (◆) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina. .... 88
- Figura 5.26: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA immobilizada. (▲) a pH 8,5-10 ; (●) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando fenilalanina; (■) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (◆) a 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina. .... 89
- Figura 5.27: Curvas de inativação frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C de PGA immobilizada: (●) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (▲) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (■) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina; (◆) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina. .... 90
- Figura 5.28: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA immobilizada em agarose glioxil a pH 10: (●) sem bloqueio dos aldeídos remanescentes; (▲) com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (◆) com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando fenilalanina; (□) com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina (■) na presença de DTT e com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina. .... 91
- Figura 5.29: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA immobilizada em agarose glioxil a pH 10: (■) na presença de DTT sem bloqueio dos aldeídos remanescentes; (●) sem

DTT com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (▲)na presença de DTT com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico. ....	92
Figura 5.30: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA immobilizada em agarose glioxil: (●) sem bloqueio dos grupos aldeídos; (◆) bloqueio com glicina por 1h; (■) bloqueio com glicina por 3h; (▲) bloqueio com glicina por 24h. ....	93
Figura 5.31: Curvas de inativação frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C de PGA immobilizada em agarose glioxil: (●) sem bloqueio dos grupos aldeídos; (◆) bloqueio com glicina por 1h; (■) bloqueio com glicina por 3h; (▲) bloqueio com glicina por 24h.....	94
Figura 5.32: Esquema da gelificação de alginato por íons cálcio. ....	96
Figura 5.33: Esquema da gelificação de quitosana por tripolifosfato (Fonte: LAUS et al., 2006). ....	97
Figura 5.34: Esquema da gelificação de agarose pelo resfriamento gradativo de uma solução aquosa do polímero inicialmente a 85 °C. Fonte: Medin, 1995. ....	98
Figura 5.35 PGA immobilizada dispersa em agarose dissolvida a 85 °C contendo partículas magnéticas. ....	99
Figura 5.36: Esferas de agarose contendo PGA immobilizada. (a) gel de agarose; (b) gel de agarose contendo partícula magnética immobilizada. ....	99
Figura 5.37: Teste da dispersão de enzima em esferas de agarose (1) Esfera controle – sem a enzima e tratada com reagente de Bradford; (2) Esfera contendo partículas de PGA corada com Bradford; (3) Corte transversal de (2); (4) Corte de esfera de agarose com imobilização direta de PGA; (5) Aglomerado de partículas de gel de agarose com 400 µm contendo PGA immobilizado e corado com reagente de Bradford.....	101
Figura 5.38: Curva de calibração para quantificação de 6-APA em caldo fermentativo. Faixa de concentração: 0,85-13,57 g/L; Volume amostra: 25 µL; Volume PDAB: 2,5 mL; Tempo de reação: 2,5 min a temperatura ambiente; Comprimento de onda: 415 nm.....	105
Figura 5.39: Cromatograma separação APA, AFA e PG. ....	106
Figura 5.40: Cultivo de <i>Penicillium chrysogenum</i> em biorreator no modo batelada utilizando concentração inicial de sacarose de 25 g/L e 100 mL de inóculo. ....	108
Figura 5.41: Cultivo de <i>Penicillium chrysogenum</i> em bioreator no modo batelada utilizando concentração inicial de sacarose de 25 g/L e 10 mL de inóculo. ....	109

Figura 5.42: Teste de contaminação: (a) alíquota retirada do inóculo; (b) alíquota retirada do meio de cultivo esterilizado e incubado com o biocatalisador; (c) alíquota retirada do biorreator após 120 h de cultivo.....	111
Figura 5.43: Produção de 6APA em biorreator (capacidade 2L) a pH7, temperatura de 25°C e concentração do biocatalisador de 3 g/L. ....	113
Figura 5.44: Perfil da concentração de sacarose durante o cultivo de <i>P. chrysogenum</i> em biorreator. ....	115
Figura 5.45: Concentração de 6APA e penG em biorreator (capacidade 6L) a pH7, temperatura de 25°C e concentração do biocatalisador de 3 g/L.....	116
Figura 5.46: Efeito da agitação sobre a hidrólise de PG durante o cultivo de <i>P.chrysogenum</i> . (a) Concentração de 6-APA e PG ao longo do cultivo de em biorreator (capacidade 2L) a pH 7, temperatura de 25°C e a quantidade do biocatalisador foi de 12 g dispersos em 4 litros de caldo fermentativo; (b) Perfil da agitação. ....	118
Figura 5.47: Foto do biorreator no quinto dia de funcionamento: (a) imagem completa, (b) destaque dos pellets envolvidos pelo fungo e (c) aumento da imagem dos pellets envolvidos. ....	119
Figura 5.48: Esquema do aparato montado para confinar o biocatalisador dentro do biorreator. ....	120
Figura 5.49: Foto do aparato (rede metálica) utilizado para confinar o biocatalisador durante o cultivo de <i>P. chrysogenum</i> . (a) Detalhes externos; (b) Detalhes internos.....	120
Figura 5.50:Esquema do aparato (rede metálica) utilizado para confinar os impelidores durante o cultivo de <i>P. chrysogenum</i> .....	121
Figura 5.51: Biorreator acoplado à chapa perfurada. ....	122
Figura 5.52: Fotos do biorreator após cultivo de <i>P. chrysogenum</i> utilizando chapa perfurada. (a) biorreator; (b) detalhe da parte inferior da chapa perfurada; (c) parte interna da chapa (d) biocatalisador preso entre a massa de fungo e a chapa perfurada. ....	123
Figura 5.53: Perfil da concentração de PG e 6-APA durante o cultivo de <i>P. chrysogenum</i> em biorreator.....	123
Figura 5.54: Helicóide após cinco dias em uso no cultivo de <i>P. chrysogenum</i> .....	124
Figura 5.55: Spiral cage, Fonte: <a href="http://www.orientaltrading.com">www.orientaltrading.com</a> . ....	125

Figura 5.56: Crescimento de <i>P. chrysogenum</i> em air lift após quatro dias de cultivo. ....	126
Figura 5.57: Velocidade de hidrólise de PG em função da concentração de substrato a 12 e 25 °C com PGA livre. ....	131
Figura 5.58: Velocidade de hidrólise de PG em função da concentração de substrato a 12 e 25 °C com PGA imobilizada. ....	132
Figura 5.59: Curvas de consumo de PG e formação de 6-APA, durante o cultivo de <i>P. chrysogenum</i> . ....	134
Figura 5.60: Velocidade de hidrólise de PG: (A) Consumo de substrato com o tempo e (B) Velocidade de hidrólise em função da concentração de substrato (Curva de Michaelis-Menten), $K_i$ foi estimada considerando os valores de $V_{m\acute{a}x} = 4,21 \mu\text{mol}/\text{min.g}$ , $K_M = 14,76 \text{ mM}$ e concentração inicial de PG = 79,01 mM. ....	135
Figura 5.61: Equilíbrio de adsorção de 6-APA em quitosana-arginina a 25 °C, pH 7. (2,3 mLcaldo/g adsorvente) ....	144

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Mudanças no processo de produção de penicilina em cinquenta anos de pesquisa. (ELANDER, 2003).....	9
Tabela 4.1: Composição do meio de cultivo para <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	42
Tabela 5.1: Atividade de penicilina G acilase e concentração de proteína antes e após procedimentos de ultrafiltração e ultradiafiltração a pH 8,0 em caldo fermentativo de <i>B.megaterium</i> (pH 8,8). Volume de caldo (Vi)= 7 mL (343 U; 1,0 mg). Volume final após ultrafiltração =0,5 mL. Erro experimental é inferior a 10% para atividade enzimática e concentração de proteína. Ensaios em triplicata.....	53
Tabela 5.2: Atividade de penicilina G acilase e concentração de proteína antes e após procedimentos de ultrafiltração e de diálise a pH 8,0 em caldo fermentativo de <i>B.megaterium</i> (pH 8,8). Volume de caldo (Vi)= 7 mL (357 U; 0,641 mg). Volume final após ultrafiltração = 0,5 mL.....	54
Tabela 5.3: Proteína e atividade enzimática medida no sobrenadante durante adsorção de PGA presente em caldo fermentativo onde foi utilizado na composição do meio de cultivo soro em pó integral (19,6 g/L). Atividade inicial no caldo: $35,7 \pm 0,6$ U NIPAB/mL. Proteína inicial: $0,41 \pm 0,03$ mg/mL. Atividade específica inicial: 87,1 U NIPAB/mg de proteína, pH 9. ....	56
Tabela 5.4: Proteína e atividade enzimática medida no sobrenadante durante adsorção de PGA presente em caldo fermentativo onde foi utilizado na composição do meio de cultivo soro em pó (19,6 g/L) hidrolisado com protease antes do cultivo. Atividade inicial no caldo : $15,1 \pm 1,4$ U NIPAB/mL. Proteína inicial: $0,22 \pm 0,06$ mg/mL. Atividade específica inicial: 68,8 U NIPAB/mg de proteína, pH 9. ....	56
Tabela 5.5: Dados da atividade enzimática e concentração de proteína no sobrenadante de caldo fermentativo após adsorção em agarose-triptofano na presença de AFA a pH 9,0. ....	63
Tabela 5.6: Resultados da adsorção de proteínas em agarose-triptofano a 15 °C, por 60 min. ....	64
Tabela 5.7: Resultados da adsorção de proteínas em agarose-triptofano a 15 °C, por 60 min. ....	67
Tabela 5.8: Valores de rendimento e atividade expressada para imobilizações de PGA em agarose glioxil na presença de DTT a diferentes valores de pH. ....	81
Tabela 5.9: Comparação de biocatalisadores preparados por diferentes estratégias.....	102

Tabela 5.10: Comparação entre os métodos HPLC e Hidrólise enzimática. Dados da dissertação de mestrado de Barros, 2008.....	106
Tabela 5.11: Parâmetros cinéticos para a hidrólise de PG em reator (100 mL) pelo método das velocidades iniciais.....	132
Tabela 5.12: Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (3,5 g/L) em resinas XAD e carvão ativado a pH 3,6 e 4 °C por 1h. Valores médios. Erro experimental <10%.....	137
Tabela 5.13: Adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (3,5 g/L) em diferentes adsorventes a 4 °C por 1h. ....	140
Tabela 5.14: Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (3,5 g/L) diferentes adsorventes a pH 7 e 4 °C por 1h.....	141
Tabela 5.15:Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (8,5 g/L) diferentes adsorventes a pH 7 e 4 °C por 1h.....	142
Tabela 5.16: Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (8,5 g/L) diferentes adsorventes a pH 7 e 4 °C por 1h.....	143
Tabela 5.17: Adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (4 g/L) em quitosana-arginina (pó) a pH 7, por 1h. ....	144
Tabela 5.18:Dessorção de 6-APA de quitosna-arginina (pó).....	145
Tabela 5.19: Efeito da pré-purificação do caldo por precipitação de proteínas com etanol sobre a extração de 6-apa poadsorção iônica de 6-APA. ....	146

## NOMENCLATURA

ACN	acetonitrila	
AEH	$\alpha$ -aminoácido éster hidrolases	
AFA	ácido fenilacético	
Ag	agarose	
AgEPI	agarose-epóxido e/ou agarose-glioxil	
AgGx	agarose-glioxil	
ATPS	sistema com duas fases aquosas (aqueous two-phase system)	
6-APA	ácido 6-aminopenicilânico	
7-ADCA	ácido 7-amino 3-deacetóxi cefalosporânico	
C	concentração	g/L
Co	cobalto	
Cu	cobre	
DNS	ácido dinitro salicílico	
DTT	ditiotreitól	
EDA	etileno di-amino	
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético	
EGDG	etilenoglicol diglicidil éter	
Gx	glioxil	
HCl	ácido clorídrico	
$K_{i, APA}$	contante de inibição de 6-APA	mM
$K_M$	constante de Michaelis	mM
$K_S$	constante de inibição	
NaBH <sub>4</sub>	borohidreto de sódio	
NaCl	cloreto de sódio	
Ni	níquel	
NIPAB	ácido benzóico 6-nitro-3-fenilacetamida	
OD	oxigênio dissolvido	
PBA	fenilbutilamônia	
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
PDAB	p-dimetil amino benzaldeído	

PG	penicilina G	
PGA	penicilina G acilase	
PV	penicilina V	
rpm	rotações por minuto	
[S]	concentração de substrato	mM
t	tempo	minuto
v	velocidade num tempo t	$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$
$V_{\text{max}}$	velocidade máxima	$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$
vvm	vazão de ar por litro por minuto	
Zn	zinco	

# SUMÁRIO

<i>Lista de figuras</i> .....	<i>i</i>
<i>Lista de tabelas</i> .....	<i>v</i>
<i>Nomenclatura</i> .....	<i>vi</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>vii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>ix</i>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1 PENICILINAS .....	5
3.2 PRODUÇÃO DE PENICILINAS .....	6
3.2.1 <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	6
3.2.2 <i>Processo industrial da produção de PG</i> .....	8
3.3 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO .....	11
3.4 OUTROS MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE 6-APA .....	13
3.4.1 <i>Obtenção de 6-APA por Método Enzimático: Alternativas para Extração de Penicilina</i> .....	15
3.4.2 <i>Obtenção de 6-APA por Método Enzimático: Hidrólise de Penicilina e Extração Simultânea de Produto (S)</i> .....	16
3.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO DE 6-APA .....	18
3.5.1 <i>Extração Líquido-Líquido</i> .....	18
3.5.2 <i>Extração em Fase Sólida</i> .....	19
3.5.3 <i>Quitosana como adsorvente</i> .....	20
3.6 PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE .....	22
3.6.1 <i>Purificação de PGA</i> .....	22
3.6.2 <i>Imobilização de Enzimas em Suportes</i> .....	24
3.7 CINÉTICA DE PGA IMOBILIZADA (HIDRÓLISE DE PG) .....	26
3.7.1 <i>Parâmetros Cinéticos para Enzima Imobilizada</i> .....	27
3.7.2 <i>Efeito do Gradiente de pH na Velocidade de Hidrólise de PG por PGA Imobilizada</i> .....	27

<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 MATERIAIS	30
4.2 MÉTODOS	30
4.2.1 Dosagem da atividade enzimática utilizando ácido 6-nitro-3-fenilacetamido benzóico (NIPAB)	30
4.2.2 Dosagem da atividade enzimática utilizando penicilina G potássica .....	31
4.2.3 Diálise .....	31
4.2.3.1 Tratamento da Membrana .....	31
4.2.3.2 Diálise / Concentração da Enzima.....	32
4.2.4 Centrifugação em Tubos com Membrana.....	32
4.2.5 Eletroforese .....	32
4.2.6 Dosagem de Proteína .....	32
4.2.7 Ativação de Agarose.....	33
4.2.8 Reação de Agarose-glioxil com Etilenodiamino e Glutaraldeído .....	33
4.2.9 Reação de Agarose-glutaraldeído com Triptofano.....	34
4.2.10 Caracterização por Infravermelho .....	35
4.2.11 Adsorção em Suporte de Afinidade.....	35
4.2.12 Dessorção de PGA .....	36
4.2.13 Adsorção Reversa em Agarose Triptofano .....	36
4.2.14 Imobilização/Estabilização de PGA de E. coli.....	36
4.2.14.1 Imobilização em Agarose e Toyopearl.....	36
4.2.14.2 Estabilidade dos Derivados Imobilizados Frente a Temperatura.....	37
4.2.14.3 Estabilidade dos Derivados Imobilizados Frente a Solvente.....	37
4.2.14.4 Estabilidade dos Derivados Imobilizados Frente a pH.....	37
4.2.14.5 Preparo de Esferas com diâmetro de 4 mm a partir de diferentes matrizes poliméricas.....	38
4.2.14.5.1 Alginato .....	38
4.2.14.5.2 Quitosana.....	38
4.2.14.5.3 Agarose.....	38
4.2.14.6 Imobilização em Esferas de Agarose de 4 mm por Ligação Direta ou Co-envolvimento .....	39
4.2.15 Esterilização do Biocatalisador .....	39
4.2.16 Quantificação de 6-APA (Método PDAB).....	39
4.2.17 Quantificação de PG (Hidrólise e PDAB).....	40

4.2.18	Quantificação PG, AFA e APA (HPLC).....	41
4.2.19	Quantificação de Sacarose.....	41
4.2.20	Cultivo de <i>P. chrysogenum</i> em Shaker .....	41
4.2.21	Cultivo de <i>P. chrysogenum</i> em Biorreator Tipo Tanque Agitado.....	42
4.2.22	Cultivo de <i>P. chrysogenum</i> em Air lift.....	43
4.2.23	Hidrólise de PG em Biorreator .....	44
4.2.24	Cinética de Hidrólise de PG.....	45
4.2.24.1	Em Reator (0,1 L) – Método das Velocidades Iniciais.....	45
4.2.24.2	Em Bioreator ( 2 L) – Método Diferencial ou Integral.....	45
4.2.25	Extração de 6-APA.....	45
4.2.25.1	Preparo de Adsorvente (Quitosana-Arginina) .....	45
4.2.25.2	Preparo de Adsorvente (Agarose-Arginina).....	47
4.2.25.3	Tratamento das Resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761 .....	47
4.2.25.4	Adsorção de 6-APA .....	47
4.2.26	Pré-Purificação 6-APA com Carvão Ativado e Etanol .....	48
4.2.27	Dessorção de 6-APA adsorvido em agarose-arginina .....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1	OBTENÇÃO DO BIOCATALISADOR: PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE .....	49
5.1.1	Purificação da PGA de <i>B. megaterium</i> .....	49
5.1.1.1	Purificação de PGA produzida por <i>B. megaterium</i> através de filtração em membranas.....	50
5.1.1.2	Purificação de PGA de <i>B. megaterium</i> por Adsorção Iônica e de afinidade .....	55
5.1.1.2.1	Seleção do agente de afinidade.....	55
5.1.1.2.2	Caracterização do suporte agarose-triptofano por infravermelho .....	57
5.1.1.2.3	Características Físico-Químicas do Suporte Agarose-Triptofano .....	59
5.1.1.2.4	Adsorção em Agarose-Triptofano.....	61
5.1.1.3	Conclusões Parciais.....	68
5.1.2	Imobilização/Estabilização da PGA de <i>E. coli</i> .....	69
5.1.2.1	Efeito do Tamanho da Fibra na Imobilização/Estabilização de PGA.....	70
5.1.2.2	Estudo da Modificação da Agarose com Diferentes Grupos Funcionais para Imobilização/Estabilização de PGA .....	72
5.1.2.2.1	Presença de Grupos Dióis e Glicina.....	72
5.1.2.2.2	Presença de Grupos Epóxidos.....	74

5.1.2.3	Imobilização de PGA na Presença de DL-Ditiotreitól (DTT) .....	76
5.1.2.3.1	Efeito do DTT na Estabilização de PGA .....	76
5.1.2.3.2	Avaliação do Efeito Redutor do DTT .....	78
5.1.2.3.3	Efeito do DTT na Cinética de Imobilização de PGA .....	79
5.1.2.3.4	Efeito do pH e Tempo de Imobilização nas Propriedades de PGA Imobilizada na Presença de DTT	80
5.1.2.4	Efeito combinado do pH e Tempo de Imobilização na Estabilidade de PGA .....	83
5.1.2.4.1	Estabilidade Térmica .....	83
5.1.2.4.2	Estabilidade frente a solvente .....	84
5.1.2.5	Influência do pH de Imobilização Sobre a Estabilidade de PGA .....	85
5.1.2.5.1	Estabilidade frente a pH .....	85
5.1.2.5.2	Estabilidade Frente a Solvente .....	86
5.1.2.6	Micro-ambiente de PGA Imobilizada (Efeito do pH de Imobilização/Tipo de Aminoácido Inserido) ....	87
5.1.2.6.1	Imobilização em pH 8,5 e 8,5-10 .....	88
5.1.2.6.2	Imobilização em pH 10 .....	90
5.1.2.6.3	Imobilização em pH 10 com DTT (microambiente-ácido aspártico) .....	91
5.1.2.6.4	Efeito do Tempo de Contato com Glicina sobre a Estabilidade de PGA Imobilizada .....	93
5.1.2.7	Conclusões Parciais .....	94
5.2	BIOCATALISADOR PARA USO NO BIORREATOR	95
5.2.1	<i>Seleção da Matriz Polimérica</i> .....	96
5.2.2	<i>Estratégia de Imobilização da Enzima em Agarose</i> .....	98
5.2.2.1	Imobilização Direta de PGA Sobre Esferas de Agarose .....	99
5.2.2.2	Dispersão de Partículas Contendo PGA em Esferas de Agarose .....	101
5.2.3	<i>Conclusões parciais</i> .....	103
5.3	PRODUÇÃO E HIDRÓLISE DE PENICILINA	103
5.3.1	<i>Quantificação de PG e 6-APA em meio de cultivo</i> .....	103
5.3.2	<i>Determinação das Condições adequadas de Cultivo de P. chrysogenum (peletização)</i> .....	107
5.3.3	<i>Controle de Contaminação</i> .....	109
5.3.4	<i>Conclusões Parciais</i> .....	111
5.4	PRODUÇÃO E HIDRÓLISE DE PENICILINA G EM BIORREATOR	112
5.4.1	<i>Cultivo de P. chrysogenum em Tanque Agitado (Modo Batelada)</i> .....	113
5.4.2	<i>Cultivo de P. chrysogenum em Tanque Agitado (Modo Batelada Alimentada)</i> .....	114

5.5	ESTRATÉGIAS PARA MANTER A INTEGRIDADE DO BIOCATALISADOR EM BIORREATOR	117
5.5.1	<i>Efeito da Agitação Sobre a Integridade e Atividade do Biocatalisador</i> .....	117
5.5.2	<i>Confinamento do Biocatalisador em Rede Metálica</i> .....	120
5.5.3	<i>Confinamento dos Impelidores em Rede Metálica</i> .....	121
5.5.4	<i>Confinamento dos Impelidores em Chapa Perfurada</i> .....	122
5.5.5	<i>Confinamento dos impelidores em helicóide</i> .....	124
5.5.6	<i>Produção de 6-APA em “Air Lift”</i> .....	126
5.5.7	<i>Conclusões Parciais</i> .....	127
5.6	ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DE PENICILINA G EM MEIO DE CULTIVO	128
5.6.1	<i>Velocidades Iniciais</i> .....	129
5.6.2	<i>Efeito de Inibição de PGA Imobilizada por 6-APA na Hidrólise de PG em Biorreator</i> .....	133
5.6.3	<i>Conclusões Parciais</i> .....	136
5.7	EXTRAÇÃO DE 6-APA	137
5.7.1	<i>Adsorção Hidrofóbica</i> .....	137
5.7.2	<i>Adsorção Iônica</i> .....	139
5.7.2.1	<i>Efeito do Tipo de Ativação de Quitosana</i> .....	140
5.7.2.2	<i>Seletividade na Adsorção de 6-APA</i> .....	142
5.7.2.3	<i>Capacidade de Adsorção de 6-APA</i> .....	143
5.7.2.4	<i>Efeito da Temperatura na Adsorção de 6-APA</i> .....	144
5.7.2.5	<i>Dessorção de 6-APA</i> .....	145
5.7.2.6	<i>Pré-Purificação do Caldo Fermentativo</i> .....	145
5.7.2.6.1	<i>Precipitação com Etanol</i> .....	146
5.7.2.6.2	<i>Adsorção Hidrofóbica</i> .....	146
5.7.3	<i>Conclusões Parciais</i> .....	147
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES</b> .....	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>152</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) é o principal precursor para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos e sua produção mundial já atingiu níveis de 10000 ton/ano (VAN DE SANDT E VROOM, 2000).

A primeira etapa para a obtenção de 6-APA é a produção da penicilina natural pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. Este fungo é capaz de sintetizar penicilinas com cadeias laterais específicas, as quais são determinadas pelo tipo de precursor que é adicionado ao meio de produção (HILLENGA et al., 1995). Em seguida a penicilina é extraída do caldo fermentativo usando acetato de butila ou acetato de amila, em baixos valores de pH (< 2,5). Para obter a forma cristalizada como sal de potássio, a penicilina é novamente extraída para a fase aquosa em pH entre 7,0-8,0.

A penicilina G (PG) potássica é dissolvida em meio aquoso e submetida à hidrólise enzimática liberando 6-APA e ácido fenilacético (AFA). AFA é extraído com solvente orgânico, enquanto o 6-APA é cristalizado em meio aquoso por ajuste do pH no ponto isoelétrico (pH 3,6), onde a solubilidade deste composto é mínima (DEN HOLLANDER et al., 2002; FERREIRA et al., 2006).

O método para obtenção de 6-APA descrito vem sendo usado há muitos anos com sucesso devido à sua eficiência e baixo custo do produto final. Entretanto, o uso de solventes orgânicos torna o processo ambientalmente desfavorável.

Muitos esforços já foram realizados com o objetivo de reduzir, substituir ou eliminar o uso de solventes orgânicos do processo de produção de 6-APA. Entretanto, a maioria dos trabalhos apresentados buscam soluções parciais para simplificar o processo. Por exemplo, são sugeridas modificações somente para as etapas de extração de penicilina ou somente para a extração de 6-APA. Além disso, o desenvolvimento de um novo método que não interfira no rendimento global de 6-APA e no custo final deste produto exige grande esforço.

Alguns exemplos de modificações parciais no processo de produção de 6-APA incluem: extração reativa da penicilina utilizando aminas de elevado peso molecular, uso de sistemas de hidrólise e extração simultânea em meio aquoso, extração de penicilina na presença de campo elétrico, extração de penicilina em três fases líquidas, adsorção de 6-APA nas matrizes Amberlite LA-2, trioctilamina, Aliquat-336, XAD16, XAD1180, XAD1600, resina aniônica IRA 400 e aminas secundárias com peso molecular entre 325 e 395 (ARNOT

et al., 1994; BORA et al., 1997; HANO et al., 1990; LUUK et al., 1996; SHEN et al., 2006; SKONEZNY et al., 2005; VAN DER DOES et al., 1999).

Uma estratégia muito interessante para simplificar o processo da produção de 6-APA foi proposta por Oliver, 1997. Neste processo, ao final do cultivo de *P. chrysogenum* o caldo fermentativo era filtrado para separar a massa de fungo, e em seguida era ultrafiltrado para remover proteínas/peptídeos maiores que 20.000 Da. Por último, a penicilina era hidrolisada no caldo fermentativo liberando AFA e 6-APA (OLIVER et al., 1997). Entretanto, a extração de 6-APA deste meio é mais difícil do que a extração de PG, devido à diferença nas propriedades físico-químicas destas moléculas. Portanto, o uso desta metodologia leva a desafios maiores na extração do produto.

A proposta deste trabalho foi desenvolver um novo processo para a produção de 6-APA. Este procedimento eliminaria todas as etapas de extração e cristalização deste antibiótico, as quais são realizadas industrialmente para a produção de 6-APA. Em seguida, propõe-se a extração do núcleo  $\beta$ -lactâmico utilizando adsorvente iônico. Desta maneira, a redução no número de etapas, associado à eliminação do uso de solventes orgânicos torna este método interessante para aplicações industriais.

Para atingir esses objetivos, quatro fatores importantes foram considerados. Primeiro, a necessidade de preparar um biocatalisador altamente ativo e estável para atuar durante o processo de produção da penicilina G. Segundo, o preparo deste biocatalisador com elevada atividade enzimática exigiu a implementação de um processo para purificação da enzima de estudo, penicilina G acilase. Terceiro, para a aplicação deste biocatalisador durante o cultivo, um protocolo de esterilização do mesmo foi necessário para evitar contaminação do meio, além disso, mecanismos para garantir a integridade do biocatalisador durante o seu uso em fortes condições de agitação também foram investigados. Por fim, um ponto chave para demonstrar a viabilidade global deste processo é a extração do produto de interesse, 6-APA, que neste trabalho foi investigada por adsorção em matriz iônica.

## 2 OBJETIVO

Estudar inovações na produção de 6-APA visando eliminar o uso de solventes orgânicos e reduzir o número de etapas do processo.

Para atingir esse objetivo o trabalho passou pelas seguintes etapas:

- purificar e imobilizar a PGA em suporte sólido;
- desenvolver um biocatalisador na forma de esferas grandes e magnéticas;
- hidrolisar PG durante o cultivo de *P. chrysogenum*;
- estudar a extração do 6-APA utilizando diferentes matrizes poliméricas como carvão ativado, resinas XAD, quitosana e agarose.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem sido tema de investigações há quase oito décadas. A importância desta classe de antibióticos para a humanidade levou ao desenvolvimento de processos industriais de alta produtividade e baixo custo deste produto. Os avanços na modificação genética de cepas e a tecnologia de instrumentação e controle aplicadas a este bioprocessos são relatados na literatura como artigos completos, mas, sobretudo como patentes, visto que esse tema é de grande interesse industrial (PATNAIK et al., 2000, 2001).

A resistência adquirida por agentes infecciosos motivou a comunidade científica a buscar meios de sintetizar antibióticos melhores com relação a potência, espectro de ação, estabilidade, atividade contra patógenos resistentes e propriedades fármaco-cinéticas (DEMAIN et al., 1999). Entretanto, a produção atual de antibióticos naturais mantém-se igualmente importante, visto que estes são utilizados como matéria prima para a síntese de novos antibióticos (KHEIROLOMOON et al., 1999; MENEZES, 2000).

A síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos (modificação do antibiótico natural através de processos químicos ou enzimáticos), por exemplo, amoxicilina e ampicilina, é uma das mais importantes inovações na produção de fármacos (SOUZA et al., 2004).

Os processos utilizados atualmente para produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos naturais e semi-sintéticos geralmente utilizam solventes orgânicos para separar o produto de interesse do caldo fermentativo ou meio reacional (DEMAIN et al., 1999). A eliminação do uso de solventes orgânicos nestes processos já é obrigatória em muitos países. O uso destes solventes torna o processo ambientalmente desfavorável. Portanto, desafios ainda maiores surgiram para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pois os novos processos desenvolvidos devem eliminar o uso de solventes orgânicos e manter o baixo custo do produto final.

Neste capítulo serão apresentados os avanços no processo de produção de penicilinas, um dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais comercializados no mundo (ELANDER, 2003). Entre os temas desenvolvidos para este processo destacam-se a otimização das condições de cultivo de *P. chrysogenum* (microrganismo produtor de penicilina), desenvolvimento de biocatalisadores para uso industrial e métodos alternativos para a separação dos produtos de interesse.

### 3.1 PENICILINAS

Penicilinas e cefalosporinas são os principais antibióticos  $\beta$ -lactâmicos comercializados no mundo e seus organismos produtores são, respectivamente, *Penicillium chrysogenum* e *Acremonium chrysogenum* (ELANDER, 2003). Estes antibióticos são caracterizados pela presença de um núcleo básico comum, o anel  $\beta$ -lactâmico, composto por três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio e agem impedindo a síntese de peptídeoglicano da parede celular bacteriana. Na ausência da parede celular a célula absorve água e é destruída por rompimento (WANG et al., 1999). A estrutura química das penicilinas tem a fórmula geral apresentada na Figura 3.1 e foi determinada por Dorothy Crowfoot Hodgkin em 1940.

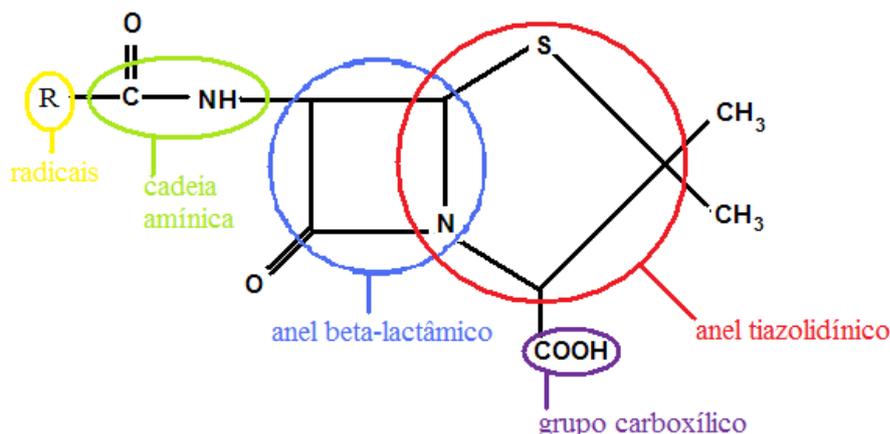


Figura 3.1: Estrutura básica da molécula de penicilina (Fonte: Barros, (2008) - dissertação de mestrado).

Além do anel  $\beta$ -lactâmico a estrutura das penicilinas contém o anel de cinco átomos denominado anel tiazolidínico. A fusão destes anéis dá origem ao núcleo comum a todas as penicilinas, o ácido 6-amino penicilânico, 6-APA (MENEZES, 2000).

A integridade do 6-APA é fundamental para garantir a ação de penicilinas sobre agentes infecciosos. Entretanto, a instabilidade destes antibióticos em meio aquoso é conhecida desde a descoberta destes por Fleming (1929), o qual verificou que o excesso de acidez ou alcalinidade acelera o processo de degradação. Um estudo detalhado realizado por Benedict, 1945, mostra que a degradação ácida de penicilina é um processo de primeira ordem e acelerado por temperaturas elevadas. Em pH 6, este antibiótico apresenta o máximo de estabilidade, com tempo de meia vida de 356 h a 24 °C e a pH 2 esse tempo é reduzido a minutos (ARNOTT et al., 1994; KOCZIÁN et al., 2007; LIBINSON et al, 1971).

Entre as penicilinas mais comercializadas atualmente destaca-se a penicilina G (benzilpenicilina), um ácido fraco com  $pK$  2,75, cujo radical (R) é o benzil como pode ser visto na Figura 3.2.

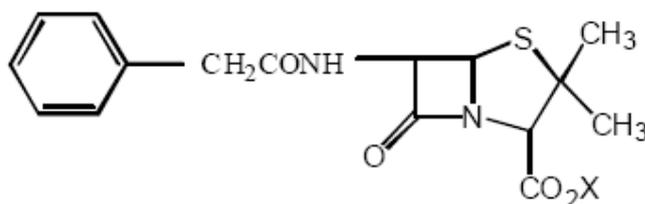


Figura 3.2: Estrutura básica da molécula de penicilina G (MENEZES, 2000). X= H (benzilpenicilina) e X= K (sal de potássio).

Esta molécula é produzida na forma de sal de potássio, o qual se apresenta como um sólido cristalino branco, sem cheiro quando puro, solúvel em água, higroscópico, instável na presença de ácido, álcali e penicilinases, com ponto de fusão de 215 °C com decomposição.

## 3.2 PRODUÇÃO DE PENICILINAS

A penicilina foi um dos primeiros antibióticos a ser descoberto, e sua produção atual atinge níveis superiores a 60 mil toneladas (DEMAIN et al., 2007). A produtividade deste antibiótico depende fortemente de características da cepa utilizada e das condições de cultivo.

### 3.2.1 *Penicillium chrysogenum*

*P. chrysogenum* é um fungo filamentoso capaz de sintetizar penicilinas com cadeias laterais (radicais R) específicas quando o precursor apropriado é adicionado ao meio de produção (HILLENGA et al., 1995). A produção de penicilina por este fungo é um dos bioprocessos mais estudados e a rota para a biosíntese de penicilina G foi descrita como mostra a Figura 3.3 (ARYIO et al., 1998; MENEZES et al., 2000).

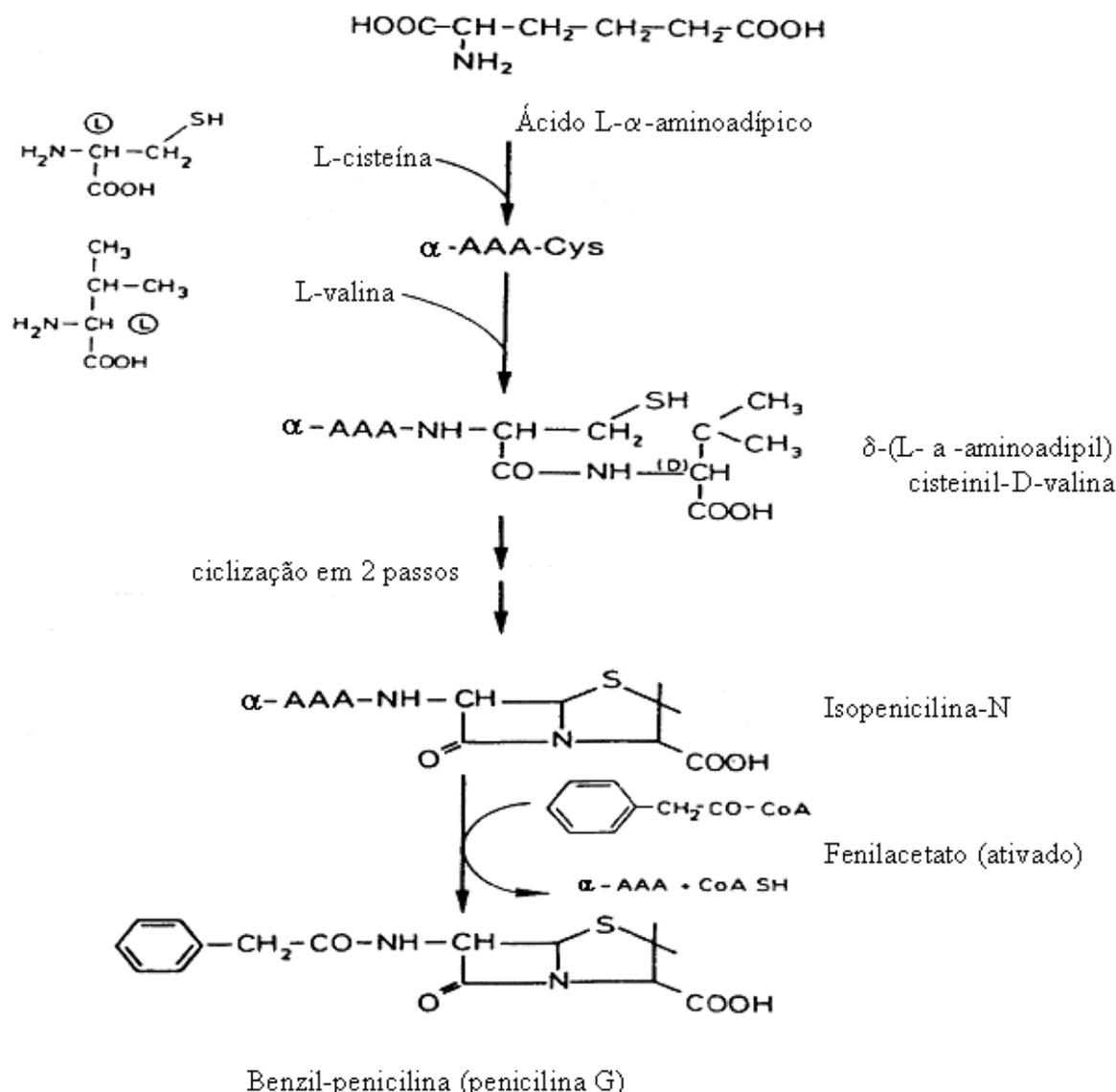


Figura 3.3: Rota para a biossíntese de penicilina G por *P. chrysogenum*. Fonte: Menezes, 2000.

A produção de penicilina depende de muitos fatores, entre eles destaca-se a forma de crescimento do fungo. Em culturas submersas, *P. chrysogenum* pode crescer como micélios ou na forma de *pellets*. O crescimento na forma de *pellets* gera caldos de cultivo com viscosidade menor e, portanto, mais fácil de misturar e transferir oxigênio. Entre os fatores que influenciam a forma de crescimento do fungo destacam-se: a cepa, método de iniciação, natureza do meio de crescimento e regime hidrodinâmico do biorreator.

A agitação em dornas tipo tanque agitado também tem um efeito significativo sobre a morfologia de crescimento do fungo. Elevada agitação causa a destruição de hifas miceliais e dos *pellets*, enquanto valores baixos de agitação podem definir o tamanho dos *pellets* (CASAS LÓPEZ et al., 2005; HOTOP et al., 2001; JUSTEN et al., 1998). Os *pellets*

devem ser pequenos e pouco compactos, o que resulta em menor viscosidade do meio e maior produtividade que a forma filamentosa (ELANDER, 2003).

Outro fator importante para atingir elevada produtividade de penicilina em cultivos de *P. chrysogenum* é a adição de um precursor. Por exemplo, para atingir a produção máxima de penicilina G, a quantidade e a forma de adição do precursor (AFA) depende da cepa utilizada.

A produtividade de PG está fortemente relacionada à capacidade da cepa sintetizar o precursor. Algumas cepas são capazes de consumir AFA como fonte de carbono, portanto somente a adição deste precursor em excesso garante a produção de PG. Vale ressaltar que a alimentação de AFA durante o cultivo representa uma fração significativa do custo da fermentação (PEÑALVA et al., 1998; RODRIGUEZ-SÁIZ et al., 2005).

Por outro lado, a adição de uma quantidade de AFA superior à necessária reduz a biomassa e produção de PG por favorecer o fenômeno de autólise celular (WHITE et al., 1999). Portanto, devido à toxicidade deste precursor para o fungo, o mesmo deve ser adicionado de modo controlado durante o cultivo. Algumas cepas modificadas geneticamente foram desenvolvidas para consumir AFA somente para a biosíntese de penicilina G, ou seja, elas não são capazes de oxidar o precursor e consumi-lo como fonte de carbono (DEMAIN et al., 1999).

### **3.2.2 Processo industrial da produção de PG**

Após décadas de pesquisa, o melhoramento genético de cepas e o desenvolvimento tecnológico nos processos fermentativos levaram a um substancial aumento na produtividade de penicilina. Atualmente o processo de produção industrial de PG é altamente computadorizado e automatizado, principalmente na regulação e controle das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e outros precursores (CHANDEL et al., 2008).

Algumas das principais mudanças na produção de penicilina em cinquenta anos de pesquisa são apresentadas na Tabela 3.1.

O processo fermentativo da produção de PG é operado em batelada alimentada (alimentação contínua de várias substâncias durante o processo), em reatores de aço inoxidável com capacidade de 30.000 a 100.000 galões. Durante o cultivo, aproximadamente 10% do caldo fermentativo é retirado a cada vez e substituído por meio de cultivo fresco (LI et al., 2005).

**Tabela 3.1: Mudanças no processo de produção de penicilina em cinquenta anos de pesquisa. (ELANDER, 2003).**

Fermentação	1950	2000
Fonte de carbono	lactose	glicose/sacarose
Modo operacional	batelada	batelada alimentada
Esterilização do meio	batelada	contínuo
Filtração do ar	filtro	filtro membrana
Alimentação	nenhuma	muitas
Morfologia	filamento	Pellet
Tempo de ciclo	120 h	120-200 h
Volume do tanque (1.000 galões)	10-20	20-60
Ensaio de PG	bioensaio	HPLC
Controle	temperatura somente	computadorizado
Título (g/L)	0,5-1,0	> 40
Recuperação e purificação		
Remoção do micélio	filtração	usando todo caldo
Modo operacional	batelada	semi-contínuo
Estágios de extração	muitos	poucos
Recuperação e reuso do precursor	descartado	recuperação e reuso
Eficiência (%)	70-80	> 90
Questões ambientais	poucas	muitas
Custo (US\$)	275-350 / kg	15-20 / kg

A operação em batelada alimentada permite que as condições de fermentação sejam mantidas em estado quase-estacionário e a cultura em estado viável. As principais vantagens neste processo é que é possível operar abaixo do nível de inibição/toxicidade de substâncias essenciais à biossíntese (por exemplo, fonte de nitrogênio e precursor), prolongar a duração da fermentação e operar em concentrações de biomassa elevada e constante (MENEZES, 2000).

Um dos principais motivos para a redução no custo na produção de PG foi a substituição da fonte de carbono lactose pela glicose, visto que este último tem valor muito baixo comparado a lactose. Diferentemente da glicose, a lactose é consumida lentamente pelo fungo e não exerce repressão catabólita pelo carbono, portanto a alimentação com este açúcar era realizada no modo batelada. Entretanto, a utilização de glicose tornou-se possível através do estabelecimento de protocolos para adição intermitente ou contínua deste açúcar (DEMAIN et al., 1999).

Além das condições de alimentação de nutrientes e precursores, as condições operacionais para máxima produção de PG foram estabelecidas e no processo industrial, o pH e a temperatura são mantidos constantes ( $\sim 6,5$  e  $25-27$  °C, respectivamente). A velocidade de arejamento é mantida entre 0,5 e 1,0 m<sup>3</sup> de ar / m<sup>3</sup> de meio / min (vvm), dependendo da estirpe, do fermentador e da velocidade de agitação (120-150 rpm). Para evitar problemas de dispersão de oxigênio no meio, procura-se aperfeiçoar a composição do meio e condições operatórias para obter uma morfologia do fungo na forma de pellet, ao invés da forma filamentosa (DEMAIN et al., 1999; ELANDER, 2003).

O processo de produção envolve usualmente duas ou três fases de germinação seguida pela fase de produção. Altos níveis de oxigênio dissolvido são necessários, especialmente durante períodos de picos no crescimento que ocorrem após 40 a 50 horas de cultivo. Um cultivo em escala industrial pode ser realizado em até 240 h (ELANDER, 2003).

Atualmente, culturas de *P. chrysogenum* já atingem concentrações de 70 g/L em penicilina (DEMAIN et al., 1999), e os processos de extração permitem a recuperação de cerca de 90 % desta quantidade (SHEN et al., 2006).

Devido a instabilidade da penicilina em solução, em alguns processos industriais, ao longo cultivo, parte do caldo é transferido para um tanque de armazenagem resfriado a aproximadamente 12 °C (GASQUES, comunicação pessoal). Ao final do cultivo, o microrganismo é separado por filtração e o caldo livre de células é submetido ao processo de extração com solvente.

PG é extraída de caldos fermentativos geralmente usando solvente orgânico, por exemplo, metil isobutil cetona, acetato de butila, acetato de amila e butanol, em baixo pH (1,8-2,5). Neste procedimento, AFA, pigmentos, produtos da rota biosintética e outras impurezas no caldo filtrado são simultaneamente extraídos para a fase orgânica. Devido a pouca estabilidade de PG nestas condições de pH esse procedimento é realizado em alguns segundos em extratores do tipo centrífuga. Em seguida, a PG é novamente extraída para a fase aquosa em valor de pH mais elevado (7-8) e cristalisada como um sal de potássio. Todos esses

estágios de purificação são necessários para chegar ao processo seguinte de obtenção de 6-APA (ABIAN et al., 2003; CHILOV et al., 2002; DEN HOLLANDER et al., 2002; FERREIRA et al., 2006; HANO et al., 1990; HENRIKSEN et al., 1996; KHEIROLOMOON et al., 1999; SHEN et al., 2006; WANG et al., 2007).

### 3.3 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO

O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) é o principal precursor para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. Este pode ser utilizado diretamente como intermediário na síntese de penicilinas semi-sintéticas ou indiretamente, através de sua expansão química ou enzimática a 7-ADCA (ácido 7-amino 3-deacetóxi cefalosporânico) para gerar algumas cefalosporinas oralmente ativas. A produção de 6-APA atinge níveis de 10000 ton/ano (KLEIN, 1980; VAN DE SANDT E ROOM, 2000). Industrialmente, 6-APA é obtido pela hidrólise enzimática de PG ou PV em pH 7-8 (PARMAR et al., 2000).

Devido a limitações termodinâmicas, em sistemas homogêneos, o rendimento máximo de hidrólise é atingido se a concentração inicial do antibiótico não excede 0,25 M. Um aumento na concentração de penicilina leva a diminuição no rendimento de 6-APA (CHILOV et al., 2002 citado por SVEDAS et al., 1988).

Este intermediário chave para a síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, obtido da hidrólise de penicilinas naturais, tem a estrutura química apresentada na Figura 3.4.

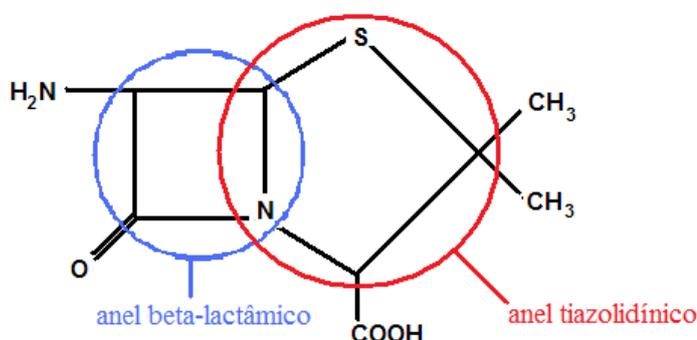
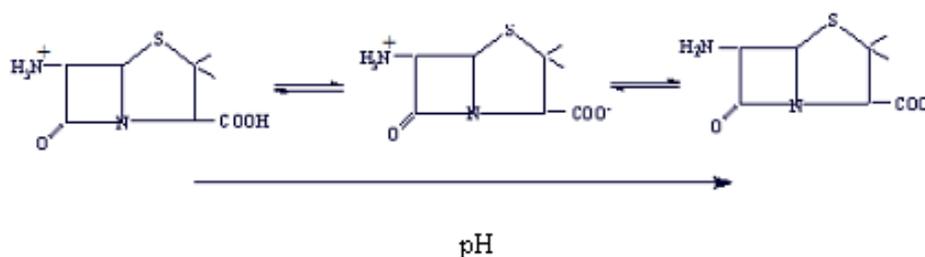


Figura 3.4: Estrutura do ácido 6-amino penicilânico (6-APA). Fonte: Barros, 2008 - dissertação de mestrado.

6-APA é um anfótero e os valores de pK para os seus grupos ionizáveis citados na literatura apresentam alguma variação, por exemplo, para o grupo carboxila os valores

determinados estão numa faixa de 2,29 a 2,60 e para o grupo amina 4,9 a 5,4 (BATCHELOR et al., 1961; CASCAVAL et al., 2002; DUTTA et al., 1997; TEWARI E GOLDBERG, 1988). Essas diferenças podem ser devidas a metodologia usada para determinar estes valores de pK, por exemplo, diferentes tipos de ácido ou base usados na titulação podem interferir na determinação destes valores (FERREIRA et al., 2006). Em solução, dependendo do pH, as espécies iônicas do 6-APA existem sob o equilíbrio de dissociação representado na Figura 3.5.



**Figura 3.5:** Equilíbrio de dissociação de 6-APA com o aumento de pH.

Em solução o 6-APA comporta-se quimicamente como uma base para ácidos fortes e como um ácido para bases fortes. Em solução existe como a combinação de três espécies: cátion (+HAPA), zwitterion (+HAPA-) e ânion (APA-). A solubilidade deste composto em água depende de condições como, pH, força iônica, ambiente hidrotópico e temperatura.

Em seu ponto isoelétrico (pH  $\sim$  3,6), 6-APA apresenta valor de solubilidade mínimo e estabilidade máxima. Em níveis de pH menor ou maior observa-se aumento da solubilidade. Este efeito do pH é utilizado para realizar a extração de 6-APA de meio reacional em condições industriais. Entretanto, antes da precipitação de 6-APA, AFA é extraído com solvente orgânico (DEN HOLLANDER et al., 2002; FERREIRA et al., 2006; MWANGI et al., 1996; WANG et al., 2007), pois ambos apresentam baixo valor de solubilidade em água (0,0025 % p/p para 6-APA e 0,011 % p/p para AFA) em pH 3,6 (TAVARE et al., 1999).

A formação dos cristais de 6-APA ocorre através da interação de suas cargas como mostra o esquema da Figura 3.6. Se durante a precipitação, AFA estiver presente como impureza, observa-se a co-precipitação deste composto junto aos cristais de 6-APA, reduzindo o grau de pureza do produto final.

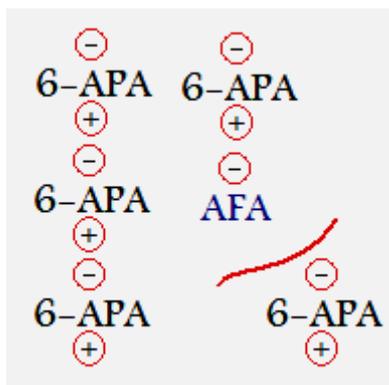


Figura 3.6: Esquema da formação de cristais de 6-APA na presença de AFA.

Uma maneira de reduzir a co-cristalização de AFA foi proposta por Tavare, 1999. Neste processo, a separação de 6-APA e AFA em meio aquoso foi realizada utilizando hidróptopos (compostos que aumentam a solubilidade de AFA e não interferem na solubilidade de 6-APA). Desta maneira 6-APA é cristalizado com melhor grau de pureza por ajuste de pH no ponto isoelétrico (TAVARE et al., 1999, 1996).

### 3.4 OUTROS MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE 6-APA

O processo industrial estabelecido e descrito anteriormente para obtenção de 6-APA envolve muitas etapas: cultivo de microrganismos para produção de penicilina, filtração do caldo fermentativo, extração da penicilina com solvente, descoloração, cristalização, hidrólise enzimática de penicilina, extração de AFA com solvente e precipitação de 6-APA no ponto isoelétrico (KLEIN, 1980; LAUS et al., 2006; SHEN et al., 2006). Entretanto, apesar das várias etapas e o uso de grande quantidade de solvente orgânico, este método não foi superado, tecnicamente ou economicamente, pelos vários processos alternativos propostos por vários pesquisadores em todo mundo ao longo de vários anos de pesquisa.

A descoberta de que em caldos fermentativos de *P. chrysogenum* havia a presença de 6-APA levou os pesquisadores a investigar a possibilidade de produzir este núcleo  $\beta$ -lactâmico diretamente em meios de cultivo (BATCHELOR et al., 1959; DEMAINE et al., 1999 citado por KATO et al., 1953; DEMAINE et al., 1959).

Cole, 1966, ao investigar diferentes cepas de *P. chrysogenum*, sugeriu que algumas destas eram capazes de excretar penicilina V acilase, dessa forma, penicilina V era hidrolisada no meio e 6-APA era produzido. A ausência de 6-APA no meio indicava a falta de capacidade de excreção desta enzima pelo fungo, assim a enzima em seu ambiente

intracelular mostrava-se mais eficiente para a síntese do que para a hidrólise. Em 1996, Whiteman, comprovou a existência de penicilina V acilase em cultivos de *P. chrysogenum*.

Verificou-se que na ausência de AFA, ao final de um ciclo de cultivo, o caldo contém cerca de 50% de 6-APA, 30 % de penicilina K, 15 % de penicilina D e 5 % de penicilina F (CASCAVAL et al., 2002 citado por FERNANDEZ-CANON et al., 1989). Desta maneira, concluiu-se que o 6-APA liberado para o meio não é um intermediário da biosíntese de penicilina visto que a reação final da biosíntese da penicilina hidrofóbica não é uma acilação de 6-APA mas uma transacilação entre isopenicilina N e uma cadeia lateral ativada (por exemplo, fenil acetil-CoA) como mostra o esquema da Figura 2.3. Portanto, o 6-APA presente em caldos de cultivo de *P. chrysogenum* é um produto da hidrólise de isopenicilina N quando a cadeia lateral não está disponível (ALVAREZ et al., 1993).

Em todos os estudos descritos acima, a concentração de 6-APA no meio foi muito baixa (0,2-3,0 %), portanto a biosíntese deste composto mostrou-se economicamente ineficiente e o desenvolvimento de outros métodos para obtenção de 6-APA foi investigado (CASCAVAL et al., 2002; ROLINSON et al., 2007).

A falha na produção de 6-APA por métodos biológicos levou a utilização de um método químico desenvolvido pela empresa Gist Brocades. Este método permitiu um aumento nos rendimento, entretanto, a utilização de reagentes tóxicos e corrosivos e baixas temperaturas (-30 a -40 °C) tornaram difícil a produção de 6-APA.

O desenvolvimento de um método ambientalmente favorável e eficiente foi realizado utilizando enzima imobilizada para hidrolizar penicilina natural e liberar o produto de interesse (6-APA), este método mostrou-se mais econômico e muito menos poluente. Atualmente, quase todos os produtores de 6-APA utilizam o método enzimático (MATSUMOTO et al, 1993; MENEZES et al., 2000).

A partir do estabelecimento do método enzimático para obtenção de 6-APA, inúmeras variações para este método foram propostas, com o objetivo de reduzir etapas e aumentar a eficiência na produção do núcleo  $\beta$ -lactâmico.

### 3.4.1 Obtenção de 6-APA por Método Enzimático: Alternativas para Extração de Penicilina

A produção de 6-APA pelo método industrial estabelecido permite bons rendimentos e recuperação do produto com baixo custo. Entretanto, uma das desvantagens deste processo inclui o elevado número de etapas desde a produção da penicilina natural pelo fungo até a extração do 6-APA. Etapas de reação, extração e vários ajustes de pH levam a formação de sais inorgânicos e degradação do anel  $\beta$ -lactâmico. Por isso, vários esforços ainda são realizados para melhorar este processo (CHILOV et al., 2002; DUTTA et al., 1997; SHEN et al., 2006).

Várias estratégias para aperfeiçoar a produção de 6-APA a partir da hidrólise de penicilina cristalizada ou diretamente nos caldos de produção, têm sido apresentadas na literatura. Nestes processos, o objetivo era remover os produtos durante a hidrólise para reduzir efeitos de inibição, aumentando os rendimentos e velocidade de reação. Alguns dos sistemas utilizados para este fim envolvem o uso de enzimas livre em reatores de membrana, eletrodiálise, extração com solvente ou fase sólida e sistema *cloud point* (DUAN et al., 1995; SUGA et al., 1993; WANG et al., 2005; WANG et al., 2007).

Os métodos propostos levam em consideração dois fatores importantes: a termodinâmica e estabilidade do produto de interesse e da enzima. Das considerações termodinâmicas, a hidrólise do antibiótico atinge rendimentos quantitativos acima de pH 7. Além disso, o pH ótimo (7,5-8,0) da atividade catalítica coincide bem com estas condições (CHILOV et al., 2002).

Uma das etapas críticas na obtenção de 6-APA é a extração da penicilina a partir do caldo fermentativo utilizando solvente orgânico e ajustando o pH do caldo para uma faixa de 1,8-2,5. Nesta faixa de pH a velocidade de decomposição do antibiótico é alta, por isso vários métodos alternativos são propostos na literatura, por exemplo, extração reativa com amberlite LA-2, di-n-octilamina e tri-n-octilamina. Estes métodos permitem a extração em condições mais suaves de pH e o antibiótico transferido para a fase orgânica deve ser recuperado numa etapa seguinte de re-extração. Um processo utilizando membrana líquida e permitindo extração e re-extração em uma só etapa foi proposto por Li, 1968. Um processo similar foi desenvolvido por Hano, (1990), utilizando membrana surfactante líquida para recuperação de penicilina G. Este processo permitiu 100 % de extração do antibiótico em alguns minutos (HANO et al., 1990).

Outra estratégia para aperfeiçoar a extração de penicilina foi realizada utilizando solvente orgânico na presença de um campo elétrico. Este método mostrou-se eficiente comparado a outras técnicas de intensificação (ARNOTT et al., 1994 citado por BAILES et al., 1971). Entretanto, a utilização do campo em valores de pH menor que 3,0 e utilizando solvente orgânico podem reduzir a eficiência global do processo, por causar degradação do antibiótico. Por outro lado o uso desta técnica associado ao método de extração reativa, onde o pH de extração está numa faixa de 5-7 foi proposto para superar estes obstáculos (ARNOTT et al., 1994).

Recentemente, foi apresentado um novo processo para obtenção de 6-APA. Neste processo, PG é extraída por um sistema de solvente constituído de três fases líquidas (água-óxido de etileno-óxido de propileno), a penicilina extraída dessa forma permitiu a obtenção de 6-APA com grau de pureza de 98 % (SHEN et al., 2006).

Os métodos apresentados aqui permitem rendimentos ligeiramente melhores para a produção de 6-APA quando comparados ao método industrial utilizado atualmente, entretanto não reduzem o número de etapas do processo global. Além disso, apesar da viabilidade técnica ser demonstrada é necessário também investigar a viabilidade econômica para que estes processos sejam aplicados industrialmente.

### **3.4.2 Obtenção de 6-APA por Método Enzimático: Hidrólise de Penicilina e Extração Simultânea de Produto (S)**

Sistemas que permitem a separação de 6-APA e AFA durante a hidrólise enzimática de penicilina G têm como principal vantagem a eliminação dos efeitos de inibição por estes produtos. Com base nesta informação, vários processos foram descritos na literatura e resultados promissores foram obtidos com aparatos para executar reação e separação dos produtos simultaneamente.

Wu, (2000), utilizou um reator-separador cromatográfico. Neste reator misturava-se células imobilizadas de *E. coli* e um adsorvente macroporoso como fase estacionária. Este processo atingiu 98 % de conversão de penicilina. Um sistema similar foi desenvolvido por Massolini, (2001) (BURNS et al., 2003).

Outro mecanismo proposto para promover esta separação é o uso de reatores com membrana, os quais objetivam reduzir o custo de produção, possibilitando a retenção da enzima e retirada seletiva do produto de interesse. Entretanto, o estudo realizado por Wenten

(2002), mostrou que a adsorção de 35 % do produto nas membranas é uma desvantagem para o processo. Portanto, os sistemas que utilizam enzimas imobilizadas no reator, apesar dos custos da imobilização, ainda são melhores alternativas para reduzir custos em processos enzimáticos.

Um método alternativo à hidrólise enzimática em meio alcalino de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foi proposto por Chilov, (2002). A hidrólise de penicilina na presença de duas fases (água-acetato de butila) e baixo pH (3-4) mostrou elevado potencial prático. Neste processo, acetato de butila contendo a forma ácida do antibiótico é diretamente adicionada a uma fase aquosa contendo penicilina acilase, em seguida ocorre a partição do antibiótico entre as duas fases, hidrólise do antibiótico na fase aquosa, precipitação do núcleo (o qual apresenta baixa solubilidade nesta condição de pH) e partição de AFA entre as duas fases.

A faixa de pH utilizada no processo (3-4) não favorece a hidrólise, visto que esta conversão depende da ionização de grupos da enzima e do substrato. A termodinâmica desta reação reza que a hidrólise em um meio alcalino é praticamente irreversível, por outro lado, a degradação do anel  $\beta$ -lactâmico em pH mais elevado, limita essa aplicação para os processos biocatalíticos, o qual torna-se ótimo na faixa de 7,0-8,0 (CHILOV et al., 2002). Entretanto, a remoção contínua dos produtos da fase reacional, permite a hidrólise nesta condição de pH. Um fator importante a ser considerado nesta metodologia é a pouca estabilidade da enzima nesta faixa de pH. Um sistema similar foi desenvolvido por Hollander, 2002, entretanto, neste sistema PGA era mantida em contato com o sistema de solvente em contra-corrente.

Uma estratégia muito interessante que permite redução de um grande número de etapas na produção de 6-APA foi apresentada por Abian, (2003). Neste método a hidrólise de penicilina ocorre num sistema bifásico (caldo fermentativo: solvente orgânico) com o objetivo de eliminar as etapas de extração e cristalização do antibiótico. Neste caso a hidrólise de penicilina ocorre no caldo fermentativo (pH  $\sim$  7) e AFA é constantemente removido para a fase orgânica, enquanto 6-APA permanece no meio reacional. Para atuar neste sistema, um biocatalisador com boa estabilidade na presença de solvente orgânico foi desenvolvido e mostrou-se promissor para aplicações industriais.

A hidrólise de penicilina, no caldo fermentativo filtrado, é uma das estratégias mais eficientes para simplificar e reduzir custos no processo global de produção de 6-APA. Entretanto, para que este processo seja técnica e economicamente viável, a extração do produto de interesse a partir deste meio complexo (caldo do cultivo), deve ser realizada de maneira simples e rápida, com o grau de pureza exigido pela indústria farmacêutica.

### 3.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO DE 6-APA

A hidrólise de penicilina diretamente em caldo de cultura exige grandes esforços para a recuperação de 6-APA, visto que as características físico-químicas desta molécula associada à complexidade do caldo dificultam este processo de separação.

Existem poucos relatos na literatura sobre a extração de 6-APA a partir de um meio complexo (DUTTA et al., 2000; OLIVER et al., 1997), visto que a extração de 6-APA deste meio é mais difícil do que a extração de PG, devido à diferença nas propriedades físico-químicas destas moléculas. Por outro lado, inúmeros relatos sobre a separação de 6-APA a partir de uma matriz simples (água) têm sido divulgados (WANG et al., 2007). Estes estudos servem como base para compreender a interação deste composto com diferentes agentes de extração. Entretanto, só são aplicados a processo em que a penicilina é hidrolisada em água, e isso não apresenta grandes vantagens na eliminação no número de etapas de obtenção de 6-APA, nem elimina o uso de solventes orgânicos no processo global, visto que a penicilina deve ser extraída e cristalizada para posterior hidrólise e obtenção de 6-APA. Portanto, um fator chave para viabilizar a produção de 6-APA a partir de caldos de cultivo consiste em desenvolver novos métodos de separação efetivos para simplificar e melhorar o processo.

Para atingir valores máximos de recuperação de 6-APA, em matrizes simples ou complexas, vários pesquisadores têm investigado o uso de diferentes fases líquidas e sólidas, as quais podem interagir com 6-APA através de interações iônicas, não iônicas, hidrofóbicas e complexação (WANG et al., 2007).

Entre os materiais utilizados para separação de 6-APA destacam-se: Amberlite LA-2, trioctilamina, Aliquat-336 (BORA et al., 1997), XAD16, XAD1180, XAD1600 (SKONEZNY et al., 2005), resina aniônica IRA 400 (LUUK et al., 1996) e aminas secundárias com peso molecular entre 325 e 395 (VAN DER DOES et al., 1999). Estes materiais se mostram promissores para atingir bons rendimentos de recuperação de 6-APA.

#### 3.5.1 Extração Líquido-Líquido

Um processo alternativo ao processo industrial utilizado para a extração de 6-APA em meio aquoso foi proposto por Van der Does, (1999). Este processo utiliza uma solução para extração alternativa aos solventes convencionais (acetato de amila, butila), a qual envolve o uso de uma amina secundária de elevado peso molecular e um álcool imiscível em

água, processos similares também foram apresentados anteriormente sob a forma de patente (PFIZER & CO INC, 1966; BEECHAM RES LAB LTD, 1966). Nestes processos a recuperação de 6-APA atinge níveis de 97 %.

Cascaval, (2002), estudou a separação de 6-APA por extração reativa em Amberlit LA-2 e di-(2-etil hexil) ácido fosfórico e comparou estes resultados com a extração física em 1,2-dicloroetano. Este estudo mostrou que Amberlit LA-2 é quase 5 vezes mais eficiente que os demais sistemas utilizados. Esta extração ocorre por meio de uma reação interfacial entre os componentes numa razão equimolar, e o mecanismo de reação é controlado pelo tipo do agente de extração e o pH da fase aquosa.

### 3.5.2 Extração em Fase Sólida

Vários trabalhos na literatura citam a capacidade de 6-APA formar complexos binários ou ternários. Entre os agentes complexantes do 6-APA estão os íons bivalentes Cu, Co, Ni e Zn e os aminoácidos glicina, valina, alanina, serina e outros (MUKHERJEE, 1991, 1994; SHEHATA et al., 2004; ZHANG et al., 1995). Além da complexação com moléculas iônicas, 6-APA também pode interagir com adsorventes poliméricos neutros (copolímero de estireno ou etilvinil benzeno e divinil benzeno) e até mesmo com superfícies hidrofóbicas (por exemplo, carvão), sob determinadas condições de força iônica, pH e temperatura.

O mecanismo de interação de 6-APA com materiais não iônicos foi rigorosamente estudado por Dutta 2000, e demonstrou que a afinidade dos  $\beta$ -lactâmicos por estes materiais depende da estrutura química do adsorvente e de sua estrutura morfológica. Foi demonstrado também que a interação por transferência de carga desempenha um papel importante na adsorção de  $\beta$ -lactâmico em soluções aquosas. Os estudos conduzidos por Dutta mostram que 6-APA em meio aquoso apresenta pouca afinidade por superfícies hidrofóbicas como o carvão ativado, XAD 4 e XAD 7, comparado a outras moléculas contendo o núcleo  $\beta$ -lactâmico.

Este conhecimento da interação da molécula de interesse com a superfície do adsorvente é importante para o desenvolvimento de adsorventes eficientes para a recuperação de 6-APA. Desta maneira, é possível estabelecer condições ótimas de adsorção e dessorção, através de um processo seletivo, ou seja, um processo onde a adsorção não específica por componentes de matrizes complexas como o caldo fermentativo não é favorável (DUTTA et al., 2000).

A interação de 6-APA com superfícies hidrofóbicas pode ser intensificada em função do pH da solução. Por exemplo, no uso de carvão ativado como adsorvente, a eficiência de adsorção de 6-APA aumenta com a redução do pH. Entretanto, observou-se que uma pequena fração de 6-APA adsorve irreversivelmente em carvão ativado a pH 4. A vantagem de utilizar carvão ativado como adsorvente é seu baixo custo e fácil disponibilidade, entretanto a difícil regeneração deste torna seu uso proibitivo em vários casos (DUTTA et al., 1997).

Alguns adsorventes utilizados para a separação de 6-APA em meio aquoso apresentam caráter iônico. Estes adsorventes mostram-se eficientes, mesmo quando 6-APA encontra-se em meio complexo. Por exemplo, Oliver et al., 1997 realizou a hidrólise de PG em caldo fermentativo. Neste caso, foram realizadas etapas de filtração e ultrafiltração antes da hidrólise de PG e a extração de 6-APA foi realizada utilizando a resina de troca iônica Aliquat 336. Este processo é descrito parcialmente na literatura como patente.

Outro exemplo de aplicação de adsorvente de troca iônica é citado por Wielen, 1996, que estudou o equilíbrio de troca entre os íons: penicilina G, 6-APA, AFA e Cl<sup>-</sup> na resina de troca iônica Amberlit IRA 400. Os experimentos foram realizados em sistema aquoso no modo batelada e a capacidade máxima da resina foi 1,26 mequiv/g da resina úmida.

Do exposto até aqui se pode concluir que o desenvolvimento de um novo método para a produção de 6-APA com menor número de etapas exige o estudo de métodos de separação deste a partir de matrizes complexas.

Dadas as características físico-químicas deste composto, mecanismo de extração via interação iônica mostram-se favoráveis. Portanto, além dos adsorventes comerciais já utilizados em trabalhos anteriores, a investigação no uso de polímeros naturais de caráter iônico ou que sejam facilmente modificados quimicamente para adquirir esta propriedade pode resultar em processos de recuperação de 6-APA mais eficientes e de baixo custo.

### **3.5.3 Quitosana como adsorvente**

O caráter iônico de 6-APA favorece a interação deste composto com suportes carregados. Quitosana é um material polimérico de baixo custo que apresenta boa capacidade de interação iônica e vem sendo muito usado em inúmeros processos biotecnológicos.

A quitosana é considerada o segundo maior composto orgânico mais abundante do mundo. Este biopolímero é derivado da quitina e sua estrutura química contém repetições de unidades beta (1-4) 2-amino-deoxi-D-glicose (ASSIS et al., 2003; HIRANO et al., 1999; VAZQUEZ-DUHALT et al., 2001).

As cadeias poliméricas da quitosana apresentam alto conteúdo de aminas, que a tornam solúvel em soluções aquosas ligeiramente ácidas, mas insolúvel próximo e acima do seu pKa 6,3. Entretanto, a estabilidade química da quitosana pode ser atingida através de ligações cruzadas com etilenoglicol diglicidil éter (EGDG), glutaraldeído e epícloridrina reduzindo sua solubilidade em meio ácido (CHATTERJEE et al., 2005; GINANI et al., 1999; LI et al., 2005; VIEIRA et al., 2006).

Inúmeras aplicações para quitosana natural ou modificada quimicamente são descritas na literatura. Alguns exemplos são: purificação de medicamentos, cosméticos e alimentos (ARRUDA et al., 1999), adsorção de amoxicilina (ADRIANO et al., 2005), adsorção de proteína (GUMUSDERELIOGLU et al., 2004), veículo para liberação de fármacos (MI et al., 2002), suporte na técnica de “Smart” biocatalisadores (VAZQUEZ-DUHALT et al., 2001), imobilização de inúmeras enzimas (ADRIANO et al., 2005; KRAJEWSKA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008).

Quitosana pode ser utilizada sob diferentes formas: pó, fibras, microesferas, membranas (BEPPU et al., 1999; HE et al., 1999; HIRANO et al., 1999). Seja em seu estado natural ou modificada a quitosana apresenta alta capacidade de adsorção, entretanto ainda é possível aumentar e melhorar esta propriedade pela modificação química de seus grupos amina ou hidroxila tornando-a mais ativa em processos de adsorção. Estas modificações da quitosana podem torna seu uso como adsorvente competitivo com as resinas de troca iônica comerciais, as quais apresentam uma concentração de grupos ativos na superfície de 0,83 a 3,91 mmol $g^{-1}$  da resina seca (JEON et al., 2003). Portanto, este biopolímero apresenta elevado potencial para aplicação na recuperação de 6-APA a partir de caldos fermentativos.

Além da recuperação do produto de interesse através de um processo simples e de baixo custo, outro fator chave a ser considerado na produção de 6-APA é o biocatalisador. O preparo de biocatalisadores altamente ativos e estáveis depende entre outros fatores do grau de pureza da enzima utilizada. No item a seguir, são apresentadas algumas metodologias para purificação e imobilização de PGA.

### 3.6 PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE

Penicilinas acilases (penicilina amidohidrolases, E.C. 3.5.1.11) são enzimas que catalisam a hidrólise seletiva da ligação amida em penicilinas e algumas cefalosporinas. Estas enzimas são de grande importância para a indústria farmacêutica, pois também são aplicadas na síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos empregando intermediários como o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e o ácido 7-amino-3-deacetoxi-cefalosporânico (7-ADCA) (ARROYO et al., 2003; SCROB et al., 2003).

Outras aplicações de penicilina acilase é a síntese de peptídeos, remoção de grupos protetores e separação de misturas racêmicas. Baseada na especificidade pelo substrato as penicilinas acilase foram originalmente classificadas em três grupos: penicilina G acilase (PGA), penicilina V acilase (PVA) e ampicilina acilase. Atualmente, entretanto, ampicilina acilase são classificadas como  $\alpha$ -aminoácido éster hidrolases (AEH) (E.C. 3.1.1.43).

Atualmente, penicilinas acilases são utilizadas na forma imobilizada, pois desta maneira os custos de processos enzimáticos são reduzidos, por permitir a reutilização da enzima, e facilitando o manuseio do catalisador em diferentes desenhos de reatores. PGA imobilizada responde por mais de 88% de todo 6-APA produzido no mundo, o restante é produzido por penicilina V acilase (PVA) imobilizada (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2004). Os derivados imobilizados de PGA são preparados por diferentes técnicas e usando soluções de enzimas parcialmente purificadas (KEÇILI et al., 2006). Portanto, a purificação destas enzimas é fundamental para o preparo de biocatalisadores ativos e estáveis.

#### 3.6.1 Purificação de PGA

PGA é produzida por vários microrganismos, sob diferentes condições de cultura e composição de meio de cultivo, na presença, portanto, de diferentes impurezas. O processo de purificação da enzima eleva o custo final da produção de 6-APA. Apesar das melhoras recentes, o processo industrial de purificação em múltiplas etapas é caro e tem baixa recuperação de atividade enzimática (SANTARELLI et al., 2000).

Muitos métodos para purificação de PGA em meios específicos têm sido propostos, entretanto, nenhum método geral de purificação para uma classe de PGA foi desenvolvido (CHENG et al., 2006; SOUZA et al., 2004). O desenvolvimento de um método

robusto para purificação de PGA continua sendo, pois, de grande interesse para o meio científico e para a indústria.

A purificação de PGA tem sido realizada através de extração em fase líquida ou extração em fase sólida. A extração em fase líquida envolve o uso de misturas de solventes orgânicos como, por exemplo, tolueno-etanol ou hidrócloro de guanidina (KHEIROLOMOON et al., 2001a). Recentemente, sistemas utilizando duas fases aquosas (ATPS), preparados pela adição de polietileno glicol, têm sido propostos com o objetivo de reduzir etapas de purificação da rota típica utilizada para proteínas intracelulares: ruptura de célula, centrifugação, ultrafiltração, etapas cromatográficas, etc. (AGUILAR et al., 2006; GUAN et al., 2001).

A extração em fase sólida ou métodos cromatográficos são os métodos mais comuns para purificação de PGA e envolvem o uso de diferentes matrizes sólidas para adsorção de PGA através de interações iônicas, hidrofóbicas, afinidade (por metais ou compostos orgânicos) ou pseudo-afinidade. Estes métodos podem ser utilizados conjuntamente e, além disso, uma mesma fase sólida pode conter sítios de adsorção híbridos, por exemplo, cargas positivas e negativas no mesmo suporte (FUENTES et al., 2007; LJUBIJANKIN et al., 2002; SANTARELLI et al., 2000; SUCK et al., 2006).

Para alguns métodos cromatográficos, faz-se necessário um pré-tratamento da solução que contém a enzima, por exemplo, precipitação com sulfato de amônio ou com estreptomicina, dessalinização (se a etapa seguinte é cromatografia de troca iônica), diálise ou ultrafiltração. Todas essas etapas resultam em um processo longo, e muitas vezes em baixa recuperação da atividade (FITTON et al., 2001; SKROB et al., 2003, SUCK et al., 2006).

A redução no número de etapas de purificação de PGA pode ser obtida pela utilização de cromatografia por afinidade, na qual a interação é baseada somente na função biológica ou na estrutura química individual, ou cromatografia por pseudo-afinidade, na qual a interação é promovida pela adição de elevadas concentrações de sal (HAGE et al., 1999; SANTARELLI et al., 2000).

Várias moléculas com potencial afinidade por PGA têm sido utilizadas para preparar suportes de afinidade, tais como monometilamina, glicina, asparagina, lisina, leucina, anilina, fenilglicina, tirosina, triptofano, fenilbutilamina (PBA), ampicilina, amoxicilina, cefalexina e penicilina (FITTON et al., 2001; KEÇILI et al., 2006). A utilização de penicilinas como agentes de afinidade em suportes sólidos não se mostrou viável devido ao seu custo elevado e à instabilidade dessas moléculas, as quais podem facilmente ser hidrolisadas. Por outro lado, as moléculas que contêm anéis aromáticos, grupos aminos ou heterociclos em sua

estrutura química têm se mostrado adequadas para purificação de PGA (COULON et al., 2004; FITTON et al., 2001; KEÇILI et al., 2006).

Os métodos de purificação de PGA utilizando adsorventes de afinidade mostram-se promissores para a purificação destas enzimas e sua aplicação para imobilização em suportes sólidos.

### 3.6.2 Imobilização de Enzimas em Suportes

O elevado custo de enzimas e sua baixa estabilidade frente a temperatura e pH, fazem da estratégia de imobilização em suportes sólidos uma grande vantagem na aplicação destas em inúmeros processos.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos reduz o custo de processos enzimáticos porque permitem o reuso da enzima (catalisador de elevado custo), pois facilita a separação da enzima do meio reacional. Além disso, a imobilização pode promover estabilização da enzima quando comparada à sua forma nativa, evitando sua degradação em temperatura e pH (PHADTARE et al., 2002). Por exemplo, PGA de *E. coli* imobilizada por ligação covalente pode ser usada em mais de cem bateladas sem adição de enzima fresca (KHEIROLOMOOM et al., 2001a).

A escolha do suporte para imobilização de enzimas depende de várias características que são importantes em sua aplicação em processos industriais, tais como: resistência mecânica e microbiana, estabilidade térmica, funcionalidade química, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, facilidade de regeneração, morfologia (superfície de contato e porosidade) e custo.

Alguns exemplos de suportes citados na literatura para imobilização de penicilina acilase são a Amberlite XAD-7, sílica, poliacrilamida, N-isopropilacrilamida, alginato, celulose (DEAE), MCM-41, poli-vinil álcool, quitosana e agarose (IVANOV et al., 2003; PARMAR et al., 2000; PEREIRA et al., 2003; WILSON et al. 2004).

A imobilização de penicilina acilase tem sido realizada por várias técnicas, entre as quais se destacam a ligação cruzada, aprisionamento físico, adsorção, copolimerização e ligação covalente em suporte sólido, sendo esta última uma das mais utilizadas. (PARMAR et al., 2000; PHADTARE et al., 2002; WILSON et al., 2004).

As técnicas envolvidas na imobilização de PGA têm se concentrado no uso da ligação covalente multipontual da enzima dentro da matriz (PHADTARE et al., 2002). Esta

técnica destaca-se por conferir ao biocatalisador maior rigidez e, conseqüentemente, um elevado grau de estabilização. Esta técnica foi inicialmente estudada por Klibanov (1982) e Mozhaev (1983) e vem sendo aplicada atualmente na estabilização de várias enzimas, especialmente aquelas de interesse comercial (MATEO et al., 2007).

A intensa ligação multipontual entre uma pequena área da enzima, cerca de 10 a 20%, e o suporte exerce sobre a enzima elevado efeito estabilizante. A imobilização multipontual torna as enzimas mais rígidas tornando-as mais resistentes a mudanças conformacionais induzidas pelo calor, presença de solventes orgânicos entre outros fatores (GUISÁN et al., 1993; TARDIOLI et al., 2003).

Os grupos funcionais na superfície das enzimas que podem ser utilizados para efetuar ligação covalente com os grupos ativos no suporte são: amina  $\alpha$  e  $\beta$ , carboxila, sulfidríla, hidroxila, imidazol e fenólico (SANO et al., 1993 citado por CHEN et al., 2000).

A metodologia de ligação covalente multipontual faz uso de reações entre os grupos aminos da enzima e grupos aldeídos na superfície do suporte, formando bases de Schiff. Essa reação ocorre de forma rápida e reversível. A reversibilidade da reação permite que a enzima se encaixe ao suporte ativado sem sofrer modificações conformacionais que causem perda de atividade catalítica. Quando esta reação reversível acontece entre dois ou mais grupos aminos de uma mesma molécula de enzima, esta tende a permanecer ligada ao suporte, pois quando uma ligação é desfeita, outra(s) ligação(ões) está(ão) se formando. Portanto, apesar de que a formação de uma base de Schiff tenha caráter reversível, um conjunto delas entre uma mesma enzima e o suporte tem caráter irreversível, porque a enzima não é desligada do suporte se duas ou mais bases de Schiff são formadas. Entretanto, se um número excessivo de ligações entre uma mesma enzima e o suporte ocorre, essa enzima pode perder sua atividade catalítica devido a mudanças na sua estrutura tridimensional, portanto, é necessário determinar o tempo de reação que é suficiente para formar múltiplas ligações entre enzima e suporte, sem que esta perca sua atividade catalítica. Esta reação é interrompida adicionando-se ao meio reacional borohidreto de sódio, o qual é um agente redutor e atua transformando os grupos aldeídos do suporte em hidroxilas inertes, ao mesmo tempo este agente reduz as bases de Schiff, tornando cada uma das ligações entre a enzima e o suporte irreversível (BLANCO e GUISÁN, 1989). A reação de redução com borohidreto de sódio pode ser vista no item 3.2.8 de Materiais e Métodos.

As propriedades finais da enzima imobilizada dependem entre outros fatores da estrutura química do suporte e condições de imobilização (pH, tempo de imobilização, temperatura, etc). A enzima imobilizada pode apresentar mudanças no pH ótimo, e aumento

nos valores de  $K_M$  (constante de Michaelis) e  $K_I$  (constante de inibição). Entretanto, melhor estabilidade temporal também pode ser observada (BIANCHI et al., 1996; JIANGO et al., 2001; MATEO et al., 2006; MATSUMOTO et al., 1993; PHADTARE et al., 2002).

### 3.7 CINÉTICA DE PGA IMOBILIZADA (HIDRÓLISE DE PG)

A hidrólise de penicilina G (PG) formando ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e ácido fenilacético (AFA) é catalisada pela penicilina G acilase. Durante este processo, reações laterais podem ocorrer, especialmente, pela presença de  $\beta$ -lactamase ou de íons  $\text{OH}^-$  ou  $\text{Me}^{+2}$  (Íons metálicos). Estas reações laterais causam a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico, formando produtos de degradação como ácido penicilênico e ácido penilênico e implicam perda de atividade biológica do antibiótico (KLEIN, 1980).

O equilíbrio para a reação principal na hidrólise de PG depende da concentração do substrato, temperatura e pH, e pode ser mais ou menos quantitativa para formação de 6-APA. Essa reação, em seu sentido direto (deacilação), segue o mecanismo ordenado uni bi e pode ser inibida pelo substrato, penicilina G, ou pelos produtos, 6-APA (não-competitivo) e AFA (competitivo) (KHEIROLOMOOM et al., 2001b; KLEIN, 1980; LAUS et al., 2006; NOROUZIAN et al., 2002). A Figura 3.7 apresenta a reação que representa a hidrólise de PG.

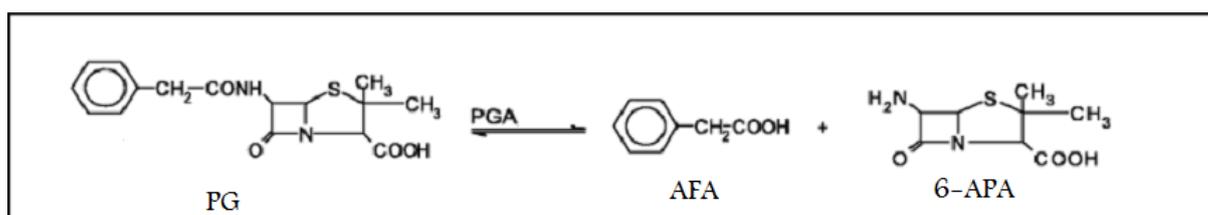


Figura 3.7: Reação da hidrólise de PG. Fonte: Pribyl et al., 2002.

Algumas condições da hidrólise de penicilina G são descritas na literatura para atingir rendimentos satisfatórios, por exemplo, um curto tempo de reação (2-3 h) em temperaturas moderadas (28-37 °C) deve ser utilizado para evitar a formação de produtos indesejados. Além disso, a concentração de penicilina G deve ser no máximo 7,5 % para que haja conversão de 99 % em um sistema batelada (MENEZES, 2000).

Inúmeros estudos cinéticos para a hidrólise de PG em solução aquosa são descritos na literatura. A determinação das constantes de velocidade e inibição sob determinadas condições é importante para definir processos de máxima eficiência.

### **3.7.1 Parâmetros Cinéticos para Enzima Imobilizada**

Em catálise heterogênea em geral, o acoplamento da reação com as etapas de transporte devem ser levadas em conta. Quando a reação ocorre na superfície externa de uma partícula não porosa, o substrato difunde através do filme líquido estagnado ao redor desta superfície, reage com a enzima e o produto resultante difunde da superfície para o meio líquido através deste filme. Desta maneira, a reação e a difusão ocorrem em série. Por outro lado, quando a reação ocorre dentro de um meio poroso, a reação e a difusão ocorrem em paralelo. A resistência difusional externa pode tornar-se desprezível dependendo da eficiência de agitação do meio líquido, entretanto a resistência difusional interna não é afetada pela agitação (RUCKENSTEIN et al., 1984).

A velocidade global da reação é determinada não somente pela distribuição da concentração do substrato dentro do meio poroso, mas também do pH. A menor velocidade de hidrólise observada em PGA imobilizada pode ser devida à contribuição de efeitos de inibição, difusão e variação do pH intrapartícula (KHEIROLOMOOM et al., 2001b; NOROUZIAN et al., 2002).

### **3.7.2 Efeito do Gradiente de pH na Velocidade de Hidrólise de PG por PGA Imobilizada**

O efeito do pH na atividade enzimática é devido a mudanças no estado de ionização de vários grupos iônicos na estrutura da enzima. Diferenças entre o pH ótimo para catálise entre as formas livre e imobilizada podem surgir devido a efeitos conformacionais, ambientais e difusionais. A limitação difusional causada pelo suporte sólido pode levar a mais elevadas concentrações de ácidos e bases no microambiente de enzimas e conseqüentemente a condições de pH desfavoráveis para a biocatálise (SPIEB et al., 1998).

Além da atividade catalítica, a estabilidade de uma enzima, é limitada em geral por uma faixa de pH e em muitos casos um pH ótimo definido é requerido. A estabilidade química de produtos e reagentes também devem ser consideradas em função do pH, por

exemplo, valores de pH acima de 8,0 e abaixo de 4,0 podem promover a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico e causar a perda de atividade biológica do produto de interesse, o 6-APA (GAIDHANI et al., 2002; LIOU et al., 1985).

Spieß, (1998), investigou, teórica e experimentalmente, o gradiente de pH desenvolvido dentro de biocatalisadores durante a hidrólise de penicilina G. Sob condições típicas desta reação, observou-se que o valor médio do pH no suporte foi 2,5 unidades menor do que o valor de pH na solução (pH = 8,0) para um sistema sem tampão, na presença de um tampão este valor foi 1 (o valor de pH medido no interior das partículas foi realizado utilizando um método fluorimétrico). Estes resultados comprovam a existência de um gradiente de pH considerável em suportes durante reações hidrolíticas, mesmo em sistemas tamponados com resistência a transferência de massa desprezível. Vários modelos matemáticos têm sido desenvolvidos e usados em procedimento de cálculos numéricos, com dois objetivos: calcular o perfil de pH no pellet catalisador e sua efetividade. Diferenças de até três unidades de pH foram verificadas entre o centro do pellet catalisador e o meio reacional (BIANCHI et al., 1996; CHIANG et al., 1997; RODRIGUES et al., 2005).

Quando penicilina G potássica é hidrolisada, ácido fenilacético começa a acumular no meio. Como resultado o pH inicial diminui, a velocidade de hidrólise diminui e se o pH está abaixo de 5,0, a inativação de PGA é acelerada. A adição de álcali é importante para manter a velocidade máxima da reação (GAIDHANI et al., 2002).

As maneiras de solucionar este problema é utilizar um tampão com valor de pK aproximadamente igual ao pH do meio líquido usado para a hidrólise. Quando possível, também se pode elevar o pH do meio líquido para que dentro do biocatalisador o pH seja ótimo. Quando este problema está relacionado a reatores de leito fixo o ajuste de pH nos seguimentos ou reciclos podem ser utilizados para minimizar gradientes de pH.

O controle do pH interno em partículas com enzima imobilizada também pode ser realizado co-imobilizando uma enzima capaz de restabelecer o pH ótimo. Por exemplo, a co-imobilização de penicilina acilase e urease resulta em um sistema capaz de controlar o pH interno da partícula. Enquanto a penicilina acilase converte penicilina em 6-APA e AFA, a urease hidrolisa a uréia em amônia e dióxido de carbono, atuando assim como um controlador de pH enzimático (LIOU et al., 1985; RUCKERTEIN et al., 1984).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Uma apresentação global de todas as metodologias utilizadas neste trabalho está descrita no diagrama de blocos seguinte (Figura 4.1):

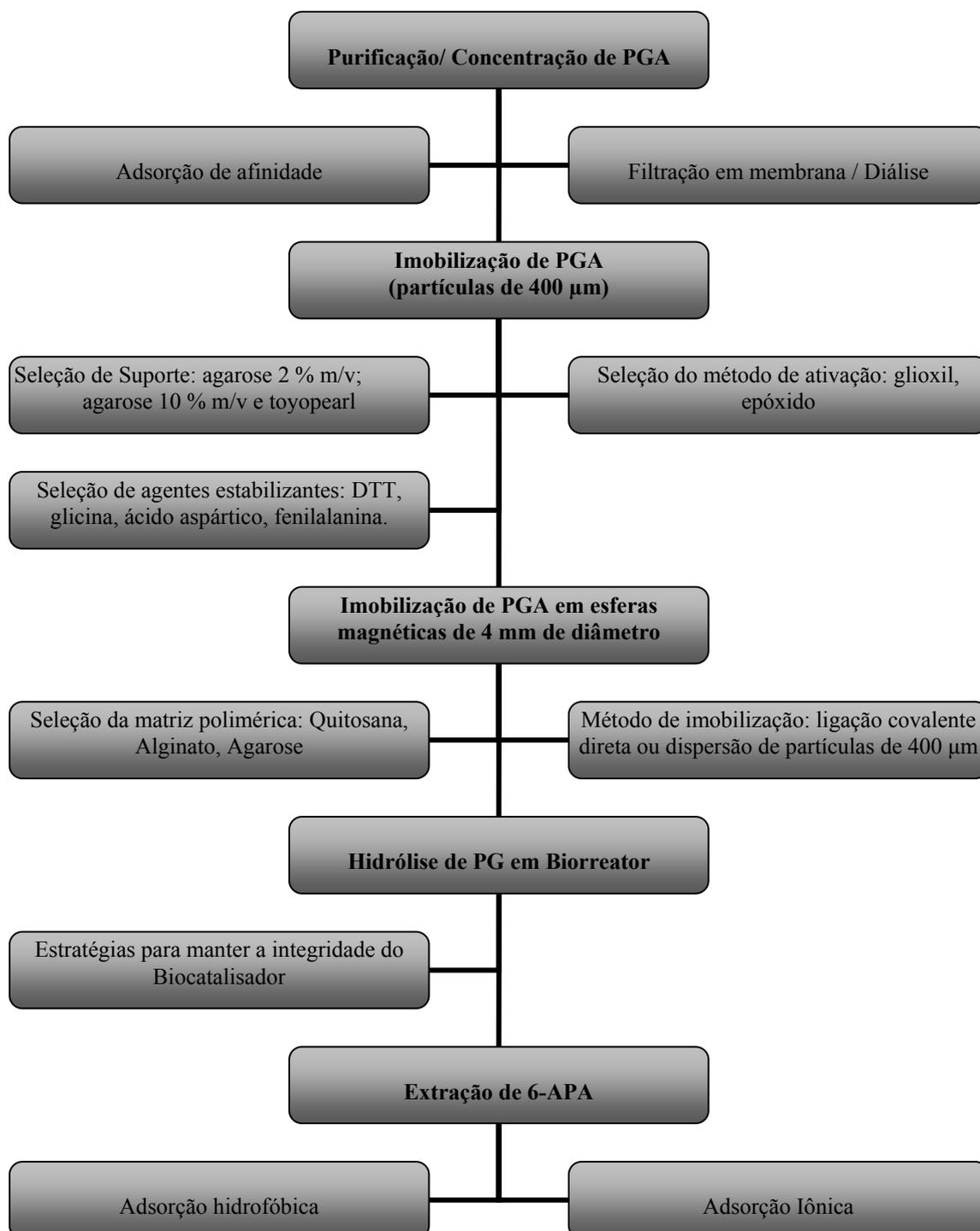


Figura 4.1: Equilíbrio de dissociação de 6-APA com o aumento de pH.

## 4.1 MATERIAIS

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Penicillium chrysogenum*, ATCC 48905 doado pela Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil).

Amostras do caldo fermentativo contendo penicilina G acilase (PGA) produzida por *Bacillus megaterium* foram fornecidas pelo grupo de Biologia Molecular do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

Foram utilizados bioreatores de bancada, tipo tanque agitado e aerado (Applikon®), volume útil de 2 L e 6 L), e airlift com volume útil de 6 L.

A penicilina G potássica utilizada foi gentilmente doada pela Prodotti Química Farmacêutica Ltda.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Dosagem da atividade enzimática utilizando ácido 6-nitro-3-fenilacetamido benzóico (NIPAB)

A determinação da atividade da PGA foi realizada utilizando a metodologia desenvolvida por Kutzbach e Rauenbusch, 1974.

Preparou-se uma solução 0,06 mg/mL de ácido 6-nitro-3-fenilacetamido benzóico (NIPAB) em tampão fosfato 50mM, pH 7,5 (ALKEMA et al., 1999). Adicionaram-se 2 mL do reagente ácido benzóico 6-nitro-3-fenilacetamida (NIPAB) em uma cubeta com capacidade de 4 mL. Em seguida adicionaram-se 20  $\mu$ L da amostra contendo a enzima. A absorbância foi monitorada por 3 minutos em espectrofotômetro UV/Vis da Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, a 405 nm. Uma unidade de atividade NIPAB é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 mmol de NIPAB por minuto a 25°C.

Este é um método simples e rápido para quantificar atividade de PGA e foi utilizado neste trabalho principalmente para monitorar a atividade enzimática no sobrenadante ao longo da imobilização, pois um volume muito pequeno do reagente era necessário (2 mL). Para utilizar este método para dosar a atividade de enzimas imobilizadas nas esferas de 4 mm de diâmetro era necessário um volume mínimo de 20 mL. Considerando o elevado custo deste reagente, optou-se por realizar a atividade da enzima imobilizada pela hidrólise de PG e

posterior reação do produto com o reagente PDAB, cujo método é descrito a seguir. Este método exige um tempo mais longo de análise, entretanto, apresenta menor custo.

#### **4.2.2 Dosagem da atividade enzimática utilizando penicilina G potássica**

A atividade enzimática determinada pelo uso do para-dimetil-amino-benzaldeído, PDAB adquirido comercialmente da Mallinckrodt, (BALASINGHAM et al., 1972; BOYD, 1928; BROMNSTED, 1965; SHEWALE et al., 1987) foi realizada adicionando-se um volume determinado da amostra contendo a enzima a 15 mL de solução de PG 40 g/L em tampão fosfato 100 mM, pH 8. Alíquotas de 25  $\mu$ L eram retiradas a cada 4 minutos num intervalo de 12 minutos e adicionadas a uma cubeta contendo 2,5 mL do reagente PDAB. Após 2,5 minutos era tomado o valor de absorbância e este valor era convertido em unidades de concentração utilizando a equação da reta obtida pela curva de calibração. A atividade foi calculada pela tangente de concentração em função do tempo e uma unidade de atividade PDAB foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu$ mol de penicilina por minuto a 37°C.

#### **4.2.3 Diálise**

A diálise (submergindo a membrana contendo o extrato enzimático em tampão) e/ou concentração (submergindo a membrana contendo o extrato enzimático em sacarose) do extrato enzimático foi realizada em membrana à base de celulose, com tamanho de corte de 12 kDa.

##### **4.2.3.1 Tratamento da Membrana**

Antes do uso a membrana de diálise foi submetida a um pré-tratamento para remover substâncias que interferissem na eficiência da membrana ou causassem perda de atividade catalítica durante este processo.

As etapas de pré-tratamento foram: lavar com detergente, enxaguar, manter em água fervente por 15 minutos, manter em solução de etanol 50 % v/v por 1 h, manter em

solução de bicarbonato de sódio (10 mM) e EDTA (1 mM) por 1 h, manter por 1 h em água milli-Q e lavar com a solução de diálise.

#### **4.2.3.2 Diálise / Concentração da Enzima**

A diálise foi realizada mantendo o extrato enzimático contido na membrana mergulhado em tampão fosfato 5 mM e pH 6, por 24 h a 4 °C.

Após a diálise, o extrato enzimático pôde ser concentrado, mantendo a membrana imersa em sacarose por 24 h a 5 °C, desta maneira a água era removida e um extrato mais puro e com maior atividade volumétrica era obtido.

#### **4.2.4 Centrifugação em Tubos com Membrana**

O extrato enzimático previamente dialisado foi concentrado em tubo de separação com membrana de celulose AMICON ULTRA-15 DA (30 kDa) da Millipore. Este procedimento foi realizado adicionando-se um volume de 7 mL do caldo ao tubo de separação. Em seguida o mesmo era centrifugado a 3214 rcf por 15 minutos a 4°C em uma centrífuga da Eppendorf modelo 5810R. A seguir, o volume permeado era repostado por igual volume de tampão fosfato 50 mM a pH 8,0 e o procedimento era repetido para a segunda diálise.

#### **4.2.5 Eletroforese**

Para monitorar o tipo de proteína existente no extrato enzimático durante o processo de purificação realizaram-se eletroforeses SDS-PAGE em diferentes amostras do caldo fermentativo. Preparava-se gel 15% (LAEMMLI et al., 1970), e a revelação era realizada usando Coomassie (WILSON et al., 1983) ou nitrato de prata (BLUM et al., 1987).

#### **4.2.6 Dosagem de Proteína**

O procedimento utilizado foi o descrito por Bradford (1976). Adicionou-se 5mL do reagente de Bradford a tubos de ensaios com capacidade para 10 mL. Em seguida foi

adicionado 0,1mL da amostra contendo proteína e a mistura foi agitada e mantida em repouso por 5 minutos quando a absorbância foi lida em 595nm.

#### 4.2.7 Ativação de Agarose

Agarose 6BCL e 10BCL utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Amershan Biosciences (Uppsala/SU). O glicidol utilizado nesta etapa de ativação foi adquirido da Sigma-Aldrich.

A ativação da agarose iniciou-se com a inserção de grupos gliceris através da reação com glicidol, em seguida estes grupos foram convertidos a glioxil em uma etapa de oxidação utilizando periodato de sódio seguindo o método descrito por Guisán, (1988).

A Figura 4.2 mostra a reação de glicidol com agarose.

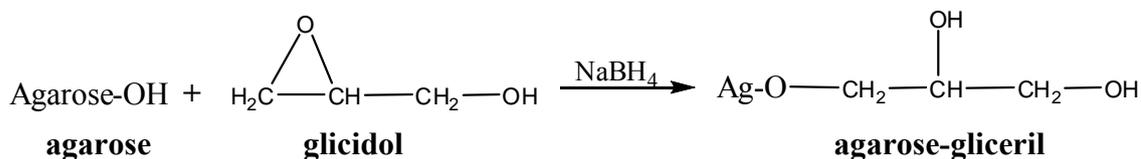


Figura 4.2: Reação da formação de agarose gliceril.

Após a formação dos grupos gliceris, o gel foi lavado sob vácuo com água destilada para remoção do formaldeído produzido. A Figura 4.3 mostra a equação para a oxidação de agarose gliceril.

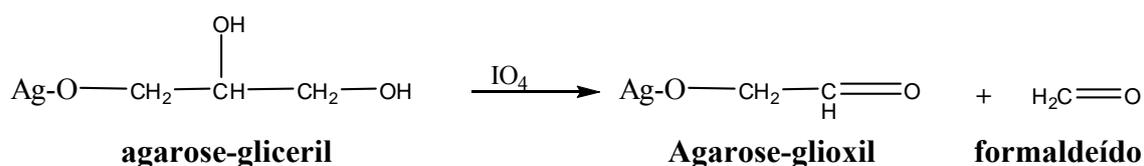


Figura 4.3: Formação de agarose glioxi

#### 4.2.8 Reação de Agarose-glioxil com Etilenodiamino e Glutaraldeído

O grupo glioxil inserido na superfície da agarose apresenta uma distância da superfície do suporte relativamente curta, e esta característica é excelente para a imobilização de enzimas, entretanto para o propósito de purificação é interessante utilizar braços espaçadores de maior comprimento. Com este objetivo, a partir da agarose-glioxil, o braço

espaçador foi expandido utilizando o método de ativação desenvolvido por Fernandez-Lafuente et al., 1993.

O aumento da cadeia iniciou-se utilizando reação com etileno diamino a pH 10. Seguindo-se uma etapa de redução das bases de Schiff formadas utilizando NaBH<sub>4</sub>. A Figura 4.4 mostra a equação para a reação de agarose glioxil com etileno diamino, seguida da redução com borohidreto.

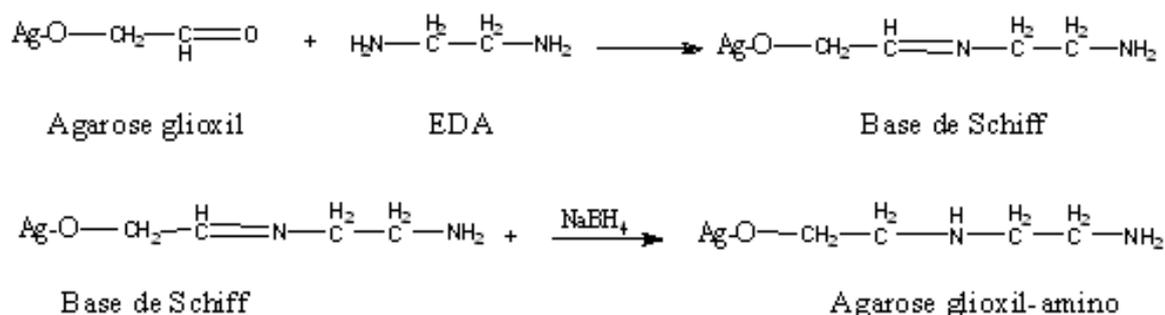


Figura 4.4: Reação de agarose glioxil com etilediamino

O segundo composto utilizado para aumentar o comprimento do braço espaçador foi o glutaraldeído 25% adquirido comercialmente da Vetec/SP. A reação de agarose-amino com glutaraldeído pode ser visualizada na Figura 4.5.

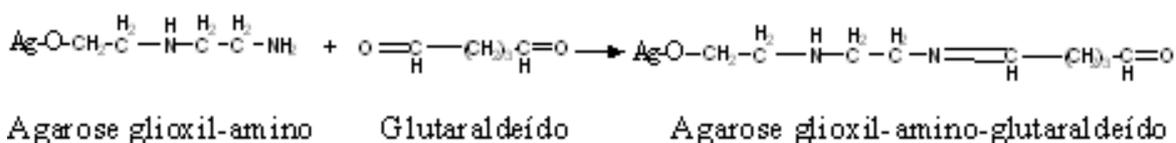


Figura 4.5: Formação de agarose-glutaraldeído.

#### 4.2.9 Reação de Agarose-glutaraldeído com Triptofano

Após obter agarose-glutaraldeído com braço espaçador relativamente grande, seguiu-se a etapa de inserção do grupo de afinidade.

O gel ativado foi mantido em contato com uma solução de triptofano (1,5 g/L em tampão bicarbonato, pH 10) numa razão 1:10. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 16 horas. Após esse tempo, filtrou-se o gel a vácuo e em seguida adicionou-se solução de NaBH<sub>4</sub> ao gel, mantendo sob agitação por 2 horas. Lavou-se o gel com água. A Figura 4.6 mostra a equação para ligação do grupo afim a agarose-glutaraldeído.

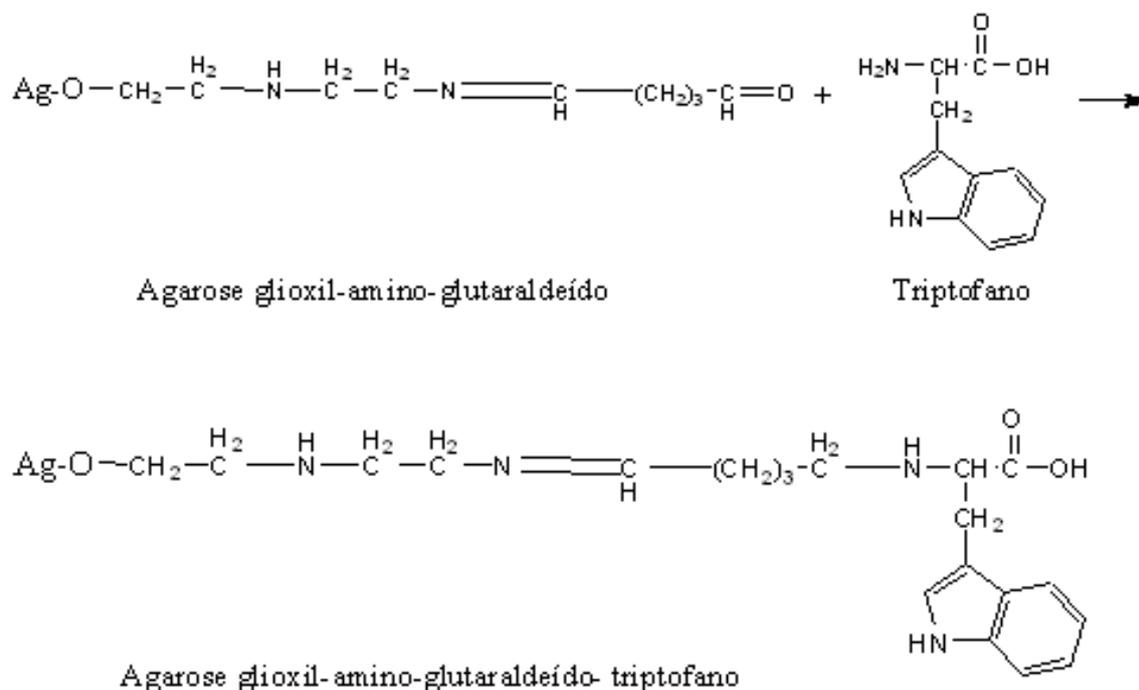


Figura 4.6: Formação do suporte de afinidade.

O procedimento descrito acima foi utilizado para preparar outros suportes de afinidade, para isto o triptofano foi substituído por fenilglicina e fenilalanina, gentilmente doados pela Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda.

#### 4.2.10 Caracterização por Infravermelho

Selecionou-se o melhor suporte de afinidade para a análise em Infravermelho com o objetivo de comprovar a formação dos grupos afins na superfície da agarose.

A análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos utilizando espectrômetro BOMEM da série MB e as absorções foram registradas em número de onda  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.11 Adsorção em Suporte de Afinidade

A adsorção era realizada adicionando-se 0,25 g do suporte de afinidade a um volume de caldo fermentativo, o qual variou de 2 mL a 25 mL. O sistema era colocado sob agitação orbital utilizando uma estufa de hibridização, modelo MA 430/RI da Marconi. A temperatura, pH e o tempo foram variáveis de estudo e são descritos com os resultados.

#### 4.2.12 Dessorção de PGA

O gel contendo PGA adsorvida foi filtrado, ressuspendido em 0,5mL de solução dessorvente (penicilina 40 g/L, etanol-água 30% v/v ou triptofano 40 g/L) a pH 7. Deixou-se sob agitação por 1 hora a 15°C e 250 rpm. Após esse tempo, filtrou-se o gel.

#### 4.2.13 Adsorção Reversa em Agarose Triptofano

Esta estratégia foi realizada nas mesmas condições de adsorção descritas no item 3.2.11, entretanto ao caldo fermentativo contendo PGA foi adicionado AFA numa concentração de 100 mM, para impedir a adsorção desta enzima ao suporte, enquanto outras proteínas eram adsorvidas.

#### 4.2.14 Imobilização/Estabilização de PGA de *E. coli*

PGA de *E. coli* foi utilizada para realizar o estudo de imobilização ao invés de usar a PGA de *B. megaterium*, pois a concentração desta última no extrato enzimático é milhares de vezes menor que a concentração da PGA de *E. coli* em seu extrato enzimático. Portanto, paralelo ao estudo de purificação e concentração da PGA de *B. megaterium*, foi conduzido o estudo de imobilização de PGA usando o extrato enzimático de *E. coli*. A metodologia padrão utilizada para imobilizar PGA e avaliar sua atividade e estabilidade é descrita na sequência. Os detalhes das ligeiras modificações realizadas em qualquer destes experimentos foram descritos junto aos resultados e discussões.

##### 4.2.14.1 Imobilização em Agarose e Toyopearl

Um procedimento padrão para imobilização de PGA em partículas de agarose de 400  $\mu$ m foi utilizado. Um grama de agarose glioxil (preparado como descrito no item 3.2.7) ou um grama de toyopearl foi adicionado a 9 mL de uma solução da enzima preparada em tampão carbonato 100 mM, pH 10, contendo ácido fenilacético 100mM e glicerina 25% v/v. Esta solução continha aproximadamente 0,2 mg proteína/mL. A suspensão foi mantida sob agitação até que a atividade do sobrenadante fosse zero. Ao final da imobilização, adicionou-se borohidreto de sódio numa concentração de 1 mg/mL de suspensão para reduzir as bases de Schiff formadas entre enzima e suporte e também converter os aldeídos

remanescentes em hidroxilas inertes. Em seguida o derivado foi lavado primeiramente com tampão fosfato 25 mM, pH 5 e em seguida com água e armazenado a 4°C.

#### **4.2.14.2 Estabilidade dos Derivados Imobilizados Frente a Temperatura**

A estabilidade térmica dos biocatalisadores foi realizada em banho termostaticado a 65°C. Uma massa do biocatalisador contendo 1,5 U foi adicionado a um frasco de vidro contendo 3 mL de tampão fosfato 25 mM, pH 7. Foi realizada a medida da atividade inicial da suspensão, em seguida o biocatalisador em suspensão foi submetido à inativação térmica e a atividade deste foi monitorada até que valor medido fosse menor que metade do valor inicial. Desta maneira, foi possível estimar o tempo de meia vida da enzima imobilizada.

#### **4.2.14.3 Estabilidade dos Derivados Imobilizados Frente a Solvente**

A estabilidade frente a solvente orgânico foi realizada a 4 °C. Uma massa do biocatalisador contendo 3 U foi adicionado a um frasco de cristal contendo solução 70% v/v em dioxano e tampão fosfato 25 mM, pH 7 (30% v/v). Foi realizada medida da atividade inicial da suspensão e a atividade residual foi medida até perda maior que 50% da atividade inicial.

#### **4.2.14.4 Estabilidade dos Derivados Imobilizados Frente a pH**

A estabilidade a pH 5,0 e pH 7,0 foi realizada em banho termostaticado a 67°C. Uma massa do biocatalisador contendo 1,5 U foi adicionado a um frasco de vidro contendo 3 mL de tampão acetato 50 mM, pH 5. Foi realizada medida da atividade inicial da suspensão e a mesma foi submetida à inativação térmica até perda maior que 50% da atividade inicial.

#### **4.2.14.5 Preparo de Esferas com diâmetro de 4 mm a partir de diferentes matrizes poliméricas**

Para obter o biocatalisador com tamanho grande (diâmetro de 4 mm) foram utilizadas as matrizes poliméricas: quitosana, alginato e agarose. Cada uma das matrizes poliméricas foi dissolvida e em seguida gelificada nas condições descritas abaixo. Este procedimento foi realizado com o objetivo de selecionar a melhor matriz para co-envolver PGA previamente imobilizada em partículas de 400  $\mu\text{m}$ . A obtenção de esferas grandes através do co-envolvimento facilitou a recuperação do biocatalisador a partir dos caldos fermentativos.

##### **4.2.14.5.1 Alginato**

As esferas de alginato foram preparadas gotejando uma solução de alginato de sódio 20 g/L em cloreto de cálcio 0,5 M. Esta mistura foi mantida sob agitação por duas horas e as esferas produzidas foram submetidas a testes de estabilidade química em meio similar ao utilizado para o cultivo de *P. chrysogenum*.

##### **4.2.14.5.2 Quitosana**

Quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5 % v/v formando uma solução 40 g/L do polímero. Em seguida esta solução foi gotejada em tripolifosfato 20 g/L, pH 7. A mistura foi mantida sob agitação por duas horas e as esferas produzidas foram submetidas a testes de estabilidade química em meio similar ao utilizado para o cultivo de *P. chrysogenum*.

##### **4.2.14.5.3 Agarose**

Uma solução aquosa contendo 100 g/L de agarose e 50 g/L de limalha de aço inoxidável foi mantida a temperatura de 95 °C até total dissolução do polímero. Em seguida esta mistura foi gotejada em vaselina. O pellet formado foi lavado com água destilada em abundância e mantido sob agitação em solução contendo surfactante (Tween), em seguida foram novamente lavados com água em abundância.

#### **4.2.14.6 Imobilização em Esferas de Agarose de 4 mm por Ligação Direta ou Co-envolvimento**

A imobilização de PGA em esferas de agarose foi realizada de duas maneiras diferentes: ligação covalente direta da enzima às cadeias poliméricas das esferas ativadas ou por dispersão de PGA previamente imobilizada (em partículas de agarose com 400  $\mu$ m, descrito no item 3.2.14.1) na solução do polímero antes do gotejamento desta em vaselina. Nesta última, a solução do polímero a 95 °C era resfriada a 60 °C antes da adição da enzima para evitar perda de atividade catalítica. À solução do polímero foram adicionadas partículas contendo 500 UI/g numa razão de 1:5, ou seja, 1 g de partículas dispersas em 4 g da solução do polímero. Após o gotejamento desta mistura em vaselina, seguia-se o procedimento descrito para o preparo das esferas.

Para a imobilização direta de PGA sobre as esferas de agarose, uma etapa de ativação deste suporte foi realizada utilizando metodologia descrita por Guisán, (1988). A quantidade de grupos ativos (glioxil) nas esferas foi determinada pela quantificação do periodato de sódio consumido na etapa de oxidação. As esferas apresentaram uma quantidade de grupos ativos de 109  $\mu$ mol/g do suporte.

A imobilização de PGA foi realizada preparando-se uma solução da enzima em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10 contendo glicerina 25 % e AFA 100 mM. Esta solução foi mantida em contato com as esferas ativadas por 24h sob agitação mecânica a 25°C.

#### **4.2.15 Esterilização do Biocatalisador**

A metodologia estabelecida para esterilizar o biocatalisador utiliza solução de iodo 50  $\mu$ M numa razão 1:10. A mistura é mantida sob agitação mecânica por 30 minutos e em seguida o biocatalisador é lavado com água esterilizada em câmara asséptica.

#### **4.2.16 Quantificação de 6-APA (Método PDAB)**

6-APA foi quantificado pelo método do p-dimetilaminobenzaldeído (PDAB), adicionando-se alíquotas de 25  $\mu$ L do caldo fermentativo a 2,5 mL da solução de PDAB. A absorbância obtida após 2,5 minutos de reação foi convertida em concentração de 6-APA utilizando curva de calibração previamente determinada.

Neste método, 6-APA reage com p-dimetilaminobenzaldeído-PDAB (BALASINGHAM et al., 1972; BOMSTEIN E EVANS, 1965; BOYD, 1928; SHEWALE et al., 1987). O grupo amino (6-APA) reage com aldeído (PDAB), resultando em um composto colorido, cuja concentração é proporcional à concentração de 6-APA no meio. Assim, tendo-se uma curva de calibração obtida a partir de concentrações conhecidas de 6-APA, a medida da absorbância da solução do composto colorido, a 415 nm, permite a determinação da concentração de 6-APA em amostras do caldo de cultivo.

#### **4.2.17 Quantificação de PG (Hidrólise e PDAB)**

Durante o cultivo de *P. chrysogenum* a PG foi quantificada retirando-se alíquotas de 975  $\mu$ L de caldo fermentativo e adicionando-se a estas 25  $\mu$ L de solução de PGA livre (500 U/mL). Essa mistura foi mantida por 15 minutos em banho a 37 °C, para hidrólise total da PG. Considerando a estequiometria da hidrólise de PG, onde cada molécula de 6-APA formada corresponde a uma molécula de PG hidrolisada, utilizou-se o reagente PDAB para quantificar o 6-APA (como descrito no item 3.2.16) e determinou-se indiretamente a concentração de PG.

Ao longo do cultivo a PG foi hidrolisada pelo biocatalisador dentro do biorreator, e para determinar a concentração de PG remanescente, em tempos determinados eram retiradas amostras com volumes de aproximadamente 5 mL.

Cada amostra era filtrada para remoção da massa de fungo e uma alíquota de 25  $\mu$ L desta era adicionada a 2,5 mL da solução de PDAB para quantificar o 6-APA (produto da hidrólise de PG dentro do biorreator). Em seguida, outra alíquota de 975  $\mu$ L da mesma amostra era submetida a hidrólise completa com PGA livre e 25  $\mu$ L desta foi utilizado para quantificar 6-APA (produto da hidrólise de PG dentro do biorreator + produto da hidrólise de PG por PGA livre).

A quantidade de 6-APA total (dentro do biorreator + produzido por PGA livre) menos o que havia dentro do biorreator (medido diretamente em PDAB) corresponde à quantidade de PG remanescente dentro do biorreator.

#### 4.2.18 Quantificação PG, AFA e APA (HPLC)

A análise dos compostos de interesse presentes em caldo fermentativo foi realizada também em HPLC. O método cromatográfico utilizado para quantificar PG, 6-APA e AFA utilizou um sistema de HPLC da SHIMADZU Com coluna C-18, novaPack, 3,9x300mm. A fase móvel utilizada era composta de acetonitrila e solução de fosfato de sódio monobásico 5 mM e pH 5,95. Um gradiente de solvente foi utilizado, e a concentração de acetonitrila variou com o tempo de análise da seguinte maneira: 0-2 min (ACN atinge 20 %), 2-5 min (ACN atinge 25 %), 5-7 min (ACN é mantida 25 %) e de 7-10 min (ACN volta a 0 %). Uma vazão de 1 mL/min foi utilizada e a detecção foi feita a 225 nm.

#### 4.2.19 Quantificação de Sacarose

Para quantificar sacarose presente no caldo fermentativo utilizando o método do ácido dinitro salicílico (DNS) foi necessário realizar um pré-tratamento da amostra. Uma alíquota de 1 mL de caldo fermentativo foi submetida à hidrólise ácida para liberação dos açúcares redutores, após neutralizar a amostra contendo açúcar redutor, a mesma foi submetida a análise por DNS (MILLER, 1959).

#### 4.2.20 Cultivo de *P. chrysogenum* em Shaker

A primeira etapa para o cultivo de *Penicillium chrysogenum* foi o preparo do meio para germinação. A composição deste meio é apresentada na Tabela 4.1.

O pH do meio de germinação foi ajustado para 7,0 utilizando hidróxido de amônio e em seguida, esse meio foi transferido para erlenmeyer com capacidade para 500 mL e submetido a esterilização em autoclave por 15 minutos. Após esterilização, o meio foi resfriado e adicionou-se a este em câmara asséptica 10 mL de uma solução salina contendo *Penicillium chrysogenum*, proveniente da raspagem de esporos presentes em tubo inclinado contendo o meio de crescimento e manutenção (agar, extrato de malte e peptona), o qual se encontrava armazenado a -5 °C.

**Tabela 4.1: Composição do meio de cultivo para *Penicillium chrysogenum*.**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
água de maceração de milho	2,8 % v/v
sulfato de amônio	0,513 % m/v
fosfato de sódio monobásico	0,523 % m/v
hidróxido de cálcio	0,131 % m/v
carbonato de cálcio	0,077 % m/v
anti-espumante (polipropileno)	0,256 % m/v
sacarose	2,5 % m/v
água	q.s.p. 100 mL

O inóculo foi mantido sob agitação de 250 rpm em shaker a 25 °C por 24h. Após esse período, 10 % do inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 90 mL de meio fresco com composição idêntica àquela descrita para o inóculo (Tabela 3.1). Entretanto, para este meio de produção o precursor (ácido fenilacético) foi adicionado na concentração de 5 g/L. O tempo de cultivo para a produção foi de 120 h.

#### **4.2.21 Cultivo de *P. chrysogenum* em Biorreator Tipo Tanque Agitado**

Os experimentos em biorreator se iniciaram com o preparo do inóculo como descrito na Tabela 3.1. Após 24 h 100 mL do inóculo foi totalmente transferido para o biorreator contendo aproximadamente 1,6 L de meio de produção. Um esquema do aparato utilizado para realizar o cultivo de *P. chrysogenum* é apresentado na Figura 4.7.

A temperatura no bioreator foi mantida a 25 °C e pH 7. A vazão de ar variou de 1 a 4 L/min. O oxigênio dissolvido (OD) foi mantido entre 0 e 20% de saturação. O biorreator da Applikon dependable instruments com capacidade para 2 L foi acoplado ao sistema de aquisição de dados (National Instruments®) e variáveis on-line foram armazenadas a cada 10 segundos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, velocidade de agitação, fração molar de dióxido de carbono no gás efluente).

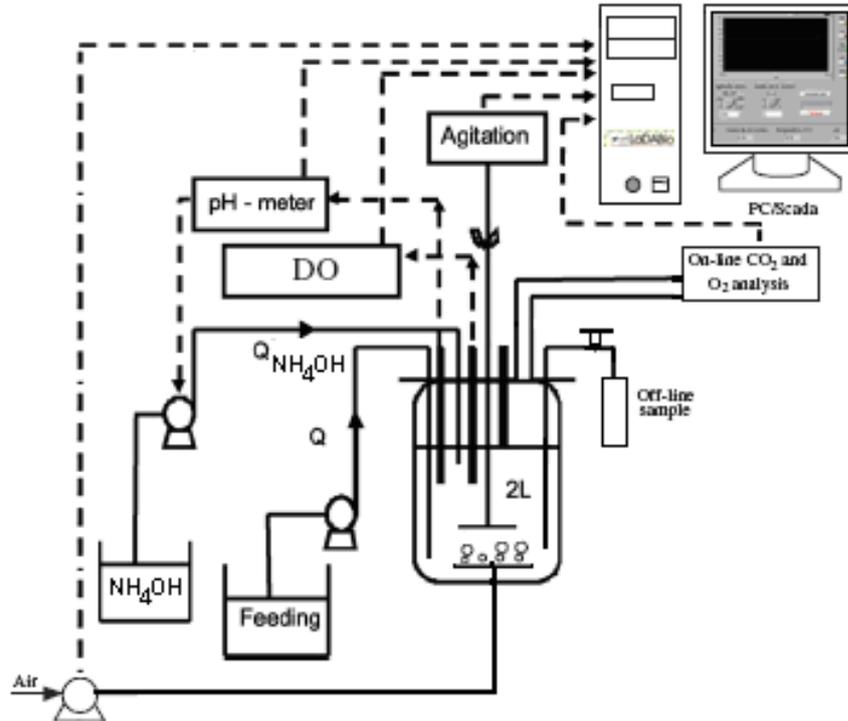


Figura 4.7: Desenho esquemático do aparato utilizado para o cultivo de *P. chrysogenum*. Fonte: Nucci et AL., 2009.

Soluções de hidróxido de amônio (12,5 % m/v) e ácido clorídrico (1M) estavam conectadas ao bioreator, e a adição automática era realizada utilizando bombas peristálticas para manter o pH 7, visto que este valor de pH é o mais indicado para o crescimento do fungo. Além disso, uma solução de sacarose com concentração de 100 g/L foi conectada para alimentação de fonte de carbono durante o cultivo.

#### 4.2.22 Cultivo de *P. chrysogenum* em Air lift

O cultivo de *P. chrysogenum* em biorreator pneumático do tipo “airlift” (Figura 4.8) com capacidade para 6L foi realizado de maneira similar ao descrito no item anterior, variando-se somente a vazão de ar, a qual foi mantida em 18 L/min.

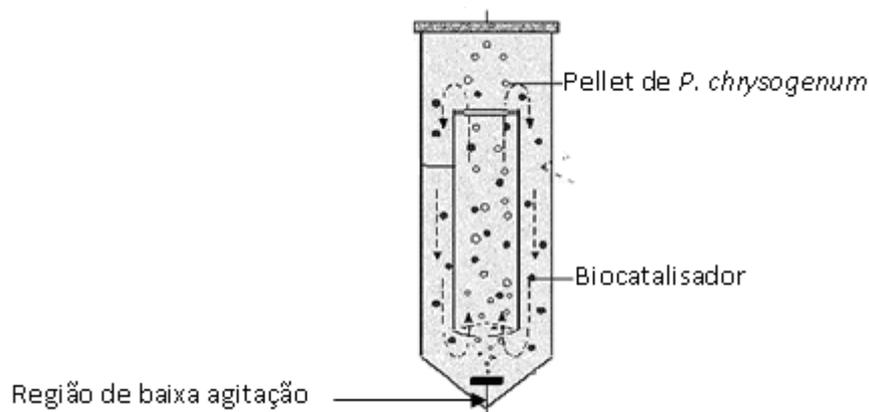


Figura 4.8: Esquema do princípio de funcionamento de reator "air lift". Adaptada de [www.rcub.bg.ac.yu](http://www.rcub.bg.ac.yu).

#### 4.2.23 Hidrólise de PG em Biorreator

A concentração de PG produzida pela cepa de *Penicillium chrysogenum* utilizada neste trabalho mostrou-se muito baixa, não sendo possível a detecção da mesma pelo método de análise utilizado. Fez-se necessário a adição de PG ao biorreator para simular as condições do cultivo na indústria, ou seja, durante o cultivo do fungo, PG foi adicionada gradativamente até atingir ao final do cultivo a concentração obtida em escala industrial (~30 g/L). Portanto, a cada 12h, adicionaram-se 6g de PG ao biorreator, além disso, pulsos de sacarose eram aplicados para manter a viabilidade da cepa. Amostras foram retiradas a cada 12h, antes e após a adição de PG, para a determinação da concentração de 6-APA após hidrólise.

A adição do biocatalisador ao biorreator foi realizada após 24h do início do cultivo, visto que, neste intervalo de tempo, o fungo está em fase de adaptação e crescimento e ainda não se observa a produção de penicilina, portanto não é necessária a presença do biocatalisador. Além disso, ao minimizar o tempo de exposição do biocatalisador a este meio, reduzem-se os riscos de perda da atividade do catalisador e inibição do crescimento do fungo devido a contaminações.

O biocatalisador esterilizado foi transferido para um Erlenmeyer contendo o meio de produção e foi mantido 24 h sob agitação de 250 rpm em shaker para verificar a existência de contaminantes. Ao fim de 24 h um teste em placa foi realizado para comprovar a esterilidade do biocatalisador. Em seguida, o biocatalisador foi transferido de maneira asséptica para o biorreator. A hidrólise de PG foi monitorada como descrito anteriormente.

#### **4.2.24 Cinética de Hidrólise de PG**

Os parâmetros para a hidrólise de PG catalisada por PGA foram determinados em biorreator (método diferencial) e em reator (método das velocidades iniciais).

##### **4.2.24.1 Em Reator (0,1 L) – Método das Velocidades Iniciais**

Os parâmetros cinéticos para PGA livre e imobilizada foram determinados pelo método das velocidades iniciais utilizando 30 mL de caldo fermentativo livre de células e concentrações de PG variando de 1-40 g/L. As reações de hidrólise foram investigadas a 12 e 25 °C e a atividade enzimática foi determinada pelo método PDAB. O reator com capacidade para 100 mL foi conectado a um banho termostático e um sistema com agitação mecânica foi utilizado.

##### **4.2.24.2 Em Bioreator ( 2 L) – Método Diferencial ou Integral**

Foi realizado um cultivo sob condições previamente estabelecidas, e após 48 h, quando a massa do fungo atingiu seu valor máximo, o biocatalisador (10 g/L) e penicilina (30 g/L) foram adicionados simultaneamente. Ao longo de 120 h amostras foram retiradas e as concentrações de PG e 6-APA foram determinadas usando o método enzimático.

#### **4.2.25 Extração de 6-APA**

##### **4.2.25.1 Preparo de Adsorvente (Quitosana-Arginina)**

###### *Ativação de Quitosana I*

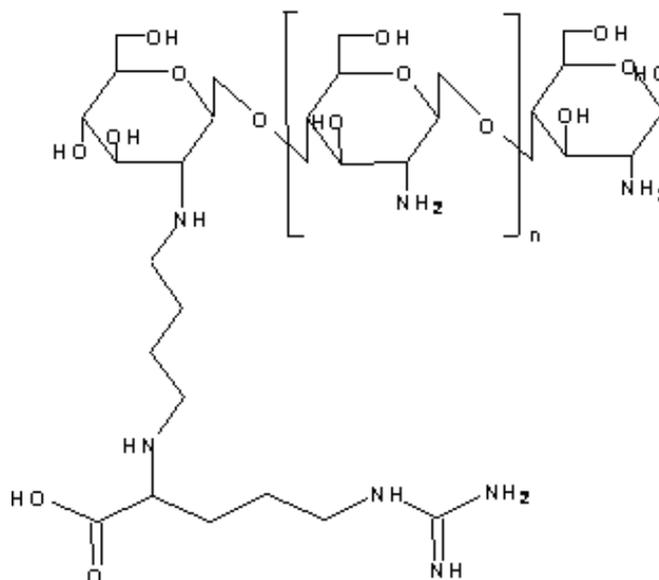
Gel de quitosana foi preparado numa concentração de 40 g/L. Quitosana foi dissolvida em ácido acético 5% e mantida sob agitação por 2 h. Em seguida a solução de quitosana foi gotejada em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M e mantida sob agitação por 24 h.

A ativação de quitosana (pó ou gel) foi realizada adicionando-se 30 mL de glutaraldeído 0,5 M a 3 g de quitosana e mantendo a mistura sob agitação por 1 h a 25°C. Em seguida

a quitosana foi filtrada a vácuo e adicionada a uma solução de arginina 1,5 M. Após 24 h, quitosana ativada foi reduzida com borohidreto de sódio.

### *Ativação de Quitosana II*

Apesar do uso de glutaraldeído em excesso durante a ativação de quitosana descrita no item anterior, a presença de elevada concentração de grupos amino na quitosana pode promover o entrecruzamento do polímero, reduzindo assim a concentração de arginina em quitosana. Para evitar o entrecruzamento, prepararam-se soluções individuais equimolares de glutaraldeído e arginina. 1 mL da solução de glutaraldeído foi adicionado a 1 mL da solução de arginina e uma coloração amarela foi observada imediatamente, resultante da reação do aminoácido com o aldeído. Esta solução foi adicionada a 30 mL de uma suspensão de quitosana (3 g) em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10, mantida sob agitação a 25 °C. O procedimento foi repetido cada 30 minutos até que o sobrenadante da suspensão de quitosana apresentasse cor amarela constante, indicando o equilíbrio da reação entre o amino da quitosana e o aldeído do glutaraldeído-arginina. Após 24 h o gel foi filtrado e reduzido com borohidreto de sódio. Um esquema da estrutura química da quitosana ativada é apresentado na Figura 4.9.



**Figura 4.9:**Esquema da estrutura química do adsorvente quitosana-arginina

#### **4.2.25.2 Preparo de Adsorvente (Agarose-Arginina)**

Agarose (CL 10%) foi previamente ativada com glicidol e etilenodiamino segundo metodologia desenvolvida por Fernandez-Lafuente *et al.*, (1993). 3g do derivado obtido (agarose-glutaraldeído) foram mantidos em contato com 10 mL de solução de arginina 0,15 M (500  $\mu$ mol de arginina/g gel) em tampão bicarbonato 100mM, pH 10 por 24 h. Em seguida o gel foi filtrado à vácuo e reduzido em solução 0,25 M de borohidreto de sódio pH 10 por 1h para converter o aldeído remanescente em hidroxilas inertes. Teste com o reagente de Schiff foi realizado para confirmar a redução dos aldeídos.

#### **4.2.25.3 Tratamento das Resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761**

Antes do uso, as resinas XAD foram submetidas a um pré-tratamento utilizando metanol, etanol e água destilada. 10 g da resina foram adicionadas a 20 mL de metanol e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. Em seguida a resina foi separada por filtração a vácuo, sendo o procedimento repetido por duas vezes. A resina tratada com metanol foi lavada com água destilada e seca em estufa a 50°C por 24 h. Em seguida a resina passou por um processo de hidratação utilizando etanol e água. Um volume de 100 mL de etanol contendo a resina foi mantido em agitação até que não fossem observadas bolhas de ar no etanol, indicando que o volume interno das partículas dos adsorventes estava totalmente preenchido pelo solvente. Em seguida a resina foi lavada abundantemente com água destilada em sistema de filtração a vácuo.

#### **4.2.25.4 Adsorção de 6-APA**

Ensaio de adsorção de 6-APA foram conduzidos em água e em caldo fermentativo para investigar o efeito de competição entre 6-APA e componentes do caldo fermentativo. Soluções de 6-APA com concentração conhecida foram preparadas a pH 7,0 ou 3,6. Em seguida as soluções foram centrifugadas a 15.557 rcf por 10 minutos em centrífuga da Eppendorf, modelo 5810R, para remover quaisquer compostos precipitados nesses valores de pH. 0,3 g do adsorvente foram adicionados a 0,7 mL da solução de 6-APA por 1 h a 25 °C, visto que este tempo foi suficiente para atingir o equilíbrio do sistema sem perda do 6-APA por degradação. Após 1 h, o adsorvente foi separado por filtração. A concentração de 6-APA, antes e após a adsorção foi determinada pelo método PDAB.

Foram utilizados como adsorventes as resinas comerciais XAD-4, XAD-7 e XAD-761, da Rohm & Haas Co. Gel de agarose CL (10%) da Amershan Bioscience Co (Uppsala/SU) e quitosana em pó (85% desacetilada) da Polymar Ind. Ltda foram modificadas quimicamente com o aminoácido arginina e usados como adsorventes.

#### **4.2.26 Pré-Purificação 6-APA com Carvão Ativado e Etanol**

A extração de 6-APA a partir de um meio complexo sofre vários tipos de interferência. Para minimizar o efeito destes interferentes foram realizadas etapas de pré-tratamento do caldo fermentativo.

Na primeira estratégia, 15 mL do caldo fermentativo foi mantido em contato com 1 g de carvão ativado, em seguida o carvão foi filtrado e o pH do caldo foi ajustado para 3,6 a fim de precipitar 6-APA no ponto isoelétrico e também mantido em contato com o suporte agarose-arginina para adsorção do 6-APA remanescente.

Na segunda estratégia, etanol foi adicionado ao caldo fermentativo e sua concentração variou de 0-80 % com o objetivo de forçar a precipitação de interferentes, como por exemplo, proteínas. O caldo foi filtrado para remoção de possíveis precipitados e o pH da solução foi ajustado para 3,6 e seguiu-se o procedimento de adsorção em 1 g de agarose-arginina.

#### **4.2.27 Dessorção de 6-APA adsorvido em agarose-arginina**

A dessorção de 6-APA foi investigada utilizando soluções de ácido clorídrico (pH 5,5; 4,5 e 3,5) e cloreto de sódio (1M). Adicionou-se 0,3g do adsorvente a 0,7 mL da solução dessorvente. Em seguida, o adsorvente foi filtrado e 6-APA em solução foi quantificado pelo método PDAB.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 OBTENÇÃO DO BIOCATALISADOR: PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE

A viabilidade técnica e econômica da hidrólise de PG durante a sua produção por *P. chrysogenum* em meio complexo depende, entre outros fatores, das características do biocatalisador. Um biocatalisador utilizado neste processo deve ter elevada atividade hidrolítica, elevada estabilidade operacional e possibilidade de reutilização. Enzimas possuem elevada atividade catalítica, mas são solúveis em meio aquoso e são frágeis operacionalmente. Assim, atender a essas três características requer várias modificações da enzima produzida in natura pelo microrganismo.

Elevada atividade enzimática por volume de catalisador implica necessidade de imobilização em suportes insolúveis com grande área superficial disponível para imobilização da enzima. Implica também algum grau de purificação da enzima para evitar que os grupos ativados do suporte reajam majoritariamente com outras proteínas presentes no caldo de cultivo da produção de enzima. Atingir elevada estabilidade operacional do derivado (suporte-enzima) requer estabilização da enzima, tanto do ponto de vista catalítico, para possibilitar uso em vários ciclos de reação, quanto mecânico, pois a necessidade de fornecimento de oxigênio ao microrganismo requer elevadas velocidades de agitação, que podem danificar o suporte. Além disso, a reutilização requer também uma fácil separação entre biocatalisador e o meio reacional, que contém o microrganismo também insolúvel. Assim, dentro do item 4.1 serão enfocadas as etapas de purificação de penicilina G acilase produzida *Bacillus megaterium* e a imobilização da enzima, que visou atender aos requisitos necessários para uso no processo em estudo.

#### 5.1.1 Purificação da PGA de *B. megaterium*

A enzima de estudo, penicilina G acilase (PGA), não é comercializada na forma livre, razão pela qual o grupo de Biologia molecular do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos vem estudando a produção extra-celular da enzima por *Bacillus megaterium*.

Uma vez que tentativas preliminares de imobilização da enzima diretamente do meio de cultivo mostraram baixo rendimento devido à presença de outras proteínas, o estudo da imobilização da enzima foi realizado utilizando PGA de *E. coli*, gentilmente doada pelo

Instituto de Catálise e Petroleoquímica da Espanha. Entretanto, fazia-se necessário a continuidade do estudo de purificação da enzima para garantir a disponibilidade futura da enzima para estudos de imobilização. Além disso, seria realizada a aplicação dos derivados de penicilina G acilase no processo em estudo e nos outros que vêm sendo desenvolvidos no grupo como, por exemplo, síntese/hidrólise de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos.

Assim, em paralelo ao desenvolvimento do biocatalisador, foi realizado um estudo de purificação de PGA produzida por *Bacillus megaterium*, visando obtenção de extrato com maior atividade específica (U/mg de proteína). Foram desenvolvidos estudos de purificação da enzima utilizando as técnicas de filtração/diafiltração em membranas e adsorção iônica e de afinidade. O estudo com a técnica de adsorção iônica foi iniciado por Laura M. Pinotti, doutora formada no grupo, e finalizado dentro deste projeto de doutorado. Uma vez que os resultados já foram publicados em revista (PINOTTI et al., 2009), apresentaremos apenas os resultados obtidos com a técnica de filtração em membranas/adsorção de afinidade.

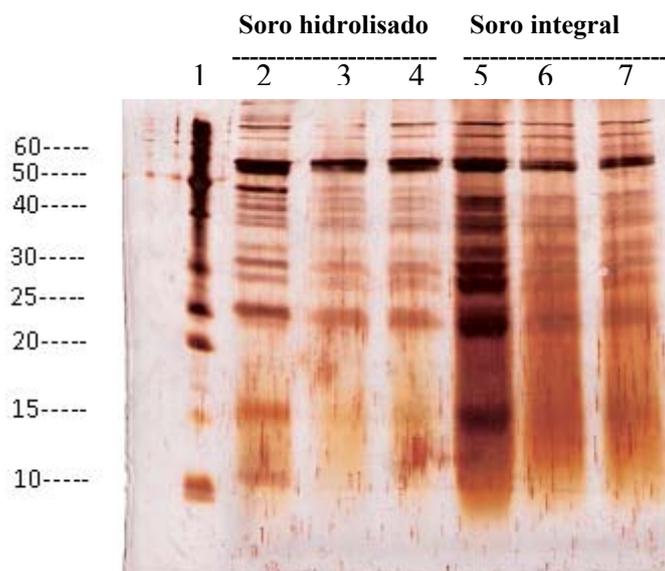
#### **5.1.1.1 Purificação de PGA produzida por *B. megaterium* através de filtração em membranas**

A produção de PGA por *B. megaterium*, que vem sendo estudada no grupo há vários anos, mostrou que a expressão da enzima é altamente dependente da presença de soro de queijo no meio de cultivo (SOUZA, 2007a). Soro de queijo contém cerca de 50 g/L de lactose e 7 g/L de proteínas, cerca de 50% sendo  $\beta$ -lactoglobulina e o restante  $\alpha$ -lactoalbumina, soroalbumina e imunoglobulinas, além de fosfato, Ca, K, vitaminas e outros elementos em baixa concentração (MORR et al., 1993). Uma das características interessantes de *B. megaterium* para a produção extracelular de PGA é a não produção de proteases, o que evita a degradação da enzima desejada. Contudo, a presença de 20 g/L de soro nutriente no meio, que tem se mostrado essencial para a expressão da enzima, introduz proteínas que não são consumidas durante o cultivo e que dificultam a purificação de PGA produzida. Portanto, ao final do cultivo de *B. megaterium* era realizado, primeiramente, a separação do microrganismo utilizando microfiltração em membrana de 0,5  $\mu$ m e em seguida o caldo fermentativo microfiltrado era concentrado através de ultrafiltração em membrana de 50 KDa. Este procedimento foi realizado por Souza, 2007a, para obter uma solução de PGA com maior atividade volumétrica e com maior grau de pureza.

O caldo fermentativo ultrafiltrado obtido por Souza, 2007a, foi utilizado neste trabalho para o estudo de purificação de PGA. Foram utilizados, inicialmente, dois caldos fermentativos, um preparado a partir de soro de queijo hidrolisado e outro a partir de soro de queijo integral. O pré-tratamento do meio de produção da enzima, através da hidrólise das proteínas do soro, foi realizado com o objetivo de aumentar a eficiência na etapa de concentração e purificação da PGA, já que, teoricamente, os oligopeptídeos resultantes da hidrólise são mais facilmente removidos que as proteínas intactas do soro.

Dados da literatura revelam que as principais proteínas presentes no soro de queijo são:  $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa; ponto isoelétrico (p.I.) 4,8),  $\beta$ -Lactalbumina (36,7 kDa; p.I. 5,35-5,49), imunoglobulinas (150 kDa; p.I. 6,2 – 7,0), soro albuminas (66 kDa; p.I. 4,9), Lactoferrina (76 kDa; 8,7-9,3), Lactoperoxidase (78 kDa, 9,6), Lisozima (18, 9.5) (JAMES, 1994). PGA é uma proteína dimérica, com massa molecular total próxima de 90 kDa e p.I. entre 6,7 e 6,9 (KEÇILI et al., 2006). Na eletroforese SDS-PAGE as duas sub-unidades se separam gerando a sub-unidade  $\alpha$ , com massa molecular média de 26,95 kDa e sub-unidade  $\beta$  com 59,07 kDa (SOUZA et al., 2005).

As amostras dos caldos fermentativos de *B. megaterium* foram caracterizadas qualitativamente através de eletroforese, e quantitativamente pela determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas. A Figura 5.1 apresenta os resultados da eletroforese de amostras de caldos fermentativos obtidos de meios de produção preparados com soro integral e soro hidrolisado, antes e após etapas de concentração e diálise em membranas com tamanho de corte de 50 KDa. As Tabelas 5.1 e 5.2 mostram resultados de atividade enzimática e concentração de proteína no caldo, antes e após as etapas de concentração/diálise, para soro integral e hidrolisado, respectivamente.



**Figura 5.1:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, com revelação em prata. Coluna 1: marcadores de peso molecular; 2: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro hidrolisado; 3: caldo fermentativo ultrafiltrado e dialisado uma vez, com soro hidrolisado; 4: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro hidrolisado; 5: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro integral; 6: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado uma vez, com soro integral; 7: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro integral.

As colunas 2 e 5 da Fig.5.1. referem-se a caldos fermentativos, contendo PGA, preparados a partir de soro de queijo hidrolisado e integral, respectivamente. Ambas as amostras foram previamente concentradas (14 vezes) em membranas com tamanho de corte de 30 kDa. Observou-se que as bandas referentes a proteínas maiores são mais intensas em amostras de soro integral (coluna 5). Isso significa que a hidrólise do soro reduz a concentração de proteínas indesejadas. Após etapas de diálise, se observa redução em todas as bandas (colunas 3, 4, 6 e 7), esse resultado pode ser devido a afinidade adsorção de proteínas à membrana, a qual é composta de material celulósico e exibe forte afinidade por proteínas. Também observou-se adsorção de PGA à membrana, visto que houve redução da atividade enzimática na solução dialisada, e considerando o tamanho da molécula (~ 90 kDa) conclui-se que a mesma não poderia atravessar os poros da membrana de diálise (~ 12 kDa).

Os resultados das Tabelas 5.1 e 5.2 mostram que o uso de soro hidrolisado aumenta em muito a eficiência do processo de purificação, principalmente na etapa de diafiltração.

No caso do soro hidrolisado o aumento real na atividade específica deve ser na verdade muito maior, pois o método de Bradford não detecta oligopeptídeos abaixo de 5KD e o soro de queijo hidrolisado possui uma quantidade significativa de oligopeptídeos nessa faixa de peso molecular.

Souza, (2007b), ao analisar a concentração de proteína pelos métodos de Lowry (que detecta inclusive aminoácidos) e Bradford num caldo de cultivo contendo soro hidrolisado (similar ao utilizado neste trabalho) encontrou os valores de 2,4 g/L e 0,07 g/L, respectivamente. Após ultrafiltração em membrana de 50 kDa, os valores encontrados no concentrado foram 4,7 e 0,47 g/L. Souza, (2007b), realizou experimentos em maior escala (cerca de 4 L), usando uma unidade de ultrafiltração plana (Mini-Pelicon – da Millipore). Com este procedimento, obteve um aumento na atividade específica de 2,5 vezes.

Contudo, os resultados das Tabelas 5.1 e 5.2 mostram que também ocorre perda significativa de atividade enzimática na filtração em membranas (a atividade no soro integral passou de 210 U/mL para 42 U/mL e no soro hidrolisado passou de 490 U/mL para 210 U/mL), parte por adsorção na membrana, parte por permeação e parte por inativação no processo, tanto para soro integral quanto para o hidrolisado.

**Tabela 5.1: Atividade de penicilina G acilase e concentração de proteína antes e após procedimentos de ultrafiltração e ultradiafiltração a pH 8,0 em caldo fermentativo de *B.megaterium* (pH 8,8). Volume de caldo (Vi)= 7 mL (343 U; 1,0 mg). Volume final após ultrafiltração =0,5 mL. Erro experimental é inferior a 10% para atividade enzimática e concentração de proteína. Ensaio em triplicata.**

Etapa de purificação (Soro Integral)		Atividade Enzimática U <sub>NIPAB</sub> /mL		Concentração de proteína (mg/mL)		Atividade Específica no concentrado U <sub>NIPAB</sub> /mg prot.
		C	P	Concentrado	Permeado	
Ultrafiltração	Inicial 7 mL	49	-	0,140	-	343
	Final 0,5 mL	210 (FC=4,3)	7	2,2(FC=15,7)	0,035	95
Ultradiafiltração 1	Inicial 7mL	15	-	0,160	-	95
	Final 0,5 mL	168	10	1,160	0,029	144
Ultradiafiltração 2	Inicial 7mL	12	-	0,083	-	144
	Final 0,5mL	42	9	0,350	0,026	120

**Tabela 5.2: Atividade de penicilina G acilase e concentração de proteína antes e após procedimentos de ultrafiltração e de diálise a pH 8,0 em caldo fermentativo de *B.megaterium* (pH 8,8). Volume de caldo (Vi)= 7 mL (357 U; 0,641 mg). Volume final após ultrafiltração = 0,5 mL**

Etapa de purificação (Soro hidrolisado)		Atividade Enzimática U <sub>NIPAB</sub> /mL		Concentração de proteína (mg/mL)		Atividade Específica no concentrado U <sub>NIPAB</sub> /mg prot.
		Concentrado	Permeado	Concentrado	Permeado	
Ultrafiltração	Inicial 7 mL	51	-	0,09	-	560
	Final 0,5 mL	490	9	0,83	0,037	593
Diálise 1	Inicial 7mL	35	-	0,06	-	593
	Final 0,5 mL	350	0	0,69	0,028	510
Diálise 2	Inicial 7mL	25	-	0,05	-	510
	Final 0,5mL	210	0	0,29	0,028	714

Para o soro integral, as proteínas indesejadas apresentam tamanho maior e não são removidas com eficiência na primeira etapa de purificação (ultrafiltração), exigindo as etapas seguintes de diálise que causam maiores perdas nos valores de atividade enzimática. Aqui se observa redução dos valores de atividade específica no caldo fermentativo de 343 para 120 U<sub>NIPAB</sub>/mg proteína.

A purificação em membrana de celulose conduz a bons resultados quando se utiliza soro hidrolisado, pois na etapa de ultrafiltração grande parte das proteínas menores (que surgem com a hidrólise) é removida e observa-se pouca perda da atividade enzimática. Esses resultados estão coerentes com os relatados por Balasingham *et al.*, (1972), citado por Souza, (2007b), que mostram uma perda de 24% na atividade recuperada após a diálise. Essa perda deve ser devido à retirada de pequenas moléculas presentes no meio de cultivo que interagem com a enzima e auxiliam-na a proteger a sua estrutura terciária, bem como adsorção de PGA na membrana. Esse último fator deve ser reduzido ao se operar em grande escala e não é preocupante.

Apesar do alto grau de purificação atingido nas etapas de ultrafiltração e diálise quando soro hidrolisado foi utilizado, é importante a busca por uma metodologia com menor número de etapas e maior eficiência de purificação para redução de custos e aumento da viabilidade econômica do processo em estudo neste trabalho.

### **5.1.1.2 Purificação de PGA de *B. megaterium* por Adsorção Iônica e de afinidade**

Estudos anteriores foram realizados por Pinotti, (2003) para a adsorção iônica de penicilina G acilase, comparando-se enzima produzida por *B. megaterium* (extra-celular) e por *E. coli* (intra-celular) em leito fixo e expandido. O meio de cultivo de *B. megaterium* continha soro integral. A técnica mostrou melhores resultados para a enzima de *E.coli*, possivelmente devido à alta interferência das proteínas de soro presente no caldo fermentativo de *B. megaterium*, que continha soro integral. A técnica foi utilizada diretamente no caldo fermentativo, após separação do microrganismo. Possivelmente, uso de soro hidrolisado e/ou de etapas anteriores de ultrafiltração/diafiltração em membranas antes da adsorção iônica poderia melhorar o nível de purificação da enzima. Contudo, decidiu-se reduzir o número de etapas no processo de purificação e assim buscou-se um suporte de afinidade que permitisse a adsorção seletiva de PGA.

Um bom suporte de afinidade requer a ligação ao suporte de uma molécula que interaja forte e seletivamente com a enzima a ser adsorvida. Vieira, (2003), estudou a inibição de penicilina G acilase por aminoácidos aromáticos, pois a grande afinidade de PGA pelo grupo fenil era fato já conhecido à época e pretendia-se utilizar a enzima PGA imobilizada em suporte insolúvel para atrair aminoácidos contendo esse grupo, especialmente fenilalanina. Nesse estudo foi verificado haver forte inibição da enzima por fenilglicina, fenilalanina e triptofano. Esses aminoácidos foram, pois, ligados covalentemente a agarose ativada com grupos glioxil e testados para seleção de qual deles tinha maior capacidade de adsorção de PGA.

#### ***5.1.1.2.1 Seleção do agente de afinidade***

Os três suporte de afinidades obtidos foram avaliados quanto a capacidade de adsorção seletiva de PGA presente em caldo fermentativo gerado a partir do cultivo de *B. megaterium* utilizando como nutriente o soro de queijo integral ou soro de queijo hidrolisado, para se verificar a influência dessa variável na adsorção.

A adsorção foi realizada a pH 9 e temperatura de 25 °C, em estufa de hidridização da Marconi, modelo MA 430/RI. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 5.3 e 5.4, para soro integral e hidrolisado, respectivamente.

**Tabela 5.3: Proteína e atividade enzimática medida no sobrenadante durante adsorção de PGA presente em caldo fermentativo onde foi utilizado na composição do meio de cultivo soro em pó integral (19,6 g/L). Atividade inicial no caldo:  $35,7 \pm 0,6$  U NIPAB/mL. Proteína inicial:  $0,41 \pm 0,03$  mg/mL. Atividade específica inicial:  $87,1$  U NIPAB/mg de proteína, pH 9.**

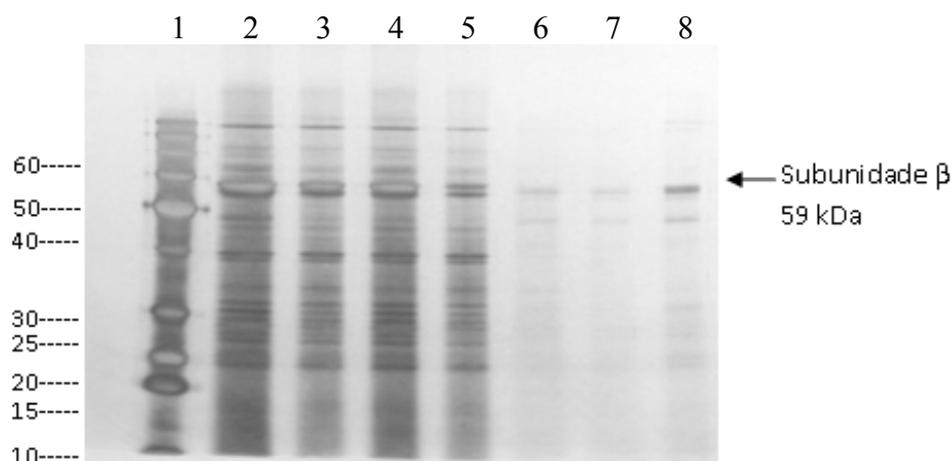
Ligante	Atividade enzimática U NIPAB/mL	Concentração proteína (mg/mL)	Atividade específica U NIPAB/mg proteína
Triptofano	12,1	$0,36 \pm 0,04$	33,6
Fenilglicina	28,0	$0,42 \pm 0,03$	66,7
Fenilalanina	26,1	$0,43 \pm 0,03$	60,7

**Tabela 5.4: Proteína e atividade enzimática medida no sobrenadante durante adsorção de PGA presente em caldo fermentativo onde foi utilizado na composição do meio de cultivo soro em pó (19,6 g/L) hidrolisado com protease antes do cultivo. Atividade inicial no caldo :  $15,1 \pm 1,4$  U NIPAB/mL. Proteína inicial:  $0,22 \pm 0,06$  mg/mL. Atividade específica inicial:  $68,8$  U NIPAB/mg de proteína, pH 9.**

Agente de ativação	Atividade enzimática U NIPAB/mL	Concentração proteína (mg/mL)	Atividade específica U NIPAB/mg proteína
Triptofano	6,6	$0,17 \pm 0,05$	38,8
Fenilglicina	12,7	$0,19 \pm 0,04$	66,8
Fenilalanina	12,8	$0,19 \pm 0,02$	67,4

Como as condições de adsorção foram idênticas para os três suportes utilizados a inativação de PGA nas condições de adsorção não foram consideradas nesta etapa do trabalho.

Os resultados da purificação nos suportes de afinidade descritos acima mostram que a modificação química da agarose usando triptofano apresenta maior eficiência na adsorção de PGA. Houve também queda na capacidade de adsorção do suporte quando a enzima foi produzida com soro hidrolisado, indicando haver interação do suporte com outros grupos cuja concentração deve ser maior no soro hidrolisado. A Figura 5.2 mostra uma análise qualitativa do desempenho de cada suporte na purificação de PGA.



**Figura 5.2:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, com revelação em coomassie blue. Coluna 1: marcadores de peso molecular; 2: caldo fermentativo inicial ultrafiltrado, com soro integral (pH 8,8); 3: sobrenadante da adsorção em agarose-fenilalanina; 4: sobrenadante da adsorção em agarose-fenilglicina; 5: sobrenadante da adsorção em agarose-triptofano; 6: sobrenadante da dessorção em agarose-fenilalanina; 7: sobrenadante da dessorção em agarose-fenilglicina; 8: sobrenadante da dessorção em agarose-triptofano.

O gel agarose-aminoácido contendo PGA adsorvida foi submetido a um tratamento com tampão de ruptura e analisado através de eletroforese (coluna 6-8). Em todos os sobrenadantes observou-se a presença da subunidade  $\beta$  da PGA, porém, maior intensidade da banda foi observada no sobrenadante do gel agarose-triptofano (coluna 8). Este resultado é confirmado pela maior redução na atividade enzimática no sobrenadante durante o experimento de adsorção em agarose triptofano, comparada aos géis agarose-fenilglicina e agarose-fenilalanina (Tabelas 5.3 e 5.4).

Após a seleção de agarose-triptofano como melhor suporte de afinidade, o mesmo foi submetido à caracterização por infravermelho para confirmar a ligação de grupos de afinidade na superfície da agarose.

#### ***5.1.1.2.2 Caracterização do suporte agarose-triptofano por infravermelho***

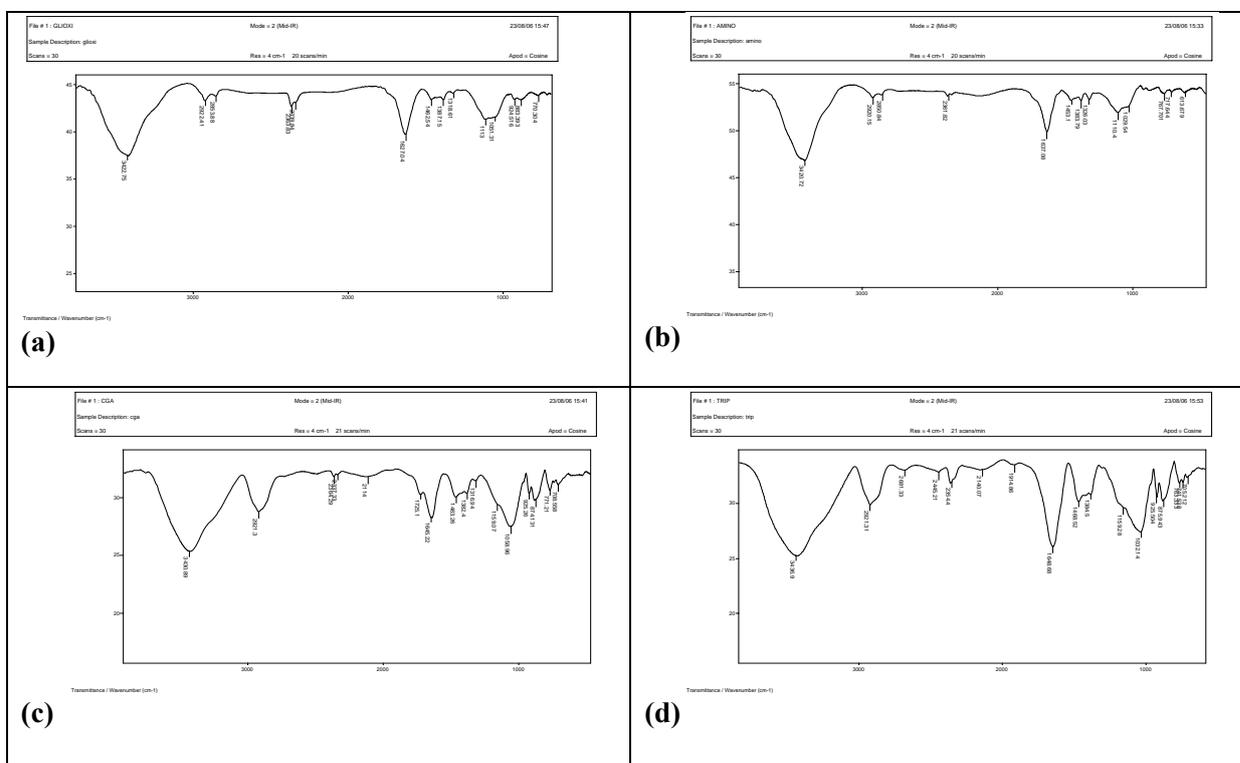
A caracterização por infravermelho foi realizada monitorando-se cada etapa da modificação química do gel agarose com o objetivo de confirmar a formação dos grupos ativos (RODRIGUES et al., 2007). A Figura 5.3 apresenta os gráficos obtidos para a análise do suporte em cada etapa da ativação.

Na primeira etapa de ativação (Figura 5.3a) a presença de bandas em  $3422\text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de deformação axial de grupos  $\text{-OH}$  presentes na agarose, e as bandas em

1627  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à deformação axial C=O, indicando que houve a formação de grupos aldeídos na superfície do suporte.

Na segunda etapa de ativação (Figura 4.3b) a presença dos grupos aminos foi confirmada pelo surgimento de bandas em 3420  $\text{cm}^{-1}$  (deformação axial –NH) e em 1637  $\text{cm}^{-1}$  (deformação angular –N-H). Além disso, também foi observada uma banda em 2920  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação axial –CH (cadeia hidrocarbônica).

Na penúltima etapa de ativação (Figura 4.3c) observam-se novamente bandas referentes a aldeídos (1645  $\text{cm}^{-1}$  = deformação axial C=O), e por último (Figura 4.3d) observa-se o surgimento de bandas que confirmam a ligação do aminoácido aos aldeídos na superfície da agarose (1648  $\text{cm}^{-1}$  = deformação axial C=O de ácido carboxílico).



**Figura 5.3:**Espectro de absorção em infravermelho de agarose modificada quimicamente: (a) Agarose-O-CH<sub>2</sub>-CHO (agarose-glioxil); (b) Agarose-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (agarose-amino); (c) Agarose-O-CH<sub>2</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)-N=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COH (agarose-amino glutaraldeído); (d) (d) agarose amino-glutaraldeído-triptofano.

A Figura 5.4 apresenta a estrutura química final do suporte de afinidade selecionado para realizar o processo de purificação de PGA em caldo de cultivo.

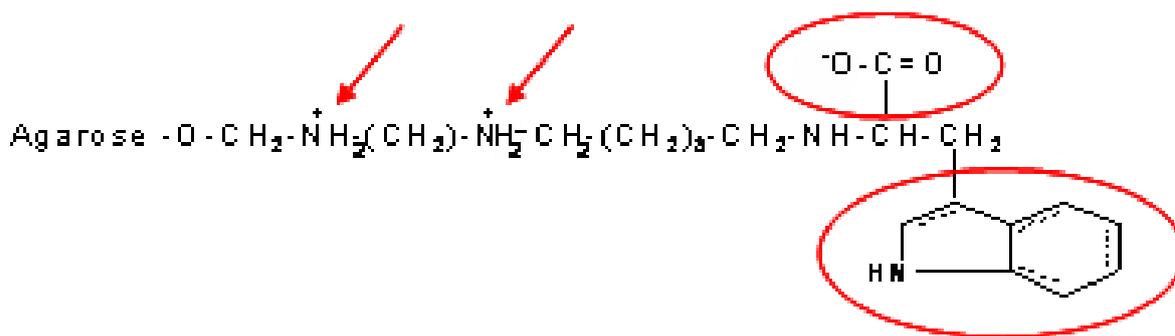


Figura 5.4: Estrutura química do suporte de afinidade agarose-triptofano.

Além da análise por infravermelho, observou-se mudança na coloração do suporte após reação com triptofano, esta mudança na coloração era esperada visto que triptofano reage com aldeídos em condições suaves de pH e temperatura, gerando compostos coloridos (HERRAIZ et al., 2003). A ligação de triptofano poderia ser feita após a formação dos grupos glioxil, entretanto a geração de braços espaçadores é necessária para ligantes de baixa massa molecular para aumentar sua acessibilidade e permitir a interação com as moléculas adsorventes (FITTON et al., 2001; SANTARELLI et al., 2000).

Os espectros de absorção no infravermelho confirmam a ligação dos agentes de afinidade a superfície da agarose, entretanto, outros fatores devem ser considerados para que o suporte de afinidade apresente elevadas seletividade e capacidade de adsorção de PGA.

### 5.1.1.2.3 Características Físico-Químicas do Suporte Agarose-Triptofano

A concentração do triptofano na superfície do suporte deve ser rigorosamente controlada, pois a elevada hidrofobicidade desta molécula associada a elevadas concentrações desta na superfície da agarose podem interferir na adsorção de PGA, por gerar impedimento estérico ou atrair outras moléculas com forte afinidade por superfícies hidrofóbicas. A Figura 4.5 apresenta um esquema de dois suportes com diferentes graus de ativação. Em baixa concentração do agente de afinidade (Figura 5.5b) ocorre maior espaçamento entre os anéis hidrofóbicos do triptofano e o micro ambiente hidrofílico na agarose é preservado.

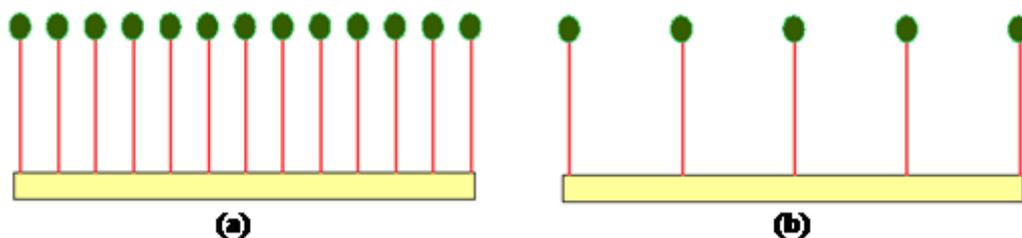


Figura 5.5: Esquema de suporte de afinidade. (a) com elevada concentração de grupos de afinidade; (b) com baixa concentração de grupos de afinidade.

O preparo do suporte de afinidade envolve várias etapas de ativação e o controle da concentração de grupos de afinidade pode ser realizado na etapa de oxidação de grupos gliceril a glioxil, ou seja, etapa de oxidação com periodato de sódio da agarose previamente ativada com glicidol. Neste trabalho, as condições reacionais foram realizadas de modo a se obter ativação máxima, pois em cada uma das cinco etapas de ativação ocorrem perdas de reagentes (ligado ao suporte ou em solução) reduzindo assim a concentração de grupos de afinidade no suporte. Por exemplo, a ligação de triptofano a agarose-glutaraldeído ocorre a pH 10 e nesta condição de pH, moléculas de glutaraldeído ligadas ao suporte podem sofrer degradação.

Para o caldo fermentativo utilizado neste trabalho os resultados da purificação obtidos nesta condição de ativação são satisfatórios. Contudo, acredita-se que a etapa de ativação do suporte de afinidade ainda pode ser otimizada, levando a fatores de purificação maiores e que deverá, portanto, ser tema de trabalhos futuros.

Outra característica importante para o suporte de afinidade é que seu braço espaçador não possa interagir com moléculas do meio. Portanto, o mesmo não pode apresentar cargas ou caráter hidrofóbico. Um braço espaçador ideal para os objetivos deste trabalho deve ser hidrofílico e suficientemente longo para permitir fácil interação entre o sítio de ligação da enzima e o agente de afinidade na superfície do suporte.

O suporte de afinidade utilizado neste trabalho apresenta três grupos os quais estão ionizados nas condições de pH utilizadas para adsorção (Figura 5.6). As aminas secundárias presentes no braço espaçador apresentam valor de pK aproximadamente igual a 10,0 (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1993) e o grupo carboxila tem pK aproximadamente igual a 2,4. Isto significa que na faixa de pH utilizada para adsorção (5-9) todos esses grupos estão na forma ionizada. Entretanto, como o caldo de cultivo contendo PGA é um meio complexo com elevada concentração de sais, a interação iônica entre as proteínas e o suporte são minimizadas, favorecendo a interação de afinidade entre a PGA e o suporte.

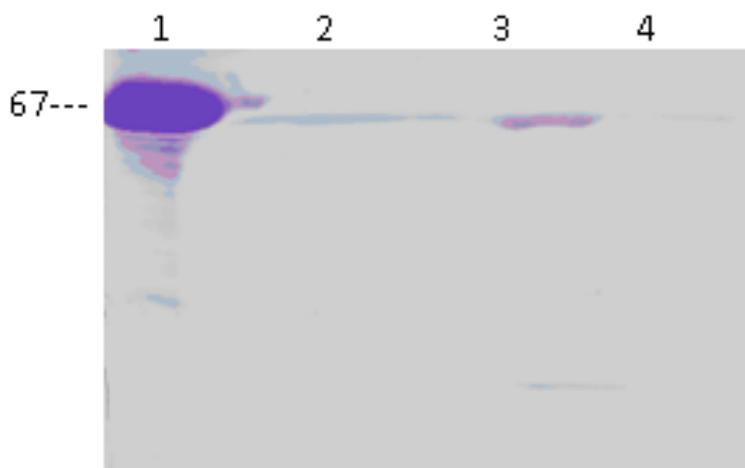
Várias estratégias de purificação de PGA foram investigadas utilizando o suporte agarose-triptofano. Os itens seguintes apresentam os resultados obtidos para o efeito de pH, temperatura, tipo de caldo fermentativo e presença de inibidores durante a adsorção.

#### ***5.1.1.2.4 Adsorção em Agarose-Triptofano***

##### **5.1.1.2.4.1 Seletividade na Adsorção de PGA**

Os resultados apresentados nas tabelas 5.3 e 5.4 mostram que há maior redução da atividade específica no caldo fermentativo quando a adsorção foi feita em agarose-triptofano, entretanto, ainda se observa atividade enzimática no caldo fermentativo ao final do processo. Isso significa que nem toda PGA foi adsorvida. Considerando que a concentração de PGA é muito baixa em relação à concentração das demais proteínas presentes, ou seja, que a quantidade de PGA presente no caldo fermentativo não seria suficiente para saturar o suporte de afinidade nas condições de adsorção (aproximadamente 4 mg de proteínas totais por g de suporte) podemos afirmar que o suporte de afinidade também adsorve outras proteínas. Entretanto, a adsorção dessas outras proteínas é devida, provavelmente às interações hidrofóbicas, enquanto PGA deve interagir com o ligante também ou unicamente através de seu sítio ativo. Segundo Santarelli, (2000), a interação da PGA com moléculas hidrofóbicas pode ser classificada como pseudo-afinidade, pois a PGA interage com estes ligantes através de sua região hidrofóbica próxima ao sítio ativo (SANTARELLI et al., 2000).

Visando obtenção de dessorção seletiva de PGA foram utilizadas três soluções de eluição: solução de penicilina 40 g/L, solução etanol-água 30% v/v e solução de triptofano 40 g/L. O sobrenadante foi submetido a uma análise de eletroforese e os resultados são apresentados na Figura 5.6.



**Figura 5.6:** Eletroforese dos ensaios de dessorção em gel poliacrilamida 15% . Linha 1: B.S.A.; 2: Dessorção com solução de penicilina; 3: Dessorção com solução de triptofano; 4: Dessorção utilizando solução etanol-água.

Observou-se que somente a solução de triptofano foi eficiente para a dessorção de PGA (linha 3). A não dessorção com solução de penicilina G, substrato natural da enzima e que possui, portanto, afinidade maior que triptofano pela enzima, indica que a ligação de PGA ao suporte deve estar ocorrendo por dois mecanismos, o de afinidade e o de interações hidrofóbicas. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores que verificaram que soluções de efetores como penicilina G, penicilina V, ácido fenilacético e ácido 6-aminopenicilânico não foram eficientes para dessorção de PGA em suporte de afinidade e também atribuíram este fato à ocorrência de adsorção de PGA por interações hidrofóbicas (FITTON et al., 2001).

Não foi possível determinar o valor da atividade recuperada ao final do processo de purificação, visto que a enzima estava associada ao inibidor em solução. A retirada do inibidor constitui-se assim em nova etapa a ser estudada neste processo. Uma vez que a PGA será utilizada industrialmente na forma de enzima imobilizada, sendo que essa imobilização sempre ocorre na presença de inibidor para proteger o sítio ativo da enzima, a solução contendo PGA/triptofano poderá ser utilizada diretamente na imobilização. Após imobilização da enzima, lavagem com força iônica adequada poderá deslocar esse inibidor, tal qual ocorre com a tradicional imobilização usando ácido fenilacético como inibidor/protetor (GUISÁN, 1988).

As considerações acima conduziram a uma nova estratégia de purificação a ser investigada. Visto que parte das proteínas e pequenos peptídeos indesejados adsorvem no

suporte de afinidade, seria interessante usar uma condição de adsorção em que essas impurezas adsorvessem e PGA permanecesse em solução, o que seria possível ocupando-se o sítio ativo da enzima com outro inibidor para que ela não pudesse se ligar ao triptofano na superfície do suporte. A molécula selecionada deveria interagir com PGA e depois ser facilmente removida para que a máxima atividade fosse recuperada ao final do processo de purificação, o que sabidamente ocorre com ácido fenil acético durante o processo de imobilização de PGA.

#### 5.1.1.2.4.2 Adsorção de PGA na Presença de Ácido Fenilacético

Para avaliar o efeito da presença de ácido fenilacético (AFA) na eficiência do processo de purificação de PGA, foi realizado um ensaio de adsorção nas condições previamente estabelecidas, adicionando AFA ao caldo fermentativo na concentração de 100 mM. Nesse ensaio a atividade enzimática foi determinada pela hidrólise de penicilina G utilizando o método desenvolvido por Balasingham et al., (1972). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5: Dados da atividade enzimática e concentração de proteína no sobrenadante de caldo fermentativo após adsorção em agarose-triptofano na presença de AFA a pH 9,0.**

Amostra	Atividade enzimática $U_{PDAB}/mL$	Concentração proteína (mg/mL)	Atividade específica $U_{PDAB}/mg$ proteína
Caldo fermentativo	0,268	0,300	0,893
Caldo fermentativo após adsorção	0,161	0,117	1,376

Estes resultados mostram que essa estratégia de adsorção reversa (PGA é mantida no sobrenadante enquanto as proteínas indesejadas são adsorvidas) teve sucesso, pois observamos aumento da atividade específica no caldo após adsorção em agarose-triptofano. Esse resultado nos animou a investigar outras variáveis que pudessem favorecer a adsorção de impurezas, mantendo PGA no sobrenadante com maior grau de pureza e valor de atividade recuperada. Foi investigado inicialmente o efeito do pH na adsorção das proteínas e a capacidade de adsorção do suporte.

#### 5.1.1.2.4.3 Efeito do pH na Adsorção de Proteínas

Todos os experimentos anteriores foram realizados no pH do caldo fermentativo onde PGA foi produzida por *B. megaterium* ( $\cong 9,0$ ). Para verificar o efeito do pH na adsorção de proteínas, testes de adsorção foram realizados a pH 5,0 na presença e na ausência de AFA. A Tabela 5.6 mostra a variação no fator de purificação em função do pH e presença de AFA.

Tabela 5.6: Resultados da adsorção de proteínas em agarose-triptofano a 15 °C, por 60 min.

	pH 5	pH 5 (AFA)	pH 9
<b>q*</b> (mg proteína/g adsorvente)	8,84	18,0	6,04
<b>Atividade específica no sobrenadante</b> (U/mg de proteína)	7,17	5,81	2,87
<b>Rendimento de adsorção</b> (% de proteína adsorvida)	46,1	76,0	22,6
<b>Fator de purificação<sup>a</sup></b>	1,69	4,14	1,21

<sup>a</sup> O fator de purificação foi calculado dividindo-se a atividade específica (U/mg de proteína) medida antes da purificação pela atividade específica medida após a purificação.

Uma análise mais detalhada do efeito do pH sobre a adsorção de proteínas é apresentada no gráfico da Figura 5.7.

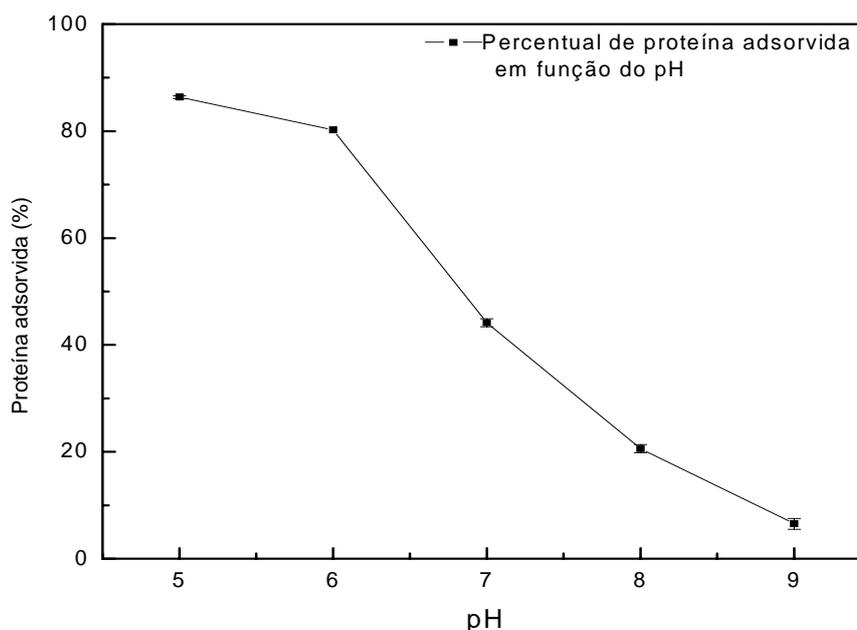


Figura 5.7: Efeito do pH na adsorção de proteína presentes em caldo fermentativo. Adsorção por 4h a 4°C em agitação orbital em gel agarose-triptofano na presença de AFA.

A redução nos valores de pH do caldo fermentativo conduz a aumento significativo da quantidade de proteína adsorvida em agarose-triptofano até pH 5. Valores de pH menores que 5 não foram investigados devido à rápida inativação de PGA nestas condições.

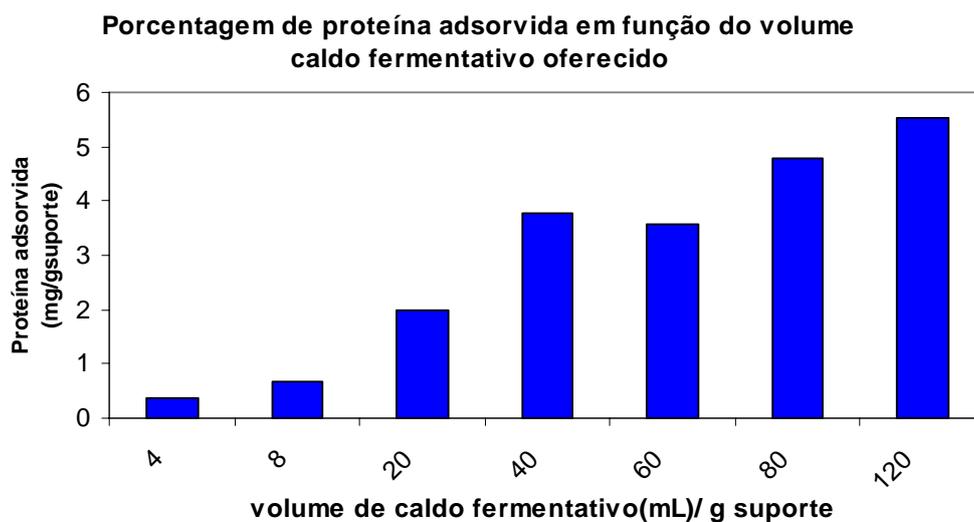
A pH 5, por exemplo, as proteínas apresentam grupos superficiais carregados positiva e negativamente, o mesmo ocorre com o suporte. Isto faz com que interações eletrostáticas rapidamente sejam estabelecidas entre as proteínas e o suporte.

As proteínas presentes no caldo fermentativo apresentam ampla faixa de ponto isoelétrico (4,8 a 9,6) e diferentes tamanhos moleculares (14 a 50 kDa), sendo, portanto, difícil estabelecer uma condição ótima para purificação de PGA por adsorção das impurezas. Entretanto, uma adsorção eficiente das proteínas não necessariamente ocorre no ponto isoelétrico, pois arranjos espaciais favoráveis à adsorção podem ser obtidos em valores de pH diferentes do ponto isoelétrico (KEÇILI et al., 2006).

Neste trabalho foi estabelecido o pH 5 para purificação de PGA, visto que esta enzima apresenta boa estabilidade nesta condição e a eficiência de adsorção de proteínas é máxima. No estudo seguinte foi investigada a capacidade de adsorção do suporte.

#### **5.1.1.2.4.4 Capacidade de Adsorção do Suporte**

A capacidade de adsorção do suporte de afinidade e seu potencial de reutilização são informações importantes para sua aplicação em processos economicamente viáveis. Nesta etapa do trabalho, a capacidade de adsorção do suporte foi investigada e os resultados são apresentados na Figura 5.8.



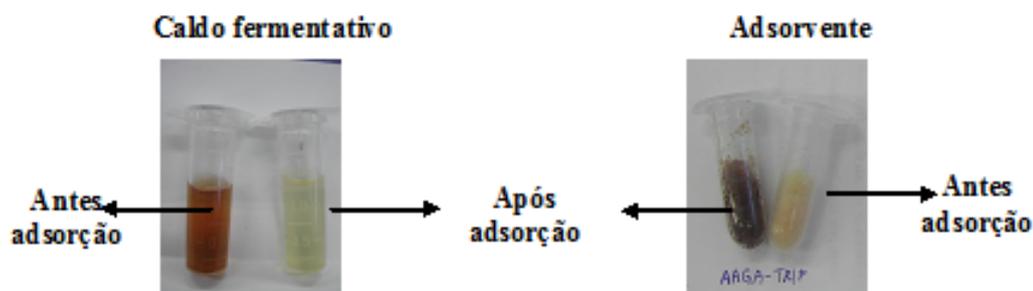
**Figura 5.8:** Efeito do volume de caldo oferecido por grama de suporte na quantidade de proteína adsorvida a pH 9,0.

Observa-se que aproximadamente 5,5 mg de proteína são adsorvidas por grama de suporte, sem que ocorra saturação do suporte. Entretanto, foi observado que o percentual de proteína adsorvida varia de 67% quando se oferece 4 mL caldo/g suporte para 32% quando se oferece 120 mL. Ao aumentar o volume de caldo fermentativo 30 vezes, a quantidade de proteína adsorvida só aumenta 14 vezes, o que implica redução da atividade específica de PGA no sobrenadante após adsorção das impurezas. Neste trabalho, a razão utilizada nos diversos experimentos é de 20 mL caldo/g suporte.

A aparentemente baixa capacidade de adsorção pode ser explicada considerando a composição do caldo fermentativo (inúmeros íons orgânicos e inorgânicos e compostos hidrofóbicos) e a metodologia de quantificação de proteínas, método de Bradford, a qual só detecta proteínas com tamanho molecular maior que 5 kDa.

A pH 5 várias espécies encontram-se na forma ionizada. As espécies iônicas de menor peso molecular se difundem mais rápido e, portanto adsorvem preferencialmente. Entre as espécies iônicas de baixo peso molecular estão íons provenientes dos sais adicionados ao meio de cultivo, os aminoácidos livres e pequenos peptídeos. Estas moléculas não são detectadas pelo método de Bradford, entretanto a remoção destas impurezas pode ser confirmada pela variação da cor do caldo fermentativo durante a adsorção. Os aminoácidos, pequenos peptídeos e outros compostos que conferem cor ao caldo fermentativo (MORR, 1993) são removidos, e o caldo clarificado apresenta cor levemente amarela após adsorção,

enquanto o adsorvente torna-se consideravelmente escuro. A Figura 5.9 mostra fotos do caldo fermentativo (9a) antes e após a adsorção e do adsorvente (9b) antes e após a adsorção.



**Figura 5.9:** Caldo fermentativo e adsorvente antes e após adsorção de proteínas em agarose-triptofano. Adsorção em pH 5,6, 4 mL caldo fermentativo/ g adsorvente, 4 °C.

#### 5.1.1.2.4.5 Efeito da Temperatura na Adsorção de Proteínas (Na presença de AFA)

Para verificar o efeito da temperatura na quantidade de proteína adsorvida e atividade recuperada de PGA, foram realizados ensaios de adsorção em 5, 15 e 25 °C, os resultados são apresentados na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7:** Resultados da adsorção de proteínas em agarose-triptofano a 15 °C, por 60 min.

Temperatura (°C)	Atividade específica no sobrenadante (U/mg proteína)
5	11,0
15	50,8
25	26,2

Verificou-se que a quantidade de proteína que permanece no sobrenadante após a adsorção não varia significativamente com a temperatura (~ 0,08 mg/mL), entretanto, observa-se significativa redução da atividade específica no sobrenadante com a diminuição da temperatura de 25 para 5 °C. Aparentemente, a menor temperatura favorece a adsorção de PGA. Para verificar se uma temperatura intermediária permitiria maior recuperação da atividade enzimática no sobrenadante realizou-se o experimento a 15 °C, obtendo-se uma atividade específica de 50,8 U/mg. Considerando-se que a atividade específica inicial no caldo fermentativo foi de 11,2 U/mg, esses resultados mostram que um fator de purificação de 4,5 foi atingido. Esse resultado é melhor que o relatado na literatura, quando triptofano foi utilizado como grupo de afinidade, no qual foi obtido um fator de purificação de 3 vezes (FITTON et al., 2001).

### 5.1.1.3 Conclusões Parciais

Soro de queijo com proteínas hidrolisadas enzimaticamente (para redução do tamanho das proteínas) como nutriente na produção de PGA, facilita o processo de purificação da enzima, visto que as moléculas pequenas são facilmente removidas por filtração em membranas. Contudo, atingir graus elevados de pureza requer etapas de lavagem (diálise) nas quais ocorrem perdas de atividade enzimática significativas.

O desempenho de suportes de afinidade preparados com triptofano, fenilglicina ou fenilalanina revelou como melhor grupo de afinidade o triptofano, o qual apresentou alta eficiente de adsorção de PGA.

A purificação de PGA utilizando agarose-triptofano como adsorvente pode ser realizada utilizando duas estratégias diferentes: adsorção de proteínas totais seguida de dessorção seletiva de PGA ou adsorção reversa, na qual a PGA é mantida no sobrenadante com AFA ligado ao sítio ativo, enquanto proteínas, peptídeos e aminoácidos são adsorvidos.

A dessorção seletiva de PGA só é possível quando se utiliza solução de triptofano, o que mostra que a interação de PGA com o suporte ocorre principalmente por afinidade. Imobilização de PGA ligada ao triptofano pode ser realizada para permitir a posterior eluição desse inibidor, que também atuará como protetor do sítio ativo durante a imobilização.

A adsorção a pH 5 é eficiente para clarificar o caldo fermentativo, pois permite a remoção de grande quantidade de moléculas pequenas, como aminoácidos e pequenos peptídeos e algumas proteínas. As possíveis interações nesta condição de adsorção são hidrofóbicas e iônica. Entretanto, PGA também pode ser adsorvida por interações hidrofóbicas, pois sua composição de aminoácidos revela abundância de triptofano, fenilalanina e tirosina, os quais são doadores de elétrons e conferem à enzima alta capacidade de interagir com grupos hidrofóbicos (KEÇILI et al., 2006; FITTON et al., 2001).

A clarificação do caldo fermentativo na presença de ácido fenilacético permitiu a obtenção de PGA quatro vezes mais pura que a PGA presente em caldo fermentativo bruto de *B. megaterium*. Este fator de purificação obtido (4,0) é aparente, visto que as moléculas pequenas removidas pelo adsorvente não foram quantificadas pelo método de análise utilizado neste trabalho para monitorar a eficiência de adsorção (Método de Bradford). Portanto, o nível de purificação de PGA atingido neste trabalho, utilizando uma metodologia que envolve uma

etapa (adsorção reversa), é satisfatório para posterior aplicação desta enzima em processos de imobilização, para obtenção de catalisadores industriais.

A estratégia para imobilização da PGA de *B. megaterium* foi investigada paralelamente ao estudo de purificação utilizando como enzima modelo a PGA de *E. coli*. A utilização desta enzima para o estudo de imobilização é possível devido a elevada semelhança entre as duas enzimas. Portanto, o protocolo desenvolvido é útil para a imobilização de ambas as enzimas. As estratégias investigadas para obtenção de um biocatalisador altamente estável são descritas no item a seguir.

### 5.1.2 Imobilização/Estabilização da PGA de *E. coli*

A estabilização de uma enzima através de sua imobilização por ligação covalente em matriz sólida depende das propriedades químicas e físicas tanto da enzima quanto do suporte.

A enzima de estudo (penicilina G acilase – PGA) é constituída de duas subunidades, seu peso molecular é de aproximadamente 90 kDa e possui dimensões de 70 Å × 50 Å × 55 Å. Esta enzima na sua forma nativa apresenta baixa estabilidade frente a temperatura (perda brusca de atividade enzimática acima de 40 °C) e pH (rápida perda de atividade em pH <5 e >8) (CHONG et al., 2004; ELDIN et al., 2000; KAZAN et al., 1995).

A agarose apresenta propriedades físicas e químicas que a tornam um excelente suporte para imobilização de enzimas. Entre elas destaca-se a presença de grupos hidroxilas que podem ser facilmente ativados. A ativação consiste de ligar à superfície da agarose os grupos aldeídos que são capazes de interagir facilmente com grupos aminos das lisinas da enzima, os quais são abundantes na maioria das proteínas. PGA apresenta 41 grupos aminos, favorecendo, portanto, a estabilização desta macromolécula através de sua interação com os grupos aldeídos na superfície da agarose (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005).

Apesar das características favoráveis para imobilização de PGA em agarose, existem muitos fatores que podem ser otimizados para que a estabilização da enzima seja máxima. Os itens descritos abaixo apresentam os resultados obtidos da investigação do efeito de alguns destes fatores, como por exemplo, tamanho da fibra, presença de aditivos, pH e tempo de imobilização nas propriedades finais de PGA imobilizada.

### 5.1.2.1 Efeito do Tamanho da Fibra na Imobilização/Estabilização de PGA

A estabilização de PGA através da imobilização em uma matriz sólida depende das interações entre a superfície da enzima e a superfície do suporte. A maioria das enzimas apresenta estrutura globular, entretanto, essa estrutura é mantida através de interações fracas, como por exemplo, a ligação de hidrogênio, portanto a enzima pode rearranjar-se para interagir com a superfície do suporte. Todavia, o desdobraimento da enzima para ligar-se ao suporte não é suficiente para garantir a eficiência do processo de imobilização. A área superficial disponível do suporte para que a enzima possa efetuar as múltiplas ligações covalentes é fundamental para que esta interação seja máxima.

A estrutura do suporte, ao contrário da enzima, não sofre desdobraimento para interagir com outras superfícies. Os suportes de estudo deste trabalho são partículas formadas por fibras entrecruzadas, as quais apresentam diferentes tamanhos (espessura), e sobre as quais a enzima é acoplada através de ligações covalente.

Fibras de tamanho grande são ideais para que a enzima possa acoplar-se, pois a superfície se assemelha a um plano, e este formato da superfície da matriz sólida viabiliza um maior número de interações entre a enzima e o suporte.

O efeito do tamanho da fibra sobre a cinética de imobilização de PGA pode ser visualizado nos gráficos apresentados na Figura 5.10, onde esta enzima é imobilizada em suportes de fibras de grande espessura (agarose 10%), pequena espessura (Toyopearl) e um tamanho intermediário (agarose 2%).

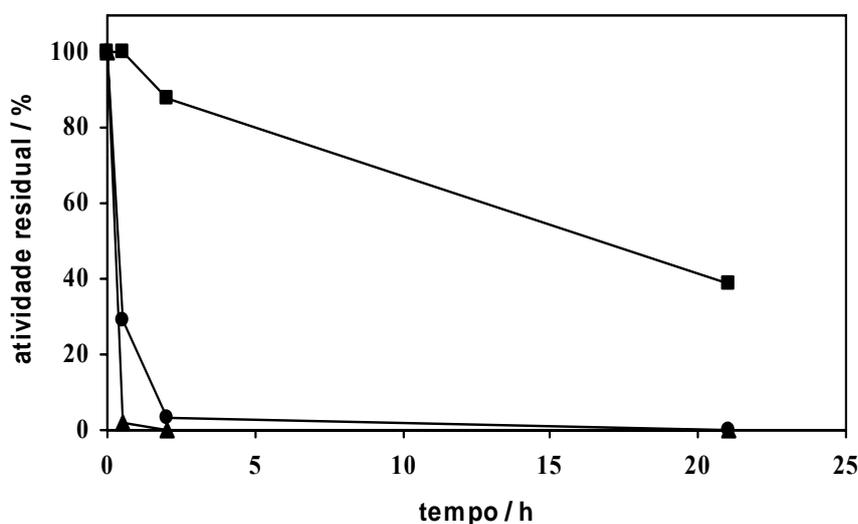


Figura 5.10: Cinética de imobilização de PGA em suportes com diferentes tamanhos de fibra. (■) Toyopearl; (●) Ag10%; (▲) Ag 2%.

Observou-se que a imobilização em agarose 2BCL e 10BCL ocorreu mais rapidamente que a imobilização de PGA em toyopearl. A pequena espessura das fibras do suporte toyopearl pode levar a formação de redes mais fechadas e conseqüentemente dificultam a entrada de PGA nos poros desta partícula. Outro fator importante que pode ter influenciado na velocidade de imobilização de PGA em Toyopearl é o grau de ativação que se pode atingir neste suporte.

A influência do tamanho da fibra mostrou-se ainda mais pronunciado quando se investigou a estabilidade térmica dos derivados. A Figura 5.11 apresenta as curvas de inativação de derivados preparados em suportes com diferentes tamanhos de fibra.

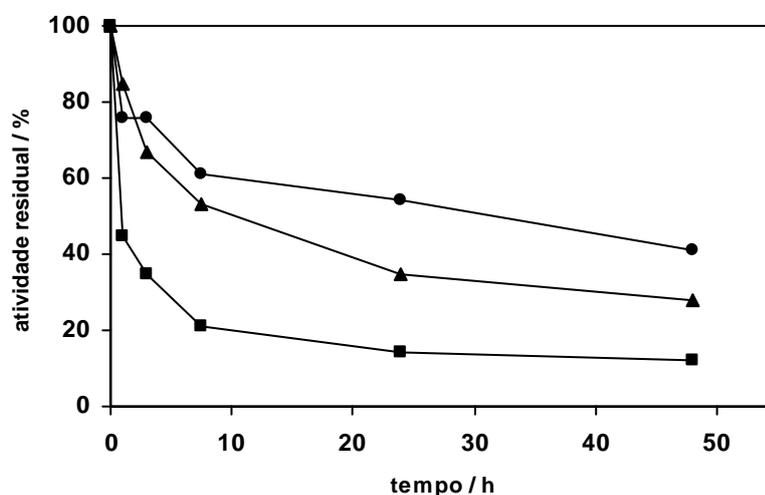


Figura 5.11: Curvas de inativação para PGA imobilizada em suportes com diferentes tamanhos de fibra a 65°C e pH 7. (■) Toyopearl; (▲) Ag 2%; (●) Ag 10%.

A estabilização de PGA frente a agentes que causam sua distorção depende fortemente do número de ligações que são efetuadas entre esta enzima e o suporte. Entretanto, este número de ligações depende do tamanho da fibra utilizada para a imobilização. Portanto a estabilização de PGA é função do tamanho da fibra do suporte.

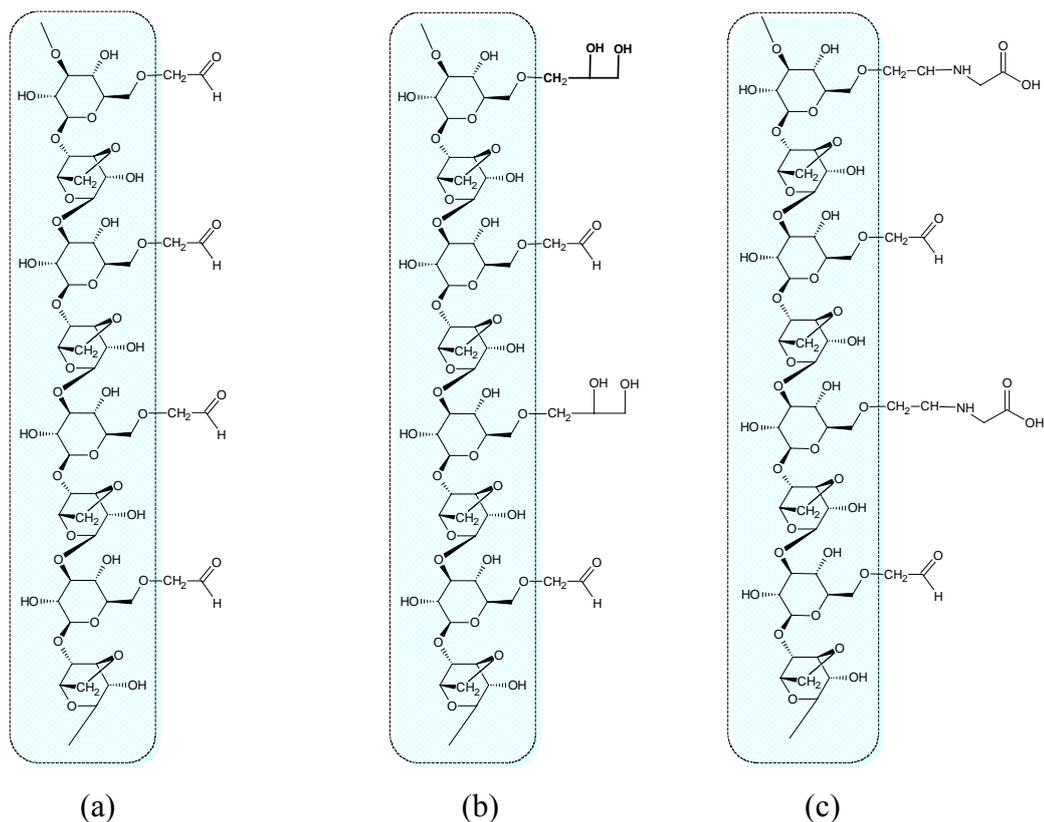
Os resultados apresentados no gráfico da Figura 4.12 representam claramente este efeito, visto que derivados preparados em agarose 10BCL (maior tamanho de fibra) apresentam maior estabilidade frente à temperatura, enquanto derivados preparados em toyopearl apresentam a menor estabilidade térmica, certamente devido ao menor tamanho de fibra deste suporte. O derivado preparado em agarose 2BCL apresenta perfil de inativação intermediário, visto que as fibras deste suporte são maiores que as fibras de toyopearl e menores que as fibras da agarose 10BCL.

### **5.1.2.2 Estudo da Modificação da Agarose com Diferentes Grupos Funcionais para Imobilização/Estabilização de PGA**

#### ***5.1.2.2.1 Presença de Grupos Dióis e Glicina***

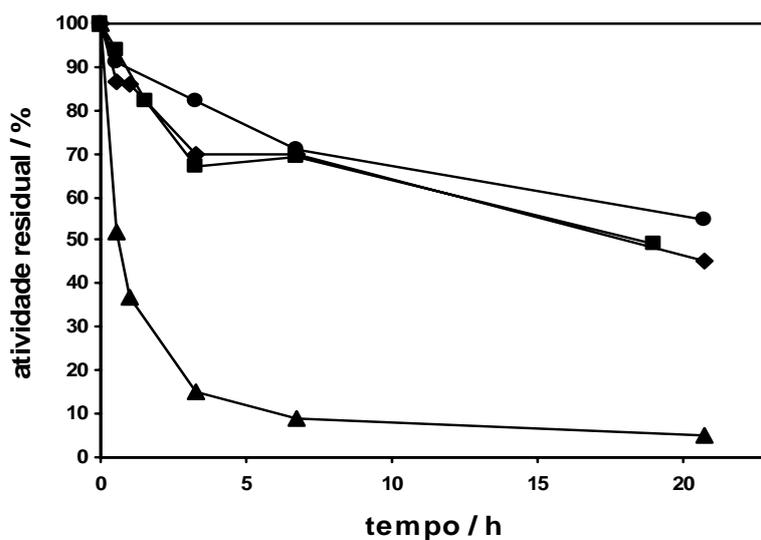
Para obter o máximo número de ligações possíveis entre a PGA e a agarose glioxil (agarose com grupos aldeído provenientes da ativação com glicidol ou epícloridrina), a ativação deste suporte é realizada com excesso do reagente de ativação, para garantir o número máximo de grupos ativos na superfície do suporte. Entretanto, a quantidade de grupos ativos (aldeídos) por área de suporte pode ser controlada através da oxidação dos grupos dióis com periodato de sódio.

Se a oxidação é realizada de modo parcial, além do efeito de redução da quantidade de grupos ativos, ainda poderia haver diminuição no número de interações entre a enzima e o suporte devido a efeitos de impedimento estérico. Este efeito pode ainda ser verificado, realizando a oxidação total dos grupos dióis e bloqueando parcialmente os grupos aldeídos formados com moléculas que contêm grupos aminos. A Figura 5.12 apresenta a estrutura química dos diferentes suportes preparados para investigar o efeito de impedimentos estéricos durante a imobilização de PGA.



**Figura 5.12:** Estrutura química de suportes para imobilização de PGA - a) Agarose-Glioxil (glicidol ou epicloridrina), b) Agarose-Glioxil (epicloridrina) parcialmente oxidado; c) Agarose-Glioxil (epicloridrina) totalmente oxidado e parcialmente bloqueado com Glicina.

O efeito da presença de outros grupos funcionais na superfície da agarose, sobre a estabilidade térmica dos biocatalisadores é apresentado na Figura 5.13.



**Figura 5.13:** Curvas de inativação térmica a 65°C e pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil (AgGx) com diferentes graus de ativação e contendo diferentes grupos funcionais. (●) AgGx (glicidol  $\approx$  200  $\mu$ mol aldeído/g suporte); (◆) Gx total (236  $\mu$ mol aldeído/g suporte); (■) Gx parcial (170  $\mu$ mol aldeído/66  $\mu$ mol dióis por g suporte); (▲) Gx Glicina (236  $\mu$ mol aldeído/g suporte antes de bloqueio com glicina);

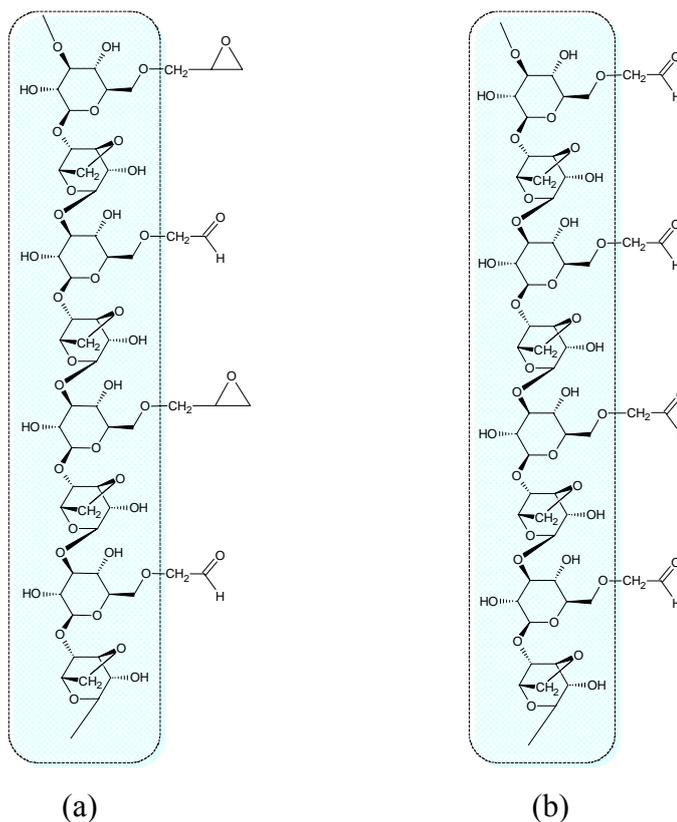
As curvas de inativação de PGA imobilizada apresentados na Figura 5.13 mostram que somente o bloqueio de aldeídos com grupos glicina exerce um efeito negativo sobre a estabilidade térmica dos biocatalisadores. Esse efeito pode ser devido ao maior volume do grupo glicina comparado ao volume dos grupos dióis. Além do efeito de impedimento estérico a falta de controle na quantidade de grupos glicina ligados ao suporte pode ter diminuído drasticamente a quantidade de aldeídos na agarose. Portanto, faz-se necessário a determinação da quantidade de glicina ligada ao suporte, para atribuir o efeito da perda de estabilidade somente ao impedimento estérico.

Deste estudo foi possível concluir também que a ativação da agarose tanto com glicidol quanto com epícloridrina resulta em derivados imobilizados igualmente estáveis termicamente.

#### ***5.1.2.2 Presença de Grupos Epóxidos***

A presença de grupos funcionais distintos de aldeídos pode apresentar efeito negativo ou positivo sobre a imobilização/estabilização da PGA. Por exemplo, a dupla ativação de agarose com grupos glioxil e epóxidos pode favorecer o aumento no número de ligações entre a enzima e o suporte e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade dos derivados. Os grupos epóxidos podem interagir com grupos amino, tióis e fenólicos da enzima (MATEO et al., 2002).

A Figura 5.14 apresenta o suporte preparado pela ativação de agarose com epícloridrina, a qual permite a obtenção de dois grupos reativos na superfície da agarose (epóxidos e aldeídos). Para avaliar o efeito da presença dos grupos epóxidos sobre a estabilidade térmica dos derivados e compará-lo com derivados imobilizados em suportes contendo somente grupos aldeídos, o suporte agarose foi ativado com epícloridrina e obteve-se agarose contendo grupos gliceris e epóxidos. Parte deste suporte foi diretamente submetido à oxidação com periodato de sódio para obtenção de suporte duplamente ativado com aldeídos e epóxidos (Figura 5.14a). Outra parte foi submetida à hidrólise ácida, para transformar todos os epóxidos em grupos gliceris, os quais foram posteriormente oxidados com periodato de sódio gerando o suporte ativado somente com aldeídos (Figura 5.14b).



**Figura 5.14:** Esquema de agarose ativada com: a) aldeído/epóxido e b) aldeídos.

O efeito desta dupla ativação pode ser analisado no gráfico da Figura 5.15. Observa-se que os derivados imobilizados no suporte duplamente ativado foram mais estáveis que o derivado contendo somente grupos aldeídos. Com o objetivo de favorecer a interação entre os grupos epóxidos e os grupos carboxílicos, após a imobilização completa de PGA (desaparecimento de toda atividade no sobrenadante), o pH da suspensão foi ajustado para 5, e o derivado foi mantido sob agitação por três horas. Ao fim da imobilização, os epóxidos remanescentes foram bloqueados com glicina e os aldeídos e bases de Schiff foram reduzidos com borohidreto de sódio.

Aparentemente, o fato de diminuir o valor de pH favorece a interação entre enzima e suporte, visto que a atividade residual tende a manter-se constante entre 50 e 60 %, indicando a formação de uma sub-população de enzimas que apresentam maior grau de estabilidade. Uma alternativa de aumentar esta interação seria iniciar a imobilização em pH 5, para imobilização através dos grupos epóxidos, e em seguida elevar o pH para 10 para favorecer a interação entre aminos e aldeídos.

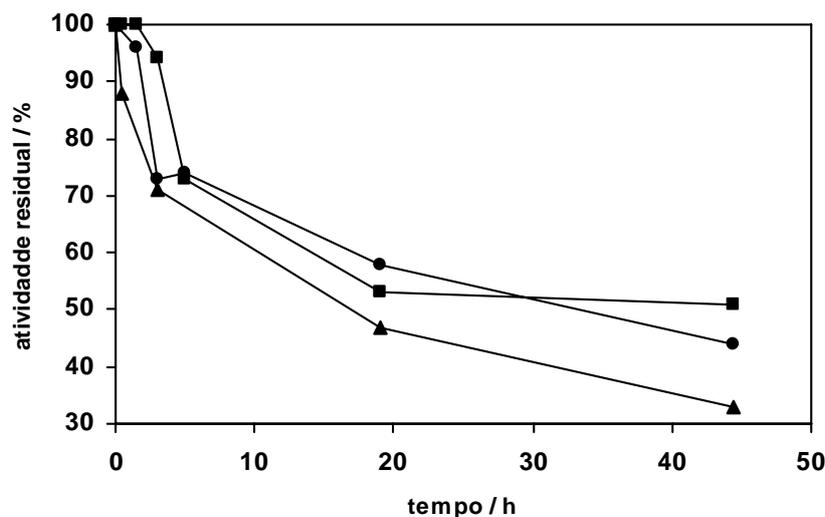


Figura 5.15: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil. (■) AgEPI-PGA-pH10/pH5-Glicina; (●) AgEPI-PGA-pH10-Glicina; (▲) AgGx (236 aldeído/g suporte).

A presença dos grupos aldeídos é fundamental para a imobilização e estabilização da PGA, visto que a imobilização desta enzima em suporte contendo somente grupos epóxidos é inviável. Entretanto, quando o suporte contém, além dos grupos epóxidos a presença de grupos aminos a imobilização de PGA ocorre, embora a velocidade de imobilização seja muito lenta. A interação de PGA com grupos epóxidos é favorecida pela presença dos grupos aminos, os quais promovem a aproximação desta enzima ao suporte direcionando os grupos reativos da enzima para a interação com os epóxidos (MATEO et al., 2003).

### 5.1.2.3 Imobilização de PGA na Presença de DL-Ditiotreitol (DTT)

#### 5.1.2.3.1 Efeito do DTT na Estabilização de PGA

Outra estratégia para estabilização de PGA investigada neste trabalho foi a utilização do aditivo DTT. Este composto já havia sido utilizado com o objetivo de estabilizar a PGA em suportes contendo grupos oxirano (DHALL et al., 1985 citado por PARMAR et al., 2000). A estabilização adicional da enzima foi atribuída ao maior número de ligações entre a enzima e o suporte, devido à presença DTT (ERARSLAN e GURAY, 1991 citado por PARMAR et al., 2000), entretanto este mecanismo de estabilização não foi esclarecido.

A imobilização de PGA em agarose resulta em derivados de elevada estabilidade (MATEO et al., 2007), entretanto a presença de DTT durante a imobilização desta enzima leva a produção de derivados ainda mais estáveis frente a temperatura, pH e solvente orgânico.

Nesta etapa do trabalho diferentes estratégias de imobilização para descobrir o mecanismo de estabilização da PGA utilizando DTT foram utilizadas. Primeiramente, a agarose glioxil foi mantida em contato com uma solução de DTT (50 mM) e depois foi lavada com água em abundância para remoção deste aditivo. Em seguida este suporte foi utilizado para imobilização de PGA. O objetivo era verificar se o DTT poderia reagir com os grupos aldeídos do suporte, reduzindo-os, entretanto testes com reagente de Schiff mostraram que os aldeídos não são reduzidos pelo DTT.

Outra estratégia utilizada foi imobilizar a PGA na presença de DTT (50 mM). E por último, com o objetivo de verificar se o DTT estabiliza a enzima diretamente, este aditivo foi adicionado numa concentração de 1 mM, a uma suspensão de derivado que foi submetida a inativação térmica, cujo resultado está apresentado no gráfico da Figura 5.16.

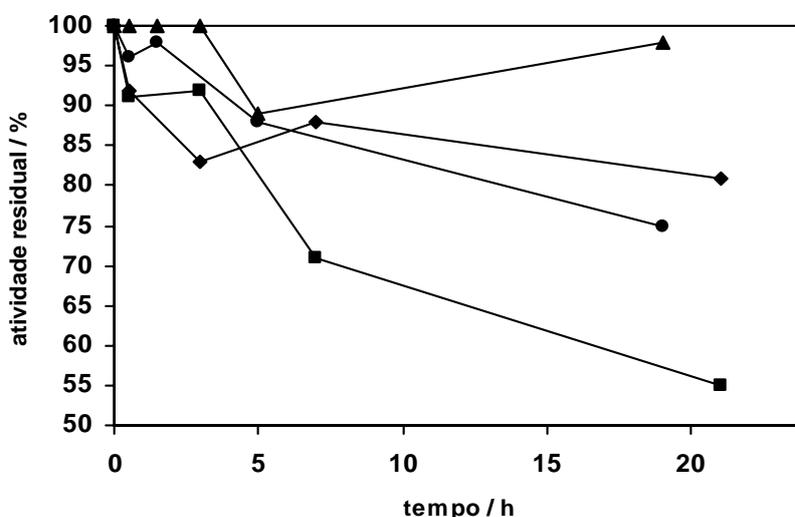


Figura 5.16: Curvas de inativação térmica a 65°C e pH 7 de PGA imobilizada: (■) em agarose glioxil; (▲) em agarose glioxil na presença de DTT; (◆) em agarose glioxil previamente tratado com DTT (incubado com solução de DTT, depois lavado com água destilada); (●) em agarose glioxil com DTT 1mM durante a inativação térmica.

Ao final da imobilização nenhum dos derivados descritos anteriormente foi reduzido com borohidreto de sódio como descrito no protocolo padrão (item 3.2.14.1), visto que este procedimento é fundamental para estabilização da enzima e o objetivo aqui era verificar o efeito isolado do DTT na estabilização. Observou-se que em todos os testes

realizados utilizando DTT, a enzima mostrou-se mais estável que o derivado preparado na ausência de DTT.

Apesar da lavagem exaustiva da agarose glioxil tratada com DTT, eliminando o odor característico deste composto, é possível que, mesmo em níveis muito baixos de concentração, o DTT ainda haja promovido a estabilização da PGA.

A adição de DTT a uma suspensão do derivado durante a inativação térmica do mesmo também causa um efeito estabilizante da PGA, indicando que este aditivo pode promover interações intramoleculares. Entretanto, maior estabilidade foi observada quando PGA foi imobilizada em agarose glioxil na presença de DTT.

Acredita-se que o DTT pode atuar como agente redutor e a sua presença durante a imobilização faz com que as bases de Schiff formadas, sejam imediatamente reduzidas gerando ligações irreversíveis. Tais ligações seriam praticamente impossíveis de ocorrer na ausência de DTT, visto que esta ligação poderia ser desfeita para permitir que a enzima se ligasse ao suporte através de outro ponto na sua superfície que exigisse menos energia. Esta hipótese considera que a reatividade do DTT é suficiente para reduzir as bases de Schiff, todavia não danifica os grupos aldeídos da agarose. Com estes resultados conclui-se que a estabilização de PGA através do uso de DTT pode estar relacionada a interações intramoleculares da PGA associada à redução das bases de Schiff.

#### ***5.1.2.3.2 Avaliação do Efeito Redutor do DTT***

O DTT poderia ser considerado um agente redutor fraco, ou seja, poderia atuar na redução imediata das bases de Schiff formadas entre enzima e suporte, entretanto não reduziria os grupos aldeídos a hidroxilas.

O gráfico apresentado na Figura 5.17 ilustra as curvas de inativação térmica para derivados preparados na presença de DTT a pH 10, reduzidos e não reduzidos com borohidreto de sódio ao fim da imobilização. Além disso, um derivado controle (PGA em agarose glioxil, pH 10 sem DTT), não reduzido foi preparado para comparar sua estabilidade a estabilidade dos derivados preparados com DTT.

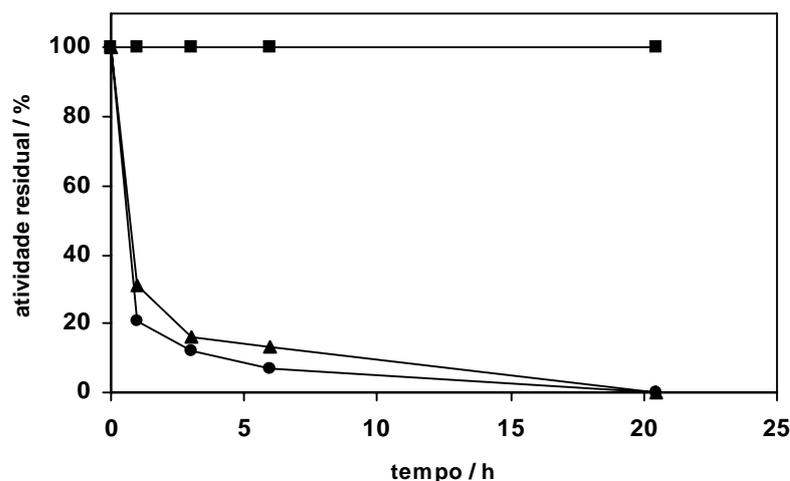


Figura 5.17: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7. (●) imobilização em agarose glioxil e derivado não reduzido ao final com NaBH<sub>4</sub>; (▲) imobilização na presença de DTT e derivado não reduzido ao final com NaBH<sub>4</sub>; (■) imobilização na presença de DTT e derivado reduzido ao final com NaBH<sub>4</sub>.

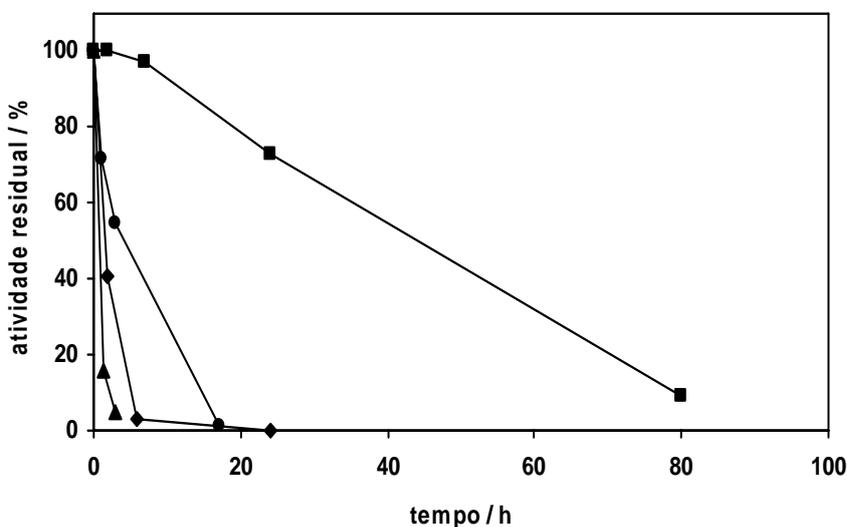
Os resultados apresentados neste gráfico mostram que a hipótese de redução das bases de Schiff pelo DTT não é totalmente verdadeira, visto que todos os derivados que não foram reduzidos com borohidreto de sódio são igualmente instáveis comparados ao derivado reduzido, vale ressaltar que PGA imobilizada em agarose glioxil na ausência de DTT e reduzida ao final da imobilização também se mostra bastante estável, entretanto quando este procedimento ocorre na presença de DTT, o fator de estabilização é aumentado. Entretanto, esta redução pode ocorrer em um nível que não se pode detectar neste teste de inativação. Testes utilizando eletroforese podem demonstrar de maneira mais clara, se ocorre redução de alguma fração das bases de Schiff formadas.

#### 5.1.2.3.3 Efeito do DTT na Cinética de Imobilização de PGA

Para compreender melhor o mecanismo de ação do DTT na imobilização de PGA, vários testes foram realizados variando-se as condições de imobilização. Neste item investigou-se a influência do DTT na cinética de imobilização de PGA em diferentes valores de pH.

Os resultados apresentados na Figura 5.18 mostram que a presença de DTT torna a velocidade de imobilização ligeiramente mais lenta em pH 10. Nota-se também que a

velocidade de imobilização de PGA torna-se mais lenta à medida que o valor de pH diminui. Entretanto, na ausência de DTT a imobilização de PGA não ocorre a pH 7.



**Figura 5.18:** Cinética de imobilização de PGA em agarose glioxil na presença de DTT (50 mM). (■) pH 7; (●) pH 8,5; (◆) pH 10; (▲) pH 10 sem DTT.

Estes resultados reforçam a idéia de que parte das bases de Schiff formadas entre a enzima e o suporte são imobilizadas e imediatamente reduzidas. Visto que a pH 7 somente os aminos terminais são capazes de reagir com os grupos aldeídos e que a ligação reversível de PGA através de um único ponto não é suficiente para manter a enzima presa ao suporte.

#### ***5.1.2.3.4 Efeito do pH e Tempo de Imobilização nas Propriedades de PGA Imobilizada na Presença de DTT***

##### **5.1.2.3.4.1 Influência do pH de Imobilização no Rendimento e Atividade Recuperada**

O efeito do DTT sobre a imobilização/estabilização de PGA em agarose glioxil está fortemente associado ao pH de imobilização. A Tabela 5.8 apresenta os valores de rendimento de imobilização, em termos de atividade, e os valores de atividade expressada antes e após a redução com borohidreto de sódio dos derivados imobilizados. Observa-se que o rendimento de imobilização em pH 7 é menor que os valores obtidos com pH 8,5 e 10, entretanto a atividade expressada antes da redução é significativamente maior comparada aos valores obtidos em pH mais alcalino.

**Tabela 5.8: Valores de rendimento e atividade expressada para imobilizações de PGA em agarose glioxil na presença de DTT a diferentes valores de pH.**

pH	Rendimento (%)	Atividade recuperada <sup>a</sup> antes da redução (%)	Atividade recuperada após redução (%)
7	89,8	92,9	22,2
7-10 <sup>b</sup>	-	-	21,3
8,5	98,7	55,0	16,8
8,5-10 <sup>c</sup>	-	-	13,8
10	94,4	50,5	17,6

<sup>a</sup> Atividade recuperada: razão entre a atividade medida no derivado e a atividade teoricamente imobilizada (toda a atividade desaparecida do sobrenadante, exceto aquela desaparecida por inativação).

<sup>b</sup> o pH inicial da imobilização é 7 e após 12 h o pH é corrigido para 10 e o sistema é mantido por mais 12 h sob agitação.

<sup>c</sup> o pH inicial da imobilização é 8,5 e após 12 h o pH é corrigido para 10 e o sistema é mantido por mais 12 h sob agitação.

Estes resultados de atividade expressada antes da redução podem estar relacionados ao número de ligações efetuadas entre PGA e agarose glioxil, o qual deve ser menor em pH 7, minimizando a perda de atividade por mudanças conformacionais da enzima. Outro fator que pode ter causado a perda de atividade dos derivados é a baixa estabilidade da PGA em valores de pH acima de 8.

Todos os derivados apresentaram perdas de atividade significativas após redução das bases de Schiff. Isto é visualizado nos baixos valores de atividade recuperada (13,8 a 22,2 %), sendo os derivados obtidos a pH 7 ou 7-10 ligeiramente mais ativos.

A estratégia de elevar o pH durante a imobilização foi utilizada para aumentar o número de ligações entre a enzima e o suporte, após a imobilização através de uma região específica.

#### 5.1.2.3.4.2 Influência do pH de Imobilização na Estabilidade Térmica

O efeito do pH de imobilização na estabilização da PGA pode ser visto no gráfico da Figura 5.19.

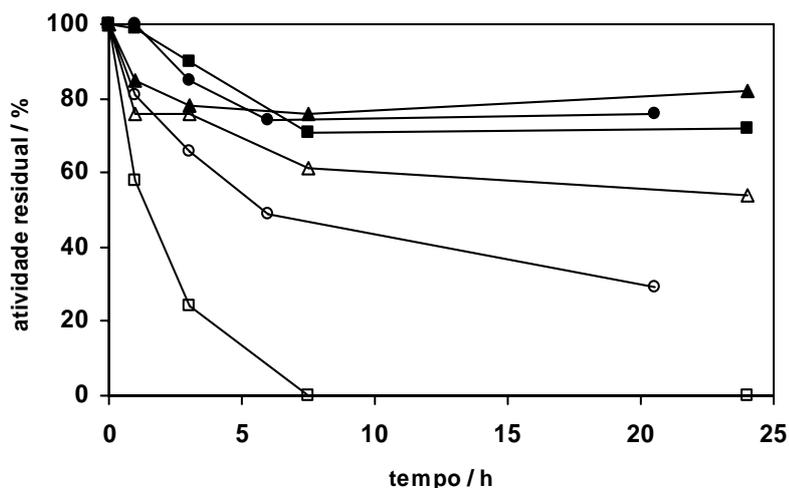


Figura 5.19: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA immobilizada em agarose glioxil na presença de DTT. (□) pH 7; (■) pH 7-10; (○) pH 8,5; (●) pH 8,5-10; (▲) pH 10; (△) pH 10 sem DTT.

O derivado obtido da imobilização em pH 7 mostrou-se muito instável confirmando que há pouca interação entre os grupos aminos e aldeídos nesta condição de imobilização. Derivados mais estáveis são obtidos à medida que aumenta o valor de pH.

Dentro do intervalo de tempo investigado neste estudo, os derivados preparados na presença de DTT e que iniciaram a imobilização com pH 7 e 8,5 e depois foram elevados a pH 10, apresentam estabilidade equivalente ao derivado preparado em pH 10 na presença de DTT. Para diferenciar estes derivados quanto a sua estabilidade, faz-se necessário estudo de inativação em condições mais drásticas, por exemplo, a 70°C. Este estudo é importante para verificar se a enzima está sendo imobilizada por diferentes regiões de sua superfície em função do pH. A imobilização através da região mais rica em lisinas resultaria em um derivado com maior estabilidade a agentes que causam sua distorção.

### 5.1.2.4 Efeito combinado do pH e Tempo de Imobilização na Estabilidade de PGA

#### 5.1.2.4.1 Estabilidade Térmica

O número de ligações entre a PGA e a agarose glioxil no processo de imobilização depende, entre outros fatores, do pH e do tempo de imobilização. Na imobilização covalente multipontual as primeiras ligações são rápidas, mas a multi-interação requer tempo maior para que ocorra o devido alinhamento entre grupos reativos da enzima e do suporte. Quando essa imobilização é realizada em pH 10 (pH próximo ao pK dos grupos aminos de lisina) a imobilização ocorre muito rápido e a estabilização é atingida em algumas horas.

Entretanto se a imobilização ocorre em valores de pH menores que 10, a imobilização torna-se muito lenta e a estabilização pode não ocorrer, mesmo em presença de DTT. Os gráficos da Figura 5.20 apresentam as curvas de inativação térmica de derivados preparados em pH 7 e pH 8,5 e diferentes tempos de imobilização.

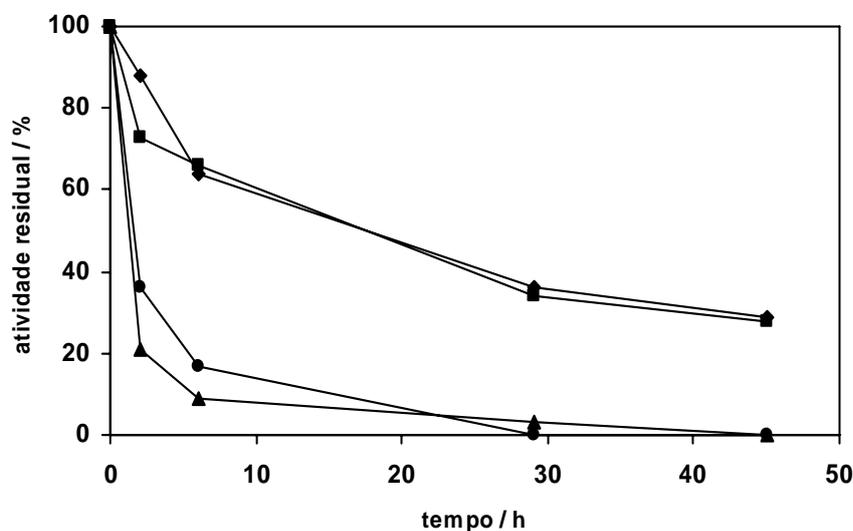


Figura 5.20: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil na presença de DTT. (●) pH 7 (3 dias); (◆) pH 8,5 (7 dias); (■) pH 8,5 (1 dia); (▲) pH 7 (7 dias).

Observa-se que o derivado preparado a pH 7 e incubado por três dias (tempo necessário para imobilização) apresenta a mesma estabilidade térmica que o derivado incubado por 7 dias neste mesmo pH. O mesmo comportamento é observado para o derivado preparado em pH 8,5. Estes resultados indicam que para cada valor de pH existe um número possível de ligações entre enzima e suporte, entretanto, a determinação do tempo em que este

equilíbrio é atingido para cada valor de pH é importante para obtenção da máxima estabilidade.

#### 5.1.2.4.2 Estabilidade frente a solvente

Os derivados supracitados foram submetidos à inativação frente a dioxano (Figura 5.21) e apresentaram perfis de inativação similares aos da estabilidade térmica.

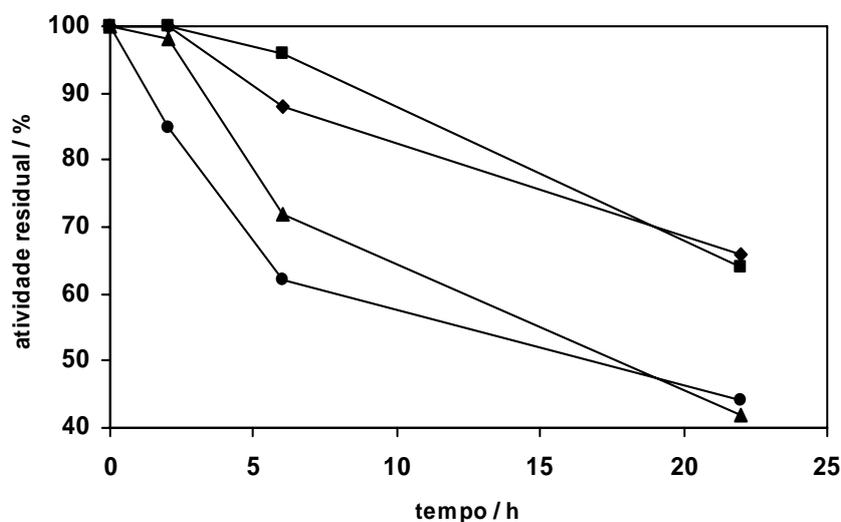


Figura 5.21: Curvas de inativação de PGA imobilizada em agarose glioxil na presença de DTT frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C. (●) PGA imobilizada a pH 7 por três dias; (◆) PGA imobilizada a pH 8,5 por sete dias; (■) PGA imobilizada a pH 8,5 por três dias; (▲) PGA imobilizada a pH 7 por sete dias.

O tempo de incubação de três dias é suficiente para imobilizar toda a enzima oferecida, entretanto testes mantendo a enzima incubada por sete dias foram realizados para tentar aumentar o número de ligações entre a enzima e o suporte e desta maneira aumentar sua estabilidade frente a agente distorcionante. Verificou-se que o tempo adicional na imobilização não aumentou a estabilidade da enzima.

### 5.1.2.5 Influência do pH de Imobilização Sobre a Estabilidade de PGA

#### 5.1.2.5.1 Estabilidade frente a pH

A investigação da região através da qual PGA é imobilizada pode ser realizada analisando-se os perfis das curvas de inativação frente a diferentes agentes distorcionantes.

O gráfico da Figura 5.22 apresenta as curvas de inativação frente a pH 5 de derivados de PGA preparados em diferentes valores do pH de imobilização.

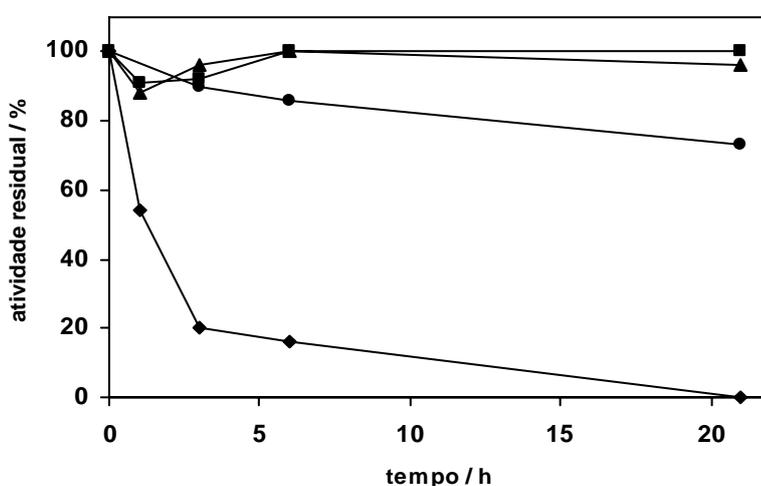


Figura 5.22: Curvas de inativação a pH 5 e 67 °C de PGA imobilizada em agarose glioxil em diferentes valores de pH. (♦) pH 7 na presença de DTT; (▲) pH 10 na presença de DTT; (■) pH 7-10; (●) pH 10.

O perfil de inativação destes derivados frente a pH 5 e 67 °C foi semelhante ao perfil de inativação destes mesmos derivados frente a pH 7 e 65°C. Ou seja, os derivados obtidos na presença de DTT em pH 7-10 ou 10 mostraram-se mais estáveis que o derivado controle (preparado em pH 10 na ausência de DTT). E, novamente, o derivado imobilizado somente em pH 7 mostrou-se pouco estável.

Neste experimento não foi possível determinar qual derivado (pH 7-10 ou pH 10) é mais estável, visto que dentro do intervalo de tempo investigado nenhum destes apresentou qualquer perda de atividade. Entretanto outros testes frente a solvente orgânico foram realizados para tentar diferenciar estes derivados.

### 5.1.2.5.2 Estabilidade Frente a Solvente

A inativação dos derivados de PGA obtidos em diferentes valores do pH de imobilização e na presença de DTT apresenta perfis de inativação ligeiramente diferenciados dos agentes distorcionantes supracitados. Neste caso, observa-se que o derivado imobilizado inicialmente a pH 7 e levado a pH 10 é menos estável que o derivado imobilizado diretamente a pH 10 (Figura 5.23).

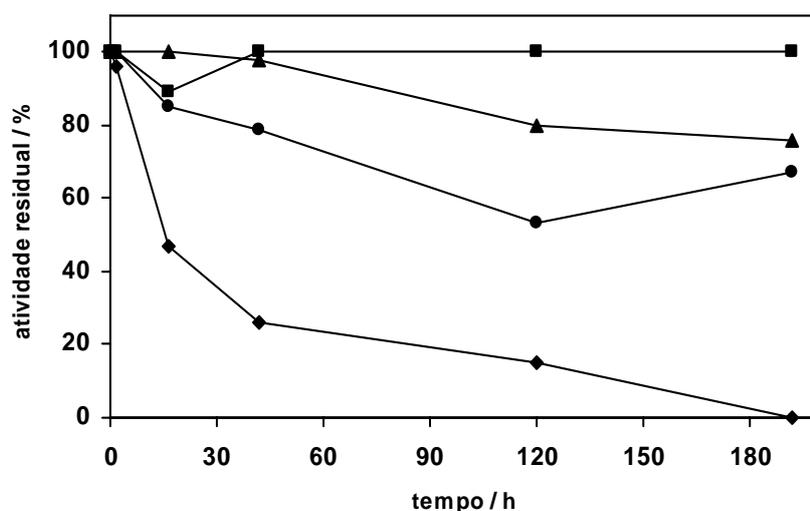


Figura 5.23: Curvas de inativação frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C de PGA imobilizada em agarose glioxil: (■) a pH 10 na presença de DTT; (▲) a pH 7-10 na presença de DTT; (●) a pH 10; (◆) a pH 7 na presença de DTT.

Estes resultados indicam que a PGA pode estar sendo imobilizada por diferentes regiões da sua superfície, entretanto, outros testes de inativação térmica precisam ser realizados para confirmar esta conclusão.

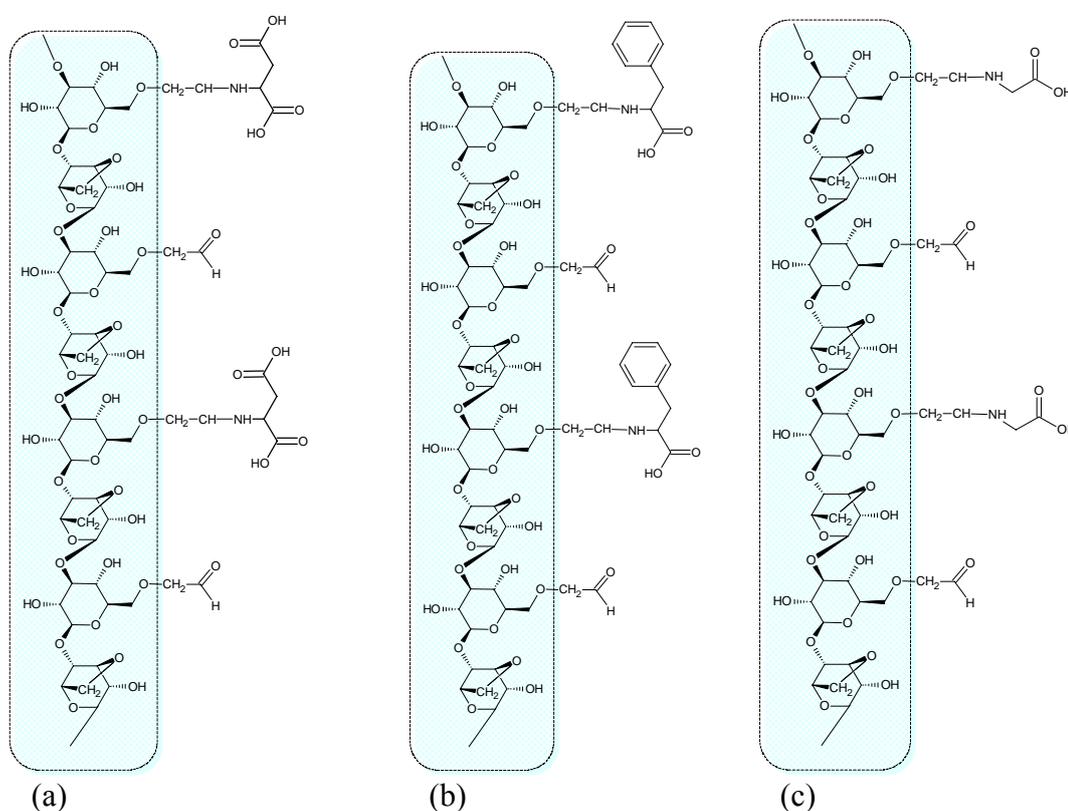
Até este momento, a imobilização em pH 10, na presença de DTT, resultou na obtenção de derivado imobilizado altamente estável frente a temperatura, pH e solvente orgânico. Entretanto a busca por derivados estáveis e com propriedades moduladas segue sendo de grande interesse. Por isso, além da estabilização, o desenvolvimento de derivados com microambientes que favorecem a formação de um produto e inibe reações laterais indesejadas é atualmente objeto de estudo em muitos projetos de pesquisa. Neste trabalho, foram preparados diferentes derivados de PGA, os quais futuramente podem ser aplicados em estudos da síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

A busca deste microambiente pode alterar a estabilidade do derivado imobilizado. As etapas seguintes neste trabalho mostram como a inserção de grupos

funcionais nos derivados imobilizados pode afetar sua estabilidade frente aos agentes distorcionantes.

### 5.1.2.6 Micro-ambiente de PGA Imobilizada (Efeito do pH de Imobilização/Tipo de Aminoácido Inserido)

A presença de diferentes grupos funcionais ao redor da enzima imobilizada pode modificar suas propriedades finais. Neste trabalho foi investigado o efeito da inserção de alguns aminoácidos entre a enzima e o suporte após o processo de imobilização. A Figura 5.24 apresenta um esquema da modificação do suporte através de ligações com os aminoácidos: fenilalanina, ácido aspártico e glicina.



**Figura 5.24:** Esquema da modificação química do suporte com aminoácidos: (a) ácido aspártico, (b) fenilalanina e (c) glicina.

Os resultados apresentados anteriormente revelam que o número de ligações entre a enzima e o suporte depende do pH de imobilização, portanto, é possível que a inserção de um aminoácido após a imobilização de PGA em diferentes valores de pH, apresente diferentes efeitos devido ao microambiente formado.

Os grupos funcionais da enzima com potencial para realizar a ligação covalente com o suporte, e que não o fizeram devido ao valor do pH de imobilização, terão que interagir

com o aminoácido inserido após a imobilização (ácido aspártico, fenilalanina ou glicina). Este microambiente gerado pode alterar as propriedades finais deste derivado, por exemplo, sua atividade e/ou estabilidade. Nos itens a seguir serão apresentados os resultados da formação deste microambiente em derivados obtidos em diferentes valores do pH de imobilização.

### 5.1.2.6.1 Imobilização em pH 8,5 e 8,5-10

Esta etapa do trabalho tem como objetivo estudar a influência do tipo de aminoácido utilizado para gerar o microambiente de PGA imobilizada associada ao efeito do pH de imobilização sobre a estabilidade do derivado.

As Figuras 5.25 e 5.26 apresentam as curvas de inativação térmica para derivados imobilizados a pH 8,5 e derivados que iniciaram a imobilização em pH 8,5 e tiveram este valor elevado para pH 10 durante a imobilização, respectivamente. Os grupos aldeídos remanescentes destes derivados foram bloqueados com glicina, fenilalanina ou ácido aspártico.

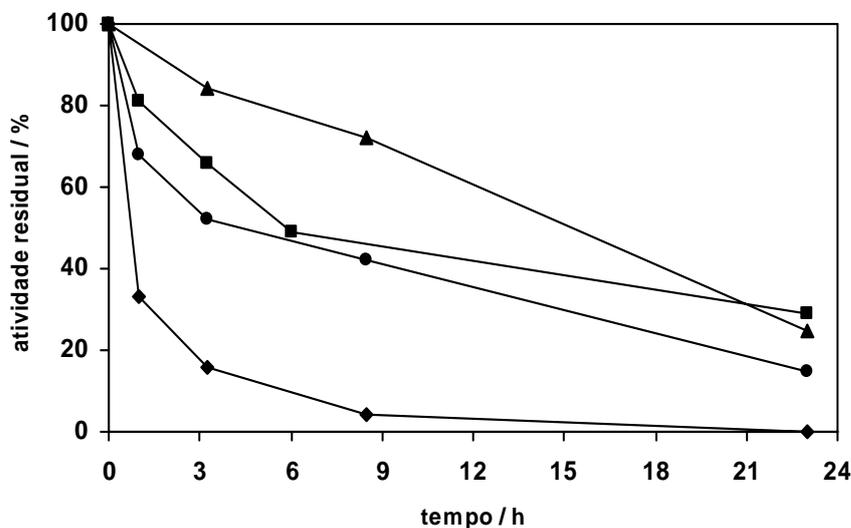


Figura 5.25: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada. (■) a pH 8,5; (▲) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (●) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando fenilalanina; (◆) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina.

Os resultados apresentados no gráfico da Figura 5.26 revelam que, o bloqueio com glicina tem efeito negativo sobre a estabilidade de PGA imobilizada, enquanto fenilalanina não altera a estabilização e o ácido aspártico apresenta efeito estabilizante, quando estes derivados são comparados ao derivado controle (pH 8,5).

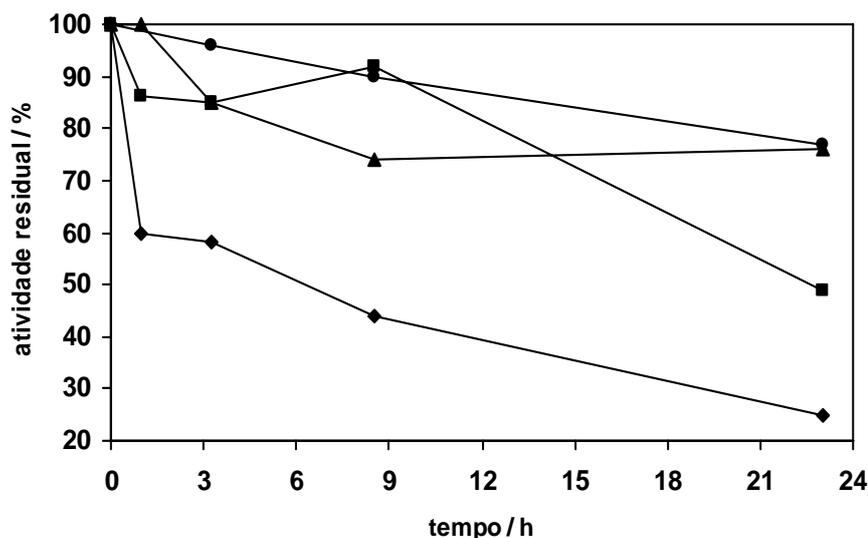


Figura 5.26: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada. (▲) a pH 8,5-10 ; (●) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando fenilalanina; (■) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (◆) a 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina.

Na Figura 5.27 pode-se verificar que o derivado imobilizado em pH 8,5-10 e posteriormente submetido ao bloqueio dos grupos glioxil com fenilalanina não sofre redução na estabilidade térmica.

A intensidade do efeito de cada um dos aminoácidos investigados pode estar relacionada à reatividade destas moléculas com os grupos aldeídos. Como o bloqueio dos aldeídos remanescentes ocorre depois da imobilização de PGA, também é possível que impedimentos estéricos dificultem a entrada de grupos funcionais de grande volume, por exemplo, o grupo fenil da fenilalanina.

Nos ensaios seguintes os derivados bloqueados com glicina e ácido aspártico foram submetidos à inativação frente a solvente orgânico. Por não exercer efeitos sobre a estabilidade de PGA imobilizada em agarose glioxil o derivado bloqueado com fenilalanina foi excluído. Os resultados obtidos são apresentados nos gráficos da Figura 5.27.

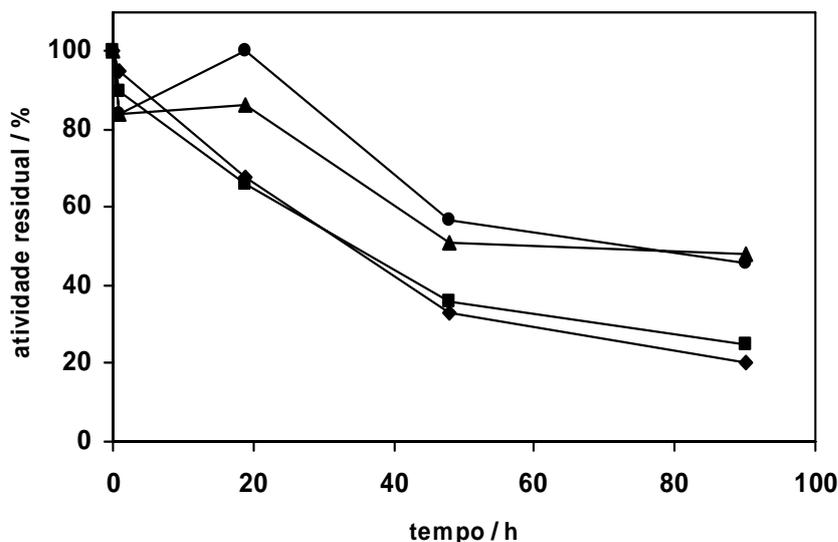


Figura 5.27: Curvas de inativação frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C de PGA imobilizada: (●) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (▲) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (■) a pH 8,5-10 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina; (◆) a pH 8,5 com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina.

Observou-se que a estabilidade frente a solvente tanto de derivados obtidos a pH 8,5 quanto a pH 8,5-10 têm perfil de inativação similar, quando ocorre bloqueio dos grupos aldeídos remanescentes com glicina. Além disso, esses derivados mostraram estabilidade menor que os derivados contendo ácido aspártico no microambiente.

Acredita-se que a glicina é capaz de romper algumas ligações entre enzima e suporte, tornando estes derivados menos estáveis e que o efeito menos pronunciado do ácido aspártico pode estar relacionado à menor reatividade deste aminoácido com aldeídos.

#### 5.1.2.6.2 Imobilização em pH 10

O efeito do microambiente gerado pela inserção de aminoácidos após imobilização de PGA a pH 10, sobre a estabilidade térmica dos derivados, é apresentado nos gráficos da Figura 5.28. Observa-se que a glicina promove a mesma perda de estabilidade observada em derivados preparados em pH 8,5-10. Fenilalanina e ácido aspártico, aparentemente, têm seus efeitos minimizados sobre a estabilidade térmica dos derivados à medida que se aumenta o pH de imobilização. Este resultado é uma indicação maior número

de ligações entre a PGA e o suporte é realizado em função do pH. Esta interação mais forte entre a enzima e o suporte torna mais difícil a inserção de aminoácidos.

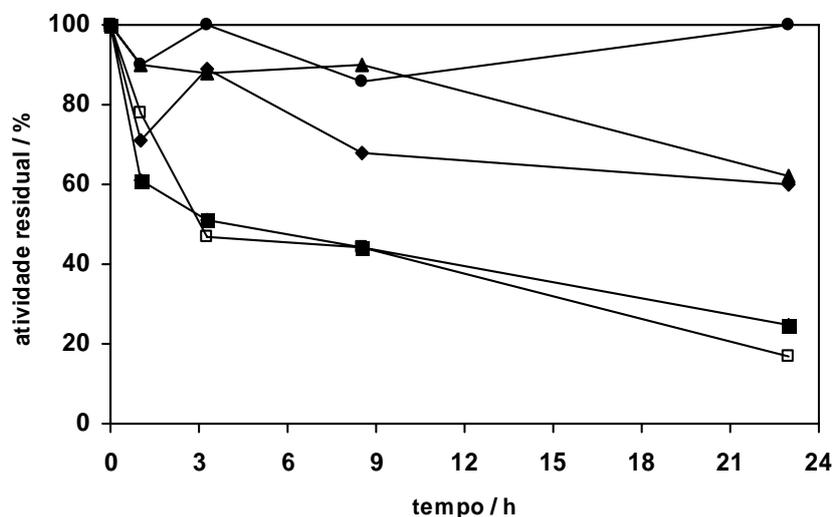
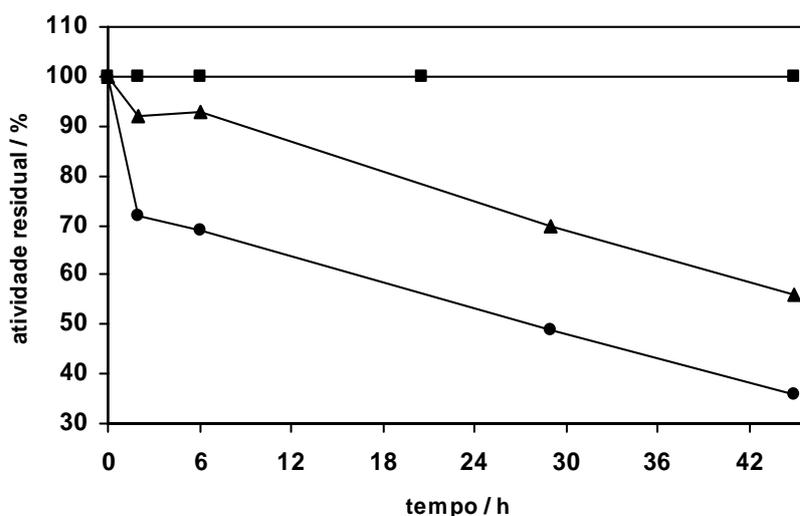


Figura 5.28: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil a pH 10: (●) sem bloqueio dos aldeídos remanescentes; (▲) com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (◊) com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando fenilalanina; (□) com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina (■) na presença de DTT e com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando glicina.

O objetivo nesta etapa do trabalho foi verificar se ocorre estabilidade adicional aos derivados de PGA através da inserção de aminoácidos entre a enzima imobilizada e o suporte, entretanto, observou-se perda da estabilidade. Por outro lado, apesar da perda de estabilidade, estes derivados podem apresentar propriedades desejáveis, como maior seletividade em diferentes reações, o que deve ser investigado em trabalhos futuros.

#### 5.1.2.6.3 Imobilização em pH 10 com DTT (microambiente-ácido aspártico)

Como demonstrado em resultados anteriores a presença de DTT durante a imobilização de PGA em agarose glioxil confere estabilidade adicional ao derivado. As curvas de inativação térmica apresentadas na Figura 5.29 mostram que a inserção de ácido aspártico ao microambiente da enzima ocasiona perda de estabilidade mesmo quando a imobilização é realizada na presença de DTT.



**Figura 5.29:** Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil a pH 10: (■) na presença de DTT sem bloqueio dos aldeídos remanescentes; (●) sem DTT com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico; (▲) na presença de DTT com bloqueio dos aldeídos remanescentes utilizando ácido aspártico.

Apesar da perda de atividade do derivado imobilizado em presença de DTT, nota-se que esta perda é menor que a observada no derivado imobilizado na ausência de DTT. A perda de estabilidade frente a temperatura e solvente orgânico após a inserção de aminoácidos pode ser devida a competição dos grupos aminos da enzima com os aminoácidos livres pelos aldeídos do suporte.

Para efeito de imobilização/estabilização de PGA estes resultados não são satisfatórios, entretanto, essa metodologia pode ser aplicada com outras finalidades, por exemplo, na purificação de enzimas. Visto que essa pode ser ligada através da formação de bases de Schiff ao suporte e em seguida removidas utilizando um aminoácido capaz de substituir o grupo lisina ligado ao suporte.

Neste trabalho, observa-se que glicina é o aminoácido com melhor potencial de substituição, pois em todos os experimentos os derivados bloqueados com este aminoácido apresentaram menor estabilidade. Entretanto existem muitas variáveis que podem controlar a quantidade de glicina que vai ligar-se à agarose glioxil, por exemplo: pH, temperatura, concentração de glicina, tempo de reação, etc.

#### 5.1.2.6.4 Efeito do Tempo de Contato com Glicina sobre a Estabilidade de PGA Imobilizada

O bloqueio de grupos aldeídos remanescentes na superfície de agarose glioxil pela glicina foi realizado utilizando uma solução 3M do aminoácido em pH 8,5. Acredita-se que a elevada concentração, além do bloqueio dos aldeídos remanescentes, também pode ter causado o rompimento de algumas ligações entre a enzima e o suporte. Entretanto, não somente a concentração de glicina pode causar estes rompimentos, o tempo de contato do derivado com a solução de glicina pode determinar o grau de reação entre a glicina e os grupos aldeídos.

O gráfico da Figura 5.30 apresenta as curvas de inativação para derivados preparados em pH 10 e bloqueados com solução de glicina 3M por diferentes tempos de incubação.

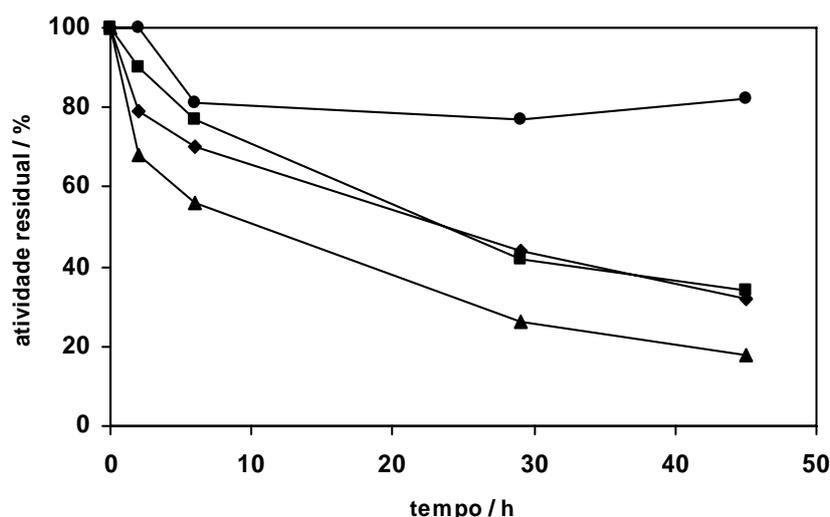
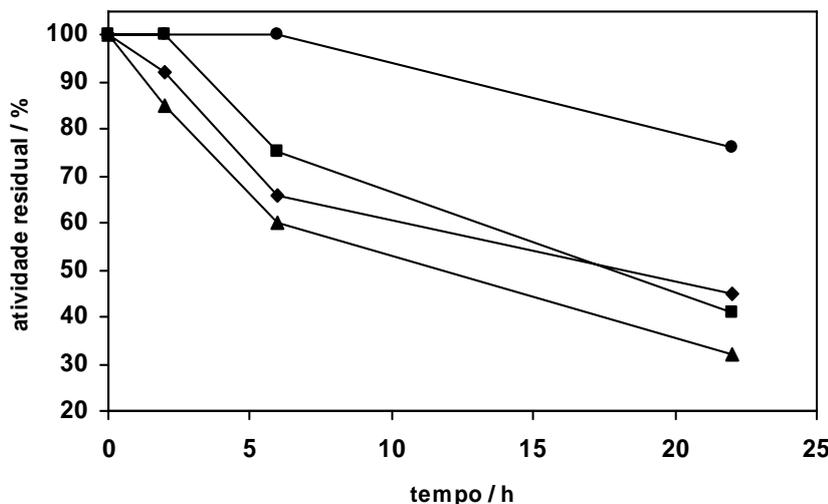


Figura 5.30: Curvas de inativação térmica a 65°C, pH 7 de PGA imobilizada em agarose glioxil: (●) sem bloqueio dos grupos aldeídos; (◆) bloqueio com glicina por 1h; (■) bloqueio com glicina por 3h; (▲) bloqueio com glicina por 24h.

Observa-se perda de estabilidade similar quando o tempo de contato com a solução de glicina é de 1 ou 3 h, e torna-se um pouco mais acentuada quando o tempo de contato é aumentado para 24 h.

Na presença de solvente orgânico também se observa uma perda brusca de estabilidade após 1 hora de contato e depois uma perda mais lenta da estabilidade em função do tempo de contato com a solução de glicina (Figura 5.31).



**Figura 5.31:** Curvas de inativação frente a dioxano 70%, pH 7 e temperatura de 4°C de PGA imobilizada em agarose glioxil: (●) sem bloqueio dos grupos aldeídos; (◆) bloqueio com glicina por 1h; (■) bloqueio com glicina por 3h; (▲) bloqueio com glicina por 24h.

Estes resultados sugerem que o bloqueio dos grupos aldeídos ao redor da PGA é suficiente para causar a perda de estabilidade dos derivados, e após o bloqueio destes grupos a glicina pode iniciar o rompimento das bases de Schiff formadas entre enzima e suporte, o qual ocorre mais lentamente.

### 5.1.2.7 Conclusões Parciais

A estabilização de PGA através da imobilização covalente multipontual depende, entre outros fatores, de propriedades do suporte, como por exemplo, o tamanho da fibra. Entre os suportes estudados neste trabalho, agarose 10 % mostrou-se mais adequado para estabilização da enzima, visto que possui maior tamanho de fibra comparada a agarose 2% e toyopearl.

A presença de grupos dióis entre os grupos aldeídos na superfície da agarose não diminui a estabilidade térmica dos derivados obtidos, entretanto esse efeito é observado quando dióis são substituídos por glicina.

A utilização de suporte bifuncional (aldeídos e epóxidos) permite a obtenção de derivados mais estáveis comparados aos derivados preparados em agarose glioxil.

A imobilização em suporte ativado com grupos epóxidos é favorecida quando existe um mecanismo para aproximar a enzima da superfície ativa do suporte. Neste trabalho,

a presença de grupos aminos e epóxidos em agarose permitiu a imobilização de PGA, enquanto a imobilização desta enzima em suportes contendo esses grupos isolados não ocorre.

A utilização de DTT durante a imobilização confere estabilidade adicional ao derivado frente a temperatura, pH e solvente orgânico. Além disso, torna possível a imobilização de PGA a pH 7 em agarose glioxil. Na ausência de DTT essa imobilização não ocorre.

A estabilização de PGA depende do pH de imobilização, sendo os derivados mais estáveis, aqueles preparados em pH 10.

O mecanismo de estabilização utilizando DTT ainda não é totalmente compreendido, entretanto acredita-se que este aditivo pode atuar diretamente sobre a enzima, estabilizando-a por interações intramoleculares, e também reduzindo imediatamente as bases de Schiff formadas nas primeiras interações entre enzima e suporte.

A inserção de grupos aminoácidos livres entre a enzima e o suporte diminui a estabilidade dos derivados, mesmo quando estes são preparados na presença de DTT. Este efeito desestabilizante é mais acentuado à medida que diminui o pH de imobilização. Entretanto, apesar da redução na estabilidade, estes derivados podem ser interessantes para aplicações em diferentes sistemas reacionais, visto que o microambiente gerado pode favorecer reações de interesse.

A imobilização de PGA utilizando a técnica de imobilização covalente multipontual foi realizada para obter a máxima estabilização da enzima. Além disso, esta técnica foi aplicada para a imobilização de PGA em partículas grandes, através da imobilização direta da enzima em esferas de 4 mm ou através do co-envolvimento de pequenas partículas contendo a enzima imobilizada, um método similar ao utilizado por Sato, (1976). As estratégias para o desenvolvimento do biocatalisador adequado para uso em bioreator são discutidas no item a seguir.

## **5.2 Biocatalisador para Uso no Biorreator**

Devido à elevada quantidade e diversidade de espécies químicas, tipo de microrganismo e condições severas de agitação do meio reacional, o biocatalisador a ser utilizado neste trabalho deve apresentar elevada estabilidade química e mecânica. Assim, foram investigadas diferentes matrizes poliméricas e estratégias de preparo do biocatalisador.

### 5.2.1 Seleção da Matriz Polimérica

Foi investigado o desempenho de três matrizes poliméricas: alginato de sódio, quitosana e agarose. As soluções dos polímeros e a gelificação destes foram preparadas como descrito no item 3.2.14.5.

O uso de alginato de sódio como suporte para imobilização da PGA não foi viável devido à instabilidade química deste gel na presença de íons fosfato, os quais estão presentes no caldo fermentativo em elevadas concentrações (ILLANES et al., 1996; PRABHUNE et al., 1991). Visto que as cadeias poliméricas do alginato são mantidas unidas por coordenação com íons cálcio (Figura 5.32), a remoção destes íons por agentes sequestrantes como, por exemplo, íons fosfato, implica dissolução do polímero e perda do biocatalisador.

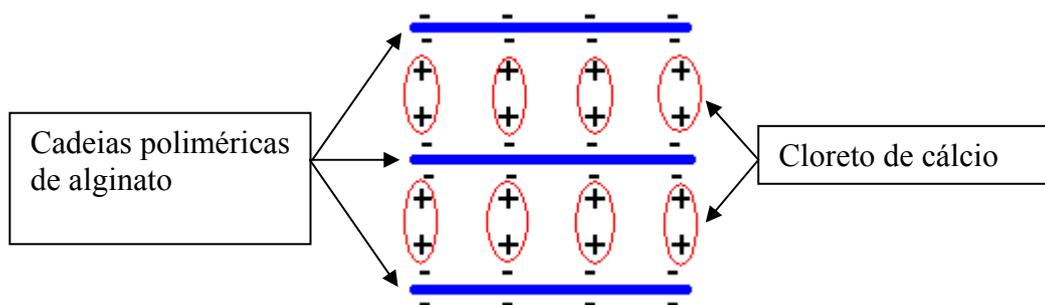


Figura 5.32: Esquema da gelificação de alginato por íons cálcio.

Uma alternativa ao uso de alginato é a quitosana. Esta matriz polimérica também é de baixo custo e já foi aplicada para a imobilização de muitas enzimas (CHIANG et al., 1997). A gelificação deste polímero geralmente é realizada em solução de hidróxido de sódio, entretanto o elevado pH da solução coagulante poderia inativar a enzima em alguns minutos. Para preservar a atividade catalítica da PGA, a gelificação de quitosana foi realizada em solução de tripolifosfato. O mecanismo de gelificação da quitosana também ocorre por entrecruzamento das cadeias poliméricas através de interação iônica como mostra o esquema da Figura 5.33 (MI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005).

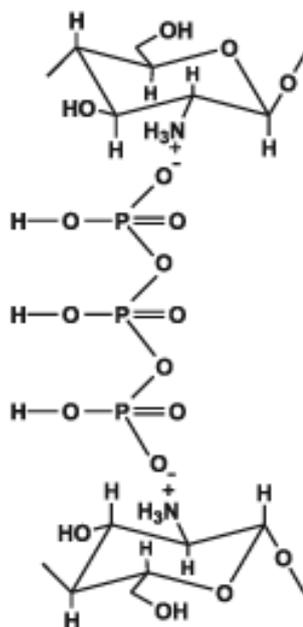
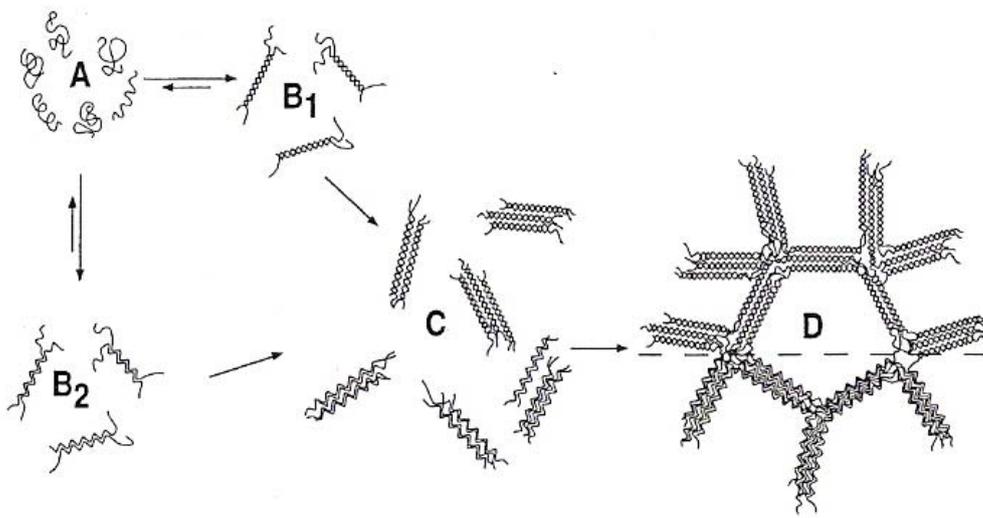


Figura 5.33: Esquema da gelificação de quitosana por tripolifosfato (Fonte: LAUS et al., 2006).

Testes de estabilidade química foram realizados mantendo esferas de quitosana em contato com caldo fermentativo durante dez dias, sob agitação de 250 rpm em shaker. Após esse período, observou-se que a integridade das esferas de quitosana foi mantida. Entretanto, testes realizados com agitadores mecânicos mostraram que estas esferas apresentaram estabilidade mecânica muito baixa comparada às esferas de alginato.

Para obter um biocatalisador com a estabilidade mecânica e química exigidas para uso em bioreator foi utilizada como matriz polimérica a agarose. O mecanismo de gelificação deste polímero envolve somente variação de temperatura.

O aquecimento da solução aquosa de agarose promove um estiramento das cadeias poliméricas, ao resfriar gradativamente esta solução, ocorre a formação de agregados de forma organizada, resultando em uma rede, a qual é mantida por ligações de hidrogênio. A estabilidade deste gel pode ser significativamente melhorada através do entrecruzamento das cadeias poliméricas por agentes bifuncionais como, por exemplo, a epiclorigidrina. Um esquema do processo de gelificação é apresentado na Figura 5.34.



**Figura 5.34:** Esquema da gelificação de agarose pelo resfriamento gradativo de uma solução aquosa do polímero inicialmente a 85 °C. Fonte: Medin, 1995.

As esferas de agarose apresentaram excelente estabilidade química em caldo fermentativo e sua estabilidade mecânica é similar à estabilidade de esferas de alginato. Como esta matriz mostrou-se adequada para uso em bioreator, iniciou-se o estudo da imobilização de PGA em esferas de agarose com diâmetro de 4 mm. As estratégias utilizadas para este fim são descritas no item a seguir.

### 5.2.2 Estratégia de Imobilização da Enzima em Agarose

Duas estratégias de imobilização foram investigadas neste trabalho. A primeira consistiu em imobilizar a PGA diretamente sobre esferas de 4 mm de diâmetro, enquanto na segunda estratégia a PGA era imobilizada em partículas de 400  $\mu\text{m}$  e em seguida essas partículas eram dispersas em solução de agarose e gotejadas em vaselina para formação das esferas de 4 mm. Em ambas as estratégias, limalha de aço inoxidável era adicionada à solução de agarose, com o objetivo de magnetizar as esferas e facilitar sua separação ao final do cultivo.

A Figura 5.35 mostra uma foto das esferas de agarose magnetizada, suspensas com a ajuda de um ímã.



Figura 5.35 PGA immobilizada dispersa em agarose dissolvida a 85 °C contendo partículas magnéticas.

### 5.2.2.1 Imobilização Direta de PGA Sobre Esferas de Agarose

A imobilização direta da PGA em esfera de agarose foi realizada mantendo uma solução da enzima em contato com as esferas previamente ativadas. O sistema foi mantido sob agitação mecânica por 24h. Um teste qualitativo usando reagente de Bradford foi realizado para verificar a dispersão da enzima na esfera. A coloração azul indica a presença de proteínas. O teste foi realizado mantendo a esfera sob agitação por 10 minutos no reagente citado.

Ao fim de 10 minutos foi realizado um corte transversal na esfera e observou-se que a imobilização ocorreu somente na superfície da esfera, como mostra a Figura 5.36.

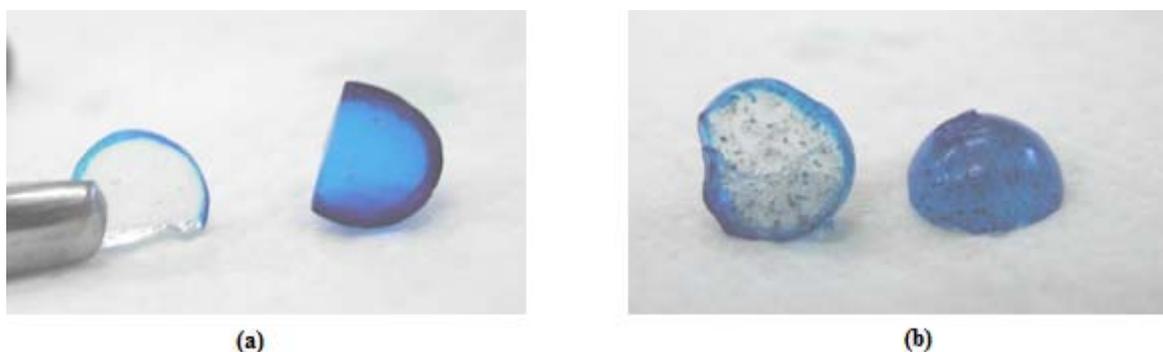


Figura 5.36: Esferas de agarose contendo PGA immobilizada. (a) gel de agarose; (b) gel de agarose contendo partícula magnética immobilizada.

Uma hipótese para o fenômeno observado é que, na condição de imobilização utilizada neste trabalho (pH 10), a primeira ligação da enzima ao suporte ocorre muito rapidamente. Portanto, muitas proteínas podem ser ligadas na entrada do poro, impedindo a

entrada de uma maior carga enzimática. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a concentração de agarose neste gel é muito elevada (10 % m/v).

Quanto maior a concentração de agarose, menor é o diâmetro de poros no gel preparado. Por outro lado, com o aumento da concentração de agarose também ocorre um aumento no diâmetro da fibra que constitui a rede polimérica, aumentando assim a superfície disponível para formar ligações multipontuais e conseqüentemente aumentando a estabilidade do derivado imobilizado.

Para verificar esta hipótese, preparou-se uma solução da enzima a pH 7 (neste pH não ocorre ligação da enzima ao suporte) e manteve-se esta em contato com esferas ativadas sob agitação por 12 h. Em seguida o pH deste sistema foi ajustado em 10 pela adição de carbonato de sódio e novamente foi submetido a agitação por mais 12 h. Este procedimento foi realizado com o objetivo de promover primeiramente a difusão das proteínas para o centro da esfera (pH 7) e em seguida forçar a ligação destas ao suporte (pH 10).

Os resultados obtidos reproduziram o fenômeno observado na Figura 4.38, ou seja, não houve difusão de proteínas no interior da esfera de agarose. Supõe-se então que a concentração de agarose 10% m/v não permitisse a imobilização de PGA em toda a extensão de uma esfera com diâmetro de 4mm.

Para solucionar este problema foram preparadas esferas com menor concentração de agarose. Soluções de 8, 6, 4 e 2 % p/v foram preparadas e as respectivas esferas foram ativadas e submetidas à imobilização. Surpreendentemente, o mesmo fenômeno foi observado.

Concluiu-se que, para partícula de agarose com 4 mm de diâmetro, a imobilização direta de uma enzima relativamente grande (90 kDa) é inviável. Entretanto, estes resultados não podem ser atribuídos somente ao elevado diâmetro da partícula, visto que este fenômeno também foi observado em partículas de 1 mm. Acredita-se que o brusco resfriamento da solução de agarose pode gerar uma rede com baixo grau de organização, o que dificulta o transporte de macromoléculas através da esfera.

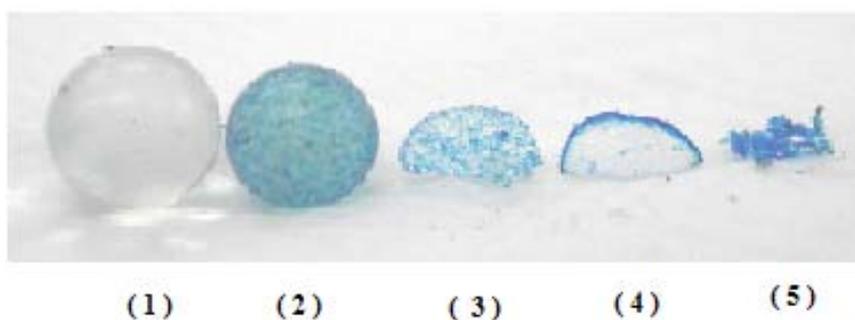
Outra estratégia proposta foi dispersar a PGA livre na solução de agarose, gotejar esta solução em vaselina para formar as esferas. Em seguida, seria promovida a ligação covalente da enzima às fibras de agarose, entretanto se o pó de agarose fosse previamente ativado com glicidol não seria possível dissolvê-lo e formar as esferas. Também não seria possível ativar a agarose na presença da enzima, visto que o pH de ativação é muito elevado (NaOH 0,75 M), pois isto inativaria a enzima, portanto esta estratégia foi descartada.

### 5.2.2.2 Dispersão de Partículas Contendo PGA em Esferas de Agarose

A necessidade de um biocatalisador com elevada carga enzimática e estabilidade operacional levou à busca de novas estratégias de preparo deste. Um método bem estabelecido de imobilização de PGA sobre partículas de gel de agarose comercial com 400  $\mu\text{m}$  foi utilizado. A grande vantagem de utilizar partículas deste gel comercial é a garantia de um material de elevada qualidade, preparado com controle de temperatura de alta precisão e condição de entrecruzamento que garantem a máxima uniformidade na distribuição do tamanho de poro e estabilidade da partícula.

As pequenas partículas contendo PGA imobilizada (pelo método descrito no item 3.2.14.1) e estabilizada (termicamente, 8.000 vezes em relação à enzima livre) foram dispersas em solução aquosa de agarose previamente dissolvida a 85 °C e resfriada até 60 °C para receber a enzima sem causar inativação da mesma. A mistura das partículas e seu gotejamento em vaselina foram realizados em poucos segundos, para garantir que nenhuma perda de atividade catalítica ocorresse durante o preparo das esferas.

O biocatalisador obtido desta maneira pode ser visualizado na Figura 5.37.



**Figura 5.37:** Teste da dispersão de enzima em esferas de agarose (1) Esfera controle – sem a enzima e tratada com reagente de Bradford; (2) Esfera contendo partículas de PGA corada com Bradford; (3) Corte transversal de (2); (4) Corte de esfera de agarose com imobilização direta de PGA; (5) Aglomerado de partículas de gel de agarose com 400  $\mu\text{m}$  contendo PGA imobilizado e corado com reagente de Bradford.

A dispersão de partículas contendo PGA imobilizada em esferas de agarose resultou numa melhor distribuição da enzima em todo o volume da esfera. Apesar de obter atividade aparente similar às esferas contendo PGA imobilizada diretamente (Tabela 5.9) sua atividade específica (U/ g do biocatalisador) é superior.

A atividade teórica para o método de imobilização direto é calculada com base na atividade que desaparece do sobrenadante durante o processo de imobilização. Sabendo-se que a enzima está imobilizada somente na superfície da esfera, os efeitos difusivos podem ser

considerados desprezíveis e a atividade aparente medida é aproximadamente igual à atividade real do derivado. Neste caso, a baixa atividade catalítica pode ser atribuída à etapa de redução com borohidreto de sódio, a qual é realizada após a medida da atividade final do sobrenadante. Portanto, parte da atividade teórica do derivado é perdida pela ação do borohidreto, e a atividade medida no derivado é inferior à teórica.

**Tabela 5.9: Comparação de biocatalisadores preparados por diferentes estratégias**

Método de Imobilização	Atividade teórica (UI/g) <sup>a</sup>	Atividade aparente <sup>b</sup> (UI/g)
Direto	130,4	23,77 $\pm$ 2,7
Por dispersão de partículas	100,0	15,50 $\pm$ 3,1

<sup>a</sup> Atividade enzimática (de PGA imobilizada em partículas de 400  $\mu$ m) dispersada por grama das esferas de 4 mm de diâmetro.

<sup>b</sup> Atividade medida diretamente nas esferas de 4 mm de diâmetro.

Por outro lado a baixa atividade aparente no biocatalisador obtido por dispersão pode ser atribuída a efeitos difusivos. Neste método, a atividade teórica é medida nas partículas pequenas depois que a enzima já está imobilizada e estabilizada e a dispersão destas na esfera de 4 mm é um método físico, ou seja, não é capaz de causar perda de atividade catalítica da PGA. Considerando as possíveis atividades reais finais nas esferas de agarose, pode-se afirmar que o biocatalisador obtido por dispersão tem uma carga enzimática quase 5 vezes maior que o biocatalisador obtido por imobilização direta da PGA.

Biocatalisadores com maior atividade catalítica ainda podem ser obtidos utilizando PGA com maior grau de pureza para imobilização em partículas de 400  $\mu$ m, pois a partir de extratos brutos a atividade máxima obtida foi 500 UI/g, isso ocorre porque proteínas indesejáveis competem com a PGA por sítios de ligação do suporte. Além disso, pode-se aumentar a concentração de partículas de agarose de 400  $\mu$ m na solução de agarose. Neste trabalho, foram utilizados 0,2 g de partículas para 0,8 g da solução de agarose 8 % m/v, ou seja, a atividade das partículas foi diluída 5 vezes e obteve-se um biocatalisador com atividade teórica final de 100 UI/g.

Para os objetivos deste trabalho, a atividade enzimática obtida foi satisfatória, além disso, a quantidade de atividade enzimática e a estabilidade mecânica da esfera de 4 mm é uma solução compromisso. À medida que aumenta o número de partículas na solução de agarose, a estabilidade mecânica é reduzida, pois a interação entre as cadeias poliméricas é dificultada devido à presença de interferentes, e a esfera torna-se mais “quebradiça”.

### 5.2.3 Conclusões parciais

Entre as matrizes poliméricas investigadas neste trabalho: alginato, quitosana e agarose, somente esta última mostrou-se viável para aplicação em biorreator por apresentar melhor estabilidade química e mecânica neste meio.

A melhor estratégia de imobilização de PGA em partículas de agarose com 4 mm de diâmetro foi através da dispersão de pequenas partículas de gel agarose contendo PGA imobilizada e estabilizada em solução de agarose, a qual era posteriormente gotejada em vaselina para preparo de esferas grandes. Ao contrário da imobilização direta em partículas grandes, esta estratégia permite a dispersão de PGA em toda a extensão da esfera.

## 5.3 Produção e Hidrólise de Penicilina

Após desenvolvimento do biocatalisador para uso em biorreator iniciou-se uma nova etapa de desafios para se realizar a hidrólise de penicilina G durante o cultivo de *Penicillium chrysogenum*. Primeiramente, foi necessário implantar metodologias simples e rápidas para quantificação de penicilina G e 6-APA em caldo fermentativo durante o cultivo. A utilização de HPLC, técnica reconhecidamente precisa e reprodutível, era inviável para este estudo, pois a grande quantidade de interferentes presentes no caldo de cultivo e o elevado número de amostras torna essa técnica demasiadamente cara. Uma vez superada essa etapa, vários cultivos em biorreator foram realizados para determinar as condições (aeração, agitação, alimentação de sacarose) em que o bolor cresceria na forma de pellet. Isso foi necessário para simular o processo industrial da produção de penicilina, no qual o fungo é mantido na forma de *pellet* para obter a máxima produção de penicilina. Após definição das condições adequadas de cultivo, foi definido protocolo para controle de contaminação para a reutilização do biocatalisador.

### 5.3.1 Quantificação de PG e 6-APA em meio de cultivo

A produção industrial de penicilina G por *P. chrysogenum* é realizada em meio complexo, utilizando, entre outros nutrientes, água de maceração de milho, sacarose ou glicose, e diferentes sais como, por exemplo, sulfato de amônio, carbonato de cálcio, fosfatos

de sódio e outros. Além destas espécies químicas, ao longo do cultivo, vários compostos orgânicos são liberados, incluindo ácidos orgânicos e proteínas.

A complexidade desse meio dificulta a quantificação de penicilina durante o processo de produção desta. A análise de PG tem sido realizada por métodos como: ensaio microbiológico, titulação mercuriométrica, métodos espectrofotométrico utilizando agentes de derivatização como, hidroxilamina, imidazole, ácido cloroplátinico e cromatografia. Análise cromatográfica é de longe a técnica mais popular para a separação de impurezas e produtos de degradação da PG. O pH é um fator crítico para o desenvolvimento de um método cromatográfico, pois pequenas diferenças no valor de pK pode promover a separação de substância parecidas. É importante verificar a estabilidade de PG frente a pH, sendo o melhor 6,5 (ALICINO et al., 1946; GRIME et al., 1979; RAYCHOWDHURY et al., 1979; YONGXIN et al., 1997). Devido a pouca capacidade de absorção de energia da penicilina muitos autores utilizam etapas de derivatização para detectar baixas concentrações deste antibiótico (FOULSTONE et al., 1982). Entretanto, a toxicidade dos reagentes de derivatização e o tempo gasto na análise tornam o método cromatográfico pouco atraente, principalmente num estudo em que muitas amostras serão analisadas.

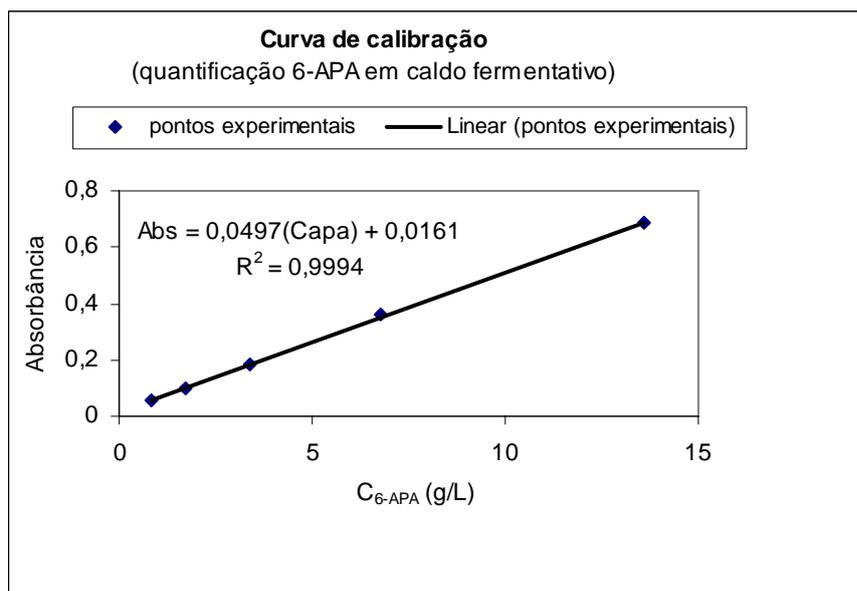
A quantificação de 6-APA em caldo fermentativo foi investigada utilizando diferentes métodos, como iodométrico e cromatográfico (ALICINO et al., 1961; IVASHKIV et al., 1964). O bioensaio (baseado no diâmetro do halo que se forma no cultivo em placa de uma bactéria sensível à penicilina, na presença de amostra contendo antibiótico) poderia ser utilizado na quantificação de penicilina, apesar de demorado e ser menos preciso que o cromatográfico. Contudo, para 6-APA, a baixa bioatividade dessa molécula torna a aplicação desse método limitada. Outra estratégia a ser utilizada consiste em determinar indiretamente a concentração de 6-APA através da formação de penicilina sintética e sua quantificação por hidroxilamina.

Com base nos obstáculos descritos acima, foi implementada uma metodologia de análise de penicilina G e 6-APA utilizando espectrofotômetro. A precisão e exatidão do método desenvolvido dependem das condições de análise estabelecidas como: volume e concentração do reagente, volume e composição da matriz contendo o analito, concentração do analito e outros (SHEWALE et al., 1987). O caldo fermentativo é uma matriz complexa com altas quantidades de proteínas, a presença de fase líquida secundária (anti-espumante) e partículas sólidas, por exemplo, provenientes da água de maceração de milho (Schugerl e Seidel, 1998). Assim, muitas moléculas podem interferir na quantificação do analito de interesse. O aldeído utilizado reage com qualquer composto que apresente aminas primárias,

com distintas velocidades de reação. Além disso, dependendo da estrutura química do composto aminado, diferentes cores podem surgir desta reação.

Portanto, a aplicação deste método para quantificar 6-APA em caldo fermentativo exige uma investigação detalhada do efeito de interferentes sobre a análise. Neste trabalho, a metodologia implementada utiliza 25  $\mu$ L de amostra e 2,5 mL da solução de PDAB. Esta relação entre os volumes foi necessária para que a interferência da cor do caldo fermentativo sobre os valores de absorvância fosse mínima, visto que a amostra foi muito diluída.

Amostras de caldo fermentativo livre de 6-APA foram utilizadas como controle, para estimar o valor de absorvância devido aos interferentes. Observou-se que somente 0,010 u.a. correspondiam à absorção por interferentes. Esses valores são relativamente pequenos, mesmo comparados a valores obtidos para soluções com baixas concentrações de 6-APA. Portanto, a metodologia mostrou-se viável para quantificar 6-APA em caldo fermentativo. Visando aumentar a exatidão do método, a curva de calibração foi construída utilizando como solvente para o preparo de soluções de concentração conhecida do analito, caldo fermentativo livre de 6-APA, e o branco também foi preparado misturando-se 25  $\mu$ L deste caldo a 2,5 mL da solução de PDAB. O tempo de reação foi de 2,5 minutos e a leitura foi realizada a 415 nm. A curva de calibração e equação obtidas são mostradas na Figura 5.38.



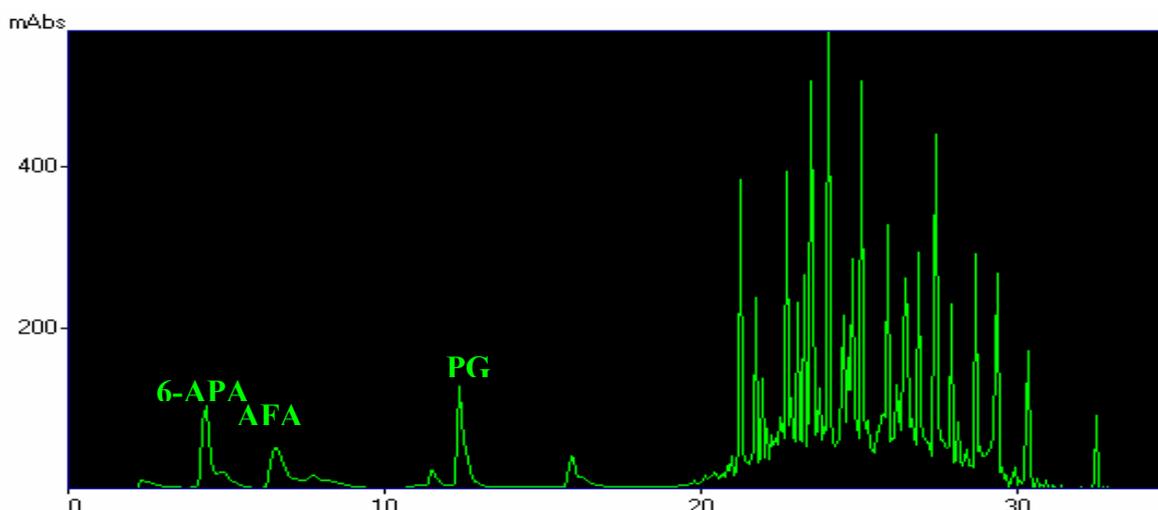
**Figura 5.38:** Curva de calibração para quantificação de 6-APA em caldo fermentativo. Faixa de concentração: 0,85-13,57 g/L; Volume amostra: 25  $\mu$ L; Volume PDAB: 2,5 mL; Tempo de reação: 2,5 min a temperatura ambiente; Comprimento de onda: 415 nm.

A concentração de penicilina G pode ser determinada indiretamente utilizando este método. A cada amostra retirada do fermentador, 25 µL eram separados para a quantificação direta de 6-APA e 1 mL era submetida a hidrólise por penicilina G acilase. Assim, a concentração molar de 6-APA na amostra hidrolisada menos a concentração de 6-APA medida diretamente resulta na concentração de penicilina. Os resultados obtidos utilizando essa metodologia simples e rápida mostraram-se satisfatórios quando comparados aos resultados obtidos por HPLC (Tabela 5.10).

**Tabela 5.10: Comparação entre os métodos HPLC e Hidrólise enzimática. Dados da dissertação de mestrado de Barros, 2008**

	HPLC	Hidrólise enzimática
Conc. Teórica de PG (g/L)	Conc. de PG (g/L)	Conc. de PG (g/L)
50,00	49,65	48,85
25,00	23,56	26,11
12,50	13,21	12,27
6,25	6,21	6,34

Contudo, para algumas amostras ainda foi necessário uso do método cromatográfico para quantificação do consumo de ácido fenil acético - AFA e degradação de 6-APA durante o cultivo de *P. chrysogenum*. Foi utilizado gradiente de concentração de acetonitrila para separação de analitos de grande similaridade química, conforme protocolo adaptado por Silva, 2003). Os resultados obtidos na resolução dos picos foram satisfatórios, como mostra a Figura 5.39.



**Figura 5.39: Cromatograma separação APA, AFA e PG.**

No método cromatográfico, as equações 1, 2 e 3, foram utilizadas para determinar a concentração de 6-APA, penicilina e AFA respectivamente, em amostras desconhecidas.

$$C_{\text{APA}} \text{ (mg/L)} = (\text{área do pico}) * 0,244 * 10^{-3} + 0,4189 \dots \dots \dots (1)$$

$$C_{\text{AFA}} \text{ (mg/L)} = (\text{área do pico}) * 0,114 * 10^{-3} - 23,4338 \dots \dots \dots (2)$$

$$C_{\text{PG}} \text{ (mg/L)} = (\text{área do pico}) * 0,077 * 10^{-3} + 1,0576 \dots \dots \dots (3)$$

O método colorimétrico utilizado neste trabalho ajudou a prevenir a perda de eficiência da coluna cromatográfica, evitando a aplicação de grande número de amostras do caldo fermentativo. A perda de eficiência da coluna pode ser detectada se o tempo de retenção dos analitos diminui com o tempo de uso (SCHUGERL e SEIDEL, 1998). Para análise em HPLC, o ideal é remover as proteínas da amostra, por exemplo, com precipitação utilizando metanol e microfiltração.

Após estabelecer as condições de análise, iniciaram-se os testes com o microrganismo de estudo. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos no item a seguir.

### **5.3.2 Determinação das Condições adequadas de Cultivo de *P. chrysogenum* (peletização)**

O primeiro teste com *P. chrysogenum* foi realizado em *shaker*. O cultivo em batelada foi realizado como descrito no item 3. Nessa condição, observou-se que o fungo cresceu sob a forma de *pellet*.

O uso de sacarose para o cultivo de *P. chrysogenum* viabiliza a operação no modo batelada porque o consumo deste açúcar pelo fungo é mais lento que o consumo de glicose, visto que a sacarose deve ser convertida primeiramente em açúcares menores, pois somente dessa forma pode ser absorvida pelo fungo.

A limitação do oxigênio dissolvido no cultivo em *shaker* deve ter sido a causa da peletização do fungo, pois quando as mesmas concentrações iniciais de açúcar e inóculo foram utilizadas em biorreator, o fungo cresceu de forma filamentosa. O controle de oxigênio dissolvido no reator deve ter impedido a peletização. A Figura 5.40 mostra uma foto do biorreator após cinco dias de cultivo em bioreator no modo batelada.



**Figura 5.40:** Cultivo de *Penicillium chrysogenum* em biorreator no modo batelada utilizando concentração inicial de sacarose de 25 g/L e 100 mL de inóculo.

O crescimento do fungo na forma filamentosa é comum quando se utiliza substratos que são metabolizados rapidamente. O aumento na viscosidade que acompanha o crescimento do fungo filamentoso impede fortemente a transferência de oxigênio e este efeito pode explicar baixos títulos do produto de interesse (CASAS LÓPEZ et al., 2005, HENRIKSEN et al., 1997).

Outra variável importante para o cultivo de fungos em biorreator é a concentração inicial de células (CASAS LÓPEZ et al, 2005). Um excesso de células vegetativas poderia justificar o rápido consumo de sacarose (aproximadamente 93 % da concentração inicial após 43 h) e o alto crescimento celular do *P. chrysogenum* na forma filamentosa.

Inicialmente, o cultivo foi realizado transferindo-se os esporos armazenados em tubo inclinado para 100 mL de meio fresco, mantido sob agitação a 25 °C por 24 h. A seguir, todo o volume era transferido para o biorreator. Para verificar o efeito da quantidade inicial de células, o inóculo foi preparado como descrito anteriormente, entretanto, volumes menores eram transferidos para o biorreator. Para a composição do meio de cultivo estabelecido neste trabalho e cultivo no modo batelada, 10 % do volume de inóculo permitiram a formação de pellet em biorreator. Este resultado pode ser visualizado na foto da Figura 5.41.



**Figura 5.41:** Cultivo de *Penicillium chrysogenum* em bioreator no modo batelada utilizando concentração inicial de sacarose de 25 g/L e 10 mL de inóculo.

Apesar de obter o crescimento do fungo na forma de *pellet* em biorreator, para conseguir simular a condição industrial da produção de penicilina G, era necessário manter a viabilidade celular. Isso foi possível controlando a concentração da principal fonte de carbono (sacarose) ao longo do cultivo.

Alguns métodos descrevendo o perfil de adição de diferentes fontes de carbono em cultivos de *P. chrysogenum* são descritos na literatura, entretanto, para cada cepa existe um perfil ótimo para atingir a máxima produção de penicilina, a qual está associada ao crescimento desse fungo. Para a cepa utilizada neste trabalho, iniciou-se o cultivo com uma concentração de sacarose de 10 g/L e após 24 h de cultivo adicionava-se um volume de solução de sacarose (100 g/L) ao bioreator para atingir a concentração de 1 g / L. Novas adições eram realizadas a cada 12 h. Controlando-se a concentração de sacarose nesse nível, Foi possível crescer o fungo na forma de *pellet* para favorecer a produção do antibiótico e manter a viabilidade celular.

### 5.3.3 Controle de Contaminação

Um fator crítico para o estudo da viabilidade da hidrólise de penicilina G durante o cultivo *P. chrysogenum* é a garantia da esterilidade do meio. A contaminação deste meio por bactérias causa a inibição do crescimento do fungo, pois a bactéria multiplica-se mais rapidamente, consumindo os nutrientes.

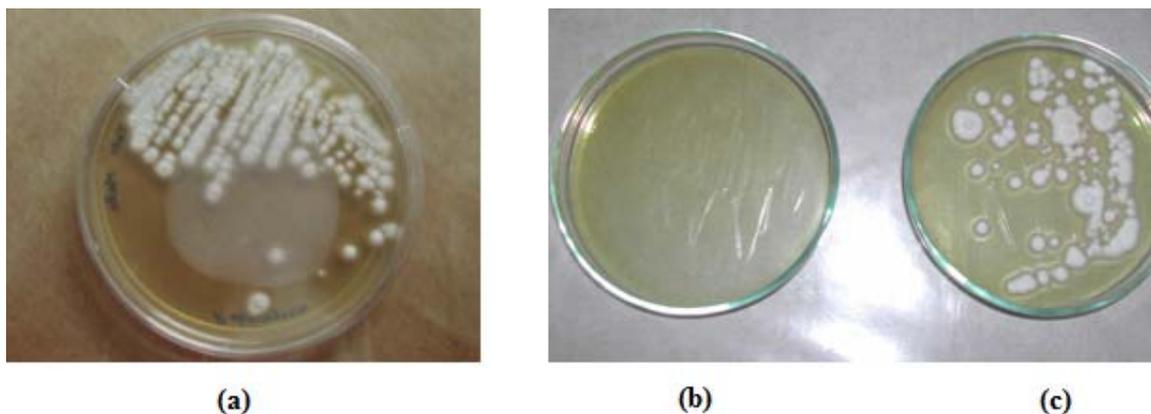
A esterilização do meio de cultivo normalmente é realizada aquecendo o mesmo a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. Contudo, o biocatalisador a ser adicionado ao meio de produção também deve estar estéril e não pode ser esterilizado a quente, pois causaria a inativação da enzima. Portanto, foi necessário encontrar um método químico para esterilizar o biocatalisador. A eficiência dos métodos testados era acompanhada realizando-se testes de contaminação do caldo fermentativo e do biocatalisador, através da inoculação de amostras do caldo de cultivo contendo o biocatalisador em placas contendo meio de crescimento sólido para crescimento de fungos e bactérias.

A esterilização do biocatalisador foi primeiramente realizada mantendo 1 g deste em contato com 10 mL de uma solução 1% m/v de azida. A mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o biocatalisador foi lavado com água estéril em câmara asséptica. O biocatalisador foi transferido para um meio de cultivo estéril, idêntico ao meio utilizado para crescimento de *P. chrysogenum*, e mantido em agitação de 250 rpm a 25 °C por 24 h. Em seguida uma alíquota deste meio foi aplicada em placa para teste de contaminação e após 24 h a placa era observada para verificar se havia o crescimento de contaminantes. Após comprovar a esterilidade do biocatalisador o mesmo era transferido para o biorreator.

Ao final do cultivo o biocatalisador foi separado, lavado e armazenado a 4 °C. Antes de ser reutilizado o biocatalisador passava novamente por todas as etapas de esterilização e teste de contaminação.

A metodologia para controle de contaminantes, utilizando azida 1% m/v, foi realizada várias vezes e mostrou-se viável, indicando que a técnica garantia a não contaminação do meio de cultivo com a adição do biocatalisador. Entretanto, quando um dos cultivos foi contaminado após vários dias de fermentação por um microrganismo desconhecido e o biocatalisador retirado desse meio foi tratado com azida 1 % m/v, o teste de contaminação mostrou que ainda havia crescimento do microrganismo indesejado. Para eliminar o contaminante, o biocatalisador foi tratado com solução azida 10 % p/v, o que causou grande perda de atividade catalítica (50%). Portanto, foi necessário utilizar outro agente químico, com maior potencial de esterilização e que não causasse perda de atividade catalítica.

A literatura cita o iodo como um dos mais eficientes agentes de esterilização (BENJAMIM e CUMMING, 1993). Neste trabalho, uma solução de iodo 50  $\mu$ M foi utilizada. Observou-se que este agente é eficiente para esterilização (Figura 5.42) e não causa perdas significativas da atividade catalítica.



**Figura 5.42:** Teste de contaminação: (a) alíquota retirada do inóculo; (b) alíquota retirada do meio de cultivo esterilizado e incubado com o biocatalisador; (c) alíquota retirada do biorreator após 120 h de cultivo.

Outra variável importante avaliada durante esses testes foi a estabilidade da PGA nas condições do cultivo. A atividade enzimática utilizando o método do PDAB foi realizada antes ( $28,0 \pm 3,5$ ) e após a utilização dos pellets ( $29,4 \pm 1,8$ ). Os resultados mostram que, aparentemente, não houve perda de atividade enzimática, o que já era esperado pois a enzima havia sido imobilizada por ligação covalente multipontual.

### 5.3.4 Conclusões Parciais

A quantificação de 6-APA e penicilina G em caldo fermentativo foi possível utilizando o método de Balasingham modificado.

O crescimento de *P. chrysogenum* na forma de *pellet* depende fortemente das condições de aeração e alimentação de sacarose. Foi necessário realizar o cultivo no modo batelada alimentada mantendo a concentração de sacarose suficientemente baixa para garantir o crescimento do fungo na forma de *pellet*, entretanto sem comprometer a viabilidade celular.

Solução de iodo 50  $\mu$ M mostrou-se eficiente para esterilização do biocatalisador, sem causar perdas significativas da atividade catalítica.

O biocatalisador manteve 100% de atividade após uso em biorreator por 120 horas.

#### **5.4 Produção e Hidrólise de Penicilina G em Biorreator**

Após estabelecer a metodologia de análise de penicilina G e 6-APA em caldo de cultivo, determinar as condições de cultivo para o *P. chrysogenum* e de esterilização para o biocatalisador, iniciou-se a etapa de produção e hidrólise de penicilina G em biorreator.

As condições de temperatura e pH necessárias para o cultivo de *P. chrysogenum* diferem bastante das condições ótimas para hidrólise de penicilina G catalisada por penicilina G acilase. Valores típicos em indústria dessas variáveis giram em torno de 25 °C e pH7, para cultivo, e 30 °C e pH 8,0, para hidrólise. Uma vez que o processo industrial já estabelecido é para o cultivo, decidiu-se trabalhar nas condições de pH e temperatura adequadas para o crescimento do microrganismo (pH7 e 25 °C). Para verificar a viabilidade da hidrólise de penicilina G durante o cultivo de *P. chrysogenum*, foi realizado um teste em *shaker*. O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma linhagem doada pela Fundação Tropical, esta cepa não foi capaz de produzir penicilina G nas condições de cultivo utilizada neste trabalho. Assim, para simular a situação que ocorreria no processo industrial de produção e hidrólise, preparou-se um cultivo do fungo e adicionou-se a este uma concentração conhecida do antibiótico. Uma vez que toda PG presente no caldo fermentativo é proveniente do que foi adicionado, o controle da concentração deste antibiótico é facilitado.

Os resultados da hidrólise em *shaker* mostraram que 50 % da penicilina G adicionada foi hidrolisada a 6-APA e fenil acético. Dois fatores importantes poderiam ser considerados para explicar este rendimento: efeito de inibição (por substrato, produtos ou outros componentes do meio) e controle de pH.

A inibição de PGA pelos produtos da hidrólise depende fortemente do pH. Para a hidrólise de penicilina G quanto menor o valor de pH, maior a inibição da enzima pelo ácido fenilacético (SPIEß et al., 1998)

Quanto ao efeito do pH, o valor inicial, 7, já está abaixo do valor ótimo para hidrólise (pH 8), e ao longo do cultivo ainda observou-se rápida redução deste valor (pH <6), devido à liberação de ácidos orgânicos pelo fungo, mas principalmente devido à liberação de AFA e 6-APA (produtos da hidrólise). Uma vez que o microrganismo não está produzindo penicilina G, não está havendo consumo de AFA, como deverá ocorrer no processo industrial. Como consequência da diminuição do pH a velocidade de hidrólise torna-se muito lenta. O efeito de inibição associado à falta de controle do pH ao longo do cultivo resultou em baixo rendimento de hidrólise em *shaker*.

Para obter melhores rendimentos de hidrólise, o cultivo de *P. chrysogenum* foi realizado em biorreator, no qual foi possível o controle automático do pH, pela adição de hidróxido de amônio.

#### 5.4.1 Cultivo de *P.chrysogenum* em Tanque Agitado (Modo Batelada)

O primeiro experimento em biorreator (capacidade 2L) foi realizado no modo batelada (concentração inicial de sacarose de 25 g/L). A este meio foi adicionado 6,13 g de biocatalisador (esferas de 4 mm de diâmetro contendo PGA imobilizada) . A cada 12 h, 3g de penicilina eram adicionadas ao meio de cultivo até atingir uma concentração final adicionada de 30 g/L, a qual corresponde à concentração atingida em processos industriais.

O controle do pH ao longo do cultivo resultou em 75,8 % de conversão de PG. O perfil da curva de produção de 6APA ao longo do tempo é apresentado na Figura 5.43. Esse valor é relativamente baixo comparado aos valores obtidos quando a hidrólise é realizada em meio aquoso a pH 8, o qual atinge níveis de 98% (GASQUES, comunicação pessoal).

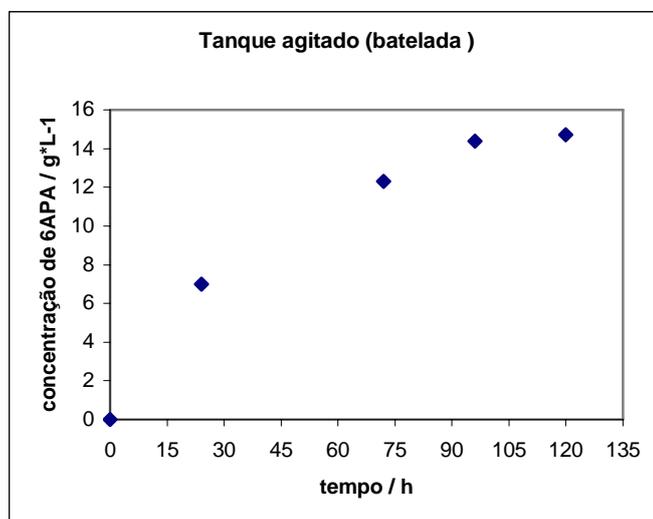


Figura 5.43: Produção de 6APA em biorreator (capacidade 2L) a pH7, temperatura de 25°C e concentração do biocatalisador de 3 g/L.

O rendimento de hidrólise obtido neste experimento pode ser atribuído, principalmente, à forma de crescimento do fungo em biorreator. Em *shaker*, observou-se a forma de *pellet* do fungo, enquanto em biorreator este cresceu sob a forma filamentosa (tópico já discutido no item 4.3.2). Portanto apesar do ajuste contínuo do pH, o alto crescimento

celular do fungo na forma filamentosa dificultou o acesso das moléculas de PG à PGA imobilizada em agarose.

Nesse experimento realizado em biorreator, com o objetivo de comparar os resultados com aqueles obtidos em *shaker*, utilizou-se agitação constante 250 rpm. Para verificar se era realmente a variação da viscosidade do meio a causa de não se ter atingido conversões próximas de 100%, decidiu-se variar a velocidade de agitação de 200 a 600 rpm.

#### **5.4.2 Cultivo de *P.chrysogenum* em Tanque Agitado (Modo Batelada Alimentada)**

Neste experimento, três variáveis foram alteradas: modo de alimentação de sacarose, velocidade de agitação e concentração inicial de células (por aumentar o volume de caldo fermentativo e manter o volume de inóculo). Essas modificações foram realizadas com o objetivo de fazer o fungo crescer na forma de *pellet* e aumentar a eficiência de hidrólise.

O cultivo foi realizado no modo batelada alimentada, com concentração inicial de sacarose de 25 g/L, em biorreator com capacidade de 6L. Foram utilizados para um volume de 4L do meio de cultivo, 12 g de biocatalisador. Penicilina G foi adicionada como descrito acima até atingir a concentração de 30 g/L. Durante todo o cultivo foram monitoradas a concentração de 6APA, PG e sacarose.

A Figura 5.44 mostra o perfil do consumo de sacarose ao longo do cultivo. O monitoramento da concentração de sacarose ao longo do cultivo foi realizado para garantir que a concentração de açúcar no meio não ficasse abaixo de 1 g/L.

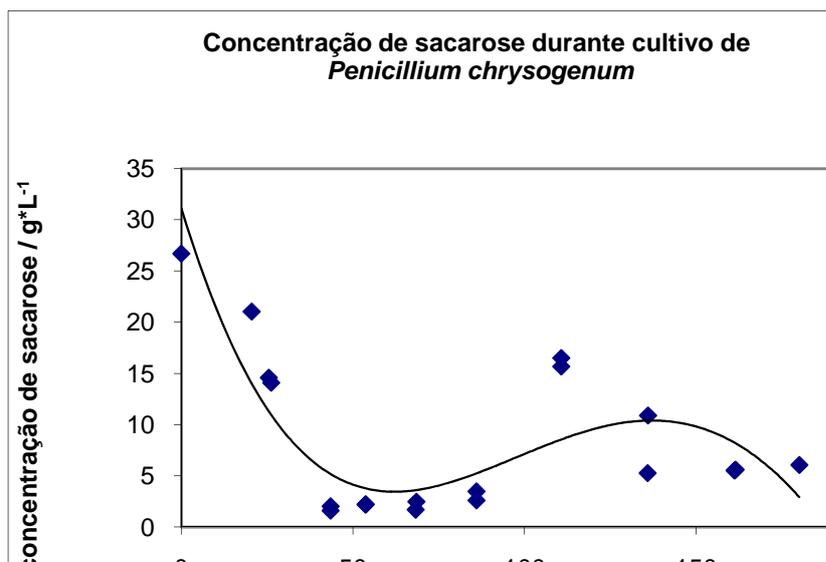


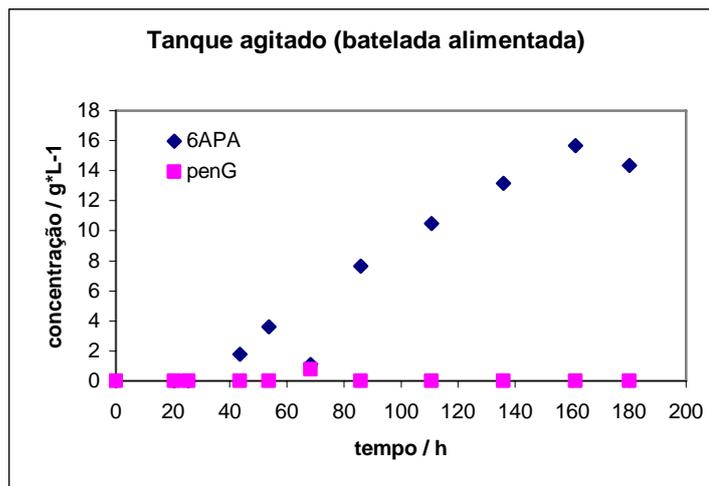
Figura 5.44: Perfil da concentração de sacarose durante o cultivo de *P. chrysogenum* em biorreator.

Em escala industrial o cultivo de *P. chrysogenum* é mantido por dez dias (GASQUES, comunicação pessoal). Neste experimento, o cultivo foi mantido por 7 dias e iniciou-se com uma concentração de 25 g/L. Somente após 120 h foi necessário adicionar sacarose, pois se observou uma redução na velocidade de consumo de oxigênio dissolvido. Assim, adicionou-se sacarose até atingir a concentração de 15 g/L e a velocidade de consumo de oxigênio voltou a aumentar. O gráfico da Figura 4.46 mostra que grande parte da sacarose é consumida nas primeiras 48h do cultivo, após esse tempo não se observa grandes variações na concentração de açúcar do meio nem variação na massa de fungo.

Considerando os resultados apresentados na Figura 4.46, nos experimentos seguintes, sacarose foi adicionada ao biorreator a cada 12 h para minimizar a morte do fungo pela ausência da fonte de carbono. Adicionou-se massa de sacarose suficiente para atingir a concentração de 1 g/L a cada 12 h. A adição de quantidades de sacarose em intervalos de tempo menores garante a viabilidade das células.

Apesar de reduzir a concentração inicial de células à metade, ainda não foi possível obter o crescimento do fungo na forma de *pellet* neste experimento. Entretanto, nesta etapa do trabalho, a concentração do inóculo foi fixada em 2,5 % v/v.

Visto que a velocidade de agitação influencia fortemente a eficiência de hidrólise, esta variável foi investigada isoladamente. A Figura 5.45 apresenta o perfil da hidrólise de PG ao longo do tempo, obtido com velocidade de agitação variando de 200 a 600 rpm.



**Figura 5.45:** Concentração de 6APA e penG em bioreator (capacidade 6L) a pH7, temperatura de 25°C e concentração do biocatalisador de 3 g/L.

A agitação durante o cultivo aumentou de 200 para 500 rpm nas primeiras 24h e foi mantida a 500 rpm por 4 dias. No sexto dia de cultivo a velocidade de agitação foi aumentada para 600 rpm. Com este perfil de agitação observou-se que 100% da PG adicionada foi hidrolisada. Entretanto, este resultado não pode ser considerado satisfatório, visto que todas as esferas contendo PGA imobilizada foram quebradas devido à forte agitação utilizada e não puderam ser recuperadas.

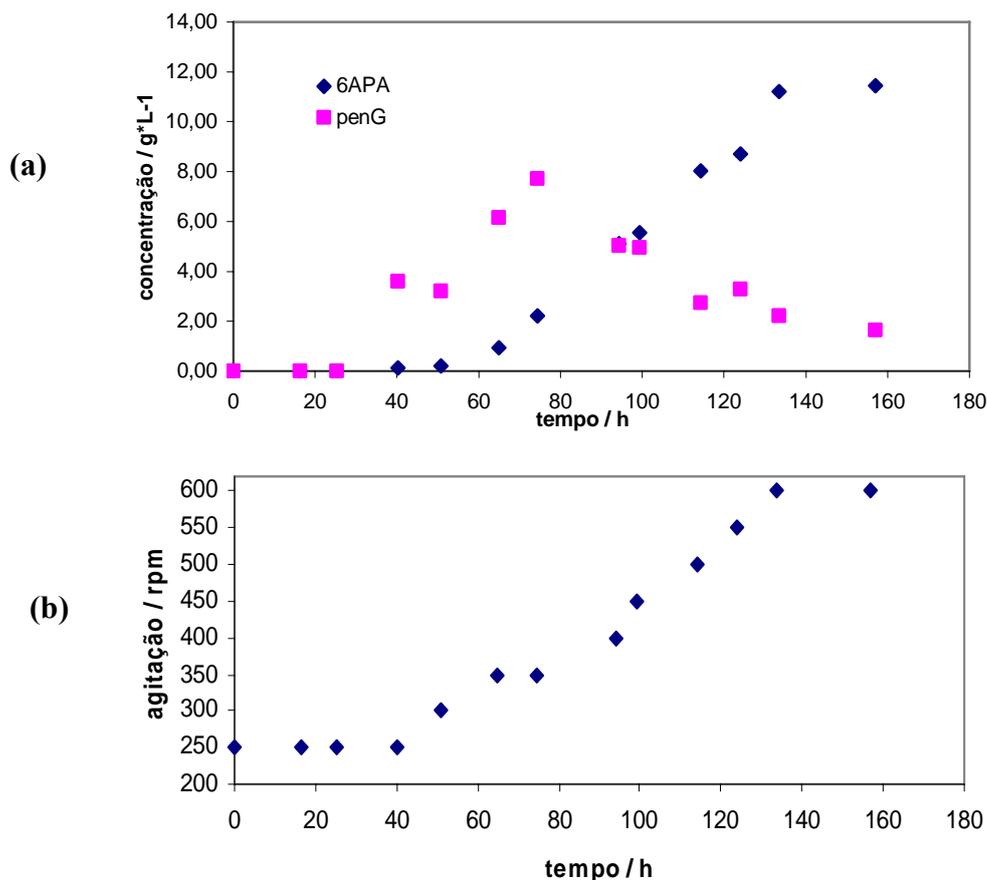
## **5.5 Estratégias para Manter a Integridade do Biocatalisador em Biorreator**

Seis estratégias diferentes foram utilizadas para evitar a fragmentação do biocatalisador durante a hidrólise de PG em biorreator. A primeira alternativa foi aumentar gradativamente a agitação em função do crescimento do fungo. A segunda consistiu em confinar o biocatalisador em uma rede metálica, fixada ao lado do eixo contendo os impelidores. Outras três estratégias foram desenvolvidas para manter os impelidores dentro de “gaiolas”, permitindo a passagem do caldo fermentativo, mas mantendo o biocatalisador movimentando-se em todo o volume externo da “gaiola”. A sexta alternativa foi avaliar a utilização de reator pneumático do tipo “airlift”, no qual a ausência de impelidores garantiu a integridade do biocatalisador ao final do processo. Os resultados obtidos em cada etapa são apresentados e discutidos nos próximos itens.

### **5.5.1 Efeito da Agitação Sobre a Integridade e Atividade do Biocatalisador**

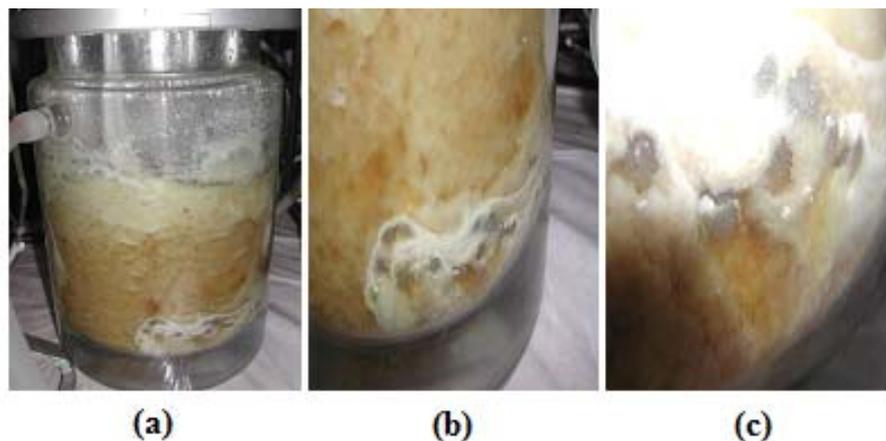
Para manter a integridade do biocatalisador, o experimento descrito no item 4.4.2 foi reproduzido, entretanto a variação da agitação foi atenuada e aumentada até 600 rpm. Neste procedimento, o aumento da agitação acompanhou o crescimento do fungo, pois na medida em que aumenta a massa deste em biorreator, os choques entre o biocatalisador e os impelidores são minimizados. A brusca variação na agitação do experimento anterior (250 a 500 rpm em 24 h) causou a rápida fragmentação do biocatalisador. O perfil de agitação e hidrólise de PG ao longo do cultivo pode ser visualizado nos gráficos da Figura 5.46.

Os resultados mostram que a hidrólise é fortemente favorecida a partir da agitação de 400 rpm para as condições do cultivo. Entretanto, o aumento deste valor até 600 rpm, mesmo quando a massa de fungo atinge valores máximos, ainda é prejudicial para a integridade dos pellets e não foi suficiente para hidrolisar toda a PG em 5 dias. Neste experimento, 92% de PG foi hidrolisada e 8% da massa dos pellets foram destruídos.



**Figura 5.46:** Efeito da agitação sobre a hidrólise de PG durante o cultivo de *P.chrysogenum*. (a) Concentração de 6-APA e PG ao longo do cultivo de em bioreator (capacidade 2L) a pH 7, temperatura de 25°C e a quantidade do biocatalisador foi de 12 g dispersos em 4 litros de caldo fermentativo; (b) Perfil da agitação.

Além do controle de agitação, é necessário também um controle rígido sobre o crescimento do fungo. A agitação mais branda associada ao elevado crescimento da massa de fungo diminui o movimento do biocatalisador dentro do bioreator, favorecendo o envolvimento deste por uma capa de fungos. A Figura 5.47 mostra fotos tiradas durante o funcionamento do biorreator, destacando o biocatalisador parado e envolvido por *P. chrysogenum*.



**Figura 5.47:** Foto do bioreator no quinto dia de funcionamento: (a) imagem completa, (b) destaque dos pellets envolvidos pelo fungo e (c) aumento da imagem dos pellets envolvidos.

Acredita-se que, em cultivos com melhor controle do crescimento do fungo, para atingir valores máximos de hidrólise sem causar perdas do biocatalisador, a agitação não deve ultrapassar 400 rpm e o tempo deve ser prolongado até hidrólise total da PG. Dados da literatura mostram que em culturas de *Aspergillus terreus*, uma agitação de 300 rpm promoveu crescimento do pellet do fungo, e velocidade de agitação superior a este valor causou fragmentação dos pellets quando se utilizou o biorreator com volume de 2 L (Casas López, 2005).

Em alguns processos, a forte agitação pode ser exigida para facilitar a transferência de oxigênio, permitindo a fragmentação das bolhas de ar e tornando mais acessível o oxigênio ao fungo. Para estes processos, a estabilidade mecânica do biocatalisador utilizado neste trabalho não é suficiente para suportar a fragmentação causada pelos impelidores. Mesmo esferas produzidas com material de estabilidade mecânica similar à estabilidade dos impelidores seriam inviáveis, visto que, o choque entre ambos danificaria o poder de corte dos impelidores e diminuiria a eficiência deste para fragmentar bolhas de ar.

Considerando os obstáculos descritos acima, outras estratégias foram investigadas para evitar o impacto do biocatalisador com os impelidores.

### 5.5.2 Confinamento do Biocatalisador em Rede Metálica

A Figura 5.48 apresenta o esquema do aparato utilizado na proteção do biocatalisador contra os impelidores.

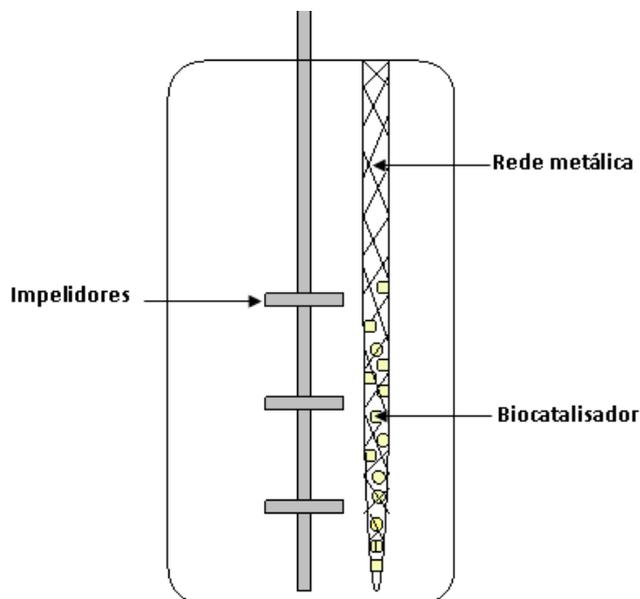


Figura 5.48: Esquema do aparato montado para confinar o biocatalisador dentro do bioreator.

A rede metálica foi fixada o mais próximo possível do eixo dos impelidores para aumentar a velocidade de troca do líquido dentro da rede metálica, favorecendo assim, a hidrólise de PG. Após 48 h de cultivo este experimento foi interrompido, pois se observou aderência do fungo sobre a rede metálica, formando uma camada que impedia a troca de líquido entre o meio interno e externo à rede. A Figura 5.49 mostra fotos com detalhes externos e internos da rede metálica após 48 h de cultivo.

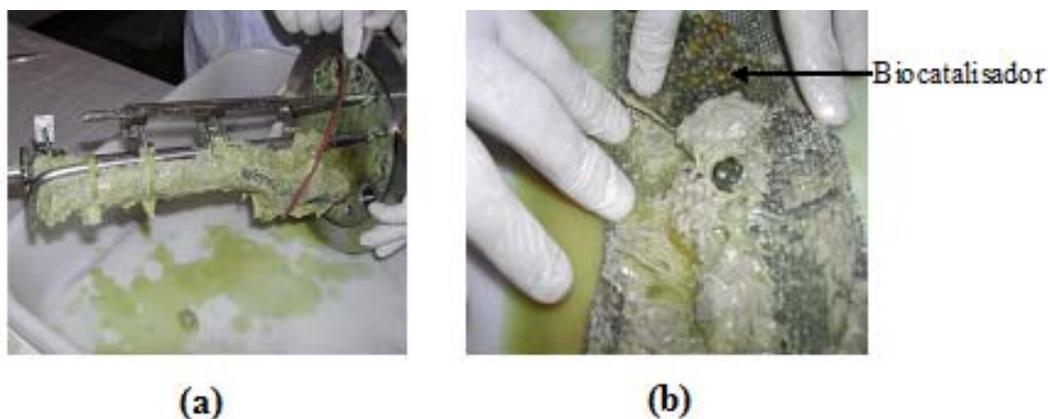
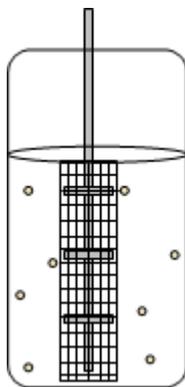


Figura 5.49: Foto do aparato (rede metálica) utilizado para confinar o biocatalisador durante o cultivo de *P. chrysogenum*. (a) Detalhes externos; (b) Detalhes internos.

Apesar de manter a integridade dos pellets, a estratégia de manter os pellets confinados em uma rede dentro do biorreator não se mostrou tecnicamente viável, pois o fungo aderiu sobre a superfície da rede e não houve hidrólise de PG.

### 5.5.3 Confinamento dos Impelidores em Rede Metálica

Numa tentativa de evitar o crescimento do fungo sobre a superfície da rede metálica, a mesma foi acoplada ao biorreator sobre os impelidores de maneira que girasse junto com o impelidor, enquanto o biocatalisador movimentava-se na parte externa da rede metálica. Um esquema deste aparato é apresentado na Figura 5.50.



**Figura 5.50:**Esquema do aparato (rede metálica) utilizado para confinar os impelidores durante o cultivo de *P. chrysogenum*.

Um teste em meio aquoso mostrou que a rugosidade da estrutura da rede metálica associada à sua velocidade de agitação (equivalente à dos impelidores, 600 rpm) resultou na fragmentação instantânea do biocatalisador. Outra tentativa de utilização desta rede metálica foi feita mantendo a mesma fixa ao redor dos impelidores, mas desta maneira o fungo aderiu sobre a rede e a agitação no volume externo à rede tornou-se nula após 48 h de cultivo.

Apesar dos resultados obtidos anteriormente, a idéia de manter uma “gaiola” fixa ao redor dos impelidores não foi descartada. Entretanto, buscou-se um material com superfície lisa para evitar a aderência do fungo. Os resultados obtidos com uma chapa metálica perfurada são apresentados no item a seguir.

#### 5.5.4 Confinamento dos Impelidores em Chapa Perfurada

A Figura 5.51 mostra uma foto do bioreator acoplado a uma chapa perfurada, a qual rodeia os impelidores. O diâmetro dos furos da chapa é suficientemente pequeno para não permitir a passagem do biocatalisador, mas permitir o fluxo do caldo fermentativo. Como descrito anteriormente o biocatalisador permaneceu em movimento na parte externa à chapa perfurada, livre da ação dos impelidores.



**Figura 5.51: Biorreator acoplado à chapa perfurada.**

O fato de usar um material de superfície lisa, associado à lavagem constante dos furos através do líquido lançado pelos impelidores de dentro para fora da placa parecia suficiente para evitar o crescimento do fungo sobre esta. Testes de estabilidade mecânica do biocatalisador, em água, foram realizados com este aparato e não foi observada destruição do mesmo quando a velocidade de agitação variou de 500 a 900 rpm num intervalo de dez dias.

Foi realizado um cultivo no qual a concentração inicial de células foi reduzida, utilizando-se agora somente 10 mL de inoculo para 4 L totais. Desta maneira, obteve-se o crescimento do fungo na forma de pellet e esta condição foi mantida para todos os cultivos seguintes. Apesar de haver formação de pellets, a utilização do aparato descrito acima promoveu forte aderência do fungo à superfície da chapa perfurada. As fotos da Figura 5.52 mostram o aspecto do bioreator e detalhes da chapa perfurada coberta pelo fungo.

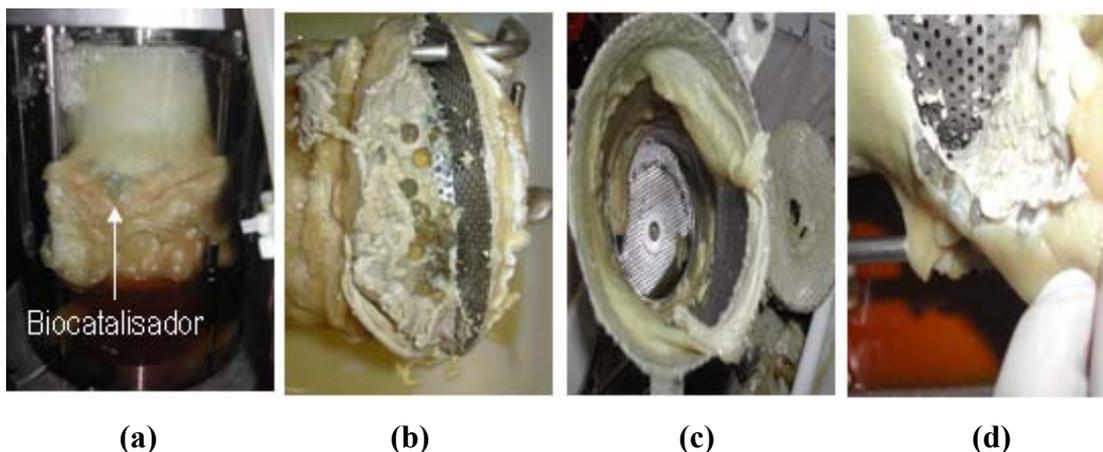


Figura 5.52: Fotos do biorreator após cultivo de *P. chrysogenum* utilizando chapa perfurada. (a) biorreator; (b) detalhe da parte inferior da chapa perfurada; (c) parte interna da chapa (d) biocatalisador preso entre a massa de fungo e a chapa perfurada.

O perfil de hidrólise de PG utilizando a chapa perfurada é apresentado na Figura 5.53.

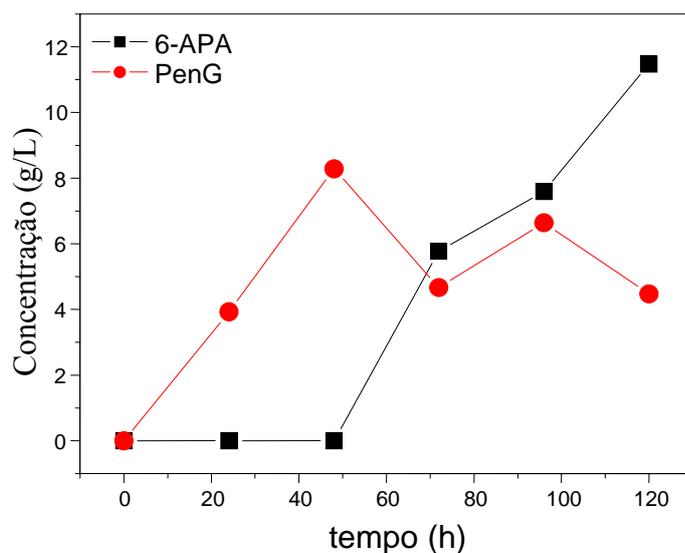


Figura 5.53: Perfil da concentração de PG e 6-APA durante o cultivo de *P. chrysogenum* em bioreator.

Nestas condições, observou-se um rendimento de 81,0 % de hidrólise de PG e nenhuma perda do biocatalisador. A velocidade de hidrólise após 5 dias de cultivo tornou-se muito lenta, devido ao aprisionamento do biocatalisador junto à camada de fungos sobre a chapa perfurada, como mostra a Figura 5.52.

O uso da chapa perfurada permitiu atingir níveis de hidrólise razoáveis e nenhuma perda por fragmentação do biocatalisador, entretanto, a separação entre este e a massa de fungo foi dificultada ao final do cultivo.

A aderência do fungo sobre a chapa perfurada ocorreu porque este material ainda apresentava um pouco de rugosidade. Para evitar a aderência foi aplicada à chapa, uma resina epóxi da WEICON. Entretanto, foi encontrada dificuldade na aplicação desta resina, pois a mesma apresenta elevada viscosidade e isto dificultou o revestimento na área dos furos.

Foi realizado cultivo para avaliar o efeito do revestimento da chapa e, embora em grau menor, ainda se observou aderência do fungo a chapa. Com o objetivo de conseguir um revestimento perfeito, foi confeccionada outra peça de furos maiores. Entretanto, cultivos utilizando este aparato serão realizados em trabalhos futuros, visto que o biorreator, para o qual a peça foi feita apresentou defeitos no mecanismo de agitação.

### 5.5.5 Confinamento dos impelidores em helicóide

Apesar do uso da chapa perfurada revestida com uma resina epóxi ter se mostrado promissor para evitar a aderência do fungo, buscou-se uma nova alternativa para evitar a fragmentação do biocatalisador. Com o uso de um helicóide preparado com arame de aço inoxidável quase nenhuma aderência foi observada após 5 dias de cultivo. Além disso, este material é de baixo custo (R\$ 2,00 por metro) e o preparo do helicóide também é um procedimento simples e rápido. A Figura 5.54 apresenta o helicóide acoplado à tampa do bioreator após cinco dias de cultivo.



**Figura 5.54:** Helicóide após cinco dias em uso no cultivo de *P. chrysogenum*.

Nesta etapa do trabalho foi atingido o objetivo de realizar a hidrólise de penicilina durante o cultivo de *P. chrysogenum* com total recuperação do biocatalisador ao final do processo.

Após verificar a viabilidade deste processo, vários aperfeiçoamentos podem ser realizados para tornar o uso deste aparato ainda mais simples. Considerando que as dornas industriais para produção de penicilina têm capacidade superior a 50.000 litros, um helicóide de comprimento equivalente a altura da dorna poderia ser utilizado, entretanto, isso seria desnecessário, pois o objetivo é rodear somente os impelidores. Assim, uma das modificações sugeridas consiste em reduzir as dimensões do helicóide.

Neste trabalho, o helicóide confeccionado tem sua base aberta e apoiada no fundo do bioreator e a parte superior está acima da altura atingida pelo volume máximo de caldo fermentativo utilizado (1,7 L). A elaboração deste desenho foi feita para evitar a entrada do biocatalisador pelas extremidades do helicóide, atingindo assim, os impelidores. Entretanto, estas extremidades poderiam ser simplesmente fechadas por espirais do mesmo material, ou seja, a continuidade do helicóide seguiria uma espiral. Um desenho muito similar deste aparato é comercializado com o nome de “spiral cage” (para armazenar pedras preciosas) e pode ser visualizado na foto da Figura 5.55.



Figura 5.55: Spiral cage, Fonte: [www.orientaltrading.com](http://www.orientaltrading.com).

Todas as medidas referentes a este aparato (tamanho da peça, diâmetro do fio, distância entre os passos da hélice e outras) devem ser determinadas de modo que problemas de transferência sejam mínimos.

Do ponto de vista industrial, a utilização do aparato apresentado aqui é a melhor alternativa para a aplicação de um processo simultâneo de produção e hidrólise de PG, pois toda a estrutura já existente (dornas tipo tanque agitado) seria aproveitada e o

acoplamento da “gaiola” seria a única modificação, visando a utilização dos biocatalisadores sem perda por fragmentação.

Por outro lado, do ponto de vista científico, é interessante investigar a viabilidade deste processo em outro desenho de reator, pois para o cultivo de *P. chrysogenum* na forma de pellet é uma grande vantagem a utilização de reatores tipo “air lift”. Desta maneira no item a seguir são discutidos os resultados obtidos para hidrólise de penicilina G durante o cultivo de *P. chrysogenum* em “air lift”.

### 5.5.6 Produção de 6-APA em “Air Lift”

O cultivo de *P. chrysogenum* em “air lift” foi realizado seguindo o mesmo protocolo desenvolvido para o reator tanque agitado. Nestas condições, observou-se excelente aumento de massa celular na forma de pellet. A Figura 5.56 mostra uma foto do quarto dia de cultivo.



Figura 5.56: Crescimento de *P. chrysogenum* em air lift após quatro dias de cultivo.

Apesar de atingir uma ótima condição de crescimento do fungo, este sistema ainda precisa ser melhorado para atingir melhores graus de hidrólise, pois somente 46% da penicilina adicionada foi hidrolisada. Este resultado deve-se, principalmente, à estagnação do biocatalisador abaixo do aspersor de ar.

Uma vazão de ar três vezes menor (1 vvm) do que o valor recomendado (3 vvm) para estes sistemas ocasionou o acúmulo do biocatalisador abaixo do aspersor e conseqüentemente menor grau de hidrólise. O biocatalisador estagnado serviu como

superfície para crescimento do fungo, pois ao final do cultivo observou-se uma camada de fungo sobre este, o que afetou o rendimento da hidrólise.

A vazão de ar manteve-se baixa devido ao entupimento do aspersor de ar por componentes sólidos da água de maceração de milho. Erroneamente, este e outros nutrientes foram esterilizados em autoclave dentro do reator. Provavelmente, nessas condições de temperatura e pressão muitos componentes foram dissolvidos e penetraram na parte interna do aspersor e ao resfriar causaram o entupimento. Portanto, acredita-se que utilizando um sistema de aeração mais eficiente (aspersores com diâmetro de furos maiores) o “air lift” seja mais uma alternativa para produção de 6-APA em biorreatores.

### 5.5.7 Conclusões Parciais

A viabilidade do processo de hidrólise de PG durante sua produção por *Penicillium chrysogenum* depende fortemente do controle de pH, forma de crescimento do fungo e agitação.

Os resultados de hidrólise em shaker (sem controle de pH) e em bioreator (com controle de pH) comprovam o efeito do pH sobre os rendimentos, 50 e 72%, respectivamente.

O crescimento do fungo na forma de pellet foi obtido controlando-se a concentração inicial de células (10 mL de inóculo por litro de meio de produção) e concentração de sacarose no meio (concentração inicial 10 g/L e alimentação a cada 12 h para manter a concentração no meio acima de 1 g/L).

Experimentos realizados em reator tanque agitado mostram que é possível atingir hidrólise total de PG nas condições do cultivo (pH 7, 25 °C) com uma baixa concentração do biocatalisador (3 g/L).

Uma brusca variação na velocidade de agitação (250 a 600 rpm em 24 h) levou à destruição total do biocatalisador, entretanto, o aumento atenuado da agitação até 600 rpm só causou a perda de 8% deste, e a variação atenuada atingindo um máximo de 400 rpm não causou perda do biocatalisador por fragmentação. O biocatalisador não pode ser testado sob condições reais de agitação no reator industrial. É possível que nas condições de produção industrial de PG, a agitação necessária para manter a viabilidade do fungo não prejudique a integridade do biocatalisador. Contudo, também é possível que uma condição mais drástica de agitação seja necessária em alguns sistemas. Nesse caso, o uso de um aparato para proteger o biocatalisador da ação dos impelidores faz-se necessário.

Entre os vários aparatos investigados neste trabalho, o helicóide envolvendo os impelidores destacou-se por não sofrer aderência pelo fungo e ser preparado de maneira simples a partir de material de baixo custo.

Tecnicamente, o uso de reator tipo “air lift” pode ser uma alternativa ao reator tanque agitado para realizar o processo de produção de 6-APA durante o cultivo de *P. chrysogenum*. Entretanto, atualmente, a produção industrial de penicilina já conta com uma estrutura que utiliza dornas tipo tanque agitado e o acoplamento (se necessário) de um aparato ao redor de impelidores torna-se mais interessante do ponto de vista industrial.

### **5.6 Estudo Cinético da Hidrólise de Penicilina G em Meio de Cultivo**

Nesta etapa, o biocatalisador desenvolvido para atuar durante o bioprocessamento de produção e hidrólise simultâneos da penicilina G foi avaliado quanto à cinética. Em processos industriais a penicilina é hidrolisada à temperatura de aproximadamente 30 °C e pH 8,0. Nestas condições, a hidrólise de soluções de penicilina com elevada concentração é realizada em um curto intervalo de tempo e os rendimentos atingem valores acima de 95% (GASQUES, comunicação pessoal).

A proposta deste trabalho foi realizar essa hidrólise em meio não convencional, em condições de temperatura e pH onde a hidrólise não é favorecida. Além disso, as características do biocatalisador (esfera de 4 mm) tem efeito significativo sobre a velocidade de hidrólise de PG em biorreator. Parâmetros cinéticos nesta condição de hidrólise ainda não foram citados na literatura. Portanto fez-se necessário investigar o desempenho do biocatalisador e determinar tais parâmetros a fim de verificar a viabilidade econômica deste processo.

Os obstáculos descritos em itens anteriores para a hidrólise de PG durante o cultivo de *P. chrysogenum* são compensados por outras características do sistema. Por exemplo, uma das técnicas mais utilizadas para aumentar os rendimentos em reações que são inibidas pelo produto é a remoção destes produtos. No caso em estudo ocorre este fato ocorre naturalmente, pois ao realizar a hidrólise da PG durante o cultivo, o co-produto AFA (inibidor da reação de hidrólise), é consumido pelo fungo, tendo o papel de precursor para a síntese de penicilina e como fonte de carbono.

A adição de AFA em processos de produção de penicilina representa uma fração importante no custo final do produto. Ao realizar a hidrólise durante o cultivo, AFA é

liberado novamente para o meio e consumido pelo fungo para liberação de uma nova molécula de PG, este fato além de dispensar a adição de AFA ao meio, favorece a hidrólise, pois o inibidor é continuamente removido do ambiente reacional. Outra diferença neste processo de hidrólise é que a concentração de PG no meio deve ser muito baixa a cada instante, devido a hidrólise simultânea à produção, portanto espera-se que os parâmetros cinéticos obtidos aqui sejam diferentes daqueles obtidos utilizando condições de hidrólise convencional.

### 5.6.1 Velocidades Iniciais

No processo industrial convencional de produção de PG, o antibiótico acumula-se no biorreator até o final do cultivo; neste caso a temperatura é de 25 °C. Em outros processos, parte do caldo fermentativo, contendo penicilina G, é transferido para um tanque de armazenagem ( $T < 12$  °C) e meio fresco é adicionado à dorna de fermentação. Este procedimento é importante devido à instabilidade química e térmica deste antibiótico (MENEZES, 2000).

A hidrólise de PG pode ser realizada em ambos os sistemas de produção. As vantagens de realizar a hidrólise a 12 °C no tanque de armazenagem são: maior facilidade na separação do biocatalisador (menor quantidade de massa celular), menor perda de atividade catalítica e menor degradação do produto por efeito da temperatura. Apesar da velocidade de reação nessa condição de temperatura ser muito baixa, isto não seria um obstáculo, pois estes bioprocessos são realizados em até dez dias.

Por outro lado, se a hidrólise de PG é realizada dentro da dorna de fermentação (25°C), tem-se a vantagem da remoção de AFA pelo fungo, reduzindo efeitos inibitórios. Considerando que o biocatalisador utilizado neste trabalho apresenta excelente estabilidade térmica, conclui-se que a hidrólise de PG no tanque de armazenagem ou na dorna de cultivo apresenta vantagens sobre o processo industrial utilizado atualmente para a produção de 6-APA. Portanto, nesta etapa do trabalho, o estudo cinético foi realizado em duas temperaturas de interesse industrial (12 e 25 °C).

A análise dos parâmetros cinéticos foi realizada, inicialmente, utilizando o método de velocidades iniciais. O tempo de reação foi estabelecido de maneira que a conversão não ultrapassasse 10% para evitar efeitos de inibição e a reação inversa.

O efeito da temperatura sobre a atividade catalítica foi investigado para PGA na forma livre e imobilizada com o objetivo de compreender também o efeito da imobilização nas propriedades finais da enzima.

O objetivo nesta etapa do trabalho foi estimar os parâmetros cinéticos para a hidrólise da PG em biorreator durante o cultivo de *P. chrysogenum* pelo método das velocidades iniciais. Entretanto, 28 cultivos (sete níveis de concentração de PG, duas temperaturas diferentes, duas formas da enzima: livre e imobilizada) seriam necessários para ter os valores de velocidades iniciais determinados no meio reacional real. Considerando, a dificuldade de reproduzir as características de cada caldo cultivo, o tempo e reagentes gastos nestes experimentos, optou-se por estimar estes parâmetros fora do biorreator. Portanto, a hidrólise em biorreator foi simulada em microrreator (100 mL de capacidade).

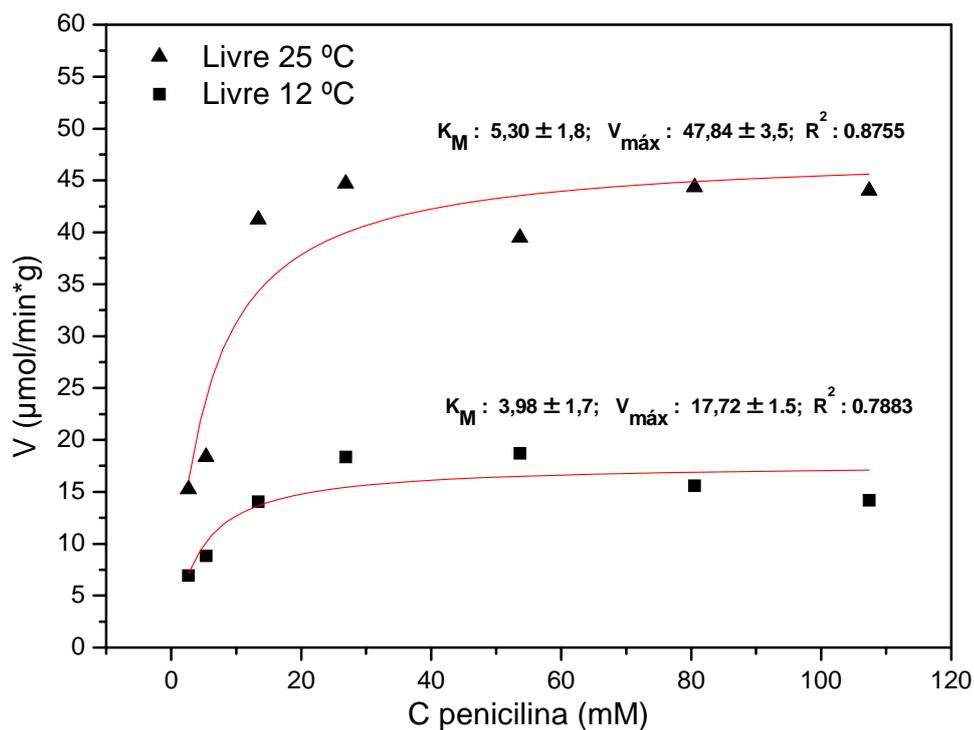
Para tentar reproduzir as condições do biorreator foi realizado um cultivo de *P. chrysogenum* e 6 L de caldo fermentativo livre de 6-APA, AFA e PG foi gerado, considerando que a cepa utilizada não é capaz de produzir penicilina. A massa de fungo foi separada por filtração e o filtrado foi utilizado como solvente para preparar as soluções de PG em diferentes concentrações.

Para a estimativa dos parâmetros  $K_M$  e  $V_{max}$  foi empregado o programa Microsoft ORINGIN 7.0. A equação utilizada para a estimativa dos parâmetros cinéticos pelo método das velocidades iniciais é apresentada (Equação 4.1).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (4.1)$$

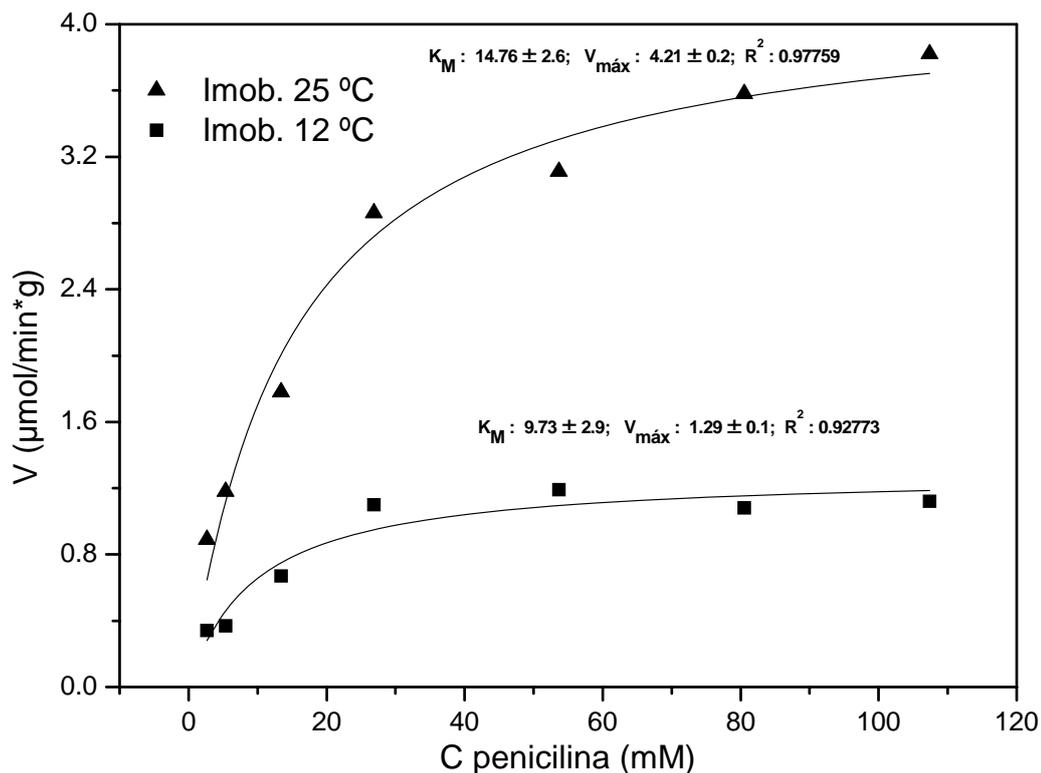
Esta equação relaciona a velocidade ( $v$ ), a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e a concentração inicial de substrato  $[S]$  com a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ).

A Figura 5.57 apresenta as curvas de velocidade *versus* concentração de PG obtidas para a enzima livre a 12 e 25 °C. A unidade utilizada para a velocidade da enzima livre neste experimento ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ ) foi utilizada para comparar este parâmetro com o da enzima imobilizada. Este cálculo foi feito substituindo o volume da solução da enzima livre pela massa do biocatalisador (agarose + proteínas) contendo as unidades deste volume. O modelo de Michaelis-Menten foi ajustado aos pontos experimentais, visto que a cinética da maioria das reações enzimáticas é bem representada por esse modelo.



**Figura 5.57:** Velocidade de hidrólise de PG em função da concentração de substrato a 12 e 25 °C com PGA livre.

A concentração de PG variou de 2,68 a 107,38 mM. Devido a limitações do sistema de detecção. Concentrações menores que 2,68 mM não puderam ser utilizadas. Em todos os níveis de concentração da PG a velocidade foi estimada respeitando a conversão máxima de 10%. Nestas mesmas condições foram levantadas as curvas de cinética para PGA imobilizada, cujo resultado é apresentado na Figura 5.58.



**Figura 5.58:** Velocidade de hidrólise de PG em função da concentração de substrato a 12 e 25 °C com PGA imobilizada.

O baixo valor de  $K_M$  para hidrólise de PG associado a pouca sensibilidade do método colorimétrico utilizado ocasionaram grandes desvios nos valores obtidos para os parâmetros cinéticos, portanto os resultados apresentados aqui são apenas uma estimativa destes valores. A dificuldade na determinação destes parâmetros é refletida na acentuada variação nas ordens de grandeza de valores publicados na literatura (ALKEMA et al., 1999).

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos pelo método das velocidades iniciais são apresentados na Tabela 5.11.

**Tabela 5.11:** Parâmetros cinéticos para a hidrólise de PG em reator (100 mL) pelo método das velocidades iniciais.

PGA	Parâmetro	12 °C	25 °C
Livre	$K_m$ (mM)	$3,98 \pm 1,7$	$5,30 \pm 1,8$
	$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ )	$17,72 \pm 1,3$	$47,84 \pm 3,5$
Imobilizada (em esferas com partículas dispersas)	$K_m$ (mM)	$9,73 \pm 2,9$	$14,76 \pm 2,6$
	$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ )	$1,29 \pm 0,1$	$4,21 \pm 0,2$

Ao comparar os parâmetros cinéticos estimados nos sistemas empregando enzima livre e imobilizada, verifica-se que há uma drástica redução na velocidade de hidrólise ao empregar PGA imobilizada. A existência de efeitos cruzados pode justificar este resultado. Entre os principais efeitos sobre a velocidade de hidrólise estão os efeitos difusivos e formação de gradiente de pH intra-partícula (SPIEß et al., 1999; GONÇALVES et al., 2008).

Comparando-se os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  para enzima livre e imobilizada em uma temperatura em particular, por exemplo, a 12 °C nota-se uma efetividade experimental de aproximadamente 0,077, este valor a 25 °C é 0,084 (Estes valores foram obtidos dividindo-se o valor da atividade medida para PGA imobilizada pela atividade medida para a enzima livre, considerando-se a mesma quantidade de proteína em ambos os sistemas). Esta pequena variação da efetividade, com o aumento da temperatura, não é suficiente para afirmar que o efeito difusivo controla a cinética de hidrólise.

Acredita-se que uma maior variação da temperatura poderia demonstrar a presença de efeitos difusivos, entretanto, para as condições de cultivo e hidrólise exigidas neste trabalho torna esta investigação desnecessária.

O fato de que o método de envolvimento das partículas de agarose (400  $\mu\text{m}$ ) contendo a PGA imobilizada não causa inativação da enzima, e de que a esfera formada tem diâmetro muito grande (4 mm) fortalecem a hipótese de efeitos difusivos. Além disso, estes efeitos difusivos associados à liberação de AFA durante a hidrólise e ao baixo valor de pH do caldo de cultivo (atividade aparente  $\sim 10$  vezes menor comparada à da enzima livre) favorecem a formação do gradiente de pH.

### **5.6.2 Efeito de Inibição de PGA Imobilizada por 6-APA na Hidrólise de PG em Biorreator**

Além das propriedades do biocatalisador, as características do sistema utilizado para realizar a hidrólise podem influenciar significativamente os parâmetros da cinética de hidrólise. Para verificar, por exemplo, o efeito da remoção contínua de AFA e a inibição de PGA por 6-APA foi realizado um cultivo em biorreator e a hidrólise completa de PG (30g/L) foi monitorada. Este experimento foi realizado em batelada durante o cultivo de *P. chrysogenum*.

O objetivo nesta etapa do trabalho foi determinar a constante de inibição de 6-APA ( $K_{i, \text{APA}}$ ) utilizando a equação (4.2).

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[PG]}{(K_M + [PG]) \left( 1 + \frac{[APA]}{K_{i,APA}} \right)} \quad (4.2)$$

Para obter o valor de  $K_{i,APA}$ , foram utilizados os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  determinados pelo método das velocidades iniciais, assim como os dados apresentados na Figura 5.59.

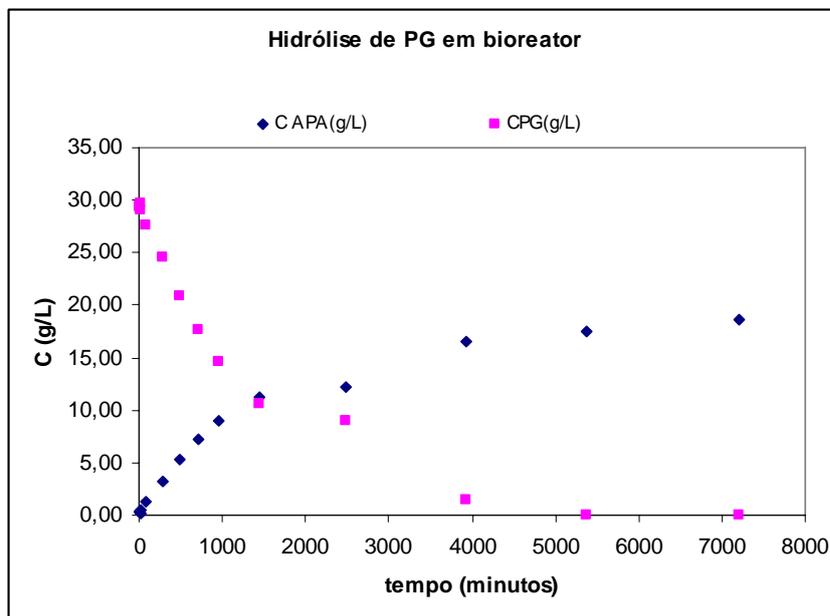
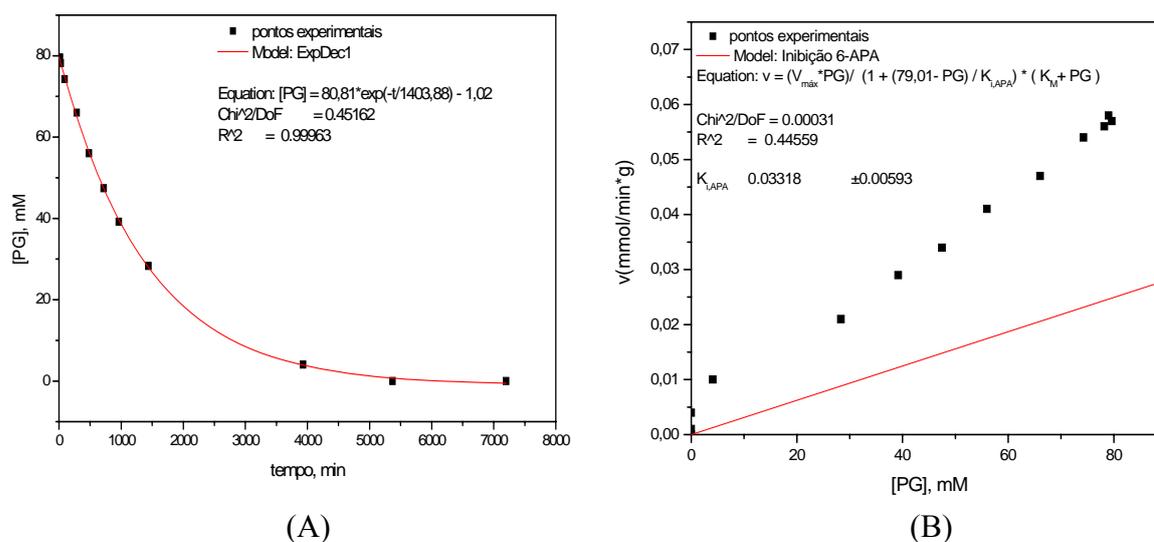


Figura 5.59: Curvas de consumo de PG e formação de 6-APA, durante o cultivo de *P. chrysogenum*.

Para obter os valores de velocidade ( $v$ ) foi realizado primeiramente um ajuste utilizando equação de decaimento exponencial através do programa Microsoft ORIGIN 7.0 (Figura 5.60a).



**Figura 5.60: Velocidade de hidrólise de PG: (A) Consumo de substrato com o tempo e (B) Velocidade de hidrólise em função da concentração de substrato (Curva de Michaelis-Menten),  $K_i$  foi estimada considerando os valores de  $V_{m\acute{a}x} = 4,21 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ ,  $K_M = 14,76 \text{ mM}$  e concentração inicial de PG =  $79,01 \text{ mM}$ .**

Em seguida, foi calculada a derivada da equação apresentada no gráfico da Figura 5.60a, e a partir desta foram determinados valores de velocidade para respectivos valores de concentração de PG. Os valores de velocidade *versus* concentração de PG foram usados para realizar o ajuste com a equação (4.2). Os parâmetros  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  utilizados aqui foram aqueles determinados pelo método das velocidades iniciais.

Observando os dados da Figura 5.60b observa-se que não foi possível ajustar o modelo de inibição de 6-APA aos valores de velocidade calculados a partir de ajuste da equação exponencial aos dados experimentais obtidos em biorreator.

Um dos principais efeitos sobre a cinética de enzimas imobilizadas em suportes sólidos é devido a variação do pH no interior da partícula. Para a hidrólise de PG, a redução no valor de pH altera o estado de ionização da PGA e desfavorece a reação de hidrólise, tornando-a mais reversível. Visto que, o biocatalisador utilizado aqui é uma esfera de 4 mm de diâmetro e que o pH do caldo de cultivo é mantido neutro, pode-se afirmar que a formação de gradiente de pH intrapartícula ocasionada por problemas difusionais é mais pronunciada em ensaios longos de hidrólise. Além disso, o aumento da concentração dos produtos AFA e 6-APA no interior da partícula nestes ensaios pode acentuar os efeitos de inibição da enzima. Portanto, os parâmetros cinéticos obtidos pelo método das velocidades iniciais não podem ser utilizados para representar a cinética de ensaios longos, visto que os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  são alterados em função do pH e presença de AFA (inibidor competitivo).

A utilização de modelos matemáticos mais complexos poderia solucionar o problema em questão, entretanto este não é o objetivo deste trabalho, tal procedimento é sugerido para trabalhos futuros.

### 5.6.3 Conclusões Parciais

O efeito da temperatura sobre a velocidade de hidrólise é significativo, entretanto, visto que o processo fermentativo é realizado em tempo relativamente longo (120-240 h), a hidrólise de PG durante este processo torna-se possível em ambas as temperaturas investigadas (12 ou 25 °C).

A imobilização de PGA em pequenas partículas e o co-envolvimento destas com gel de agarose causam uma drástica redução no valor teórico da atividade enzimática, aproximadamente dez vezes menor. Como o procedimento de preparo deste biocatalisador não causa perda de atividade catalítica, concluiu-se que a baixa atividade aparente está relacionada a efeitos difusivos, de inibição ou formação de gradiente de pH no interior das esferas. Esta hipótese é fortalecida pelo fato da esfera apresentar elevado diâmetro (~ 4mm).

Os parâmetros cinéticos determinados apontam para a viabilidade do processo de produção de 6-APA durante o cultivo de *P. chrysogenum*. Visto que toda a penicilina adicionada foi hidrolisada em cinco dias de cultivo.

Entretanto, a partir deste ponto outro desafio surge como consequência do sucesso obtido na hidrólise de PG em biorreator. A separação do produto de interesse a partir de uma matriz complexa é discutida no item a seguir.

## 5.7 Extração de 6-APA

A extração industrial de 6-APA obtido pela hidrólise de PG em meio aquoso é feita por precipitação deste no seu ponto isoelétrico, na presença de acetato de amila, que remove PG residual e demais contaminantes fortemente hidrofóbicos a para fase orgânica. Contudo, quando se tentou aplicação direta dessa técnica para extração de 6-APA do caldo, não ocorreu precipitação de 6-APA. Isso era esperado, devido ao grande número de moléculas interferentes tais como aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos e sais. É por essa razão inclusive que na hidrólise industrial evita-se uso de tampão, com o controle do pH sendo feito por adição de álcali.

Passou-se então a investigar a eficiência da extração do 6-APA gerado no processo em estudo neste trabalho utilizando diferentes técnicas de separação. Adsorção hidrofóbica, adsorção iônica, precipitação com solvente orgânico e precipitação no ponto isoelétrico foram estudadas, em conjunto ou individualmente.

### 5.7.1 Adsorção Hidrofóbica

A adsorção de 6-APA presente em água tem sido estudada em diferentes resinas comerciais XAD. Neste trabalho, as resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761 foram utilizadas para estudar a adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo. Além destas resinas, carvão ativado também foi utilizado para este estudo, visto que o mesmo é utilizado em alguns processos industriais, por exemplo, na pré-purificação de PG, presente em caldos fermentativos. O desempenho de cada adsorvente na extração de 6-APA é apresentado na Tabela 5.12.

**Tabela 5.12:** Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (3,5 g/L) em resinas XAD e carvão ativado a pH 3,6 e 4 °C por 1h. Valores médios. Erro experimental <10%.

Adsorventes	6-APA adsorvido (mg/g adsorvente)	% de 6-APA adsorvido <sup>a</sup>
XAD-4	2,2	3,1
XAD-7	4,2	6,0
XAD-761	6,6	9,4
Carvão ativado	13,8	19,7

<sup>a</sup> Percentagem de 6-APA adsorvido em relação a quantidade oferecida (70 mg / g adsorvente).

Dos adsorventes utilizados, carvão ativado apresenta o maior grau de hidrofobicidade, seguido de XAD-4, XAD 7 e XAD-761. Portanto, era esperado que a interação destes adsorventes com o produto de interesse (6-APA) e/ou com os componentes do caldo fermentativo apresentasse uma tendência em função do grau de hidrofobicidade.

Os resultados da Tabela 8.1 mostram que carvão ativado apresentou maior eficiência de adsorção, enquanto o segundo adsorvente mais hidrofóbico (XAD-4) apresentou menor eficiência. Portanto, o maior percentual de adsorção de 6-APA não depende somente do grau de hidrofobicidade. Outros fatores importantes, como área superficial do adsorvente e sua afinidade pelos componentes do caldo fermentativo (ou seja, seletividade) devem ser considerados. Além disso, a afinidade entre adsorbato e adsorvente depende da estrutura química de ambos, pois uma interação mais forte entre estas moléculas pode surgir em nível de elétrons (DUTTA et al., 1997).

Os resultados obtidos da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo nas resinas XAD estão de acordo com os resultados obtidos por Vieira et al., 2003, para 6-APA presente em água. Observou-se que todas as resinas XAD apresentam pouca capacidade para adsorção de 6-APA, sendo o desempenho da resina XAD-761 ligeiramente superior ao das demais.

O pH do caldo fermentativo nestes experimentos foi mantido no ponto isoelétrico do 6-APA (pH 3,6), pois dados da literatura mostram que nesta condição a eficiência de adsorção é máxima para soluções de 6-APA em água (DUTTA et al., 1997).

Para justificar o efeito do pH sobre interações hidrofóbicas, alguns autores, afirmam que uma molécula globalmente neutra pode ter sua interação com uma superfície hidrofóbica favorecida. Outros autores discordam dessa justificativa, pois as cargas pontuais interferem negativamente sobre a adsorção destas moléculas sobre superfícies hidrofóbicas (KEÇILI et al., 2006).

Neste trabalho é defendida a hipótese de que as cargas pontuais dos grupos amino e carboxílico podem interferir fortemente na interação de 6-APA com as superfícies hidrofóbicas. Entretanto, numa solução de 6-APA em água com pH ajustado no ponto isoelétrico, facilmente ocorre a formação de aglomerados através de interações iônicas. Dessa maneira, cargas negativas do grupo carboxila interagem com cargas positivas dos grupos aminos. Ao se neutralizar, essas moléculas formam um aglomerado, menos solúveis em água e com maior grau de hidrofobicidade que o monômero de 6-APA, aglomerado esse que adsorve mais facilmente em superfícies hidrofóbicas.

O melhor resultado para adsorção de 6-APA (carvão ativado) obtido nesta etapa ainda não pode ser considerado satisfatório visto que somente 19,7 % de 6-APA de uma solução de baixa concentração (3,5 g/L) foi adsorvido. Além disso, este adsorvente apresenta elevado custo e há relatos na literatura de que geralmente a adsorção é praticamente irreversível, não sendo possível recuperar o suporte (DUTTA et al., 1997).

Por outro lado, apesar de não observar elevada capacidade de adsorção de 6-APA, todos esses adsorventes apresentam elevada capacidade de remover compostos que conferem cor ao caldo fermentativo, sendo XAD-4 o mais eficiente para este fim. Essa propriedade pode ser útil na pré-purificação do caldo em uma condição onde 6-APA não seja adsorvido. Contudo, dos trabalhos na literatura que relatam tentativas de extração de 6-APA obtido por hidrólise de PG no caldo de cultivo (tentando evitar a etapa de purificação de PG) os melhores resultados são obtidos com adsorção em resina catiônica. Assim, antes de estudar uma possível pré-purificação do caldo com resinas hidrofóbicas, nos experimentos seguintes, adsorventes alternativos, utilizando mecanismos de interação iônica, foram utilizados para buscar maior capacidade de adsorção.

### 5.7.2 Adsorção Iônica

A presença de grupos ionizáveis na molécula de 6-APA torna o uso de adsorventes de troca iônica interessante para extração deste núcleo  $\beta$ -lactâmico.

Exemplos de matrizes comerciais utilizadas na extração de 6-APA são as resinas de troca aniônica Aliquat 336 e IRA 400. Neste trabalho, adsorventes alternativos e de baixo custo foram preparados pela inserção de grupos carregados positivamente na superfície de polímeros como agarose e quitosana.

A extração de 6-APA de caldo fermentativo utilizando suportes carregados positivamente elimina etapas de ajuste de pH. Durante o cultivo de *P. chrysogenum* o pH é continuamente ajustado para o valor 7,0. Nessa condição, 99,5% das moléculas de 6-APA está na forma aniônica (KÓCZIÁN et al., 2007). Nessa mesma condição de pH, os grupos funcionais dos suportes utilizados neste trabalho estão carregados positivamente.

Os primeiros testes de adsorção utilizaram quitosana como suporte para ligar arginina. Para verificar a ação da arginina como agente de modificação, quitosana em pó foi utilizada como controle. A comparação da eficiência de adsorção entre estes dois adsorventes

e os melhores adsorventes hidrofóbicos pode ser feita observando os resultados apresentados na Tabela 5.13.

**Tabela 5.13: Adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (3,5 g/L) em diferentes adsorventes a 4 °C por 1h.**

Adsorventes / pH adsorção	6-APA adsorvido (mg/g adsorvente)	% de 6-APA adsorvido <sup>a</sup>
XAD-761 / 3,6	9,2	13,1
Carvão ativado / 3,6	20,2	28,9
Quitosana (gel)-arginina <sup>b</sup> / 7,0	10,6	15,1
Quitosana (pó) / 7,0	1,6	2,3

<sup>a</sup> Percentagem de 6-APA adsorvido em relação à quantidade oferecida (70 mg / g do adsorvente);

<sup>b</sup> Utilizou-se: Ativação de Quitosana I (item 3.2.26.1).

A baixa eficiência de adsorção no adsorvente controle (quitosana pó) é devida ao baixo valor de pK de seus grupos aminos (6,5), portanto em pH 7,0 nem todos os grupos estavam carregados positivamente. Por outro lado, se o aminoácido arginina é ligado ao polímero através do glutaraldeído, o grupo amino desse aminoácido, que tem pK 12,48, se mantém positivo a pH 7,0 e melhor eficiência de adsorção é observada.

Os resultados apresentados na Tabela 8.2 apontam para a resina quitosana ativada com arginina como um adsorvente promissor para extração de 6-APA presente em caldo fermentativo. Observa-se que esse adsorvente tem um desempenho similar àquele obtido com XAD-761.

A modificação da quitosana também confere a este polímero maior estabilidade química, pois o pó de quitosana é solúvel a pH menor que 6,5, enquanto quitosana-arginina não é solúvel a pH 3,5. A ativação de quitosana com arginina foi ainda investigada utilizando diferentes condições reacionais com o objetivo de aumentar a concentração de cargas positivas sobre o polímero.

### 5.7.2.1 Efeito do Tipo de Ativação de Quitosana

Duas condições reacionais foram utilizadas para ativar a quitosana com o objetivo de aumentar a concentração dos sítios de adsorção nesse suporte. Na primeira estratégia (Ativação de Quitosana I, item 2.3), ativou-se quitosana com glutaraldeído e em

seguida adicionou-se a esta uma solução de arginina. Desta maneira, a quantidade de grupos arginina ligada a quitosana pode não atingir valores máximos, porque ao adicionar a solução de glutaraldeído primeiramente à quitosana, uma mesma molécula de glutaraldeído pode ligar-se a dois grupos aminos, num processo de entrecruzamento das cadeias deste polímero. Entretanto, o excesso de glutaraldeído utilizado neste trabalho (5% v/v) torna este grau de entrecruzamento muito pequeno, visto que para atingir altos graus de entrecruzamento, concentrações baixas (0,75 % v/v) devem ser utilizadas (GINANI et al., 1999; VIEIRA et al., 2006).

Para investigar a ocorrência de entrecruzamento, outra estratégia foi utilizada para realizar a ativação de quitosana (Ativação de Quitosana II, item 2.4). Nesse método, arginina reagiu primeiramente com glutaraldeído em uma solução equimolar desses compostos. Em seguida, o produto da reação foi adicionado ao gel de quitosana para formar o polímero ativado com cargas positivas. Resultados comparando a eficiência de adsorção nos dois métodos são apresentados na Tabela 5.14.

**Tabela 5.14: Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (3,5 g/L) diferentes adsorventes a pH 7 e 4 °C por 1h.**

Quitosana (gel)-arginina	6-APA adsorvido (mg/g adsorvente)	% de 6-APA adsorvido
Ativação I	10,6	15,1
Ativação II	12,9	18,4

Os resultados apresentados na Tabela 8.3 mostram que o método de ativação II resulta numa eficiência de adsorção ligeiramente melhor que o método de ativação I. Entretanto, para atingir valores ainda melhores para a eficiência de adsorção outro fator foi investigado. A presença do grupo carboxila ligado ao carbono alfa da arginina pode dificultar a reação entre o grupo amino deste aminoácido e o aldeído. A influência deste grupo foi então investigada a seguir.

Um estudo detalhado do efeito do grupo carboxila foi realizado, utilizando uma matriz polimérica bem conhecida (agarose). Inicialmente, reagiu-se agarose 10 BCL ativada (280  $\mu$ mol de aldeído por grama do gel) com solução de arginina, 24 horas sob agitação. A seguir, adicionou-se reagente de Schiff (teste para aldeídos) e observou-se que havia aldeído remanescente.

Para investigar o efeito do grupo carboxila na ativação de agarose com arginina, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado, entretanto, com uma etapa

adicional realizada antes de reagir a arginina com agarose ativada, para reduzir o grupo carboxila do aminoácido com hidreto de lítio e alumínio. Após essa redução, o teste com reagente de Schiff não acusou presença de grupos aldeído remanescentes na agarose ligada a arginina. Entretanto, os resultados apresentados na Tabela 5.15 mostram que a redução foi prejudicial para a ativação de agarose com arginina.

**Tabela 5.15: Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (8,5 g/L) diferentes adsorventes a pH 7 e 4 °C por 1h.**

Arginina	6-APA adsorvido (mg/g adsorvente)	% de 6-APA adsorvido <sup>a</sup>
reduzida	6,6	33,1
não reduzida	8,8	44,1

<sup>a</sup> Percentagem de 6-APA adsorvido em relação à quantidade oferecida (20 mg / g do adsorvente).

Os resultados apresentados na Tabela 5.15 parecem não concordar com o resultado teórico esperado, pois a redução do grupo carboxílico, convertendo esse grupo funcional em hidroxila, tornaria a reação do amino ligado ao carbono alfa do aminoácido com o aldeído mais favorável. Acredita-se que após a etapa de redução, o hidreto de lítio e alumínio remanescente reduziu os grupos aldeídos da superfície do gel, diminuindo assim a quantidade de arginina ligada ao mesmo e conseqüentemente diminuiu a eficiência de adsorção.

Considerando os testes realizados até este momento, foi estabelecido que o melhor método de ativação com arginina é através da reação desta com o glutaraldeído, seguida da reação deste produto com o suporte quitosana ou agarose aminada.

Nesta etapa do trabalho, outros parâmetros foram investigados para verificar a viabilidade do uso destes adsorventes na extração de 6-APA a partir do caldo de cultivo.

### 5.7.2.2 Seletividade na Adsorção de 6-APA

Uma observação importante é que a necessidade de aumentar os grupos ativos (arginina) na superfície de polímeros surge devido aos vários componentes do caldo fermentativo (ácidos orgânicos, inorgânicos e sais) que competem com moléculas de 6-APA pelos sítios de adsorção. Portanto, a influência dos componentes do caldo de cultivo na adsorção de 6-APA foi investigada realizando experimentos nos quais 6-APA era adicionado a água e ao caldo fermentativo e ambos eram submetidos a adsorção sob as mesmas condições de pH e temperatura. Os resultados são apresentados na Tabela 5.16.

**Tabela 5.16: Eficiência da adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (8,5 g/L) diferentes adsorventes a pH 7 e 4 °C por 1h.**

Adsorvente	6-APA (água) adsorvido (mg/g adsorvente)	6-APA (caldo) adsorvido (mg/g ads.)
XAD-4	0,05	0,00
quitosana (pó)	3,21	1,41
quitosana-arginina (pó)	16,53	10,33
quitosana-arginina (gel)	14,46	10,14

Comparando o desempenho dos diferentes adsorventes apresentados na Tabela 5.16, concluiu-se que a quitosana na forma de pó ou gel é mais eficiente na adsorção de 6-APA presente em água que em caldo fermentativo, com a eficiência do pó ligeiramente superior em água. Em caldo fermentativo, pó e gel de quitosana apresentam desempenho similar. Estes resultados sugerem que os componentes do caldo fermentativo interferem na adsorção de 6-APA de forma significativa. Essa interferência pode ser reduzida realizando-se etapas de pré-tratamento do caldo fermentativo. Os resultados deste estudo são apresentados no item 4.7.2.6.

### 5.7.2.3 Capacidade de Adsorção de 6-APA

Quitosana-arginina usada como adsorvente apresenta como principal vantagem o baixo custo deste polímero. Entre outras vantagens, a elevada concentração dos grupos amino no polímero permite a obtenção de um adsorvente com elevada concentração de sítios de adsorção por grama do adsorvente. Neste trabalho, mesmo com um baixo grau de ativação, resultados satisfatórios foram obtidos para a adsorção de 6-APA em caldo fermentativo. O gráfico da Figura 5.61 mostra o perfil de adsorção de 6-APA em quitosana-arginina.

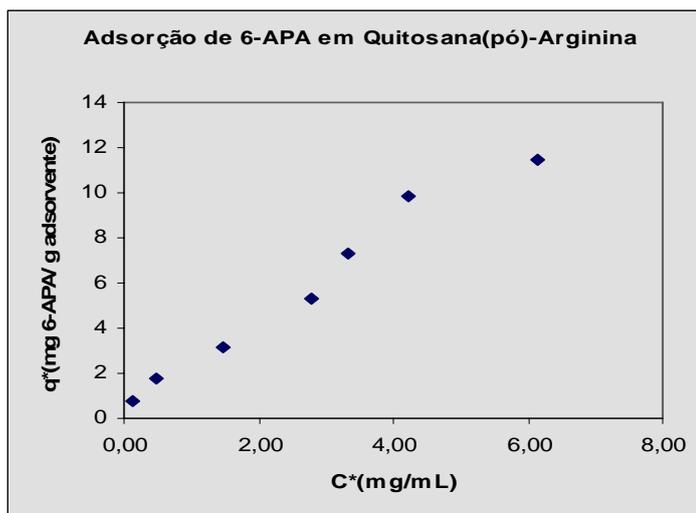


Figura 5.61: Equilíbrio de adsorção de 6-APA em quitosana-arginina a 25 °C, pH 7. (2,3 mLcaldo/g adsorvente)

Observou-se que até uma concentração de 11 g/L de 6-APA ainda não ocorre saturação do suporte. Níveis maiores de concentração serão investigados para adsorventes com maior grau de ativação.

#### 5.7.2.4 Efeito da Temperatura na Adsorção de 6-APA

Para investigar o efeito da temperatura na adsorção de 6-APA, o experimento foi conduzido a 5 e 25 °C. A Tabela 5.17 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5.17: Adsorção de 6-APA presente em caldo fermentativo (4 g/L) em quitosana-arginina (pó) a pH 7, por 1h.

Temperatura (°C)	6-APA adsorvido (mg/g adsorvente)	% de 6-APA adsorvido
5	5,82	58,1
25	6,43	64,3

<sup>a</sup> Percentagem de 6-APA adsorvido em relação à quantidade oferecida (10 mg / g do adsorvente);

Observa-se que a temperatura mais elevada favorece a adsorção. A interação de todas as moléculas neste sistema complexo depende, entre outros fatores, da temperatura. É provável, que na temperatura de 25 °C algumas associações moleculares sejam feitas ou desfeitas favorecendo a adsorção de 6-APA.

As condições de adsorção até então estabelecidas só poderão ser aplicadas se a dessorção também se mostrar viável. Portanto, algumas estratégias de dessorção foram investigadas e os resultados são discutidos no próximo item.

### 5.7.2.5 Dessorção de 6-APA

Testes preliminares da dessorção de 6-APA foram realizados utilizando soluções de ácido clorídrico em diferentes valores de pH e solução de cloreto de sódio 1M. Os resultados obtidos (Tabela 5.18) ainda não são satisfatórios. Entretanto, a utilização de uma solução ácida ainda pode ser avaliada juntamente com a otimização das condições de agitação, temperatura e tempo de dessorção para aumentar a eficiência de dessorção.

**Tabela 5.18: Dessorção de 6-APA de quitosna-arginina (pó).**

Dessorvente	6-APA dessorvido <sup>a</sup> (mg/g adsorvente)	% de 6-APA dessorvido
HCl pH 3,5	0,70	11,0
HCl pH 4,5	0,28	4,5
HCl pH 5,5	0,23	3,7
NaCl 1 M	1,80	28,4

<sup>a</sup> Erro experimental <10%

Os resultados obtidos até o momento para adsorção/dessorção de 6-APA em quitosana-arginina mostram-se promissores, entretanto, devido a complexidade da matriz de estudo, etapas de pré-purificação foram realizadas para aumentar a recuperação deste produto.

### 5.7.2.6 Pré-Purificação do Caldo Fermentativo

Considerando que o adsorvente utilizado neste trabalho ainda não apresenta elevada concentração de sítios de adsorção, o estudo de uma etapa de pré-purificação de 6-APA em caldo de cultivo foi realizado com o objetivo de aumentar a eficiência de adsorção deste composto.

Foram utilizadas duas maneiras de purificação, uma utiliza etanol como agente de precipitação de impurezas e outra utiliza carvão ativado para adsorção destas impurezas.

### 5.7.2.6.1 Precipitação com Etanol

O teste de precipitação com etanol foi realizado em diferentes concentrações deste solvente. A Tabela 5.19 mostra os resultados obtidos para o pré-tratamento do caldo fermentativo.

**Tabela 5.19: Efeito da pré-purificação do caldo por precipitação de proteínas com etanol sobre a extração de 6-apa poadsorção iônica de 6-APA.**

Concentração de etanol (% v/v)	pH	C <sub>6-APA</sub> (inicial) (g / L)	C <sub>6-APA</sub> no sobrenadante (após ajuste pH a 3.9 e filtração) (g / L)	C <sub>proteína</sub> (g / L)	C <sub>6-APA</sub> no sobrenadante (após adsorção em agarose-arginina) (g / L)
0	7,13	4,73	3,97	0,22	3,44
10	7,28	4,41	4,04	0,19	2,82
50	7,80	2,58	2,56	0,12	2,28
80	8,10	1,12	1,14	0,04	1,10

Os resultados obtidos com etanol não se mostraram satisfatórios visto que não foi possível precipitar 6-APA após o pré-tratamento com este solvente, mesmo utilizando elevadas concentrações. Entretanto, em concentração de 80 %, foi possível observar a formação de um precipitado branco, considerando que a concentração de 6-APA foi mantida durante todas as etapas, a remoção das impurezas seguida da evaporação deste solvente pode resultar em um processo eficiente para purificação de 6-APA. Entretanto, estudos mais detalhados a respeito desta metodologia devem ser realizados para atingir níveis de recuperação satisfatórios.

### 5.7.2.6.2 Adsorção Hidrofóbica

Sabendo-se que 6-APA tem baixa afinidade por superfícies hidrofóbicas em pH 7 (pH do caldo fermentativo), espera-se que ocorra a adsorção preferencial de impurezas e que o 6-APA mantido em solução possa ser precipitado por ajuste de pH. Os testes realizados mostraram que nenhuma adsorção de 6-APA ocorre nesta condição e que um caldo clarificado é obtido por este tratamento. Entretanto, somente 8 % de 6-APA é precipitado após este tratamento. E 18 % do restante é adsorvido em agarose-arginina.

### 5.7.3 Conclusões Parciais

A extração de 6-APA a partir de um meio complexo é um dos maiores desafios no desenvolvimento de novos métodos livres de solventes orgânicos. Dados da literatura revelam que processos em múltiplas etapas são necessários para obtenção deste produto com grau de pureza satisfatório. Entre os adsorventes propostos para a extração de 6-APA, aqueles que apresentam caráter iônico permitem maior eficiência na recuperação deste composto.

Quitosana modificada quimicamente com arginina é um adsorvente potencial para extração de 6-APA, entretanto, o aumento da concentração dos sítios de adsorção na superfície deste polímero deve ser atingido para melhorar a capacidade de adsorção deste suporte.

Métodos de pré-tratamento do caldo fermentativo utilizando etanol e carvão ativado não se mostraram viáveis para purificação de 6-APA.

## 6 Conclusões

- A purificação de PGA utilizando agarose-triptofano como adsorvente foi eficiente para clarificar o caldo fermentativo, pois remove grande quantidade de moléculas pequenas, como aminoácidos e pequenos peptídeos.
- A adsorção de proteínas na presença de ácido fenilacético permitiu a obtenção de PGA 4,5 vezes mais pura que a PGA presente em caldo fermentativo bruto de *B. megaterium*. Este fator de purificação é aparente, visto que as moléculas pequenas removidas pelo adsorvente não foram quantificadas pelo método de análise utilizado neste trabalho para monitorar a eficiência de adsorção (Método de Bradford). Portanto, o nível de purificação de PGA atingido neste trabalho, utilizando uma metodologia que envolve uma única etapa, é satisfatório para posterior aplicação desta enzima em processos de imobilização, para obtenção de catalisadores industriais.
- A estabilização de PGA através da imobilização covalente multipontual depende, entre outros fatores, de propriedades do suporte, por exemplo, o tamanho da fibra, do grau de ativação do suporte e do pH de imobilização.
- Entre os suportes estudados neste trabalho, agarose 10 % mostrou-se mais adequado para estabilização da enzima, visto que possui maior tamanho de fibra comparada a agarose 2% e toyopearl.
- A imobilização de PGA em agarose glioxil a pH 10 já permite ótima estabilização da enzima. Entretanto, este fator de estabilização pode ser aumentado se a imobilização ocorre na presença de DTT, ou reduzida, se houver competição entre outras moléculas (aminoácidos, por exemplo) e a PGA pelos grupos ativos do suporte.
- A viabilidade técnica da hidrólise de PG durante o cultivo de *P. chrysogenum* foi demonstrada e três maneiras de atingir hidrólise completa mantendo a integridade do biocatalisador foram apresentadas. O primeiro procedimento utilizou um helicóide envolvendo os impelidores quando elevada velocidade de agitação for exigida. O segundo procedimento consistiu em manter a agitação constante e máxima de 300 rpm, neste caso a adição do biocatalisador ao biorreator foi realizada somente quando a concentração de biomassa atingiu valores máximos. Por último, foi utilizado biorreator tipo air lift, visto que este sistema é ideal para crescimento do fungo na forma de pellet.
- A cinética de hidrólise de PG catalisada por PGA (livre ou imobilizada) em meio não convencional foi investigada em bioreator (2 L) e em reator (0,1 L) com agitação mecânica de 300 rpm. Os resultados indicam que apesar dos efeitos difusivos

significativos, baixo pH de hidrólise e baixas temperaturas (12 ou 25 °C) é possível hidrolisar toda a penicilina presente no meio de produção.

- A adsorção de 6-APA em resinas hidrofóbicas apresentou baixa eficiência. O melhor resultado obtido neste trabalho foi para carvão ativado (20 mg de 6-APA adsorvido/ mg adsorvente), resultado este provavelmente atribuído à sua elevada área superficial. A separação de 6-APA através de interação iônica teve como melhor adsorvente quitosana-arginina (16,5 mg de 6-APA adsorvido/ mg adsorvente). Acredita-se que a eficiência ainda possa ser melhorada, aumentando o grau de ativação deste adsorvente.
- O método apresentado nesta tese para produção de 6-APA mostra-se tecnicamente viável, visto que foi demonstrada a possibilidade de hidrólise completa de PG recuperação do biocatalisador ao final do processo. Entretanto, a viabilidade global do processo depende da recuperação do produto final. Neste trabalho, o uso de quitosana modificada com arginina mostrou-se promissor para a extração do núcleo  $\beta$ -lactâmico, entretanto, ainda precisa ser otimizado para competir com processos anteriormente descritos em patentes e assim atingir níveis de pureza exigidos pela indústria farmacêutica.

## 7 Sugestões

Para aperfeiçoamento dos resultados obtidos neste trabalho são sugeridas algumas atividades, as quais poderão ser realizadas em trabalhos futuros.

- Para aumentar a eficiência na purificação de PGA presente em caldo fermentativo do *B. megaterium* um suporte de afinidade contendo braço espaçador inerte pode ser preparado, substituindo os agentes de ativação glicidol, etilenodiamino e glutaldeído, utilizados para gerar este braço, por um único agente, o etileno glicol diglicidil éter (EGDE). Dessa forma é possível obter um braço espaçador inerte e hidrofílico, em um processo de ativação mais simples.

- A concentração dos grupos de afinidade na superfície da agarose também é uma variável importante na purificação de enzimas por afinidade. Portanto, preparar suportes com diferentes graus de ativação é uma etapa importante para atingir máxima eficiência na recuperação de PGA.

- Devido à complexidade do caldo fermentativo contendo PGA, etapas de pré-purificação desta enzima poderiam resultar em melhor grau de pureza da mesma ao final do processo de purificação. Testes preliminares com sulfato de amônio mostraram que grande parte das impurezas pode ser removida antes da etapa de adsorção por afinidade. Portanto, buscar as condições de concentração de sulfato de amônio, temperatura, pH e tempo de reação onde a precipitação de impurezas é mais seletiva permitirá maior eficiência na recuperação de PGA.

- O biocatalisador utilizado neste trabalho tem atividade teórica de 100 UI/g. Este valor é suficiente para o propósito deste trabalho, entretanto é possível obter biocatalisadores com maior atividade volumétrica, utilizando extrato enzimático parcialmente purificado e investigando a quantidade máxima de partículas de agarose que podem ser dispersas por volume da solução de agarose no preparo das esferas, sem comprometer a estabilidade mecânica destas.

- Neste trabalho, PGA foi imobilizada utilizando a técnica de imobilização covalente multipontual, a qual permite uma estabilização térmica de 8000 vezes em relação a enzima livre. Entretanto, verificou-se neste trabalho que este mesmo protocolo de imobilização quando realizado na presença de DTT, resulta num derivado imobilizado com maior estabilidade térmica que o derivado de referência (imobilizado em agarose glioxil). Além disso, constatou-se que na presença de DTT é possível imobilizar em agarose glioxil em pH neutro. Testes para explicar o mecanismo através do qual a enzima é melhor estabilizada e

imobilizada em pH neutro na presença deste composto seria de grande interesse científico e poderia ser utilizado para várias enzimas que não suportam a condição de imobilização a pH 10.

- A recuperação do biocatalisador ao final do processo fermentativo depende da força de atração entre as esferas (magnetizadas) e o ímã utilizado. A busca de materiais com maior potencial magnético é interessante, pois reduziria a massa destas partículas na esfera, cedendo espaço para as partículas contendo PGA imobilizada.

- Outra sugestão para realizar a hidrólise de PG simultânea à sua produção por *P. chrysogenum* é adaptar à dorna de fermentação uma coluna contendo o biocatalisador. Na saída da dorna poderia ser acoplado um microfiltro para evitar a entrada de fungo na coluna contendo o biocatalisador. Neste sistema, o caldo fermentativo poderia ser recirculado para garantir máxima eficiência de hidrólise e a separação do biocatalisador seria facilmente recuperado ao final do processo. Neste trabalho, a adição do biocatalisador diretamente à dorna de fermentação foi proposta para aproveitar a estrutura já existente da indústria, sem custos adicionais para a implementação do novo processo.

- Para a extração de 6-APA, o desenvolvimento do novo adsorvente utilizando quitosana mostrou-se promissor. Estudos mais detalhados para obter maior grau de ativação deste suporte ainda se faz necessário para atingir maior nível de recuperação do produto de interesse. Isto pode ser obtido otimizando as condições de ativação utilizando epicloridrina. Além disso, seria interessante utilizar, como referência, um dos adsorventes iônicos citados em patentes para recuperação de 6-APA, cujos resultados são ditos satisfatórios.

- Etapas de pré-purificação de 6-APA em caldos fermentativos utilizando solventes ou outras resinas devem ser investigadas, visto que isso resulta em maior grau de pureza do produto final. Os agentes de pré-purificação utilizados neste trabalho, não apresentaram bons resultados, portanto, o estudo de outros solventes e resinas poderia ser realizado para esta finalidade.

- Uma etapa fundamental a ser desenvolvida é o estudo da estabilidade e solubilidade de 6-APA nas condições de cultivo de *P. chrysogenum* e em meio aquoso como controle, para comprovar a viabilidade do processo proposto.

## 8 Referências bibliográficas

- ABIAN, O. et al. Improving the Industrial Production of 6-APA: Enzymatic Hydrolysis of Penicillin G in the Presence of Organic Solvents. **Biotechnology progress**, v. 19, p. 1639-1642, 2003.
- ADRIANO, W.S. et al. Adsorption of amoxicillin on chitosan beads: kinetics, equilibrium and validation of finite bath models. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 132-137, 2005.
- AGUILAR, O. et al. Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase process for the partial purification of penicillin acylase produced by E. coli. **Journal of Chromatography**, v. 835, p. 77-83, 2006.
- ALICINO, J.F. Iodometric Assay of natural and synthetic penicillins, 6-aminopenicillanic acid and cephalosporin C. **Analytical Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 648-649, 1961.
- ALKEMA, W.B.L.; FLORIS, R.; JANSSEN, D.B. The Use of Chromogenic Reference Substrates for the Kinetic Analysis of Penicillin Acylases. **Analytical Biochemistry**, v. 275, p. 47-53, 1999.
- ALVAREZ, E. et al. The isopenicillin-N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* has isopenicillin-N amidohydrolase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single penDE gene. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 323-332, 1993.
- ARNOTT, I.A.; WEATHERLEY, L.R. The stability of penicillin G during recovery by electrically enhanced extraction. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 5, p. 447-455, 1995.
- ARROYO, M. et al. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 507-514, 2003.
- ARRUDA E.J.; SANTANA, C.C. Phenylboronate-chitosan resins for adsorption of beta-amylase from soybean extracts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 829-842, 2003.
- ARYIO, P. et al. Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of *Penicillium chrysogenum* in stirred-tank reactors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, p. 165-170, 1998.
- ASSIS, O.B.G.; Silva, V.L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- BALASINGHAM, K. et al. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 276, p. 250-256, 1972.
- BARROS, A.N.C. **Separação de penicilina g por adsorção em resinas hidrofóbicas**. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2008.

BATCHELOR, F.R. et al. 6-Aminopenicillanic Acid. III. Isolation and Purification. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences**, v. 154, n. 957, p. 498-508, 1961.

BEECHAM RES LAB LTD. **6-aminopenicillanic acid is recovered from aqueous solution by extraction with an inert solvent, having dissolved therein one or more s-amine R.NH.CR<sup>2</sup>R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>**, patente 1966-00456F.

BENEDICT, R.G. et al. Penicillin III, The stability of penicillin in aqueous solution. **Journal of Bacteriology**, v. 49, p. 85-95, 1945.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA, C.C. Síntese e Caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 4, p. 163-169, 1999.

BIANCHI, D. et al. Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 592-596, 1996.

BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360-366, 1989 (a).

BLANCO, R.M.; CALVETE, J.J.; GUISÁN, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 353-359, 1989 (b).

BLUM, H.; HILDBURG, B.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOMSTEIN, J.; EVANS, W.G. Automated colorimetric determination of 6-aminopenicillanic acid in fermentation media. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 576-578, 1965.

BORA, M.M. et al. Reactive extraction of 6-aminopenicillanic acid with Aliquat-336: Equilibrium and kinetics. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.75, n. 3, p. 520-526, 1997.

BOYD, W.J. XII. Note on the determination of tryptophan by means of p-dimethylaminobenzaldehyde. **Biochemistry**, v. 23, p. 78-82, 1929.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURNS, K.L.; MAY, S.W. Separation methods applicable to the evaluation of enzyme-inhibitor and enzyme-substrate interactions. **Journal of Chromatography B**, v. 797, 175-190, 2003.

CASAS LÓPEZ, J.L. et al. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 1, 2005.

CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; GALACTION, A.I. Separation of 6-aminopenicillanic acid by reactive extraction. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 7, n. 5, 2002.

CHANDEL, A.K. et al. The realm of Penicillin G acylase in  $\beta$ -lactam antibiotics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 199–207, 2008.

CHATTERJEE, S. et al. Adsorption of a model anionic dye, eosin Y, from aqueous solution by chitosan hydrobeads. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, n. 1, p. 30-35, 2005.

CHENG, T. et al. Expression and purification of penicillin G acylase enzymes from four different micro-organisms, and a comparative evaluation of their synthesis/hydrolysis ratios for cephalexin. **Protein expression and Purification**, v. 46, p. 107-113, 2006.

CHEN Y. et al. Covalent immobilization of invertase onto the surface modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. **European Polymer Journal**, v. 36, p. 2095-2103, 2000.

CHIANG, C.J.; HSIAU, L.T.; LEE, W.C. Immobilization of cell-associated enzymes by entrapment in polymethacrylamide beads. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 2, p. 121-125, 1997.

CHILOV, G.G.; SVEDAS, V.K. Enzymatic hydrolysis of  $\beta$ -lactam antibiotics at low pH in a two-phase “aqueous solution –water-immiscible organic solvent” system. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 80, p. 699–707, 2002.

CHONG A.S.M.; ZHAO, X.S. Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst. **Catalysis Today**, v. 93–95, p. 293–299, 2004.

COLE, M. Formation of 6-Aminopenicillanic Acid, Penicillins, and Penicillin Acylase by Various Fungi. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 98-104, 1966.

COSTA, J.O.D. et al. Purificação de penicilina G acilase presente em caldo fermentativo de *Bacillus megaterium* por adsorção em suporte de afinidade. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba-PR, Brasil, 2007.

COULON, D. et al. Penicillin acylase purification with the aid of hydrophobic charge induction chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 808, p. 111-115, 2004.

DEMAIN, A.L.; ELANDER, R.P. The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present and the future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 5–19, 1999.

DEN HOLLANDER J. L. et al. Continuous enzymatic penicillin G hydrolysis in countercurrent water–butyl acetate biphasic systems. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 1591 – 1598, 2002.

DRAGET, K.I.; SKAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 21, p. 47-55, 1997.

DUAN, G.; CHEN, J.Y. Kinetic analysis of the effects of products removal on the hydrolysis of penicillin G by immobilised penicillin acylase. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 27-30, 1996.

DUTTA M; BARUAH, R; DUTTA, N.N. Adsorption of 6-aminopenicillanic acid on activated carbon, **Separation and Purification Technology**, v. 12, n. 2, p. 99-108, 1997.

DUTTA, M.; DUTTA, N.N.; BHATTACHARYYA, K.G. Adsorptive interaction of certain beta-lactam antibiotics in aqueous solution: interpretation by Frontier Orbital Theory. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2000.

ELANDER, R. P. Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n.5-6, p. 385-392, 2003.

ELDIN, M.S.M. et al. Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 445-451, 2000.

FERNANDEZ-CANON, JM. et al. II. Phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255: molecular specificity of its induction. **The Journal of Antibiotics**, v. 49, n. 9, p. 1410-1415 1989.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pk amino-groups - a new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550, 1993.

FERREIRA, J.S. et al. Solution crystallization kinetics of 6-aminopenicillanic acid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 6740-6744, 2006.

FITTON, V. et al. Penicillin acylase purification with the aid of pseudo-affinity chromatography, **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 553-560, 2001.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 10, p. 226-236, 1929.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and calvulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 753-762, 1982.

FUENTES, M. et al. Solid phase proteomics: Dramatic reinforcement of very weak protein-protein interactions. **Journal of Chromatography B**, v. 849, p. 243-250, 2007.

GAIDHANI, H.K. et al. Intensification of enzymatic hydrolysis of penicillin G: Part 2. model for enzymatic reaction with reactive extraction. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 1985 - 1992, 2002.

GINANI, M.F. et al. Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 801-804, 1999.

GONÇALVES, L.R.B. et al. Influence of mass transfer limitations on the enzymatic synthesis of b-lactam antibiotics catalyzed by penicillin G acylase immobilized on glioxil-agarose. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 411-418, 2008.

GRIME, J.K. Direct titrations of antibiotics with iodate solution. Part 1 Titration of some selected penicillins. **Analytica Chimica Acta**, v. 105, p. 361-368, 1979.

GUAN, Y.H.; LILLEY, T.H.; BROOK, A.H. Production of immobilized penicillin acylase using aqueous polymer systems for enzyme purification and in situ immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 218-224, 2001.

GUISÁN, J.M., Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J.M. et al. Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment to activated pre-existing supports. **Stability and Stabilization of Enzymes**, p. 55-62, 1993.

GUMUSDERELIOGLU, M.; AGI, P. Adsorption of concanavalin A on the well-characterized macroporous chitosan and chitin membranes. **Reactive & Functional Polymers**, v. 61, p. 211-220, 2004.

HAGE, D.S. Affinity chromatography: A review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 5, p.593-615, 1999.

HANO, T. et al. Extraction of penicillin with liquid surfactant membrane. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 23, n. 6, p. 772-775, 1990.

HENRIKSEN, C.M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Influence of the Dissolved Oxygen Concentration on the Penicillin Biosynthetic Pathway in Steady-State Cultures of *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 776-782, 1997.

HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 53-65, 1999.

HERRAIZ, T.; GALISTEU, J.; CHAMORRO, C.L. Tryptophan reacts with naturally occurring and food-occurring phenolic aldehydes to give phenolic tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids: activity as antioxidants and free radical scavengers, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2168-2173, 2003.

HILLENGA, D.J. et al. *Penicillium chrysogenum* takes up the penicillin G precursor phenylacetic acid by passive diffusion. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 7, 2589-2595, 1995.

HIRANO, S. et al. Chitosan staple fibers and their chemical modification with some aldehydes. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 293-298, 1999.

HOTOP, S. et al. Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivations. **Process Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 99-104, 1993.

IVANOV, A.E. et al. Conjugation of Penicillin Acylase with the Reactive Copolymer of N-Isopropylacrylamide: A Step Toward a Thermosensitive Industrial Biocatalyst. **Biotechnology Progress**, v.19, p. 1167-1175, 2003.

IVASHKIV, E. Chemical method for determination of 6-aminopenicillanic acid in fermentation broths. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 13, p. 2506-2507, 1964.

JEON, C.; HOLL, W.H. Chemical modification of chitosan and equilibrium study for mercury ion removal. **Water Research**, v. 37, p. 4770-4780, 2003.

JIANGUO, L. et al. Studies of poly(vinyl acetate-co-divinyl benzene) beads as a carrier for the immobilization of penicillin acylase and the kinetics of immobilized penicillin acylase. **Reactive & Functional Polymers**, v. 48, p. 75-84, 2001.

JUSTEN, P. et al. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 6, p. 762-775, 1998.

KAZAN, D.; ERTAN, H.; ERARSLAN, A. Stabilization of penicillin G acylase against pH by chemical cross-linking. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 135-140, 1996.

KEÇILI, R.; SAY, R.; YAVUZ, H. Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, p. 250-255, 2006.

KHEIROLOMOOM, A. et al. The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 205-211, 1999.

KHEIROLOMOOM, A. et al. Isolation of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 by physical and chemical treatments. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 223-227, 2001(a).

KHEIROLOMOOM, A. et al. Clarification of penicillin G acylase reaction mechanism. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1095-1101, 2001 (b).

KLEIN, J.; WAGNER, F. Immobilization of whole microbial cells for the production of 6-APA. In **Enzyme Engineering**, v. 5, p. 335-345, 1980.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 1-28, 1982.

KÓCZIÁN, K. et al. Site-specific protonation microequilibria of penicillin and cephalosporin beta-lactam core molecules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 1-7, 2007.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KUTZBACH, C.; RAUENBUSCH, E. Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105, **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v. 354, p. 45-53, 1974.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAUS, R. et al. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (iii) e manganês (ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2006.

LIBINSON, G.S. Stability of 6-aminopenicillanic acid in aqueous solutions with low and medium concentration. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 5, p. 552-555, 1971.

LIU, J.K.; ROUSSEAU, I. Mathematical model for internal pH control in immobilized enzyme particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 1582-1589, 1986.

LI, X.B.; ZHAOA, G.R.; YUAN, Y.J. A strategy of phosphorus feeding for repeated fed-batch fermentation of penicillin G. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 53–58, 2005.

LJUBIJANKIC, G. et al. High-level secretory expression of penicillin amidase from *Providencia rettgeri* in *Saccharomyces cerevisiae*: purification and characterization. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 330-336, 2002.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 1–10. 2005.

LÓPEZ, J.L.C. et al. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 61-77, 2005.

LUUK, A. M. et al. Anion Exchange Equilibria of Penicillin G, Phenylacetic Acid, and 6-Aminopenicillanic Acid versus Cl<sup>-</sup> on IRA400 Ion Exchange Resin. **Chemical Engineering**, v. 41, p. 239-243, 1996.

MASSOLINI, G. et al. Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 147–160, 2001.

MATEO, C. et al. Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 629-634, 2002.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274–280, 2006.

MEDIN, A.S. **Studies on structure and properties of agarose**. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Sweden, 1995.

MENEZES, J.C.; ALVES, T.P.; CARDOSO, J.P. Biotecnologia microbiana: a produção de penicilina, cap. 12, p.15 in “**Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**”, N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL, 2000.

MI, F.L.; SUNG, H.W.; SHYU, S.S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 61-72, 2002.

MILLER, GL, Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOZHAEV, V.V.; SIKSNIS, V.A. Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 1937-1945, 1983.

MUKHERJEE, G.N.; GHOSH, T.K. Metal-ion interactions with penicillins 6. Equilibrium study on the mixed-ligand complex-formation of cobalt (II), nickel (II), copper (II) and zinc (II) with 6-aminopenicillanic acid as the primary ligand and bipyridine, glycinate and

imidazole as secondary ligands. **Indian Journal of Chemistry Section A-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 869-871, 1994.

MUKHERJEE, G.N.; GHOSH, T.K. Metal-ion interaction with some antibiotic drugs of penicillin family 1. Equilibrium study on the complex-formation of cobalt (II), nickel (II), copper (II) and zinc (II) with 6-aminopenicillanic acid. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 68, n. 4, p. 194-196, 1991.

MWANGI, S.M.; GARSIDE, J. Morphology of 6-aminopenicillanic acid crystals and the effect of phenoxyacetic acid. **Journal of Crystal Growth**, v. 166, p. 1078-1083, 1996.

MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 431-476, 1993.

NOROUZIAN, D. et al. Immobilization of whole cell penicillin G acylase in open pore gelatin matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 26-29, 2002.

NUCCI, E.R. et al. On-line monitoring of penicillin G acylase production using a fuzzy logic algorithm. **Chemical Product and Process Modeling**, in press, 2009.

OLIVEIRA, B.F. **Preparação de microesferas de quitosana por spray drying com diferentes tipos de reticulação para uso na vacinação gênica**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil, 2005.

OLIVER, R.M. et al. **Pure 6-amino penicillanic acid production from fermentation broth containing penicillin by ultrafiltration, enzymatic conversion and isolation on ion exchange resin**. Patente número: WO9735029-A; EP826776-A; WO9735029-A1; ES2105989-A1; AU9720296-A; EP826776-A1; ES2105989-B1; JP11505425-W; US6110699-A, 1997.

PARMAR, A. et al. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA), **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 4, p. 289-301, 2000.

PATNAIK, P.R. Penicillin fermentation: Mechanisms and models for industrial-scale bioreactors, **Critical Reviews In Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 25-39, 2001.

PEÑALVA, M.A., Rowlands, R.T., Turner, G. The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 483-489, 1998.

PFIZER & CO INC. **Separation of amphoteric amino acids**. Patente: 1966-04303F.

PHADTARE, S. et al. Penicillin G acylase-fatty lipid biocomposite films show excellent catalytic activity and long term stability/reusability. **Biotechnology Progress**, v.18, p. 483-488, 2002.

PINOTTI, L.M. **Produção e purificação de penicilina G acilase**. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2003.

PINOTTI, L.M. et al. Recovery and partial purification of penicillin G acylase from E. coli homogenate and B. megaterium culture medium using an expanded bed adsorption column. **Biochemical Engineering Journal**, in press, 2009.

PINOTTI, L.M. et al. The production of penicillin G acylase by *B. megaterium* is amino acid consumption dependent. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 346-353, 2007.

PRIBYL, M. et al. Penicillin G hydrolysis in an electro-membrane reactor with immobilized penicillin G acylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 793–801, 2003.

PRIBYL M. et al. Dynamics of penicillin G hydrolysis in an electro-membrane reactor. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 77, p. 51-62, 2002.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 97, 1-13, 2004.

RAYCHOWDHURY, M.; CHAKRABARTI, P. A new method of estimation of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 413-415, 1979.

RODRIGUES; D.S. et al. Extração de ácido 6-aminopenicilânico presente em caldo fermentativo por adsorção em matrizes poliméricas. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife-PE, Brasil, 2008.

RODRIGUES, D.S. et al. Efeito do gradiente de íons na atividade de hidrólise de penicilina G catalisada por penicilina G acilase imobilizada. VIII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá-PR, Brasil, 2005.

RODRÍGUEZ-SÁIZ, M.; DÍEZ, B.; BARREDO, J.L. Why did the Fleming strain fail in penicillin industry?. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 464-470, 2005.

ROLINSON, G.N.; GEDDES, A.M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 3–8, 2007.

RUCKENSTEIN, E.; SASIDHAR, V. Acid generating immobilized enzymic reactions in porous media-activity control via augmentation of proton diffusion by weak acids. **Chemical Engineering Science**, v. 39, n. 7/8, p.1185-1200, 1984.

SANTARELLI, X. et al. Preparation, evaluation and application of new pseudo-affinity chromatographic supports for penicillin acylase purification. **Journal of Chromatography B**, v. 739, p. 63-72, 2000.

SCHUGERL, K.; SEIDEL, G. Monitoring of the concentration of  $\beta$ -lactam antibiotics and their precursors in complex cultivation media by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 179-189, 1998.

SHEHATA, M.R.; SHOUKRY, M.M.; BARAKAT, M.H. Coordination properties of 6-aminopenicillanic acid: binary and ternary complexes involving biorelevant ligands. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 1369 – 1386, 2004.

SHEN, S. et al. Process integration for production of 6-aminopenicillanic acid from penicillin G fermentation broth. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 571–574, 2006.

SHEWALE, J.G.; KUMAR, K.K.; AMBEDKAR, G.R. Evaluation of determination of 6-amino penicillanic acid by p-dimethylaminobenzaldehyde. **Biotechnology Techniques**, v. 1, p. 69–72, 1987.

SANO, S.; KATO, K; IKADA, Y. Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization. **Biomaterials**, v. 14, n. 11, p. 817-822, 1993.

SILVA, R.G. et al. Using a medium of free amino acids to produce penicillin G acylase in fed-batch cultivations of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p.37-43, 2006.

SKONEZNY, P.M.; STANKAVAGE, R.J.; STEIN, G.L. **Production of 6-aminopenicillanic acid useful for preparing e.g. ampicillin involves dissolving penicillin V acid in water, performing primary recovery of acid to obtain discharge stream, treating with nonionic resin, and eluting with water.** Patente número: US2005020685-A, 2005.

SKROB, F. et al. Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 738-744, 2003.

SMIDSROD, O.; SKAK-BRAEK, G. alginate as immobilization matrix for cells. **Trends of Biotechnology**, v. 8, p. 71-78, 1990.

SOUZA, V.R. **Diferentes meios de cultivo e condições operacionais na produção de penicilina G acilase por *Bacillus Megaterium*** (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2007a.

SOUZA, V.R. et al. Estudo de condições operacionais na produção de penicilina g acilase por *Bacillus megaterium*. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba-PR, Brasil, 2007b.

SOUZA, V.R. et al. Characterization of the penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.105 – 111, 2005.

SPIEß, A. et al. pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of  $\beta$ -lactam hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 3, p. 267-276, 1999.

SUCK, K. et al. Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 361-367, 2006.

SUGA, K.I. et al. Production of 6-aminopenicillanic acid in immobilized enzyme reactor with electro dialysis. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 26, n. 6, p. 709-714, 1993.

TARDIOLI, P.W. et al. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 565-574, 2003.

TAVARE, N.S.; JADHAV, V.K. Separation through crystallization and hydrotropy: the 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and phenoxyacetic acid (PAA) system. **Journal of Crystal Growth**, v. 198/199, p. 1320-1325, 1999.

TAVARE, N.S.; JADHAV, V.K. Solubilities of 6-aminopenicillanic acid and phenoxyacetic acid in hydrotrope solutions. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 41, p. 1196-1202, 1996.

TEWARI, Y.B.; GOLDBERG, R.N. Thermodynamics of the conversion of penicillin G to phenylacetic acid and 6-aminopenicillanic acid. **Biophysical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 245-252, 1988.

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiology**. Benjamin/Cummings Series in the Life Sciences, edição número 4, capítulo 7, 1992.

VAN DER DOES, T. et al. **Recovery of 6-amino-penicillanic acid from a mother liquor, useful as an intermediate in the production of beta-lactam antibiotics**. Patente número: EP950660-A; WO9948895-A; WO9948895-A1; EP950660-A1; AU9930361-A, 1999.

VAN DER WIELEN, L.A.M. et al. A countercurrent adsorptive reactor for acidifying bioconversions. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 10, p. 2315-2325, 1996.

VAN DE SANDT, E.J.A.X.; DE VROOM, E. Innovations in cephalosporin and penicillin production: Painting the antibiotics industry green. **Chimica Oggi—Chemistry Today**, v.18, p. 72–75, 2000.

VAZQUEZ-DUHALT, R. et al. Enzyme Conjugation to the Polysaccharide Chitosan: Smart Biocatalysts and Biocatalytic Hydrogels. **Bioconjugate Chemistry**, v. 12, p. 301-306, 2001.

VIEIRA, A.T.S. **Separação entre aminoácidos aromáticos e peptídeos**. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2004.

VIEIRA, M. F.; BARBOZA, M.; GIORDANO, R. L. C. Adsorption of components of enzymatic synthesis of ampicillin on different hydrophobic resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.108, p.705 - 714, 2003.

VIEIRA, R.S.; BEPPU, M.M. Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg (II) ions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 279, p. 196–207, 2006.

WANG, Z. et al. Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. **Current Opinion in Chemical Biology**, v., 3, p. 614–622, 1999.

WANG, Z. et al. Enzymatic hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid in cloud point system with discrete countercurrent experiment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 121–126, 2007.

WANG, Z. et al. Cloud point system as a tool to improve the efficiency of biotransformation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 589–594, 2005.

WENTEN, I.G.; WIDIASA, I.N. Enzymatic hollow fiber membrane bioreactor for penicillin hydrolysis. **Desalination**, v. 149, n.1-3, p. 279-285, 2002.

WHITEMAN, P.A.; ABRAHAM, E.P. Phenoxymethylpenicillin amidohydrolases from *Penicillium chrysogenum*. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 394, p. 31-33, 1996.

WHITE, S.; BERRY, D.R.; MCNEIL, B. Effect of phenylacetic acid feeding on the process of cellular autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 173–185, 1999.

WILSON, C.M. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. **Methods in Enzymology**, v. 91, p. 236-47, 1983.

WILSON, L. et al. Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: an easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 852-857, 2004.

WU, J.C. et al. Enhancement of penicillin G hydrolysis using penicillin acylase to 6-aminopenicillanic acid by simultaneous chromatographic separation. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1959–1962, 2000.

YONGXIN, Z. et al. Analysis of benzylpenicillin by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 792, p. 83-88, 1997.

ZHANG, X.D. et al. The interaction of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) with-6-aminopenicillanic acid in aqueous solution. **Chinese Chemical Letters**, v. 6, p. 531-532, 1995.