

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

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA COM DIFERENTES SUBSTRATOS EM  
REATOR INTEGRADO**

**Geisa de Abreu Leite**

**São Carlos – SP  
2009**

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

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA COM DIFERENTES SUBSTRATOS EM  
REATOR INTEGRADO**

**Geisa de Abreu Leite**

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

**Orientador: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano**

**São Carlos – SP  
2009**

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

L533se

Leite, Geisa de Abreu.

Síntese enzimática de ampicilina com diferentes substratos em reator integrado / Geisa de Abreu Leite. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

142 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Biotecnologia - processos. 2. Síntese enzimática. 3. Ampicilina. 4. Penicilina G acilase. 5. Reatores. I. Título.

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

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **GEISA DE ABREU LEITE**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 12 DE DEZEMBRO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:



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



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Lopes de Oliveira Ferreira  
**UFC**



Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite  
**UFBA**



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



Dr<sup>a</sup>. Fabiana Batigaglia  
**UFSCar**

Dedico este trabalho aos meus amados pais e a minha irmã, pois sempre me incentivaram e apoiaram nos momentos difíceis. Ao Fábio pelo companheirismo, apoio e paciência. A todos os meus amigos e amigas pela amizade, força e conselhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade e por ter me feito ir até o fim.

Agradeço de todo coração ao Professor Roberto de Campos Giordano pela orientação, dedicação e paciência, fatores essenciais para a realização deste trabalho. Muito obrigada mesmo!!! Á Professora Raquel de Lima Camargo Giordano, pela contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus conterrâneos, Wellington, Cássia, Luiza, Karol e Dasciana pelos momentos que passamos juntos longe de casa.

Agradeço muito a Deus por ter colocado na minha vida pessoas tão maravilhosas como o Fábio, meu amor, Sueli e Zinato, meus futuros sogros, Fabrício, Fernando e Elga, meus cunhados, João Pedro, meu sobrinho e a toda a sua família em especial a Elaine e o Zé Roberto. Agradeço também por todas as pessoas que conheci, especialmente meus amigos e amigas da pós-graduação: Renata, Vanessa, Juliana, Carolzinha, Patrícia, Fabiana, Aline, Rebeca, Letícia, Sandra, Mônica Iemma, Daniele, Anny, Débora, Adriano, Edson, Gilson, André, Thiago, Marcelo, Oldair, Adilson, Tiago.

Agradeço aos meus pais por nunca terem medido esforços na minha educação e a minha irmã e meu cunhado Walber por todo o apoio e preocupação.

Agradeço aos meus amigos e amigas de Fortaleza, em especial a Ana Carmem, Janaina, Fernanda, Veulena, Maíra e Cris pela eterna amizade.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e FINEP pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

Resumo-----	i
Abstract-----	ii
Lista de Figuras-----	iii
Lista de Tabelas-----	vii
Capítulo 1- Introdução -----	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica-----	6
2.1 - Enzimas-----	6
2.1.1 - Penicilina G Acilase -----	8
2.1.2 - Imobilização de Enzimas-----	10
2.1.3 - Suportes para Imobilização -----	14
2.2 - Antibióticos -----	19
2.2.1 - Antibióticos $\beta$ -lactâmicos -----	20
2.2.2 - Ampicilina -----	24
2.3 - Síntese de Antibióticos $\beta$ -lactâmicos Semi-sintéticos-----	25
2.3.1 - Síntese Termodinamicamente Controlada (STC)-----	26
2.3.2 - Síntese Cineticamente Controlada (SSC)-----	28
2.4 - Mecanismo de Ação da PGA-----	30
2.5 - Fatores que Influenciam na SCC-----	34
2.5.1 - Efeito do pH-----	34
2.5.2 - Efeito da Temperatura-----	38
2.5.3 - Concentração de Substrato-----	39
2.5.4 - Força Iônica-----	44
2.5.5 - Solvente Orgânico-----	46
2.6 - Constantes de Dissociação e Solubilidade dos Compostos-----	48
2.7 - Cristalização da Ampicilina no Interior do Reator (Reator Integrado) -----	51

2.8 - Separação da Ampicilina do Meio Reacional-----	53
Capítulo 3 – Materiais e Métodos -----	54
3.1 - Materiais e Equipamentos -----	54
3.1.1 - Materiais e Reagentes -----	54
3.1.2 - Equipamentos -----	55
3.2 - Métodos-----	56
3.2.1 - Pré-tratamento das Membranas de Diálise-----	56
3.2.2 - Diálise do Caldo Fermentativo para Pré-Concentração da Enzima PGA -----	57
3.2.3 - Métodos para Determinação de Proteínas-----	58
3.2.3.1 - Método de Lowry-----	58
3.2.3.2 - Método de Bradford-----	58
3.2.4 - Atividade Enzimática - Método NIPAB-----	59
3.2.5 - Obtenção das Partículas de Agar-Agarose e Agarose 10% (m/m)-----	59
3.2.6 - Ativação dos Suportes com Glicidol – Obtenção do Gel Gliceril-Agarose-----	60
3.2.7 - Oxidação dos Suportes – Obtenção do Gel Glioxil-Agarose-----	61
3.2.8 - Quantificação dos Grupos Aldeído dos Suportes-----	61
3.2.9 - Imobilização da PGA-----	62
3.2.10 - Atividade Enzimática - Método PDAB-----	63
3.2.11 - Obtenção das Partículas de Alginato-----	64
3.2.12 - Síntese de Ampicilina-----	64
3.2.13 - Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)-----	66
3.3 - Ensaios de Precipitação no Ponto Isoelétrico-----	67
Capítulo 4 – Resultados e Discussões-----	69
4.1 - Pré-Concentração da penicilina G acilase (PGA) -----	69
4.2 - Imobilização da PGA nos Diferentes Suportes -----	71
4.3 - Caracterização das Partículas - Diâmetro Médio -----	73
4.4 - Sínteses de Ampicilina-----	76

4.4.1 - Síntese Enzimática de Ampicilina Utilizando os Diferentes Ésteres de Cadeia Lateral-----	76
4.4.2 - Síntese de Ampicilina – Avaliação do Biocatalisador Agar 3%-Agarose ME 6% (m/m)-----	80
4.4.3 - Síntese de Ampicilina – Velocidades Iniciais-----	83
4.4.4 - Precipitação no Ponto Isoelétrico-----	104
4.4.5 - Síntese de Ampicilina – Estudo Cinético-----	105
4.4.6 - Síntese de Ampicilina – Batelada Alimentada-----	103
Capítulo 5 - Conclusões-----	116
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas-----	118
Apêndice A-----	129
Apêndice B-----	135

## RESUMO

Penicilina G Acilase (PGA), EC 3.5.1.11, é uma enzima empregada nas reações de hidrólise da penicilina G para produção do ácido 6-amino penicilânico (6-APA), sendo também utilizada na síntese de antibióticos semi-sintéticos. Este trabalho levantou a influência de diferentes concepções de biocatalisador e de diferentes doadores acil sobre a síntese de ampicilina com PGA imobilizada, determinando experimentalmente dados de rendimento (antibiótico produzido/doador acil consumido), seletividade (antibiótico produzido/fenilglicina gerada) e produtividade (antibiótico produzido (mmol)/UI/tempo). Primeiramente foram realizadas sínteses de ampicilina em meio homogêneo (com substratos e produtos solúveis), utilizando catalisador industrial Recordatti, a fim de verificar a influência dos diferentes doadores acil, os ésteres metílico (EMFG), etílico (EEFG) e isopropílico (EIFG) de D-fenilglicina na síntese de ampicilina. Os resultados obtidos mostraram que a utilização de EEFG, além de não reduzir a velocidade de síntese de ampicilina, também diminuiu a velocidade de hidrólise do éster, mostrando grande potencial para aumentar a seletividade da rota enzimática. Em seguida, PGA foi imobilizada covalentemente em matriz agar-agarose com diâmetro médio de  $1,3 \pm 7 \times 10^{-2}$  mm. Esse biocatalisador foi testado na síntese de ampicilina, a 25°C com os ésteres metílico e etílico, com o objetivo de avaliar seu desempenho em dois valores de pH (6,2 e 6,5). O éster etílico apresentou rendimentos e seletividades ( $71,0 \pm 4$  e  $2,2 \pm 4 \times 10^{-1}$ ) melhores que o éster metílico de fenilglicina ( $67,0 \pm 1$  e  $2,0 \pm 1 \times 10^{-1}$ ) sendo o pH 6,2 mais favorável. Dois diferentes biocatalisadores para uso na síntese de ampicilina com cristalização simultânea dos produtos foram testados: PGA imobilizada em partículas de agarose com diâmetro médio de  $95,2 \pm 3 \times 10^{-1}$  µm e, em seguida, envolvida em gel de alginato, resultando em partículas com  $2,1 \pm 6 \times 10^{-2}$  mm de diâmetro; e PGA imobilizada em partículas de agarose ME 10% ((m/m)) com  $1,4 \pm 8 \times 10^{-2}$  mm de diâmetro. Tanto o envolvimento da enzima imobilizada por uma matriz secundária (caso do catalisador agarose-alginato) como o uso de partículas de gel de dimensões milimétricas (agarose 1,4 mm) causaram modificações no microambiente da enzima, principalmente em razão dos perfis intra-partícula de íons gerados com o avanço da reação. Em vista do exposto acima, sínteses de ampicilina foram realizadas em três diferentes pHs (6,0; 6,2 e 6,5), a 25°C, utilizando os ésteres metílico, etílico e isopropílico com excesso de 6-APA. Para reduzir a hidrólise do antibiótico produzido, viabilizando sua produção industrial, foi necessário que ele precipitasse dentro do próprio reator de síntese. Avaliando de forma global seletividade, rendimento e produtividade se concluiu que uma estratégia promissora seria realizar a síntese utilizando éster etílico, catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL em pH 6,2. Condição em que se obteve produtividade de  $8,0 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$ , com seletividade  $2,0 \pm 2 \times 10^{-1}$  e rendimento 62%. As reações também foram realizadas com excesso de éster, porém a seletividade foi drasticamente reduzida chegando a  $1,1 \pm 6 \times 10^{-2}$ . A última etapa do trabalho foi o estudo cinético da síntese de ampicilina. Sínteses foram realizadas em várias condições iniciais de concentração de substrato (6-APA e EEFG) em pH 6,0 e 6,2 com o catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL. Em alguns casos cristais de ampicilina e D(-)-FG foram semeados no início da reação para verificar possíveis efeitos inibitórios dos produtos. Maiores rendimentos e seletividades foram alcançados quando se aumentava a concentração de 6-APA frente à concentração de éster. Efeito inibitório na hidrólise do antibiótico foi verificado quando se utilizou alta concentração de ambos os substratos. Em geral, os experimentos realizados em meio heterogêneo favoreceram rendimento, seletividade e produtividade. Em todos os experimentos o pH mais baixo (pH 6,0) favoreceu a melhora do rendimento e seletividade enquanto que a produtividade foi favorecida a pH 6,2. A síntese em reator batelada alimentada, com alta concentração dos substratos, favoreceu a seletividade da reação, que passou de 2,5 para 3,5.

## ABSTRACT

Penicillin G acylase (PGA), EC 3.5.1.11, is an enzyme employed in the hydrolysis reactions of penicillin G to produce 6-amino penicillanic acid (6-APA), but it can also be used in the synthesis of semi-synthetic antibiotics. This work investigated the influence of different biocatalysts and of different acyl donors on the ampicillin synthesis with immobilized PGA, determining experimental yield data (antibiotic produced / consumed acyl donor), selectivity (antibiotic produced/D(-)-phenylglycine generated) and productivity (produced antibiotic (mmol)/UI/time). First of all, ampicillin synthesis was carried out in homogeneous solution (with substrates and products soluble), using industrial catalyst Recordati, in order to verify the influence of the different acyl donors, D(-)-phenylglycine methyl (PGEM), ethyl (PGEE) and isopropyl (PGEI) esters on the synthesis of ampicillin. The results showed that the use of EEPG, besides not reducing the ampicillin synthesis rate, also it reduces the ester hydrolysis rate, showing great potential to increase the selectivity of the enzymatic route. The multipoint covalent attachment of PGA was carried out in agar-agarose support with medium diameter of  $1.3 \pm 7 \times 10^{-2}$  mm. That biocatalyst was tested in the ampicillin synthesis at 25°C with the methyl and ethyl esters, with the objective of evaluating its acting in two pH values (6.2 and 6.5). The ethyl ester presented the yield and selectivity ( $71 \pm 4$  and  $2.2 \pm 4 \times 10^{-1}$ ) better than the phenylglycine methyl ester ( $67 \pm 1$  and  $2.0 \pm 1 \times 10^{-1}$ ) being the pH 6,2 more favorable. Two different biocatalysts for use in the ampicillin synthesis with simultaneous crystallization of the products were tested: PGA immobilized within agarose particles with average diameter of  $95.2 \pm 3 \times 10^{-1}$   $\mu\text{m}$  and, soon after, wrapped by alginate gel, resulting in particles with average diameter of  $2.1 \pm 6 \times 10^{-2}$  mm; and PGA immobilized in agarose ME particles (10% wt) with average diameter of  $1.4 \pm 8 \times 10^{-2}$  mm. So much the involvement of the immobilized enzyme by a secondary support (agarose-alginate catalyst) as the use of particles gel of millimetric dimensions (agarose 1.4 mm) caused modifications in the microambient of that enzyme, mainly in reason of the profiles of ions intra-particle generated with the progress of the reaction. In view of the above exposed, ampicillin synthesis was carried out in three different pHs (6.0; 6.2 and 6.5), at 25-°C, using the methyl, ethyl and isopropyl esters with excess of 6-APA. To reduce the hydrolysis of the produced antibiotic, making possible its industrial production, was necessary that it precipitates inside of the synthesis reactor. When we evaluated of global form the selectivity, yield and productivity we concluded that a promising strategy would be to carry out the synthesis using ethyl ester, alginate-PGA-agarose 6BCL catalyst in pH 6.2. By this condition was obtained productivity of  $8.0 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$ , selectivity  $2.0 \pm 2 \times 10^{-1}$  and yield 62%. The reactions were also carried out with ester excess, however the selectivity was drastically reduced getting at  $1.1 \pm 6 \times 10^{-2}$ . The last stage of this work was the kinetic study of the ampicillin synthesis. Synthesis was carried out in several initial conditions of substrate concentration (6-APA and PGEE) in pH 6.0 and 6.2 with the alginate-PGA-agarose 6BCL catalyst. In some cases, ampicillin and D(-) -FG crystals were sowed in the reaction start to check possible inhibitory effects of the products. Largest yields and selectivities were obtained when the concentration of 6-APA was increased by the ester concentration. Inhibitory effect in the antibiotic hydrolysis was verified when a high concentration of both substrates was used. In general, the experiments carried out in heterogeneous medium favored the yield, selectivity and productivity. In all of the experiments the lowest pH (pH 6.0) favored the improvement of the yield and selectivity while the productivity was favored the pH 6.2. The synthesis in fed-batch reactor, with high concentration of substrates, favored the selectivity of the reaction, it passed from 2.5 to 3.5.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da PGA. Em rosa aparece a subunidade beta e em azul a subunidade alfa. No centro da molécula, indicado em vermelho, encontra-se o resíduo serina catalítico (Flores <i>et al.</i> , 2004). -----	9
Figura 2 -	Mecanismo catalítico proposto para a ação da penicilina G acilase na hidrólise de penicilina G (Duggleby <i>et al.</i> , 1995). -----	10
Figura 3 -	Métodos de imobilização de enzimas (adaptada de Blanch & Clark, 1996 e Dalla – Vechia <i>et al.</i> , 2004). -----	11
Figura 4 -	Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado. -	12
Figura 5 -	Esquema do processo de gelificação por difusão (Smidsrod e Draget, 1997). -----	14
Figura 6 -	Reações para a obtenção de géis glioxil-agarose via epóxido (glicidol). -----	17
Figura 7 -	Estrutura do alginato: a) $\beta$ -D-manurônico (M); b) $\alpha$ -L-gulurônico (G) e c) estrutura em blocos das duas unidades. -----	18
Figura 8 -	Esquema da ligação de resíduos G com o íon cálcio, em moléculas adjacentes de alginato (Moe <i>et al.</i> , 1995). -----	18
Figura 9 -	Estrutura química geral das penicilinas -----	21
Figura 10 -	Hidrólise enzimática da penicilina G por penicilina G acilase (PGA) para a produção de 6-APA (Arroyo <i>et al.</i> , 2003). -----	23
Figura 11 -	Estrutura química da ampicilina. -----	25
Figura 12 -	Reação de síntese termodinamicamente controlada de ampicilina a partir de D-(-)-fenilglicina (FG) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (Diender <i>et al.</i> , 1998, Ospina <i>et al.</i> , 1996a, Margolin <i>et al.</i> , 1980). -----	27
Figura 13 -	Síntese cineticamente controlada de ampicilina. O doador acil, neste caso um éster, se diferencia em R, podendo ser o radical metila, etila ou isopropila. Os respectivos álcoois serão: metílico, etílico e isopropílico. (Adaptada de Ribeiro, 2007). -----	29
Figura 14 -	Mecanismo de ação da PGA para a síntese de antibióticos $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. -----	31
Figura 15 -	Mecanismo da síntese enzimática cineticamente controlada de antibióticos $\beta$ -lactâmicos. As reações destacadas são as etapas não-consensuais na literatura. Para síntese de ampicilina utilizando éster metílico de fenilglicina, tem-se: EH = enzima não-ligada (com o hidrogênio da hidroxila da serina terminal presente); AB = EMFG; NH = 6-APA; BH = metanol; AOH = FG; AN = ampicilina; EA = complexo acil-enzima; EA •• NH = complexo acil-enzima-núcleo. Ligações não-covalentes estão pontilhadas (Ribeiro <i>et al.</i> , 2005). -----	33
Figura 16 -	Efeito do pH na relação síntese/hidrólise (seletividade). 6-APA - 50mM, EMFG -	36

	150 mM, 25°C, PGA - 3 UI/ml. (Ospina <i>et al.</i> , 1996 a). -----	
Figura 17 -	Solubilidade da ampicilina e fenilglicina em água a 25°C em função do pH (Vieira, 2003). -----	50
Figura 18 -	Solubilidade do 6-APA e EMFG em água pura a 25°C em função do pH (Vieira, 2003). -----	50
Figura 19 -	Representação esquemática da seqüência utilizada nos ensaios de precipitação no ponto isoelétrico da ampicilina. -----	68
Figura 20 -	Eletroforese das amostras de sobrenadante ao longo das 24 horas de imobilização. --	72
Figura 21 -	Fotografia do biocatalisador agar 3% - agarose ME 6% ((m/m)). -----	74
Figura 22 -	Fotografia do biocatalisador agarose ME 10% ((m/m)). -----	74
Figura 23 -	Fotografia do biocatalisador alginato - agarose 6BCL ((m/m)). -----	75
Figura 24 -	Perfil de concentração de ampicilina obtido em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,5. C <sub>inicial</sub> de 6-APA 10 mM e C <sub>inicial</sub> dos diferentes ésteres 50 mM. Enzima comercial Recordati – 2,6 UI/mL <sub>reator</sub> . -----	78
Figura 25 -	Perfil de concentração de D(-) fenilglicina obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,5. C <sub>inicial</sub> de 6-APA 10 mM e C <sub>inicial</sub> dos diferentes ésteres 50 mM. Enzima comercial Recordati – 2,6 UI/mL <sub>reator</sub> . -----	78
Figura 26 -	Perfis das seletividades, (S/H=Ampicilina/Fenilglicina), obtidos na síntese de ampicilina empregando os ésteres metílico, etílico e isopropílico previamente sintetizados. -----	79
Figura 27 -	Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos na síntese enzimática de ampicilina a 25°C: a) pH 6,5 e b) pH 6,2. C <sub>inicial</sub> de 6-APA 250 mM e C <sub>inicial</sub> éster metílico 25 mM, com.desvios-padrão de triplicatas. -----	81
Figura 28 -	Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C: a) pH 6,5 e b) pH 6,2. C <sub>inicial</sub> de 6-APA 250 mM e C <sub>inicial</sub> éster etílico 25 mM, com.desvios-padrão de triplicatas. -----	81
Figura 29 -	Seletividade (S/H) ao longo da reação de síntese enzimática de ampicilina a 25°C utilizando diferentes ésteres de fenilglicina: a) éster metílico e b) éster etílico. -----	82
Figura 30 -	Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster isopropílico 150 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução. -----	87
Figura 31 -	Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster metílico 150 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução. -----	88

Figura 32 - Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster etílico 150 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução. -----	89
Figura 33 - Solubilidade da D(-)-FG e ampicilina durante a reação de síntese realizada com os diferentes ésteres. Ensaios 11, 14 e 16 (excesso de 6-APA). -----	90
Figura 34 - Micrografia da partícula de agarose 10% (m/m) antes da síntese. (A) partícula inteira, (B) corte da partícula. -----	92
Figura 35 - Micrografia da partícula de agarose 10% (m/m) após a síntese. (A) partícula inteira e (B) corte da partícula. -----	93
Figura 36 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL antes da síntese. Partícula inteira. -----	94
Figura 37 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL antes da síntese. Corte da partícula. (a) agarose 6BCL e (b) gel de alginato. -----	95
Figura 38 - Figura 39 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após a síntese, sem lavagem. Partícula inteira. (a) agarose 6BCL, (b) gel de alginato, (c) e (d) cristais. -----	96
Figura 49 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após a síntese, sem lavagem. Corte da partícula. -----	97
Figura 40 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após síntese, com lavagem. Partícula inteira. (a) agarose 6BCL e (b) gel de alginato. -----	98
Figura 41 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após a síntese, com lavagem. Corte da partícula. -----	98
Figura 42 - Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 150 mM, éster metílico 300 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução. -----	102
Figura 43 - Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 150 mM, éster etílico 300 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução. -----	103
Figura 44 - Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 150 mM, éster isopropílico 300 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução. -----	103

Figura 45 - Solubilidade da D(-) FG e ampicilina durante a reação de síntese realizada com os diferentes ésteres. -----	104
Figura 46 - Cromatograma da amostra de ampicilina purificada analisada em HPLC. *Impureza não identificada. -----	105
Figura 47 - Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução (Total = cristais + solúveis). -----	108
Figura 48 - Perfis de concentração dos produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 50 mM e D(-)-FG 70 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução (Total = cristais + solúveis). -----	109
Figura 49 - Perfis de concentração dos reagentes e produtos da síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. -----	110
Figura 50 - Perfis da seletividade em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL <sub>Reator</sub> . -----	111
Figura 51 - Perfis de concentração dos reagentes e produtos da síntese enzimática de ampicilina em reator semi-contínuo com alimentação de reagentes em pulsos a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 21,4 UI/mL <sub>Reator</sub> . -----	114
Figura 52 - Perfil da seletividade em síntese enzimática de ampicilina em reator semi-contínuo a 25°C, pH 6,0. C <sub>inicial</sub> : 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 21,4 UI/mL <sub>Reator</sub> . -----	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Algumas propriedades do gel de agarose 6 BCL. -----	16
Tabela 2 -	Critérios utilizados para avaliar o desempenho da SCC de ampicilina. -----	30
Tabela 3 -	Constantes de dissociação em água pura a 25°C [pK = -log(K)]. -----	49
Tabela 4 -	Desempenho do reator em vórtices na síntese enzimática de ampicilina nas diferentes condições operacionais. -----	52
Tabela 5 -	Concentrações iniciais dos reagentes no estudo cinético a pH 6,0 e 6,2. -----	66
Tabela 6 -	Resultados obtidos na etapa de centrifugação/diálise e diálise/centrifugação. Ensaio em triplicata. -----	69
Tabela 7 -	Quantidade de grupos aldeídos obtidos durante a oxidação dos suportes. -----	71
Tabela 8 -	Atividade enzimática do sobrenadante na imobilização. -----	72
Tabela 9 -	Atividade medida nos derivados pelo método PDAB. -----	73
Tabela 10 -	Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH. -----	80
Tabela 11 -	Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizado como catalisador agarose ME 10% (m/m). Excesso de 6-APA. -----	85
Tabela 12 -	Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizado como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL (m/m). Excesso de 6-APA. -----	86
Tabela 13 -	Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizando como catalisador agarose ME 10% (m/m). Excesso de Éster. -----	100
Tabela 14 -	Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL (m/m). Excesso de Éster.-----	101
Tabela 15 -	Rendimento e grau de pureza da ampicilina obtida no processo de precipitação no ponto isoelétrico a temperatura ambiente. -----	104
Tabela 16 -	Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com o éster etílico e pH 6,0 utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL (m/m). -----	106
Tabela 17 -	Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com o éster etílico e pH 6,2 utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL (m/m). -----	112

## 1 – INTRODUÇÃO

Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem um grupo de substâncias caracterizadas pela presença de um grupamento químico denominado anel  $\beta$ -lactâmico. Este anel é o responsável pela atividade antimicrobiana desses antibióticos. Após a descoberta do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), pesquisas em diversos laboratórios resultaram na descoberta de penicilinas semi-sintéticas com propriedades diferentes das penicilinas microbianas (Menezes *et. al.*, 2000).

Os antibióticos podem ser empregados como agentes terapêuticos em medicina humana e veterinária, utilizados para evitar infecções, promover ganho ponderal e rápido crescimento de animais criados para a alimentação humana, proteger alimentos congelados, resfriados ou em conserva contra deterioração, combater ervas daninhas, preservar plantas e esterilizar meios laboratoriais (Tavares,1994).

A ampicilina, primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico semi-sintético derivado da penicilina G, foi sintetizada por Doyle em 1961. Algumas das suas características são: atividade contra certas bactérias gram-negativas aeróbias (ex. *Escherichia coli*); eficiência no tratamento da meningite e em infecções causadas por microorganismos gram-positivos; pode ser usada na forma anidra, tri-hidratada, sódica e ligada a benzatina ou probenecida; pode ser administrada via oral, intramuscular e intravenosa; altamente absorvida quando administrada oralmente e apresenta alta estabilidade em pH ácido (Korolkovas e de França, 2000). As importações brasileiras de ampicilina na forma de sais chegam a 153 ton/ano e na forma de medicamentos a 201 ton/ano (15 de Janeiro de 2007, aliceweb.mdic.gov.br).

A síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos torna-se uma alternativa bastante promissora para substituição do processo de síntese química, que requer a utilização de grupos de proteção para evitar reações secundárias, temperaturas muito baixas ( $-30^{\circ}\text{C}$ ),

---

derivados altamente reativos de fenilglicina e o uso de reagentes tóxicos como piridina, dimetilnilina e diclorometano (Ospina *et al.*, 1996a).

As enzimas são proteínas que apresentam elevada eficiência catalítica operando em condições suaves de reação (meio aquoso, pH neutro e temperaturas moderadas), possuem elevada seletividade e especificidade frente ao substrato não sendo necessária a utilização de solventes tóxicos e a proteção de grupos funcionais, sendo, portanto, indicadas para processos que necessitam de condições ambientais mais limpas (Bruggink *et al.*, 1998; Ghosh *et al.*, 1996; Hernandez-Jústiz *et al.*, 1999; Kim e Lee, 1996a; Youshko *et al.*, 2000; Clausen e Dekker, 2000).

Apesar das excelentes perspectivas que as enzimas apresentam como catalisadores, sua aplicação industrial não é imediata, pois estas apresentam outras características que limitam sua utilização em escala industrial. As principais dificuldades se devem, primeiro, à solubilidade destas no meio de reação, o que inviabiliza economicamente sua separação dos produtos. O segundo problema é sua instabilidade operacional frente a variações de pH e temperatura (Hernández-Justiz, 1996).

Em conseqüência das dificuldades acima citadas, em muitos processos é essencial imobilizar e estabilizar as enzimas usadas como catalisadores, para viabilizar sua aplicação em um processo industrial. A imobilização de enzimas em suportes mediante união covalente multipontual permite superar as desvantagens de solubilidade em meio aquoso e da instabilidade operacional no uso industrial, tornando-as catalisadores viáveis para a produção e transformação de compostos de interesse, seja da indústria alimentícia, de química fina, energética ou farmacêutica (Ferreira *et al.*, 2004).

A Penicilina G Acilase (PGA), enzima utilizada neste trabalho, é um eloqüente exemplo de substituição progressiva de processo químico por enzimático, sendo a segunda enzima mais usada industrialmente no mundo na forma imobilizada, abaixo somente da

---

glicose isomerase (Ospina, 1992). A principal aplicação da penicilina G acilase (PGA) é a hidrólise da penicilina G para a produção do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), composto chave na produção industrial de uma ampla gama de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, tais como ampicilina e amoxicilina. Desde que Cole (1969) descobriu que a PGA era também capaz de catalisar a reação de transferência do grupo acil para o núcleo antibiótico, ela vem sendo largamente empregada no estudo da síntese de antibióticos semi-sintéticos.

A síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos pode ser realizada através de duas estratégias: síntese termodinamicamente controlada, onde temos a reação reversa da hidrólise do antibiótico, e síntese cineticamente controlada (SCC), onde é necessário o uso de derivados ativados dos doadores da cadeia acil para promover a acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico.

Este trabalho estudou a síntese de ampicilina através da rota de síntese cineticamente controlada. Na SCC catalisada pela PGA, utiliza-se um doador acil ativado na forma de éster ou amida. Os substratos aqui empregados para a produção de ampicilina foram: éster metílico, etílico e isopropílico de D(-)-fenilglicina, como doadores acil e 6-APA.

Alguns problemas existentes na reação de síntese cineticamente controlada de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a hidrólise do antibiótico recém-formado e a hidrólise do doador acil, também catalisadas pela penicilina G acilase, devem ser controlados para viabilizar economicamente a rota enzimática industrial.

O rendimento da SCC é dado pelo balanço entre as velocidades de três diferentes reações, todas catalisadas pela PGA: a síntese do antibiótico (atividade transferase ou de síntese), a hidrólise do derivado do doador acil (atividade hidrolase – esterase ou amidase), e a hidrólise do antibiótico que é previamente sintetizado (atividade amidase), Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996.

---

Para que a rota enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos seja industrialmente competitiva, é necessário que se encontre um reator eficiente, que opere em seu ponto ótimo. Muitos processos industrialmente importantes envolvendo produção de antibióticos, enzimas e ácidos orgânicos são realizados em reator tipo batelada alimentada (também chamado semi-contínuo), onde o substrato é adicionado continuamente em um reator operando em transiente. Reactores tipo batelada alimentada são particularmente úteis em bioprocessos onde haja inibição por alta concentração de substrato ou produtos (Sengupta e Modak, 2001).

Muitas reações bioquímicas envolvendo enzimas imobilizadas ou livres como catalisadores apresentam cinéticas com inibição por substrato e/ou produto. Algumas apresentam cinéticas muito complexas, e o controle na adição de substrato se torna essencial para uma máxima formação do produto desejado. Recentemente numerosos estudos trataram da determinação da velocidade de alimentação ótima de substrato em reatores de batelada alimentada.

No caso da síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas, a utilização de reator tipo batelada alimentada possibilita o controle da concentração dos substratos e produtos, de tal forma que se minimizem as velocidades de hidrólise do éster, assim como efeitos inibitórios devidos ao 6-APA. Outra maneira de se minimizar efeitos indesejáveis das reações que concorrem com a síntese é a utilização de um meio aquoso-precipitado onde produtos (e substratos, eventualmente) estejam em fase sólida no reator. A utilização de um meio heterogêneo com precipitação de produtos e/ou com reagentes cristalinos pode ser mais vantajosa que a utilização de um meio homogêneo, onde todas as espécies estão solúveis. A cristalização do antibiótico e do éster impede que estes sejam hidrolisados aumentando, assim, a eficiência do processo (Youshko *et al.*, 2000, Ferreira, 2004 b).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a síntese de ampicilina, em termos de seletividade, produtividade e rendimento, utilizando diferentes biocatalisadores e diferentes doadores acil (ésteres) como substrato.

## 2 – REVISÃO BIBLIGRÁFICA

### 2.1 - ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídos de proteínas ou glicoproteínas, que desempenham a função de catalisar reações nos organismos vivos. Podem ser encontradas em células animais, células de plantas ou em microorganismos.

Mais de 3.000 diferentes enzimas já foram identificadas e muitas destas isoladas em sua forma pura. Várias têm sido obtidas na forma cristalina, sendo a seqüência de aminoácidos e a estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

As propriedades funcionais das enzimas dependem essencialmente do número e distribuição dos resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia protéica. Essencialmente, as enzimas apresentam três propriedades importantes para seu uso como catalisadores em processos de biotransformação (Illanes, 1994), sendo essas:

- Estabilidade: a capacidade catalítica de uma enzima depende da manutenção da sua estrutura nativa, que, por sua vez, é dependente de muitas forças de interação como as pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto, forças de van der Waals, interações polares e iônicas. As mais suaves alterações (pH, temperatura, etc.) no meio reacional podem afetar a estrutura da enzima ocasionando a perda parcial ou total de sua funcionalidade biológica.
- Atividade: atua diminuindo a energia de ativação requerida para a transformação de um substrato em produto e, conseqüentemente, aumentando a velocidade do sistema reacional. É capaz de aumentar a velocidade de uma reação por um fator de  $10^{14}$ . A capacidade catalítica de uma enzima é devida ao seu sítio ativo, uma estrutura complexa cuja configuração permite alojar a molécula de substrato na posição correta para que os grupos funcionais da enzima efetuem a transformação química.

- Especificidade: define a afinidade de uma enzima por grupos específicos de um determinado substrato. Esta é uma propriedade imprescindível das enzimas enquanto catalisadores. Duas características estruturais são determinantes na especificidade da enzima: o substrato possui ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se unem à enzima permitindo seu correto alinhamento no sítio ativo para que a reação possa ocorrer. As enzimas também são capazes de atuar seletivamente discriminando isômeros de um composto quiral (Sio e Quax, 2004).

Em consequência de todas as características acima mencionadas, enzimas imobilizadas são catalisadores de grande potencial industrial. A alta atividade, em condições suaves de temperatura e pH, torna essas biomoléculas alternativas importantes como catalisadores em processos cujos reagentes e/ou produtos sejam instáveis e se decomponham em condições extremas de reação, como é o caso dos fármacos.

Atualmente, devido à crescente preocupação com a preservação dos recursos naturais e também devido à implementação de novas leis de controle ambiental, os processos enzimáticos tornam-se, industrialmente, importantes competidores de alguns processos químicos tradicionais. Dentre os vários processos enzimáticos comercialmente utilizados em diversas áreas de atuação como industrial, ambiental, analítica, médica, alimentícia, química fina, etc. Podem ser citados a obtenção de 6-APA a partir da hidrólise da penicilina G, produção de antibióticos, produção de combustíveis, desenvolvimento de biossensores, degradação de pesticidas, produção de corantes, isomerização da glicose, hidrólise da lactose, clarificação de bebidas e resolução de misturas racêmicas (Lima e Angnes, 1999).

### 2.1.1 - PENICILINA G ACILASE (PGA)

A PGA, também conhecida como penicilina amidase, penicilina amidohidrolase ou penicilina aciltransferase é uma das enzimas de maior interesse industrial. Existe uma grande variedade de PGAs originadas de diversos microorganismos como bactérias e fungos. As culturas mais comumente usadas para a produção em grande escala de PGA incluem: *Bacillus megaterium*, *Streptomyces lavendula*, *Achromobacter* sp., *Proteus rettgeri*, *Actinoplanes* sp., *Bovista plúmbea*, *Kluyvera atrophila*, *Pseudomonas melanogenum* e *Penicillium chrysogenum* (Chisti e Moo-Young, 1991; Shewale et al., 1990), porém a mais amplamente utilizada e estudada é a PGA de *Escherichia coli* ATCC 11105 (EC 3.5.1.11) (Bruggink et al., 1998, Parmar et al., 2000).

Há mais de 20 anos a aplicação industrial mais significativa da PGA é a hidrólise da penicilina G para produção de ácido 6-aminopenicilânico, o qual é composto de partida para a síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos (Calleri *et al.*, 2004). Porém, ela também pode ser utilizada em diversas outras aplicações biotecnológicas como, por exemplo, a síntese de peptídeos, acilação enantioselectiva e separação racêmica (Shewale *et al.*, 1990; Parmar *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003).

O uso da PGA de *Escherichia coli* tornou possível o desenvolvimento de procedimentos para a síntese em larga escala de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. A PGA catalisa a hidrólise/síntese de acil derivados do ácido fenilacético ou de um composto análogo via a formação de intermediários covalentes acil-enzima através da serina terminal (Savidge, 1984).

O consumo anual de PGA está estimado em 10–30 milhões de toneladas. Para satisfazer a demanda de produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, um crescimento significativo ocorreu durante as duas últimas décadas. Indústrias que produzem antibióticos  $\beta$ -lactâmicos

substituíram os processos tradicionais de hidrólise de penicilina pelo processo enzimático, cuja eficiência está entre 80–90% (Elander, 2003).

O centro ativo da PGA da *Escherichia coli* está situado entre a subunidade  $\alpha$ , com 209 aminoácidos e 20 kDa, responsável pelo reconhecimento da cadeia lateral do substrato, e a subunidade  $\beta$ , com 557 aminoácidos e 70 kDa, que contribui com um resíduo serina N-terminal responsável pela atividade catalítica (Bock *et al.*, 1983, Novella *et al.* 1994). Juntas, as duas subunidades formam a enzima cataliticamente ativa e sua dissociação ocasiona a inativação, de forma praticamente irreversível, da mesma (Figura 1).

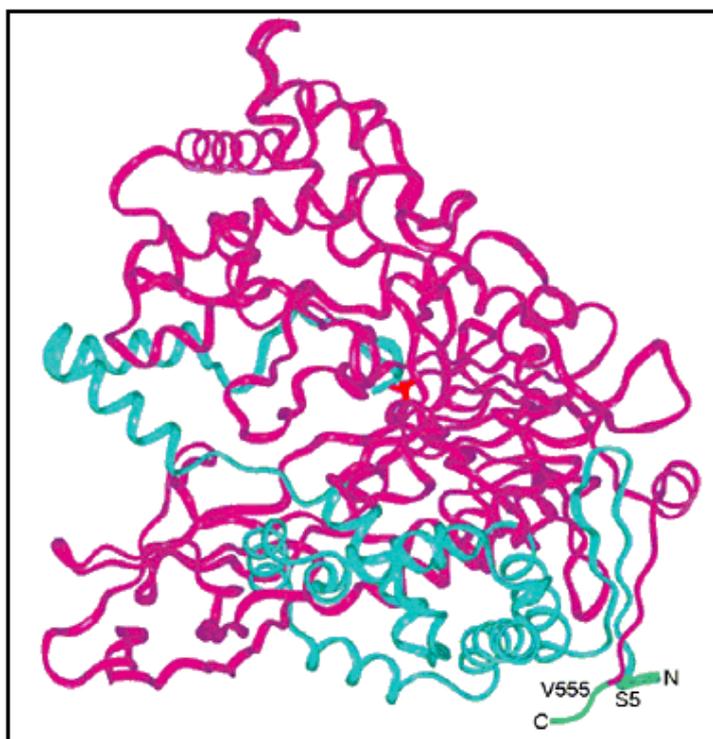


Figura 1 – Estrutura da PGA. Em rosa aparece a subunidade beta e em azul a subunidade alfa. No centro da molécula, indicado em vermelho, encontra-se o resíduo serina catalítico (Flores *et al.*, 2004).

A estrutura do sítio ativo da PGA é complexa, em forma de bolsa com grupamentos serina e asparagina, entre outros. A Figura 2 apresenta uma proposta de mecanismo catalítico para a hidrólise da penicilina G que mostra a importante função das ligações de hidrogênio entre a água e o grupo  $\alpha$ -amino, altamente nucleofílico, da serina B1. O substrato também interage com os nitrogênios B69 e os da ligação lateral da asparagina

B241. No sítio ativo, a serina B1 fica posicionada para um ataque nucleofílico ao carbono carbonil do substrato. A desacilação do complexo acil-enzima ocorre por ataque nucleofílico de uma molécula de água (Duggleby *et al.*, 1995, Giordano *et al.* 2006).

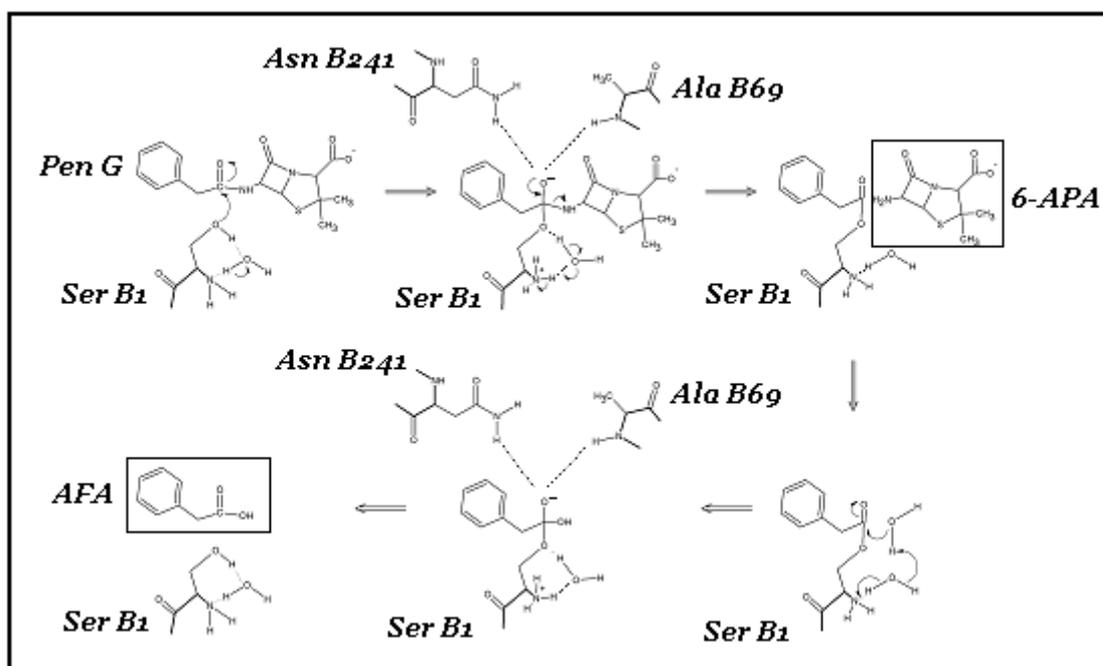


Figura 2 - Mecanismo catalítico proposto para a ação da penicilina G acilase na hidrólise de penicilina G (Duggleby *et al.*, 1995).

### 2.1.2 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A viabilidade comercial de qualquer enzima depende da sua estabilidade operacional e reaproveitabilidade. Apesar das excelentes perspectivas que as enzimas apresentam como catalisadores, sua aplicação industrial apresenta elevado custo, pois estas, na forma livre, são solúveis em água não podendo ser reutilizadas devido à sua perda durante processo: como estão sempre presentes em baixas concentrações, sua separação do produto final muitas vezes é inviável economicamente, impedindo assim seu uso contínuo (Bryjak e Trochimczuk, 2006, Heilmann *et al.*, 2007). As enzimas também estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos que podem ocorrer durante a estocagem ou uso (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Os problemas acima citados podem ser minimizados com a utilização de enzimas imobilizadas, pois as técnicas de imobilização, além de fornecerem estabilidade às enzimas, também permitem que a reação ocorra em catálise heterogênea, facilitando a recuperação e reutilização do biocatalisador (Calleri *et al.*, 2004, Cecchini *et al.*, 2007). A imobilização necessariamente não aumenta a estabilidade da enzima, mas isto pode ser alcançado através de diferentes técnicas (Lopez-Gallego *et al.*, 2005, Cao *et al.*, 2001, Giordano *et al.*, 2006).

Uma enzima imobilizada é aquela que está fisicamente confinada ou localizada em uma região definida do espaço com retenção de sua atividade catalítica podendo ser utilizada repetida e continuamente (Gonçalves, 1996). A imobilização de enzimas pode ocorrer através de três principais métodos: confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou simplesmente aprisionamento físico, ligação cruzada onde se observa o estabelecimento de ligações químicas entre duas moléculas de enzima e ligação da enzima a um suporte sólido, que pode se dar através de adsorção física ou ligação química (iônica metálica ou covalente, Parmar *et al.*, 2000; Shewale e Sivaraman, 1989). A Figura 3 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para a imobilização de enzimas.

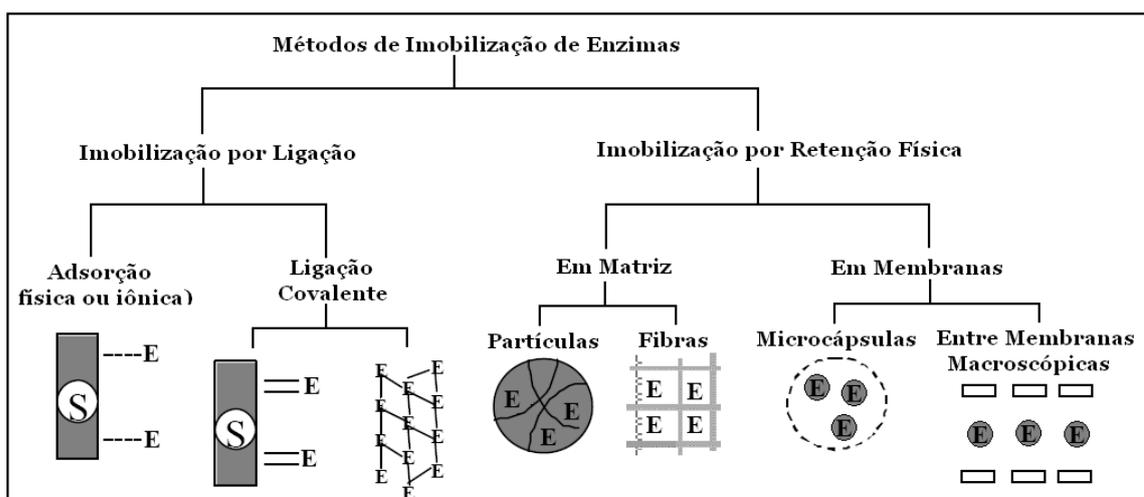


Figura 3 – Métodos de imobilização de enzimas (adaptada de Blanch & Clark, 1996 e Dalla – Vechia *et al.*, 2004).

Embora várias técnicas de imobilização possam ser usadas para a uma mesma enzima, nenhuma delas pode ser considerada como um método geral devido à diversidade estrutural das enzimas, substratos e produtos. Cada método tem limitações específicas e, para uma aplicação particular, é necessário utilizar um procedimento simples e barato que resulte em boa atividade e estabilidade operacional do derivado.

Na imobilização por ligação covalente, o suporte ativado se combina quimicamente a grupos funcionais da enzima não essenciais para a atividade catalítica, dependendo dos grupos reativos disponíveis no suporte (Figura 4). Estabilização através da imobilização multipontual covalente é uma das possibilidades mais promissoras para melhorar a estabilidade da enzima, desde que as posições relativas de todos os grupos envolvidos sejam mantidas. Porém, apenas 20% da superfície da enzima, aproximadamente, participará da reação enzima-suporte e uma real estabilização da proteína só poderá ser alcançada se realizadas muitas ligações entre esta área da proteína e o suporte (Mateo *et al.*, 2006).

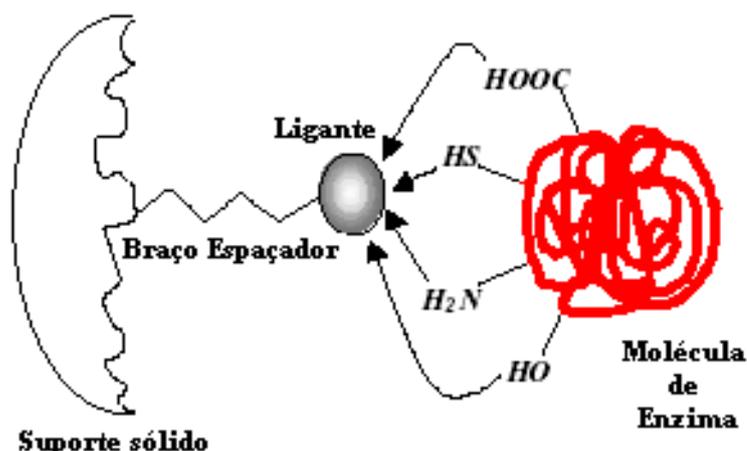


Figura 4 – Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado.

As enzimas podem ser ligadas covalentemente ao suporte na presença de um inibidor competitivo para prevenir a possibilidade de dano ao sítio ativo da enzima (Lehninger, 1977). A maioria dos suportes não possui sítios reativos que podem ligar-se

diretamente com a enzima, mas possuem grupos hidroxil, amino, amida ou carboxil que requerem ativação anterior. Os reagentes mais comumente utilizados como agentes ativantes de suporte são os reagentes polifuncionalizados contendo grupos epóxidos ou aldeídos e o brometo de cianogênio.

A imobilização multipontual em suportes ativados é realizada através dos grupos amino dos resíduos Lisina (Lys) da enzima e do grupo  $\text{NH}_2^+$  - terminal. A maioria das enzimas apresenta muitos resíduos lisina que geralmente não estão envolvidos com o centro catalítico e os grupos amino são polares estando geralmente expostos ao meio na superfície da enzima. Os grupos amino, quando desprotonados, são muito reativos não necessitando de ativação prévia para atuarem como agentes nucleofílicos contra átomos com carga (+ $\delta$ ) localizados na superfície do suporte (Guisán, 1988).

A ligação unipontual enzima-suporte pode ser reversível; porém, quando ocorrem dois ou mais pontos de ligação a imobilização torna-se irreversível (Guisán, 1988). A natureza forte das ligações covalentes formadas impede que o biocatalisador seja arrastado para fora do suporte. O biocatalisador imobilizado deve idealmente promover o aumento da interação enzima-substrato e a diminuição da inibição pelo produto, alterar o pH ótimo aparente para um valor desejado, facilitar a recuperação da enzima para reutilização.

Várias abordagens utilizando biocatalisadores comerciais, que objetivam facilitar a separação do catalisador dos cristais em um reator integrado, têm sido sugeridas em patentes (Ilhan e Kraemer, 2001, Kaasgaard *et al.*, 1992, Clausen e Dekkers, 2000). Giordano *et al.*, 2003, propõem a utilização de uma segunda matriz (co-imobilização), composta de gel de pectina ou alginato, para proteger a integridade física do biocatalisador e aumentar o tamanho das partículas, facilitando desta forma a separação dos cristais e produtos.

A técnica de formação de géis por difusão é caracterizada como sendo de gelificação rápida, onde a solução de alginato é gotejada em solução contendo os íons cálcio,

formando esferas únicas e independentes (Smidsrod e Draget, 1997). Nesta técnica é criada uma zona de gelificação da superfície em direção ao centro do gel. Moléculas de alginato difundirão da parte interna, não gelificada, rumo à região contendo os íons cálcio, e a concentração de alginato é considerada aproximadamente igual à zero no centro do gel.

Assim, o gel formado não é homogêneo, com maior concentração de alginato na superfície em relação ao centro. A homogeneidade do gel pode ser alcançada com alginato de alta massa molar e altas concentrações de íons gelificantes. A Figura 5 ilustra este processo de gelificação.

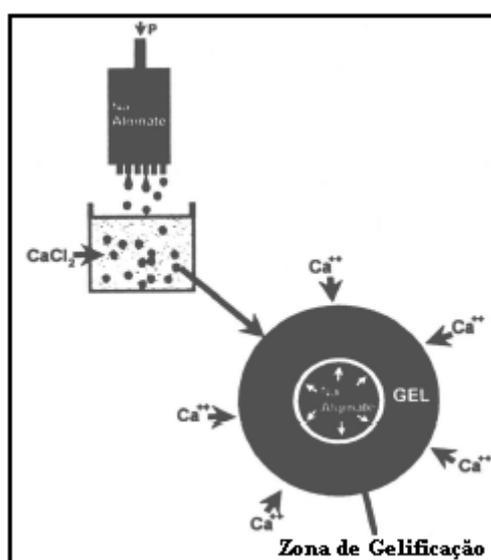


Figura 5 - Esquema do processo de gelificação por difusão (Smidsrod e Draget,1997).

### 2.1.3 - SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Os suportes para imobilização de enzimas podem ser classificados conforme sua composição (orgânicos e inorgânicos) e morfologia (porosos, não-porosos e estrutura em gel) (Messing, 1975).

Suportes inorgânicos são mais adequados para o uso industrial devido as suas propriedades físicas, além disso, apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como: elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes

---

orgânicos e ataque de microrganismos e fácil regeneração por processo de pirólise. No mais, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente, devido a grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos.

Quanto à morfologia, os suportes podem ser: porosos, não porosos e estrutura gel. Os suportes porosos, tanto orgânicos quanto os inorgânicos, apresentam como vantagem grande área superficial interna disponível para imobilização da enzima, que neste caso fica protegida de turbulência externa. Observa-se que a morfologia interna dos suportes porosos permite não só a imobilização da enzima, como também o acesso das moléculas de produtos e substratos. Os não-porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, contudo, apresentam uma limitada área superficial disponível para imobilização de enzimas. Para aumentar a carga de enzima imobilizada, utilizam-se partículas finas ou fibras, porém, estas são dificilmente removidas da mistura reacional, limitando o uso em reações contínuas, desde que levadas a uma alta pressão em reatores de leito fixo. Além disso, influem no grau de escoamento se utilizadas em reatores de leito fluidizado (Pereira, 1996).

Os géis, embora de uso simples, são úteis apenas nos casos em que a grade formada seja de malha suficiente para reter a enzima sem implicar em restrições difusionais sérias para o substrato.

Dentre os suportes já estudados para a imobilização da PGA, podem ser citados o gel de agarose, sílica macroporosa, epóxi, aluminossilicato mesoporoso (MCM-41), resinas poliacrílicas, nylon e quitosana (Guisán, 2006, He *et al.*, 2005, Terreni *et al.*, 2001, Trevisan *et al.*, 2000).

O gel de agarose é freqüentemente escolhido para ser utilizado como suporte de imobilização, pois possui grande área superficial, é facilmente ativável e apresenta boas propriedades mecânicas, podendo ser utilizado em condições industriais.

Algumas das propriedades do gel de agarose 6BCL, como densidade, raio médio e porosidade, determinadas por Gonçalves, 2001a, são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Algumas propriedades do gel de agarose 6 BCL.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Densidade (g/mL)	<b>1,02 ± 1,6×10<sup>-3</sup></b>
Raio médio (µm)	<b>86,4 ± 26</b>
Porosidade (%)	<b>94,50 ± 1,6×10<sup>-1</sup></b>

No método de ativação com grupos glioxil, obtém-se um gel de agarose com elevada densidade de grupos aldeídos, moderadamente separados de sua superfície (característica importante para evitar impedimentos estéricos), que reagirão com a enzima pela zona de maior densidade de grupos lisina (Guisán, 1988). A utilização de grupos aldeídos tem como principal vantagem a reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar distorções importantes na sua estrutura, enquanto reagem com os grupos aminos da mesma (Mateo *et al.*, 2000 e Pereira, 1996).

As etapas para a obtenção de géis glioxil-agarose utilizados no processo de imobilização covalente multipontual, são apresentadas na Figura 6. A ativação de suportes via éóxido ocorre em duas etapas. Primeiro ocorre a eterificação do suporte com glicidol, obtendo-se grupos gliceril e posteriormente ocorre a oxidação desses grupos com periodato de sódio obtendo-se grupos glioxil (Guisan, 1992).

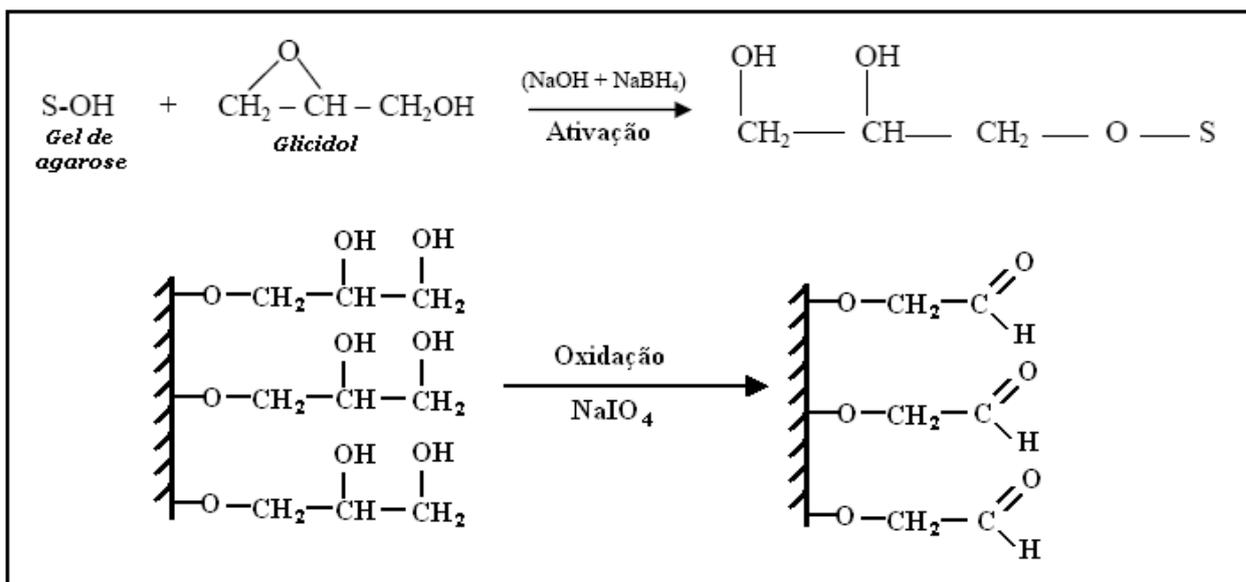


Figura 6 – Reações para a obtenção de géis glioxil-agarose via epóxido (glicidol).

Alginato é um polímero de ocorrência natural, bastante hidrossolúvel, com ausência de toxicidade, alta viscosidade e capacidade de gelificação. É produzido a partir da polimerização da algina, um polissacarídeo obtido a partir de algas marinhas marrons, especialmente a espécie *Macrocystis pyrifera*, encontrada ao longo da costa da América do Norte e do Sul, Nova Zelândia, Austrália e África. Conforme apresentado na Figura 7, o alginato é um copolímero linear de ácido β-D-manurônico (M) e ácido α-L-gulurônico (G), ligações 1,4 α- e 1,4 β- glicosídicas, com proporções variadas e arranjos sequenciais de M e G ao longo da cadeia. A composição molecular específica de uma amostra de alginato depende da alga de onde foi extraído, podendo ocorrer variação nas porcentagens de ácido manurônico e gulurônico (Sriamornsak, 1998).

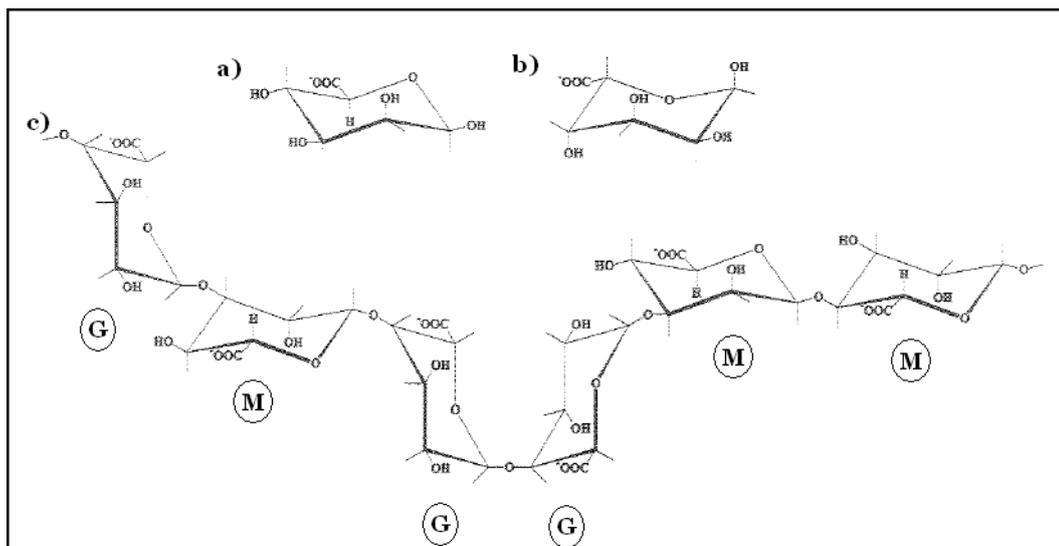


Figura 7 – Estrutura do alginato: a)  $\beta$ -D-manurônico (M); b)  $\alpha$ -L-gulurônico (G) e c) estrutura em blocos das duas unidades (Sriamornsak, 1998).

A gelificação do alginato é baseada na sua afinidade e habilidade de ligar-se a certos íons divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$ . O íon ligante é seletivo ao conteúdo guluronato, e quanto maior for este conteúdo maior será a resistência mecânica do gel. Suportes de alginato são obtidos a partir do entrecruzamento do grupo carboxil do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico com uma solução catiônica gelificante como cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Draget *et al.*, 1997 e Smidsrod *et al.*, 1990). A Figura 8 mostra a ligação de dois resíduos G com o íon cálcio. Na literatura esta estrutura recebe o nome de ‘egg box’.

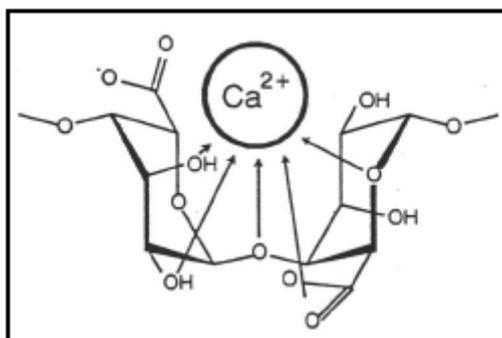


Figura 8 - Esquema da ligação de resíduos G com o íon cálcio, em moléculas adjacentes de alginato (Moe *et al.*, 1995).

Diferente do alginato de sódio, o alginato de cálcio é insolúvel em água sendo, portanto amplamente utilizado para imobilização, formação de membranas e

microencapsulação (Funduenanu *et al.*, 1999 e Velten *et al.*, 1999). O gel de alginato de cálcio é desestabilizado na presença de fósforo, lactato e citrato ou cátions não gelificantes como sódio e magnésio, pois estes compostos provocam afastamento das cadeias poliméricas devido à remoção de íons cálcio e as enzimas aprisionadas fisicamente tendem a lixiviar para o meio reacional (Smidsrod e Skak-Braek, 1990 e Draget *et al.*, 1997).

## 2.2 – ANTIBIÓTICOS

Antibióticos são substâncias químicas específicas capazes de inibir o crescimento de microorganismos patogênicos ou, eventualmente, destruí-los. São produzidos por organismos vivos e seus análogos estruturais podem ser obtidos por síntese ou semi-síntese (adição de diferentes cadeias laterais ao anel central ácido 6-aminopenicilânico)

A forma de atuação antimicrobiana por parte dos antibióticos pode ocorrer de acordo com processos diferentes, atuando sobre estruturas distintas como (Santana, 2006):

- Na respiração e/ou fosforilação oxidativa: os compostos que atuam dessa forma não são usados na terapêutica, pois atingem todas as células, tanto as invasoras quanto as do hospedeiro;
- Na parede celular: esta estrutura, importante para a proteção e sustentação da célula bacteriana, possui uma característica comum à maioria das bactérias: apresenta um componente chamado de basal, o qual é formado de um polímero denominado de mucopeptídeo. Todos os antibióticos que atuam sobre a parede celular impedem a síntese da camada basal. Já que eles impedem a sua síntese e não destroem a já existente, as bactérias devem estar em condições proliferativas para que o antibiótico possa agir. Sem a parede celular o organismo não consegue sobreviver, pois ocorre um desequilíbrio da pressão osmótica, acarretando lise celular. Neste grupo se inserem as penicilinas e cefalosporinas;

- Na membrana citoplasmática: os antibióticos que atuam nesta estrutura podem agir de duas maneiras: desorganizando a estrutura da membrana ou causando modificações iônicas que provocam falhas na permeabilidade da membrana;
- Na síntese de ácidos nucleicos: este tipo de antibiótico pode impedir a replicação da informação genética (impedindo a ação da DNA-polimerase), interferir no metabolismo dos nucleotídeos e na transcrição do DNA. Eles atacam a informação genética do organismo, sendo letais às células. Possuem pouca seletividade, sendo usados em casos extremos ou como agentes antitumorais;
- Na síntese de proteínas: podem tanto dificultar a tradução do RNAm quanto provocar a formação de proteínas defeituosas. Atuam nas estruturas periféricas dos ribossomos, onde ocorre a síntese de novas proteínas.

### 2.2.1 - ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS

Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são uma classe de agentes bactericidas caracterizados pela presença de um grupamento químico comum, responsável pela ação antimicrobiana, chamado anel  $\beta$ -lactâmico. Agem interferindo na síntese dos componentes do peptidoglicano da parede celular da bactéria. Conseqüentemente, sem a proteção da parede celular, a célula morre devido à alta pressão osmótica interna que causa rompimento da mesma. (Polderman-Tijmes, 2004). São pertencentes a esta classe de antibióticos as penicilinas, aminopenicilinas (dentre elas a ampicilina), cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenes.

As penicilinas, Figura 9, têm uma estrutura comum composta por um anel tiazolidina fundido ao anel  $\beta$ -lactâmico (estrutura de três carbonos e um nitrogênio). Qualquer alteração nessa estrutura ocasiona a inativação do antibiótico, fazendo com que este perca sua

função bactericida (Gonçalves, 2001a). A cadeia lateral R determina o espectro antibacteriano, a estabilidade em meio ácido, a resistência a  $\beta$ -lactamases e as propriedades farmacocinéticas do antibiótico.

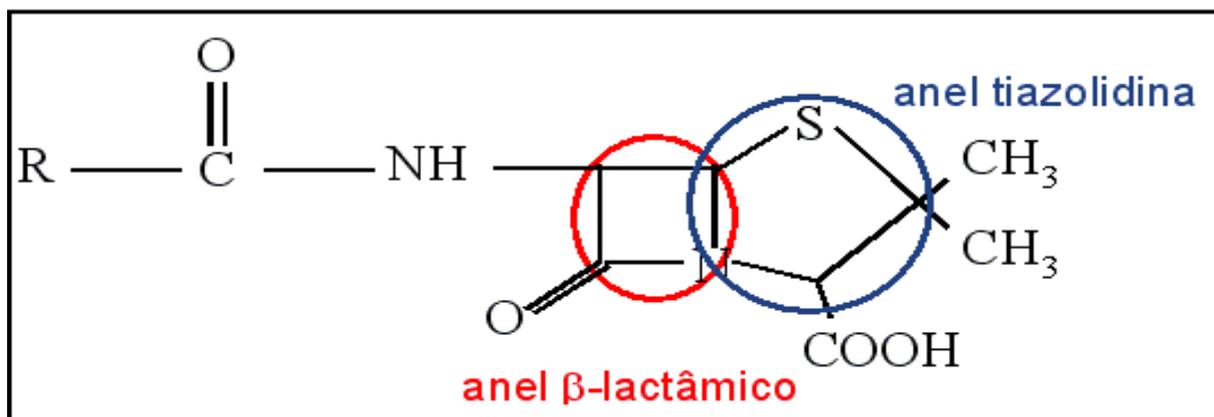


Figura 9 – Estrutura química geral das penicilinas.

Diferentes métodos podem ser utilizados para a obtenção de penicilinas. Dentre eles estão o cultivo de microrganismos (fornecendo penicilinas naturais ou microbianas) e os métodos semi-sintético e sintético (este último não é competitivo com os outros processos de obtenção).

Penicilina G e penicilina V apresentam um mesmo espectro de atividade contra bactérias Gram positivas e são as principais penicilinas produzidas por fermentação de fungos filamentosos como o *Penicillium chrysogenum* (Nielson *et al.*, 1995, Korolkovas e de França, 2000). Por ser degradada no estômago pelo suco gástrico, deve ser administrada por via intramuscular (Nathwani e Wood, 1993). Porém, este antibiótico é bastante utilizado quando se deseja um rápido efeito ou quando há necessidade de altas concentrações no plasma sanguíneo.

Grande parte dessas penicilinas é utilizada como matéria-prima para a produção do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), após hidrólise da cadeia lateral. Outros fungos (como, por exemplo, o *Cephalosporium chrysogenum*) são cultivados para produzir

uma classe diferente de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as cefalosporinas, que, após hidrólise da cadeia lateral, fornecem o ácido 7-aminocefalosporâmico (7-ACA) ou o ácido 7-aminodesacetoxicefalosporâmico (7-ADCA) – o qual pode ser obtido pela transformação química do 7-ACA.

Dentre as penicilinas produzidas por microorganismos, denominadas penicilinas naturais, a penicilina G, também conhecida como benzilpenicilina, é a única ainda comercialmente utilizada (Marzo e Dal Bo, 1998). Alta eficiência e baixa toxicidade são as duas características fundamentais que fazem das penicilinas os antibióticos mais utilizados.

As penicilinas semi-sintéticas são assim denominadas porque são obtidas mediante a incorporação, por via sintética, de grupamentos químicos específicos ao ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).

A quebra da ligação amida entre o grupo amino primário do núcleo  $\beta$ -lactâmico e o grupo carboxila do ácido fenilacético lateral da penicilina G, como mostram na Figura 10, pode ser realizada industrialmente por catálise enzimática separando o núcleo  $\beta$ -lactâmico da cadeia lateral (Sio e Quax, 2004). O primeiro processo para a produção de 6-APA foi desenvolvido usando uma desacilase de *Streptomyces lavendulae* e penicilina V como substrato. A patente para este processo foi depositada por Beecham Pharmaceuticals em março de 1959. Posteriormente foi descoberta uma desacilase de origem bacteriana e a penicilina G passou a ser utilizada para a produção de 6-APA. Com a disponibilidade de 6-APA foi possível a síntese de um conjunto extenso de novas penicilinas (Rolinson e Geddes, 2007).

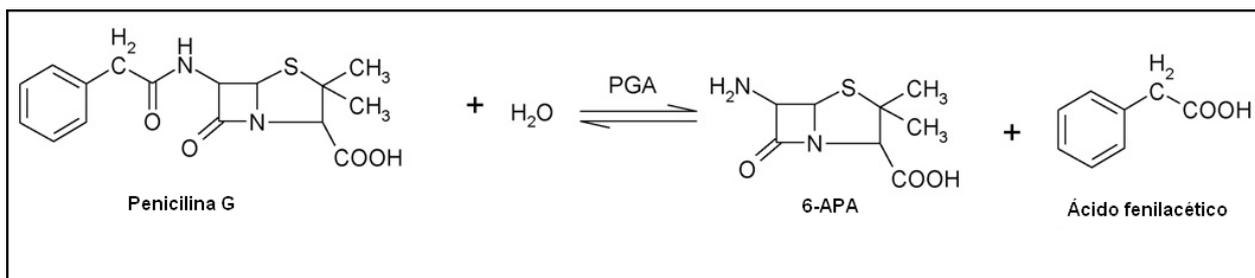


Figura 10 – Hidrólise enzimática da penicilina G por penicilina G acilase (PGA) para a produção de 6-APA (Arroyo *et al.*, 2003).

Partindo do núcleo, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), e condensando-o a diversas cadeias laterais diferentes é possível a síntese de penicilinas semi-sintéticas (van de Sandt e de Vroom, 2000). A baixa atividade contra bactérias Gram-negativas e a instabilidade em meio ácido da penicilina G foram os obstáculos superados pelo aparecimento dos antibióticos semi-sintéticos. Dentre as vantagens dos antibióticos semi-sintéticos em relação aos naturais podem ser citadas: maior espectro de ação antimicrobiana, maior facilidade de sua absorção pelo organismo e resistência ao suco gástrico, o que possibilita sua ingestão via oral.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, em particular penicilinas e cefalosporinas, representam um dos principais mercados biotecnológicos do mundo. A evolução do mercado mundial de semi-sintéticos desde seu aparecimento foi expressiva, passando de 4.000 ton/ano em 1970 para 45.000 ton/ano em 2000 (Bruggink e Roy, 2001). Com vendas anuais de aproximadamente US\$ 15 bilhões, eles compõem aproximadamente 65% do mercado total de antibióticos (Elander, 2003). Sozinhos eles constituem a maioria das vendas do mundo: 30.000 ton/ano de um total de 50.000 ton/ano produzidos mundialmente (de Souza *et al.*, 2005).

### 2.2.2 - AMPICILINA

Ampicilina (ácido 6-[2-amino-2-fenilacetamida] penicilânico) é um dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais usados, com produção mundial estimada em 5.600 ton/ano (Ospina *et al.*, 1996a). Atualmente as importações brasileiras de ampicilina na forma de sais chegam a 153 ton/ano e ampicilina na forma de medicamentos a 201 ton/ano (15 de Janeiro de 2007, aliceweb.mdic.gov.br).

Em 1956, um ano antes da descoberta do 6-APA, Paul Garrod escreveu no Diário Médico britânico: “A característica mais inquietante da prática hospitalar atual é a prevalência de infecções por *Staphylococcus* devido à resistência ao antibiótico”. A primeira penicilina semi-sintética estável frente à penicilinase ( $\beta$ -lactamase) de *Staphylococci* e clinicamente efetiva contra *Staphylococcus aureus* foi a metecilina. A metecilina foi introduzida no mercado em 1960, apenas três anos após a descoberta do 6-APA, e no ano seguinte (1961) ocorreu o aparecimento da ampicilina (Rolinson e Geddes, 2007).

Em 1964, pesquisas mostraram que a introdução de um grupo p-hidroxi à cadeia lateral da ampicilina conduzia a outra penicilina semi-sintética, denominada amoxicilina. A amoxicilina é um dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais usados, devido ao fato da resistência bacteriana a essa substância ser limitada (Louwrier e Knoelest, 1997). Além disso, como é um antibiótico de amplo espectro, esta penicilina semi-sintética é aplicável contra uma grande variedade de infecções bacteriológicas. Outra vantagem é que sendo muito estável a pH ácido, pode ser usada por via oral (Tsuji *et al.*, 1978).

A ampicilina difere estruturalmente da penicilina G devido à presença de um grupo amino, ionizável, na posição alfa do carbono benzênico da cadeia lateral (Figura 11).

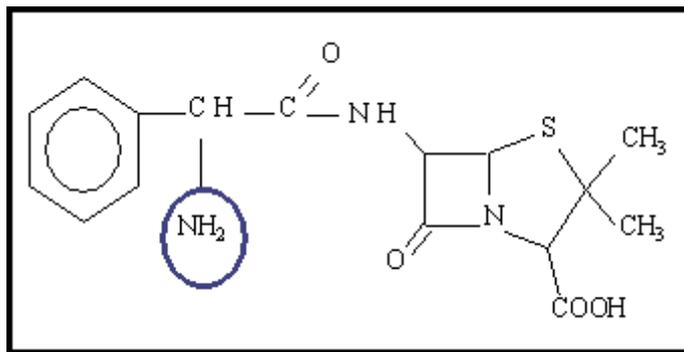


Figura 11 - Estrutura química da ampicilina.

O grupamento amino confere à ampicilina um amplo espectro de ação, maior até que o da benzilpenicilina. São algumas das características da ampicilina: ativa contra certas bactérias gram-negativas aeróbias (ex. *Escherichia coli*); eficaz no tratamento da meningite e em infecções causadas por microorganismos gram-positivos; pode ser usada na forma anidra, trihidratada, sódica e ligada a benzatina ou probenecida; pode ser administrada via oral, intramuscular e intravenosa; alta taxa de absorção quando administrada oralmente e alta estabilidade em pH ácido (Korolkovas e de França, 2000).

A ampicilina sofre inativação por efeito das  $\beta$ -lactamases, porém quando administrada concomitantemente com ácido clavulânico este inibe as  $\beta$ -lactamases produzidas como mecanismo de defesa por microorganismos resistentes (Ospina *et al.*, 1996a).

### 2.3 - SÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS SEMI-SINTÉTICOS

Tradicionalmente os antibióticos semi-sintéticos são produzidos em escala industrial através de processos químicos, porém, devido à sua complexidade, estes apresentam algumas desvantagens (Ospina *et al.*, 1996a). Os processos químicos exigem diversas etapas de proteção e desproteção dos grupos reativos para evitar reações de hidrólise não seletiva. Para tanto, são necessários solventes organoclorados, tóxicos e de difícil manejo, que geram resíduos não recicláveis e nocivos ao meio ambiente. Os solventes organoclorados podem ser

cancerígenos, sendo indesejáveis tanto como resíduos quanto como impureza presente no produto, ainda que como traços (Diago e Ludescher, 1998). As reações ocorrem a baixa temperatura (-30°C) e com longo tempo de reação.

A reação de síntese enzimática de ampicilina pela rota enzimática utilizando Penicilina G Acilase (PGA), conhecida desde 1969, pode ser realizada à temperatura ambiente, em meio aquoso e em pH neutro. Nos últimos anos, devido ao surgimento de diversas leis de proteção ambiental, a síntese enzimática, por ser uma rota alternativa mais limpa, no âmbito da química verde, se torna mais atrativa quando comparada à síntese química. No entanto, atualmente, um dos principais obstáculos à sua implementação industrial é a busca por melhores rendimentos, seletividades e produtividades, sendo conhecida apenas uma planta que utiliza a rota enzimática para a produção de cefalosporina semi-sintética (Wegman *et al.*, 2001). Neste contexto, a obtenção de modelo cinético é uma ferramenta fundamental para a otimização da rota enzimática a fim de viabilizar sua implantação em escala industrial.

A síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos pode ser realizada através de duas estratégias: síntese termodinamicamente controlada, onde temos simplesmente a reação reversa da hidrólise do antibiótico, e síntese cineticamente controlada, onde é necessário o uso de derivados ativados dos doadores da cadeia acil para promover a acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico.

### 2.3.1 - SÍNTESE TERMODINAMICAMENTE CONTROLADA

A síntese termodinamicamente controlada (STC), cujo rendimento depende apenas do equilíbrio termodinâmico entre reagentes e produto, é considerada a estratégia mais

simples para a obtenção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. No caso da ampicilina (Figura 12), ocorreria a condensação direta do 6-APA com a D-(-)-fenilglicina (doador acil)

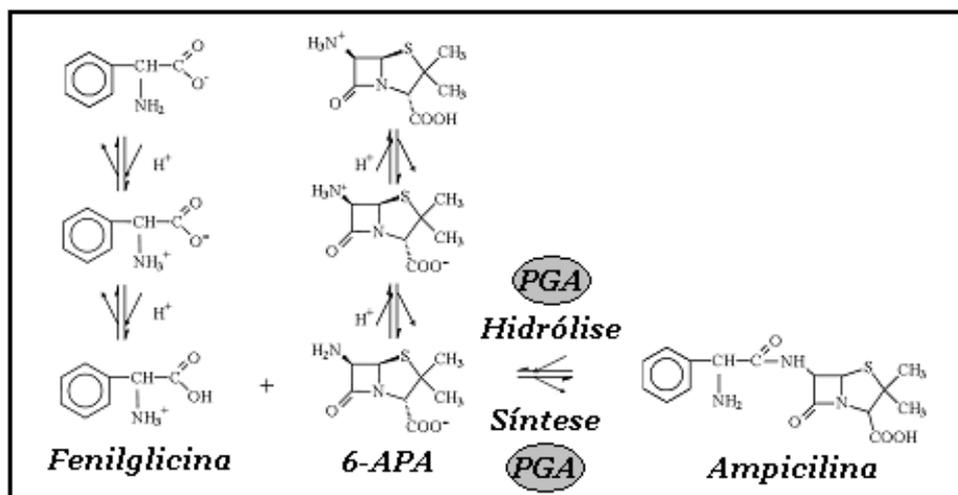


Figura 12 – Reação de síntese termodinamicamente controlada de ampicilina a partir de D-(-)-fenilglicina (FG) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (Diender *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996a, Margolin *et al.*, 1980).

Para que a síntese ocorra, ou seja, para o substrato ser reconhecido e o sítio ativo da PGA de *E. coli* estar disponível, o grupo amino do 6-APA e o grupo carboxílico da FG devem estar neutros (Margolin *et al.*, 1980, Diender *et al.*, 1998). A faixa de pH onde a PGA tem alta atividade está entre 5,0-8,0, porém nessa condição a concentração de FG na forma neutra (grupo carboxílico descarregado) é muito baixa. (Diender *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996a).

Outra desvantagem da síntese termodinâmica é o fato de que em meio aquoso o equilíbrio da reação é fortemente deslocado no sentido da hidrólise. Para contornar esse problema foram testados solventes orgânicos, pois além de atuarem diminuindo a concentração de água no meio, também aumentam a constante de dissociação (pKa) de substratos e/ou produtos (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998). Contudo, a utilização de um co-solvente pode reduzir a estabilidade da enzima tornando-se outro obstáculo para a síntese termodinamicamente controlada. No caso da fenilglicina foi testada dimetilformamida (DMF)

para aumentar seu  $pK_{a1}$ , porém a variação deste (2,2 para 3,1) não foi suficiente para aumentar a concentração de FG na forma não-dissociada em uma região onde a enzima permanecesse ativa e estável (Ospina, 1996 a).

### 2.3.2 - SÍNTESE CINETICAMENTE CONTROLADA

A substituição da fenilglicina por um derivado ativado, como éster ou amida de fenilglicina, foi a solução encontrada para contornar os problemas da síntese termodinamicamente controlada, ou seja, a necessidade do grupo carboxílico neutro (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996).

Dentre as rotas de síntese enzimática, a síntese cineticamente controlada (SCC) é a mais popular na literatura científica e a mais factível para a produção de penicilinas semi-sintéticas. No caso da produção de ampicilina, o derivado éster da fenilglicina (por exemplo, o éster metílico de FG, EMFG) se combina com o núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA) para produzir o antibiótico (ampicilina) e álcool (metanol). Dentre os derivados ativados, o éster metílico de fenilglicina levou o rendimento da SCC a valores mais altos que as amidas (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1991).

Diferentemente da STC, onde o rendimento é determinado apenas pela constante termodinâmica do processo, o rendimento da SCC é dado pelo balanço da cinética de três diferentes reações, todas catalisadas pela mesma enzima (Figura 13): a síntese do antibiótico (atividade transferase ou de síntese), a hidrólise do derivado do doador acil (atividade hidrolase – esterase ou amidase), e a hidrólise do antibiótico que é previamente sintetizado (atividade amidase) (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996).

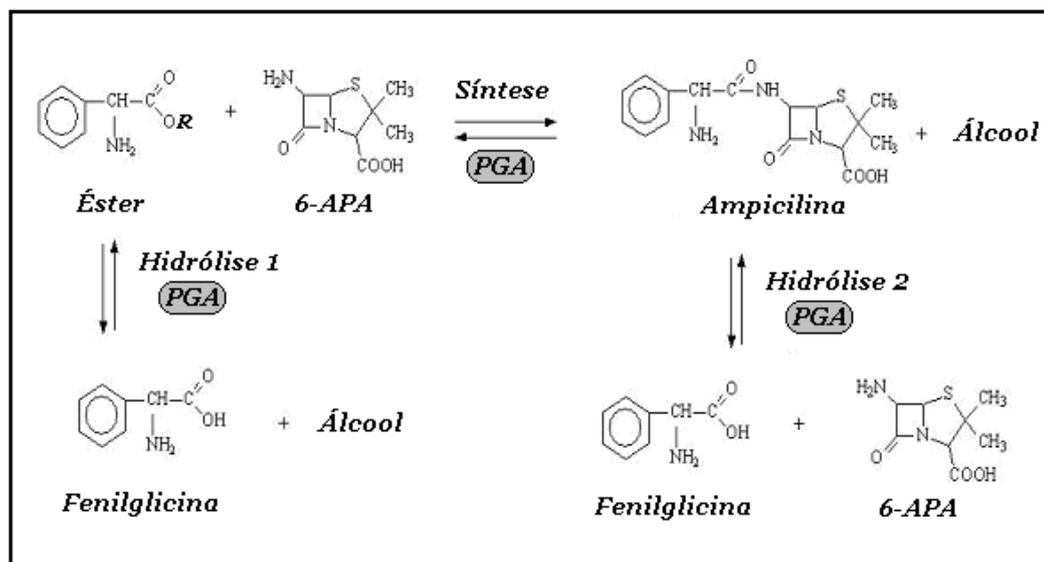


Figura 13 - Síntese cineticamente controlada de ampicilina. O doador acil, neste caso um éster, se diferencia em **R**, podendo ser o radical metila, etila ou isopropila. Os respectivos álcoois serão: metílico, etílico e isopropílico (Adaptada de Ribeiro, 2007).

Na rota cineticamente controlada o antibiótico formado, sendo produto intermediário, é quase completamente hidrolisado pela PGA sob condições de equilíbrio termodinâmico. No entanto, ao cessar a reação antes que a velocidade de hidrólise do antibiótico recém formado seja maior que a velocidade de síntese, a concentração do antibiótico pode ser maior que o valor de equilíbrio termodinâmico, conseguindo-se, assim, um máximo transiente durante o processo de conversão. Devido às reações hidrolíticas indesejáveis, a perda improdutiva de doador de acil é uma das principais desvantagens para um processo industrial (Gabor *et al.*, 2005).

Muitos estudos foram realizados a fim de melhorar a SCC de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos através de engenharia do meio ou modificação as condições da reação. Qualquer modificação no derivado, na fonte da enzima (inúmeros microrganismos a expressam), no tipo de imobilização ou nas condições de reação pode acarretar uma variação nas velocidades de reação e, conseqüentemente, uma alteração do rendimento máximo (Gonçalves, 2001a, Hernández-Jústiz *et al.*, 1999). Em conseqüência da diversidade de

variáveis que influenciam nesta rota de síntese, é necessária análise cuidadosa das propriedades da enzima, do substrato ativado e do sistema.

A otimização do processo de síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas é necessária para viabilizar a implementação desta rota em escala industrial. No caso da síntese cineticamente controlada, a mais factível, recai-se em problema típico de otimização de reações série-paralelo, pois o ponto de máxima seletividade em antibiótico deve ser buscado para operação do reator levando-se em conta também produtividade, rendimento do éster e conversão do 6-APA. Os critérios utilizados para avaliar o desempenho da síntese de ampicilina são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Critérios utilizados para avaliar o desempenho da SCC de ampicilina.

<b>Produtividade</b> (concentração de ampicilina/UI* /tempo de reação)	$P = \frac{C_{AMP}}{UI \times \text{min}}$
<b>Seletividade</b> (concentração de ampicilina/concentração de D-FG)	$S = \frac{C_{AMP}}{C_{FG}}$
<b>Rendimento do éster</b> (concentração de ampicilina/concentração de éster consumido)	$R = \frac{\text{Ampicilina}_{\text{produzida}}}{\text{Éster}_{\text{consumido}}}$
<b>Conversão de 6-APA</b> (concentração de ampicilina/concentração de éster inicial)	$X = \frac{\text{Ampicilina}_{\text{produzida}}}{6-APA_{\text{inicial}}}$

\*UI = unidade de enzima, vide Materiais e Métodos.

## 2.4 - MECANISMO DE AÇÃO DA PGA

Uma investigação detalhada do mecanismo das reações de transferência acil catalisadas pela PGA pode ter um papel muito importante no entendimento das características gerais de tais transformações enzimáticas e na otimização das conversões biocatalíticas.

Análises cristalográficas de raio-X utilizando linhagens de enzimas e vários tipos de complexos enzimáticos, assim como análise de dados cinéticos, têm sido utilizadas para estudar os vários aspectos mecanísticos da síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

A partir do mecanismo de hidrólise da penicilina G proposto por Duggleby *et al.*, 1995, foi proposto um mecanismo para a síntese de ampicilina, onde o ataque nucleofílico da água é substituído pelo ataque do núcleo  $\beta$ -lactâmico (Ospina *et al.*, 1996a).

PGA catalisa reações de transferência acil via formação de um intermediário acil-enzima. Em seguida, na desacilação, este intermediário reage com o núcleo  $\beta$ -lactâmico formando o antibiótico e regenerando a enzima (Figura 14). A formação do complexo acil-enzima é consenso tanto para a síntese quanto para a hidrólise de antibióticos e derivados da fenilglicina (éster ou amida).

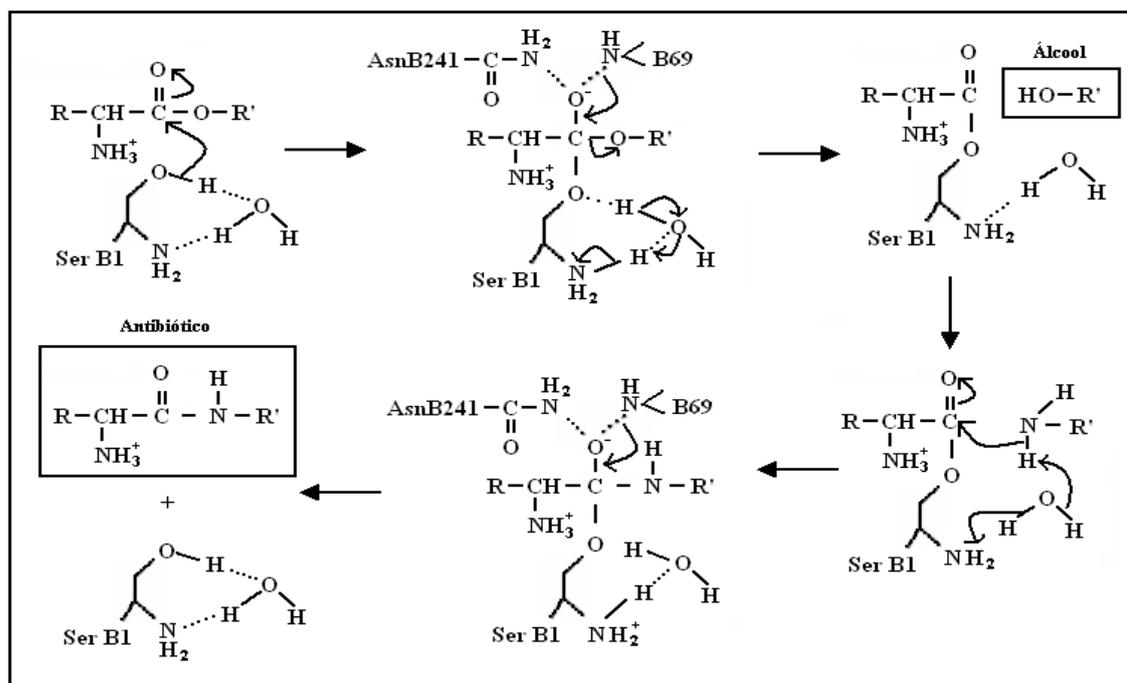


Figura 14 - Mecanismo de ação da PGA para a síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos proposto por Ospina *et al.*, 1996a seguindo o mecanismo de hidrólise de Duggleby *et al.*, 1995.

A formação do complexo acil-enzima-núcleo antes do ataque nucleofílico ao complexo acil-enzima para a formação do antibiótico é um ponto mecanístico importante verificado, através de dados cinéticos, por diversos autores (Kasche *et al.*, 1984, Youshko e Svedas, 2000, Gonçalves *et al.*, 2002). Este mecanismo envolve a formação de um complexo acil-enzima covalente como intermediário que pode ser desacilado tanto pela água como por outros nucleófilos.

A Figura 15 mostra um esquema cinético de transferência enzimática do grupo acil para o nucleófilo a partir da formação de um complexo acil-enzima-núcleo (Ribeiro *et al.*, 2005). De acordo com a literatura, o núcleo  $\beta$ -lactâmico deve estar ligado à enzima antes do seu ataque nucleofílico ao complexo acil-enzima.

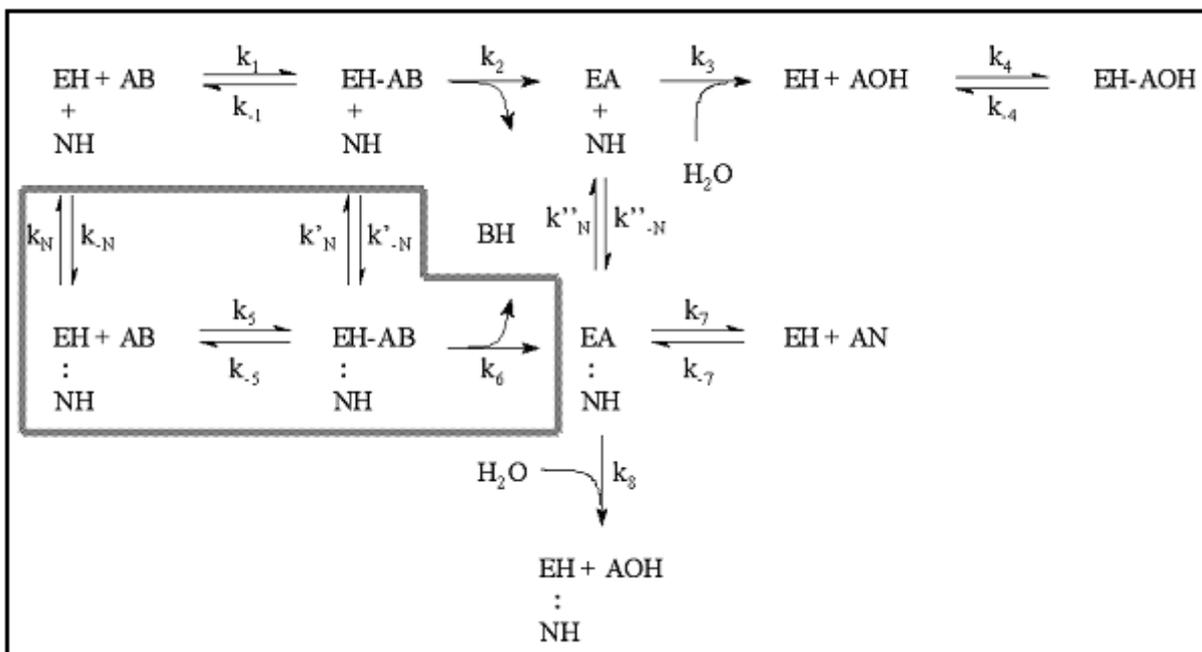


Figura 15. Mecanismo da síntese enzimática cineticamente controlada de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. As reações destacadas são as etapas não-consensuais na literatura. Para síntese de ampicilina utilizando éster metílico de fenilglicina, tem-se: EH = enzima não-ligada (com o hidrogênio da hidroxila da serina terminal presente); AB = EMFG; NH = 6-APA; BH = metanol; AOH = FG; AN = ampicilina; EA = complexo acil-enzima; EA •• NH = complexo acil-enzima-núcleo. Ligações não-covalentes estão pontilhadas (Ribeiro *et al.*, 2005).

Kasche *et al.*, 1984, mostrou que a razão de constantes aparentes de desacilação,  $(k_H/k_S)_{ap}$ , dada por  $\left(\frac{k_H}{k_S}\right)_{ap} = C_{NH} \frac{v_{AOH}}{v_{AN}}$  seria invariante em relação aos substratos, caso o 6-APA livre (sem estar adsorvido) atacasse o complexo acil-enzima. Nessa expressão, no caso da ampicilina,  $v_{AOH}$  é a velocidade de produção de fenilglicina e  $v_{AN}$ , a de produção de antibiótico. De fato, tanto Kasche *et al.* 1984 como Gonçalves *et al.* 2002 observaram um dependência linear de  $(k_H/k_S)_{ap}$  com respeito a  $C_{NH}$  (concentração de núcleo).

Apesar do consenso na literatura sobre esse ponto do mecanismo, não há unanimidade sobre a etapa de desacilação. Essa questão é discutida por Ribeiro *et al.*, 2006 que, a partir de seus dados concluem que as reações constantes da região destacada na Figura 15 são de fato essenciais para que a síntese do antibiótico ocorra.

Em outras palavras, para que o núcleo  $\beta$ -lactâmico consiga competir vantajosamente com as moléculas de água presentes, muito mais abundantes, e dessa forma consiga fazer a enzima trabalhar como transferase e não hidrolase é necessário que este núcleo (o 6-APA no caso da ampicilina) esteja previamente adsorvido na enzima, posicionado de forma adequada para promover o ataque nucleofílico ao complexo acil-enzima. Em outras palavras, o mecanismo completo indicado na Figura 15 deve ser considerado na modelagem cinética e não apenas um mecanismo simplificado, como o proposto por Youshko e Svedas, 2000, que não considera a região demarcada na Figura 15 (adsorção do 6-APA à enzima previamente à formação do complexo acil-enzima).

## 2.5 - FATORES QUE INFLUENCIAM NA SCC

Os principais fatores que afetam a síntese (pH, temperatura, força iônica do meio, além dos efeitos inibitórios dos substratos e produtos) interferem nas variáveis representativas do processo como conversão de 6-APA, produtividade de antibiótico, seletividade e rendimento de éster, assim como na solubilidade dos substratos e produtos.

### 2.5.1 - EFEITO DO pH

Na síntese cineticamente controlada de penicilinas semi-sintéticas os reagentes e produtos são eletrólitos fracos. Ampicilina, amoxicilina, 6-APA, FG e pOH-FG são compostos que apresentam grupos amino e carboxil (característica aminoácida), portanto quando em pH igual a seu ponto isoelétrico (pI) em solução aquosa se comportam essencialmente como íons dipolares (*zwitterions*) (Hou e Poole, 1969). Dependendo do pH no meio reacional, estes compostos podem se apresentar na forma neutra, carregados positivamente ou negativamente.

A dissociação dos componentes é muito importante em síntese enzimática pois para que ocorra o ataque nucleofílico do 6-APA ao complexo acil-enzima, seu grupo amino deve estar desprotonado, o que ocorre a pHs levemente ácidos (Margolin *et al.*, 1980). O pH é uma variável que influencia não só na atividade e dissociação da enzima, mas também na dissociação, solubilidade e precipitação dos componentes da reação (Youshko *et al.*, 2000, Diender *et al.*, 2000).

Nota-se, ainda, que a atividade catalítica da enzima cai em pHs ácidos, pois o grupo amino da serina terminal precisa estar descarregado para poder promover o ataque

nucleofílico à ligação carboxílica (éster ou amida) do substrato. Dessa forma, quando o grupo amino estiver protonado a enzima permanecerá cataliticamente inativa (Lummer *et al.* 1999).

Sendo assim, o pH torna-se um dos fatores de maior influência na síntese de penicilinas semi-sintéticas e, portanto estudado por vários autores (Spiess *et al.*, 1999, Gonçalves, 2001a, Diender *et al.*, 2000, Diender *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996a, Schröen *et al.*, 1999, Hou e Poole, 1969).

Estudos sobre o efeito do pH na síntese de ampicilina, catalisada por *E. coli* imobilizada, a partir de EMFG e 6-APA, indicaram que em pH 7,0 a atividade de síntese da enzima é muito baixa quando comparada a sua atividade de hidrólise tanto do éster quanto da própria ampicilina. A diminuição do pH para 6,0 forneceu resultados bastante diferentes. Nessa condição a atividade de hidrólise do éster foi reduzida em 82% enquanto a redução na hidrólise da ampicilina foi de 63%. A influência da diminuição do pH na síntese foi menos significativa chegando a um decréscimo na velocidade de 53% (Ospina *et al.*, 1996 a).

A Figura 16 apresenta o efeito do pH na relação síntese de ampicilina e a hidrólise do éster (seletividade). A velocidade de síntese de ampicilina foi favorecida em pH 6,0 alcançando um valor 1,3 vezes maior que a velocidade de hidrólise do éster e 60% de rendimento, porém com o aumento do pH esse valor foi decrescendo, chegando a apenas 0,25 vezes a pH 7,0 com rendimento de 50% (Ospina *et al.*, 1996 a). Esse comportamento frente ao pH também foi observado na síntese de amoxicilina a partir do éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA com PGA imobilizada em gel de agarose. As velocidades de síntese e hidrólise decresceram quando o pH diminuiu de 7,5 para 6,5 a 25°C, porém a velocidade de hidrólise diminuiu mais rapidamente que a de síntese, favorecendo a seletividade da reação (Gonçalves *et al.*, 2000).

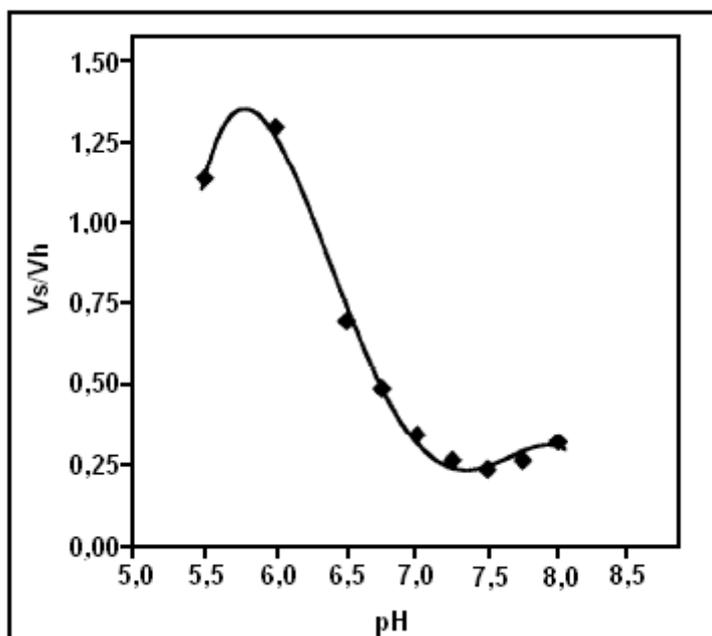


Figura 16 - Efeito do pH na relação síntese/hidrólise (seletividade). 6-APA - 50mM, EMFG - 150 mM, 25°C, PGA - 3 UI/ml. Dados Ospina *et al.*, 1996a.

Ferreira 2004a, estudando a síntese de ampicilina, verificou que valores mais altos de seletividade, rendimento e produtividade foram alcançados em pH 6,5. A adsorção de 6-APA no sítio ativo da enzima é muito forte em pH 6,5 favorecendo a reação de síntese frente à de hidrólise. Dados obtidos na simulação da síntese de amoxicilina a 25°C em diferentes pHs (pH 6,5 e 7,5) mostram que o rendimento, seletividade e produtividade de síntese são sempre maiores a pH 6,5 (Gonçalves 2001a).

Youshko *et al.*, 2002 propuseram uma nova abordagem para a otimização da síntese cineticamente controlada de ampicilina a partir de PGA livre de *E.coli*. Promovendo um gradiente de pH em uma batelada, buscaram otimizar seletividade e rendimento de ambos os substratos (6-APA e D-fenilglicina amida), incorporando um meio aquoso-precipitado onde o antibiótico cristaliza. A grande dependência da solubilidade dos substratos e produtos e da seletividade em relação ao pH permitiu de modo empírico, que se chegasse a conversões de 71% do doador acil e 96% de 6-APA. Identificar um perfil ótimo de pH utilizando enzimas imobilizadas pode ser uma tarefa difícil, contudo, deve-se considerar que o gradiente de pH

no próprio biocatalisador pode alcançar entre 1 e 2,5 pontos abaixo do pH no seio do fluido (Spiß *et al.*, 2000).

Youshko *et al.*, 2000 estudaram o efeito do pH na solubilidade dos substratos e produtos envolvidos na síntese de ampicilina e concluíram que o efeito do pH é devido, principalmente, à diminuição da fração de moléculas na forma protonada. A partir disso, concluíram também que a precipitação da fenilglicina é inevitável quando se utilizam altas concentrações iniciais de substrato e que a precipitação de ampicilina é efetiva apenas quando o pH é inferior a 7,5. Desta forma, valores de pH básicos retardam a precipitação de ampicilina, contribuindo para sua hidrólise e degradação. A escolha do pH do processo de síntese, portanto, deve ser feita de maneira que o nucleófilo tenha reatividade máxima e a precipitação de ampicilina seja efetiva não havendo degradação significativa da mesma. Os autores concluíram que para a síntese de ampicilina esta faixa de pH encontra-se entre 6 e 7.

Resumindo, definir o melhor pH é claramente um problema de otimização: diminuindo o pH melhora a adsorção de 6-APA (efeito desejável), porém também diminui o número de grupos  $\alpha$ -aminos da serina B1 descarregados (efeito indesejável). A pH 6,5, a taxa de formação do complexo acil-enzima e o ataque nucleofílico pelo grupo amino do 6-APA ainda não são seriamente prejudicados, resultando em uma maior seletividade.

Tendo em vista esses fatores, uma região ótima de pH, para SCC de ampicilina, encontra-se entre pH 6,0 e 6,5. Nessa faixa de pH há um compromisso entre a atividade enzimática (relacionada diretamente à produtividade do antibiótico) e a seletividade (relacionada à perda de substrato e produto devido às reações de hidrólise) (Ribeiro, 2007).

### 2.5.2 - EFEITO DA TEMPERATURA

A velocidade de todas as reações moleculares aumenta com o aumento da temperatura. Esse aumento da temperatura confere às moléculas, em estado líquido ou gasoso, uma maior energia cinética, levando-as a colidirem com maior frequência. No entanto, a razão entre as velocidades de diferentes reações não necessariamente permanece constante com a variação da temperatura. A temperatura tem efeito também sobre as constantes de dissociação ( $pK$ ) dos componentes, assim como sobre sua estabilidade e solubilidade. Por isso, no caso da síntese de penicilinas semi-sintéticas, cujo rendimento é controlado cineticamente, os efeitos térmicos não são imediatamente previsíveis. Comparando-se as velocidades de hidrólise 1 e 2 com a velocidade de síntese em duas temperaturas, obviamente, todas velocidades diminuem com a redução da temperatura, mas as velocidades de hidrólise são mais significativamente afetadas na menor temperatura (Gonçalves *et al.*, 1998, Hernández-Justiz, 1996)

Por um lado, a velocidade de reações catalisadas por enzimas aumenta com o aumento da temperatura somente até certo ponto. Enzimas são moléculas protéicas complexas com estrutura terciária altamente ordenada através de interações entre grupos aminoácidos específicos situados a longa distância entre si dentro da seqüência primária, e sua atividade catalítica depende da integridade desta conformação nativa: a estrutura terciária de uma enzima se conserva por diferentes tipos de interações fracas. Em outras palavras, uma molécula de enzima é uma estrutura frágil e o aumento de temperatura, acima de certo ponto, pode levar à quebra dessas ligações, provocando sua desnaturação (Lehninger *et al.*, 1995). A imobilização da enzima por ligações covalentes a suporte insolúvel, por outro lado, tende a aumentar sua estabilidade térmica (Hernández-Jústiz, 1996).

Como a síntese cineticamente controlada de ampicilina é um sistema reacional complexo, série-paralelo, os efeitos térmicos não são imediatamente previsíveis. Experimentos de síntese de ampicilina, realizados com PGA imobilizada em agarose,

mostraram que o rendimento da reação, com relação ao 6-APA, foi favorecido quando realizada a 4°C, porém seletividade e produtividade foram favorecidas com elevação da temperatura para 25°C (Ferreira *et al.*, 2004b). Kaasgaard *et al.* (1996) estudaram a influência da temperatura na síntese de ampicilina catalisada por PGA de *E. coli* a pH 6,4 e observaram que o rendimento foi maior a 20°C (alcançado em 22 h). Obtiveram rendimento de 95% a 10°C, porém alcançado em 72 horas de reação.

Estudos realizados a 4°C e pH 6,5 indicaram que, nessas condições, a hidrólise do éster metílico de p-hidroxifenilglicina é mais favorecida que hidrólise da amoxicilina. Desta forma, o rendimento da síntese de amoxicilina foi mais favorecido nesta condição, porém a seletividade e produtividade foram afetadas negativamente (Gonçalves 2001a).

Há um decréscimo do rendimento máximo de síntese com o aumento de temperatura. Na síntese da ampicilina, a queda do rendimento não é linear com o aumento da temperatura: ele se mantém com uma tendência decrescente suave até 20°C e a partir desse ponto há uma diminuição sensível (Ferreira, 2004a).

### 2.5.3 - CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS

A síntese de ampicilina realizada em concentrações iniciais altas de substratos ( $\geq 100\text{mM}$ ) alcança rendimentos maiores do que as sínteses realizadas em concentrações iniciais de substrato bem abaixo das concentrações de saturação. Porém, existem alguns inconvenientes: devido à grande concentração do produto no meio reacional pode ocorrer degradação da ampicilina em níveis inaceitáveis (Bruggink *et al.*, 2001); a presença de uma alta concentração de EMFG (éster metílico de fenilglicina) aumenta a solubilidade do antibiótico, dificultando sua separação do meio (Youshko *et al.*, 2000). Para minimizar os

efeitos de degradação do antibiótico, soluções como filtração, cristalização e sínteses em pH ácido podem ser adotadas.

Ospina *et al.*, 1996a, estudaram a influência da razão 6-APA/Éster na síntese de ampicilina catalisada pela PGA livre a 25°C e pH 6,0. Eles verificaram que a conversão de 6-APA em ampicilina foi favorecida quando a razão 6-APA/Éster aumentou de 1:1 para 1:5. Altas concentrações de substrato também foram utilizadas para verificar o efeito na produtividade. Os autores obtiveram um acréscimo na produtividade de 3,5 mg de ampicilina UI<sup>-1</sup> (50 mM de 6-APA:150 mM de éster) para 17,45 mg de ampicilina UI<sup>-1</sup> (200 mM de 6-APA:600 mM de éster).

Balasingham *et al.* (1972) observaram que altas concentrações de benzilpenicilina inibiam atividade da penicilina amidase de *E. coli* 9637 e penicilina amidase de *E. coli* 8743A. O ácido fenilacético e o 6-APA, ambos produtos da reação de hidrólise, atuavam como inibidores competitivo e não competitivo, respectivamente. Eles observam também que havia inibição devido o excesso de substrato (penicilina G).

Kato, 1980a, observou que a hidrólise de éster metílico de fenilglicina, catalisada por  $\alpha$ -amino ácido éster hidrolase de *Xantomonas citri* sofre inibição dependendo da concentração de 7-ADCA. A velocidade de hidrólise do éster é máxima na ausência do núcleo e vai diminuindo com a adição de concentrações crescentes de 7-ADCA. À medida que a velocidade de hidrólise diminuía, o autor observou que a velocidade de transferência acil foi aumentando até chegar a um máximo.

Kasche *et al.*, 1984, observaram que 6-APA é um inibidor do tipo misto e fenilglicina é um inibidor competitivo na velocidade de desaparecimento de éster metílico de fenilglicina, catalisada por penicilina amidase de *E. coli*. Quando substratos maiores são utilizados, tais como ampicilina e benzilpenicilina, 6-APA é considerado um inibidor não competitivo.

Boccu *et al.*, 1991, estudaram a síntese enzimática de ampicilina, usando métodos estatísticos de otimização, e observaram que a razão entre as concentrações de éster e núcleo deve ser alta para a obtenção de alto rendimento de síntese.

Ospina, 1992, caracterizou um biocatalisador composto por penicilina amidase imobilizada em resina epoxiacrílica. O autor observou que a reação de hidrólise de benzilpenicilina, a pH 7,8 e 37°C, sofria inibição pelo substrato, inibição competitiva pelo ácido fenilacético e inibição não competitiva pelo 6-APA.

Blinkovsky e Markaryan, 1993, observaram que os produtos da hidrólise enzimática da cefalexina (fenilglicina e 7-ADCA), catalisada pela enzima D-(-)- fenilglicina- $\beta$ -lactamida amidohidrolase de *Xanthomonas sp.*, atuam como inibidores competitivo e não-competitivo, respectivamente. Além disso, os autores concluíram que a concentração de éster deve ser maior que a do núcleo. O aumento da razão entre as concentrações de núcleo e de éster de 1:1 até 1:10 favoreceu o rendimento de síntese. Acima dessa proporção o rendimento voltou a diminuir.

Bryjak e Nowryta, 1993, estudaram a cinética de hidrólise de penicilina acilase imobilizada em suporte acrílico. Os autores não observaram inibição pelo substrato nem inibição não competitiva pelo 6-APA. Apenas o ácido fenilacético comportou-se como inibidor competitivo.

Maladkar, 1994, estudou a produção enzimática de cefalexina a partir de éster metílico de fenilglicina e 7-ADCA usando PGA de *E. coli* imobilizada em matriz de celulose. O autor observou que uma concentração de 25mM ou mais de 7-ADCA inibiu a reação enquanto que PGME não causou efeito inibitório até 300mM. Quanto ao efeito inibitório do produto, observou que a taxa de conversão não era afetada até uma concentração de 50mg/ml de cefalexina.

Pode-se observar que os resultados obtidos sobre os efeitos inibitórios nas reações de síntese e hidrólise são contraditórios. Contudo, parece haver consenso no que diz respeito ao ácido formado na reação de hidrólise: ele é um inibidor não competitivo.

Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995 observaram que 6-APA inibe a síntese de  $\alpha$ -hidroxipenicilina catalisada por penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada em gel de agarose. Segundo os autores, esta inibição pode ser causada por uma mudança conformacional na enzima promovida pela ligação do núcleo. Fernandez-Lafuente *et al.*, 1996 observaram que a utilização de um excesso de doador de acil promoveu um aumento significativo no rendimento de síntese cineticamente controlada de cefaloglicina utilizando penicilina amidase de *E. coli*.

Segundo Youshko *et al.*, 2000, a síntese de ampicilina, por acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico em solução aquosa e catalisada por penicilina acilase, é muito dependente da concentração inicial dos substratos. Eles observaram que a solubilidade do 6-APA é significativamente maior na presença do doador de acil. Os autores compararam dois meios de reação: um homogêneo e outro heterogêneo. O meio heterogêneo, contendo substrato em solução e na forma não dissolvida, foi mais favorável para a síntese de ampicilina, alcançando um rendimento de 93% contra 70% de rendimento em meio homogêneo. Os autores também realizaram síntese de ampicilina com excesso de doador de acil, em relação ao 6-APA. Apesar de um excesso 3,2 vezes superior da cadeia lateral sobre o 6-APA somente 75% de 6-APA e 25% da cadeia lateral foram convertidos em ampicilina. Quando a reação foi realizada sob as mesmas condições com um excesso molar 6 vezes superior de doador acil, a conversão de 6-APA alcançou 90%, mas somente 15% dessas moléculas foram convertidas em ampicilina, sendo o excedente hidrolisado em FG.

Gonçalves, 2001a, realizou ensaios de velocidade inicial de síntese de amoxicilina na presença de diferentes concentrações iniciais de 6-APA e éster a pH 6,5.

Efeitos inibitórios foram observados para baixas concentrações iniciais de éster e altas concentrações iniciais de 6-APA (maiores que 20mM). A velocidade de formação do complexo acil-enzima foi máxima para altas concentrações de éster e baixas concentrações de núcleo, indicando uma condição ótima de operação para a síntese de amoxicilina. Foi observado também que à medida que se aumentou a concentração de núcleo, diminuiu a velocidade inicial de reação. Este fato indica que o excesso de núcleo inibiu a formação do complexo acil-enzima.

Ribeiro *et al.*, 2005, mapeou a seletividade da síntese enzimática de ampicilina para uma grande intervalo de concentrações dos substratos. Seus resultados mostraram que concentrações crescentes de 6-APA conduzem a menores taxas de acilação, porém o efeito na hidrólise do éster é mais intenso que o efeito na síntese de ampicilina, melhorando desta forma a seletividade global da reação. As condições que conduziram a valores mais altos de seletividade foram diferentes daquelas que levaram a maior produtividade. A seletividade aumentou quando a relação 6-APA/PGME foi elevada. Porém, a produtividade aumentou quando ambas as concentrações dos substratos eram altas.

Ferreira *et al.*, 2007, realizaram a síntese de ampicilina, catalisada por PGA-agarose co-imobilizada em pectina, em reator com escoamento em vórtices de Taylor, operando em batelada alimentada, com a adição de EMFG (concentração inicial 60mM) e uma alta concentração inicial de 6-APA (300mM), a 25 °C e pH 6,5. A produtividade e seletividade da reação aumentaram quando comparadas com a reação realizada nas mesmas condições de temperatura e pH, porém com menor razão éster/6-APA (25/300) sendo alimentados os dois substratos.

#### 2.5.4 - FORÇA IÔNICA

Na síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ocorrem diversas reações entre íons de cargas diferentes que podem ser influenciadas pela força iônica do meio reacional. Nesse tipo de reação, as constantes de dissociação e o rendimento devem diminuir com o aumento da força iônica.

O efeito positivo do pH sobre a seletividade, por sua vez, indica que a interação iônica enzima-núcleo (6-APA) é ponto crucial na síntese cineticamente controlada. Como na faixa de pH utilizada o grupo acil do 6-APA está dissociado, o aumento da força iônica irá dificultar a adsorção dessa molécula na enzima, comprometendo assim a reação de síntese. Por outro lado, o papel catalítico do grupo amino da serina terminal (vide Figura 5), como já discutido anteriormente, é deslocar o hidrogênio da hidroxila, permitindo a formação do grupo acil-enzima – provavelmente com intermediação de uma molécula de água. Maior força iônica do meio pode, também, alterar esse mecanismo catalítico. Desta forma, é esperado que o aumento da força iônica cause uma diminuição das atividades hidrolase e transferase da enzima, mas com maior efeito sobre a segunda, diminuindo a seletividade. Com efeito, os dados da literatura indicam ser essa a tendência observada.

Kato *et al.*, 1980a, estudaram a síntese de amoxicilina, catalisada por  $\alpha$ -amino ácido éster hidrolase de *Xanthomonas citri*, a partir de 6-APA e éster metílico de p-hidroxifenilglicina e observaram que tanto a velocidade de reação quanto o rendimento de síntese aumentaram quando tampão fosfato não foi adicionado no meio reacional.

Fernandez-Lafuente, 1992, estudou o efeito da presença de sulfato de amônio na síntese de  $\alpha$ -hidroxipenicilina catalisada por enzima imobilizada e a partir dos resultados obtidos concluiu que não é conveniente utilizar altas concentrações de sulfato de amônio em

síntese cineticamente controlada de antibióticos, e que a força iônica diminuiu também a estereoespecificidade do derivado imobilizado.

Kim e Lee, 1996a, observaram que a velocidade de síntese de ampicilina, catalisada por penicilina acilase de *E. coli*, sofre influência direta da força iônica da solução. Eles observaram que o aumento da força iônica provoca uma diminuição da velocidade de reação.

Ferreira, 2004 a, estudou a síntese de ampicilina, catalisada por penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada em gel de agarose, e concluiu que uma concentração de tampão fosfato no meio reacional na faixa 0-50 mM não foi capaz de influenciar significativamente no rendimento e seletividade da reação. Por outro lado, a produtividade foi influenciada, ou seja, uma redução na concentração de tampão melhora a produtividade da reação.

Diante dos estudos realizados por diferentes pesquisadores conclui-se que reação de síntese de antibiótico é inibida por altas concentrações de tampão. Existe uma interação eletrostática específica entre o sítio ativo da enzima e compostos iônicos sendo o sítio catalítico da penicilina acilase carregado negativamente. Portanto, o uso de íons que não estão diretamente relacionados à síntese deve ser minimizado quando reações entre íons de cargas opostas estão envolvidas (Van der Wielen *et al.*, 1997 e Hernández-Jústiz, 1996).

O controle de pH, em escala industrial, é geralmente feito pela adição de hidróxido de sódio ou amônio. Se esse controle for feito em combinação com um tampão (normalmente fosfato de potássio), o aumento da força iônica do meio reacional pode inibir a síntese. Além disso, os subseqüentes processos de purificação, baseados no deslocamento do pH, podem ser dificultados por esse efeito tampão.

### 2.5.5 - SOLVENTES ORGÂNICOS

Na síntese termodinamicamente controlada de antibióticos semi-sintéticos a utilização de solventes orgânicos polar próticos em sistemas monofásicos é imprescindível pois estes solventes atuam aumentando a solubilidade dos substratos, deslocando o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (por redução da atividade da água), alterando os valores das constantes de dissociação (pKs) dos reagentes e controlando a especificidade/enantioseletividade das enzimas (Kim e Lee, 1996b).

Por exemplo, baixo rendimento de síntese em água é obtido na condensação direta de um núcleo antibiótico e um doador de acil não ativado (termodinamicamente controlada, portanto), pois a hidrólise do antibiótico é favorecida. Para deslocar o equilíbrio na direção da síntese, deve-se mudar o pH – mas então cai-se fora da região de atividade da enzima – ou adicionar altas concentrações de solventes orgânicos (Diender *et al.*, 1998).

Na síntese cineticamente controlada de antibióticos semi-sintéticos a utilização de solventes orgânicos não é estritamente necessária. Nessa rota de síntese, os solventes orgânicos afetam diretamente as características das enzimas e estes efeitos podem ser drásticos, uma vez que a atividade catalítica da enzima está diretamente ligada à sua estrutura terciária. Portanto, pequenas mudanças conformacionais nessa estrutura podem causar distorções no sítio ativo da enzima promovendo grandes variações nas suas propriedades catalíticas (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998).

Kato *et al.*, 1980, verificaram que a adição de 2-butanol na síntese de amoxicilina, catalisada por  $\alpha$ -amino ácido éster hidrolase de *Xanthomonas citri*, promoveu aumento da conversão de 6-APA. Eles observaram que a adição deste álcool influenciou significativamente apenas na reação de hidrólise do éster.

Kasche, 1985, observou que o rendimento de síntese de ampicilina aumentou com a adição de etanol ou metanol, porém a velocidade de hidrólise foi drasticamente reduzida. Este efeito mostra que solventes orgânicos influenciam na estrutura do sítio ativo da enzima.

Pessina *et al.*, 1988, estudaram o uso de solventes orgânicos com o objetivo de aumentar o rendimento de síntese de algumas ligações amida. Os autores observaram que a adição de 25% metanol ou dimetilformamida levou a um aumento de 5% no rendimento de síntese.

Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995 estudaram o efeito do metanol na síntese de  $\alpha$ -hidroxipenicilina catalisada por penicilina G acilase de *Escherichia coli* imobilizada em agarose. Os autores observaram que esse solvente causou um decréscimo na atividade da enzima devido, provavelmente, a mudanças conformacionais na sua estrutura.

Ospina *et al.*, 1996b, testaram diferentes solventes como sorbitol, acetonitrila, acetona, dimetilformamida e dimetilsulfóxido na síntese de ampicilina e observaram que o sorbitol não causou nenhum efeito na taxa de reação enquanto que os outros solventes testados causaram desativação da enzima.

Kim e Lee, 1996a, verificaram que na síntese de ampicilina catalisada por penicilina acilase de *Escherichia coli* imobilizada em Eupergit C a 20°C e pH 6,2 em misturas contendo água e metanol, a adição de metanol duplicou o rendimento de síntese quando 40% (v/v) de metanol foi utilizado. Eles também verificaram a estabilidade da enzima e observaram que nessas condições, a perda de atividade era insignificante.

Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998, verificaram que a presença de 20% metanol na síntese de  $\alpha$ -hidroxipenicilina catalisada pela PGA-agarose, a partir do ácido 6-amino penicilânico e éster d-metil mandelato, promoveu uma diminuição significativa na atividade esterase enquanto a atividade de síntese foi razoavelmente preservada. Isto gerou um aumento

significante na razão síntese/hidrólise. Dessa forma, a razão máxima foi aumentada de 4 para 6 sem afetar aparentemente a adsorção do 6-APA no centro ativo da enzima. Eles também observaram que a adição de metanol promoveu um aumento na razão síntese/hidrólise para todos os valores de pH estudados. Na realidade, considerando que o pH controla a adsorção do nucleófilo no sítio ativo da enzima, metanol pode aumentar a razão síntese/hidrólise.

Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998 observaram que na síntese de antibióticos como ampicilina, cefalexina e cefaloglicina a adição de metanol promoveu uma diminuição significativa na razão síntese/hidrólise. Os autores concluíram que o efeito do metanol depende da natureza do doador de acil, da enzima e das condições de reação.

Ferreira, 2004a, verificou que a adição de uma concentração de 500 mM de metanol na reação de síntese de ampicilina para a concentração máxima de 50 mM de ambos os substratos não favoreceu significativamente o rendimento e produtividade da reação e provocou apenas uma sutil melhora na seletividade.

## 2.6 - CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO E SOLUBILIDADE DOS COMPOSTOS

Na síntese cineticamente controlada de ampicilina, o rendimento pode ser aumentado através da separação da ampicilina formada do meio aquoso reacional, através de sua precipitação/cristalização. Contudo, as três reações envolvidas (síntese e hidrólise do antibiótico e hidrólise do doador acil) dependem de forma diferente do pH, temperatura e concentração de reagentes e produtos, sendo o rendimento máximo dependente das condições em que se realiza a reação. Cada componente diferente presente no meio (fenilglicina, ácido 6-aminopenicilânico, doador acil e o álcool formado) também influencia na solubilidade da ampicilina em água. Sendo assim, tanto a ampicilina como a fenilglicina apresentam características aminoácidas, ou seja, apresentam grupos amino e ácido na sua

estrutura. No caso específico de separação da ampicilina a partir da mistura de cristais de ampicilina e fenilglicina, obtida via síntese enzimática cineticamente controlada, é de fundamental importância o conhecimento dos valores de pKs e pIs de ambos compostos, pois sabe-se que tanto a ampicilina como a fenilglicina apresentarão suas menores solubilidades nos valores de pH dos seus pontos isoelétricos.

A Tabela 3 apresenta as constantes de dissociação obtidas experimentalmente por vários autores em solução aquosa a 25°C.

Tabela 3 – Constantes de dissociação em água pura a 25°C [pK =  $-\log(K)$ ].

FONTE	FG		6-APA		AMP		EMFG	EEFG
	pK 1	pK 2	pK 1	pK 2	pK 1	pK 2	pK 1	pK 1
1	-	-	2,50	4,90	-	-	6,89	-
2	-	-	2,60	5,40	-	-	-	-
3	2,20	9,30	-	4,60	-	-	7,00	-
4	1,96	9,02	2,47	4,93	2,66	7,24	6,89	-
5	2,01	8,86	2,50	4,87	2,79	7,15	6,92	7,05

Fonte: <sup>1</sup>Diender *et al.* (1998a); <sup>2</sup>Rudolph *et al.* (1999); <sup>3</sup>Fernandez-Lafuente (1996); <sup>4</sup>Vieira (2003); <sup>5</sup>Santana, 2007.

Aliado a este aspecto, o pH tem especial importância quanto a sua influência na variação da solubilidade dos compostos, e a precipitação no ponto isoelétrico pode ser considerada uma estratégia interessante para purificação de ampicilina produzida enzimaticamente.

Vieira, 2003, verificou o comportamento da solubilidade do 6-APA, EMFG, ampicilina e FG frente ao pH. O autor concluiu que as solubilidades dos substratos, 6-APA e EMFG, frente ao pH apresentam diferentes comportamentos. A solubilidade do 6-APA

aumentou de 0,45 M em pH 5,5 para 1,9 M em pH 7,5 enquanto que a solubilidade do EMFG caiu de 2,3 M em pH 5,5 para 0,75 M. A solubilidade da ampicilina sofreu aumento significativo com a variação de pH (19 mM em pH 5,5 e 50 mM em pH 7,5) enquanto que a solubilidade da FG sofreu apenas um leve aumento (22 mM em pH 5,5 e 27 mM em pH 7,5). As Figuras 17 e 18 apresentam os resultados obtidos pelo autor, para os compostos puros dissolvidos em água a 25°C.

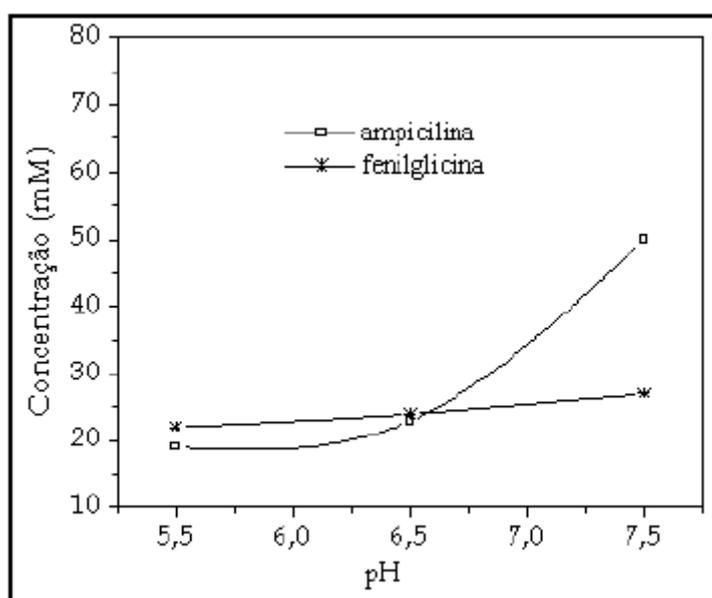


Figura 17 – Solubilidade da ampicilina e fenilglicina em água a 25°C em função do pH (Vieira, 2003).

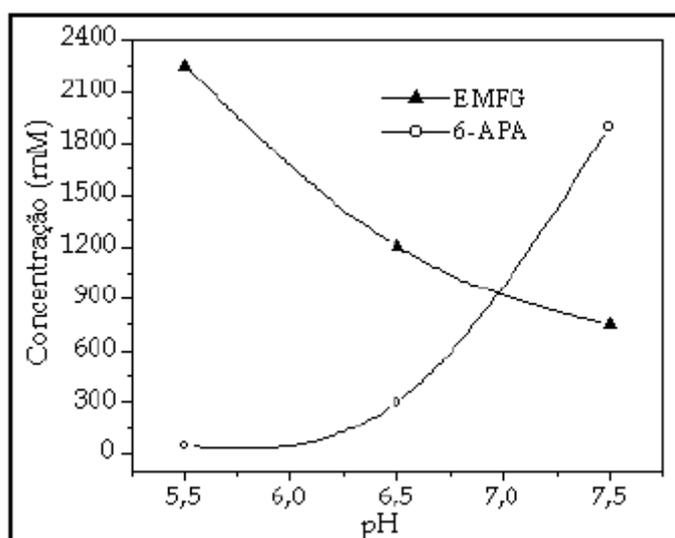


Figura 18 – Solubilidade do 6-APA e EMFG em água pura a 25°C em função do pH (Vieira, 2003).

Santana, 2007, verificou que a solubilidade da fenilglicina se mostra pouco dependente do pH e da temperatura. A solubilidade do 6-APA aumentou substancialmente acima de pH 6,5 a 24,88°C. A solubilidade da ampicilina está coerente com o apresentado por Vieira, 2003. Os autores verificaram um aumento significativo na solubilidade da ampicilina, com o aumento do pH a 24,88°C.

Youshko *et al.*, 2000, estudando a solubilidade da ampicilina, 6-APA, fenilglicina, éster metílico de fenilglicina e amida de fenilglicina, observaram que a solubilidade do 6-APA aumenta muito a pH maiores que 6,5. Em valores de pH acima de 6,5, a eficiência de transferência do grupo acil para o nucleófilo deve ser melhor, porém condições básicas de pH retardam a precipitação da ampicilina cuja solubilidade aumenta com o aumento do pH. Também se deve levar em conta que pHs básicos favorecem a degradação do anel  $\beta$ -lactâmico. Como a solubilidade dos reagentes pode ser diferente em misturas complexas, os autores mediram a influência de altas concentrações do doador de acil na solubilidade do 6-APA, fenilglicina e ampicilina e observaram que tanto a solubilidade da ampicilina quanto a do 6-APA aumentaram com o aumento da concentração do doador acil. Esse comportamento não foi verificado para a fenilglicina cuja solubilidade não se mostrou dependente do pH nem da concentração do doador acil.

## **2.7 - CRISTALIZAÇÃO DA AMPICILINA NO INTERIOR DO REATOR (REATOR INTEGRADO)**

Um modo para reduzir a hidrólise da ampicilina é transferir o antibiótico para a fase sólida. Isso pode ser alcançado operando a síntese em um pH onde solubilidade da ampicilina seja baixa, de forma que todo o antibiótico sintetizado, além do limite saturação, cristalize, não podendo mais ser atacado pela enzima. A cristalização do antibiótico no reator

é essencial para aumentar a seletividade do processo (Diender *et al.*, 1998; Kaasgaard e Veitland, 1996).

A síntese de ampicilina catalisada por enzima imobilizada, com cristalização dos produtos, realizada em reator com escoamento em vórtices de Taylor, foi patenteada por Giordano *et al.*, 2005 e Giordano *et al.*, 2003. Ferreira *et al.*, 2007, realizaram ensaios de síntese nesse reator variando o pH e temperatura e usando diferentes estratégias de alimentação dos substratos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. Os autores concluíram que o reator em vórtices mostrou-se satisfatório, melhorando tanto a seletividade quanto a produtividade da reação.

Tabela 4 – Desempenho do reator em vórtices na síntese enzimática de ampicilina nas diferentes condições operacionais.

		pH 6,5	pH 7,5
<b>Batelada alimentada: EMFG</b>	<b>T = 20°C</b> <b>EMFG/6-APA<sub>0</sub> = 25/300 = 0,08<sup>a</sup></b>	Condição de máxima produtividade (5h): P = $3,83 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 4,50	Condição de máxima produtividade (3,5h): P = $3,90 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 3,21
		Condição de máxima concentração de AMP (10h): P = $3,31 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 3,56	Condição de máxima concentração de AMP (7,5h): P = $2,87 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 3,21
	<b>T = 25°C</b> <b>EMFG/6-APA<sub>0</sub> = 60/300 = 0,20<sup>a</sup></b>	Condição de máxima produtividade (3,5h): P = $6,33 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 4,82	Condição de máxima produtividade (2,5h): P = $5,60 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 2,32
		Condição de máxima concentração de AMP (8h): P = $4,12 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 3,50	Condição de máxima concentração de AMP (4h): P = $3,76 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 1,48
<b>Batelada alimentada: EMFG e 6-APA</b>	<b>T = 25°C</b> <b>(EMFG/6-APA)<sub>0</sub> = 25/300 = 0,08<sup>a</sup></b>	Condição de máxima produtividade (4h): P = $6,63 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 3,69	Condição de máxima produtividade (2,5h): P = $5,60 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 2,32
		Condição de máxima concentração de AMP (7h): P = $5,23 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 1,75	Condição de máxima concentração de AMP (2,5h): P = $3,17 \times 10^{-3}$ mM/UI/min S/H = 0,93

<sup>a</sup>Condições em t = 0h. Ferreira *et al.*, 2007.

## 2.8 - SEPARAÇÃO DA AMPICILINA DO MEIO REACIONAL

Um grande número de processos de separação pode ser usado em sistemas biotecnológicos, dos quais filtração, centrifugação, extração, adsorção, cromatografia, precipitação, eletroforese, cristalização e filtração com membranas são os mais importantes. (Belter *et al.*, 1988)

Em um procedimento típico, onde excesso de substrato (6-APA e doador acil - éster ou amida) é utilizado, os cristais de ampicilina e FG obtidos podem ser novamente dissolvidos em pH básico. Posteriormente, a ampicilina pura é obtida reduzindo o pH dessa solução até o seu ponto isoelétrico (Bruggink *et al.*, 1998).

### 3.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.1 – MATERIAIS E REAGENTES

- ↪ Membranas de diálise (Fundação Sardi) com corte de 14000 Da e diâmetro de 35 mm;
- ↪ Tartarato de sódio potássico, sulfato de cobre, fenol Folin-Ciocalteau e Azul Brillhante de Coomassie G 250 da BioRad;
- ↪ Suporte: Agarose 6BCL produzida por Hispanagar S. A. (Espanha);
- ↪ Suporte: Partículas compostas de Agar (Vetec) 3%/Agarose (Across) ME 6% ((m/m)) com diâmetro médio de 1,3 mm;
- ↪ Suporte: Partículas compostas de Agarose (ACROSS) ME 10% ((m/m)) com diâmetro médio de 1,4 mm;
- ↪ Alginato de sódio (Vetec – São Paulo);
- ↪ Caldo fermentativo - penicilina G acilase de *Escherichia coli* recombinante [EC 3.5.1.11] doada por Antibióticos S/A (Espanha);
- ↪ Enzima penicilina G acilase comercial, Recordatti, Itália, doada pela empresa PRODOTTI Laboratórios Farmacêuticos;
- ↪ Hidróxido de sódio, ácido acético, borohidreto de sódio, periodato de sódio, iodeto de potássio, bicarbonato de sódio, fostato de sódio e ácido fenilacético todos de grau analítico e diferentes marcas comerciais;
- ↪ Glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) e epícloridrina (1-cloro-2,3-epóxido) adquiridos junto a Sigma;
- ↪ Ácido 6-nitro-3-fenilacetamido benzóico (NIPAB) da Sigma;
- ↪ p-dimetilamino benzaldeído (PDAB) da Mallinckrodt;
- ↪ Metanol da Qhemis;
- ↪ Penicilina G doada pela PRODOTTI Laboratórios Farmacêuticos;

- ↪ Éster metílico de fenilglicina (EMFG) da Aldrich;
- ↪ Éster etílico sintetizado (97%) e éster isopropílico sintetizado (97%). Os espectros de massa, infravermelho (IV) e RMN-<sup>1</sup>H são apresentados no Apêndice A (Batigalhia *et al.*, 2007);
- ↪ Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) da Fluka;
- ↪ Ampicilina Trihidratada da Sigma;
- ↪ D(-)-Fenilglicina da Aldrich;
- ↪ Acetonitrila da J.T. Baker (grau HPLC), dodecil sulfato de sódio da Mallinckrodt, fosfato de potássio monobásico da Synth, ácido fosfórico da Qhemis, Isopropanol da J.T. Bake (grau HPLC), água mili-Q;
- ↪ Vaselina líquida da Tec Lab.

### 3.1.2 – EQUIPAMENTOS

- ↪ Agitador mecânico marca Nova Ética modelo M 110-VER-4K3;
- ↪ Agitador magnético com aquecimento marca Fisatom modelo 752 A;
- ↪ Balança analítica marca Quimis modelo Q-500L210C;
- ↪ Banho termostatizado marca Neslab modelo R134A;
- ↪ Bomba de vácuo marca Solab;
- ↪ Centrífuga marca Ependorf modelo SB10R;
- ↪ Coluna C18, 110Å, 5µm, 150 × 4,6mm, marca Phenomenex;
- ↪ Espectrofotômetro UV-Vis marca PHARMACIA BIOTECH modelo ULTROSPEC 2000;

- ↪ HPLC - Cromatógrafo líquido de alto desempenho marca Shimadzu, com bomba LC - 6AD, injetor automático Sil - 10AF, detector UV-Vis SPD - 410Avp e controlador SCL – 10Avp. Software Class-vp Shimadzu;
- ↪ Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) - Philips X 30 FEG;
- ↪ Contador de partículas Galai Macro Viewer com software de visualização Image - Pro Plus da Media Cybernetics;
- ↪ Sistema de ultrafiltração AMICON ULTRA da Millipore com NMWL de 50 kDa
- ↪ pHmetro marca Orion modelo 420 A;
- ↪ pH-stat marca METROHM modelo 718 STAT Titrimo;
- ↪ Reator de vidro encamisado;
- ↪ Agitador rotativo marca Marconi modelo MA830;
- ↪ Ultrassom marca Maxiclean modelo 1450.

## 3.2 - MÉTODOS

### 3.2.1 - PRÉ-TRATAMENTO DAS MEMBRANAS DE DIÁLISE

O pré-tratamento das membranas de diálise foi realizado para a eliminação de metais pesados.

Primeiro deve-se lavar a membrana com detergente e água. Após retirar todo o detergente ferver por 15 minutos. Em seguida deixar em etanol 50% (2 a 5 L) por 2 horas trocando a solução de etanol a cada hora. Transcorridas às duas horas, transferir as membranas para uma solução de bicarbonato de sódio 10 mM e EDTA 1 mM e deixá-las nessa solução também por 2 horas com troca da solução a cada hora. Em seguida deixar as membranas em água Milli-Q por 2 horas com troca da água a cada hora. Lavar com tampão fosfato 5 mM pH 8 (solução de diálise). Uma vez iniciado o tratamento descrito, nunca deixe as membranas de diálise secar porque elas rompem.

### 3.2.2 - DIÁLISE DO CALDO FERMENTATIVO PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA PGA

A etapa de pré-concentração do caldo fermentativo, necessária quando se trabalha com meios fermentativos contendo altas concentrações de substratos, seguiu duas metodologias para se verificar a influência das etapas de diálise e centrifugação na eliminação de impurezas e preservantes presentes no caldo. A diálise permite a retirada de solutos de baixo peso molecular e a retenção de moléculas protéicas enquanto que a centrifugação permite a retirada de peptídeos.

Na primeira metodologia o caldo contendo a solução de enzima foi colocado em três membranas de diálise. Em seguida, cada membrana foi colocada em um béquer contendo tampão fosfato 5 mM pH 8 (solução de diálise) e mantida em câmara fria. Após 6 horas de diálise uma membrana foi retirada e a solução de diálise das outras duas trocadas. Completadas 20 horas outra membrana foi retirada e a solução de diálise da terceira trocada. A última membrana foi retirada com 32 horas de diálise. As três soluções dialisadas foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C e 11000 ×g.

Na segunda metodologia o caldo contendo a solução de enzima foi primeiro centrifugado por 30 minutos a 4°C e 11000 ×g e em seguida foi realizada a diálise do sobrenadante obtido na centrifugação em câmara fria por 32 horas. A solução de diálise foi trocada duas vezes (6 horas e 20 horas).

Transcorridas às 32 horas, para as duas metodologias, a atividade da enzima foi medida pelo método NIPAB (Kutzbach e Rauenbusch, 1974) e análises de proteínas foram realizadas através dos métodos de Bradford e Lowry (Bradford, 1976; Hartree, 1972).

### 3.2.3 – MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

#### 3.2.3.1 - MÉTODO DE LOWRY

As amostras de proteínas foram avaliadas quantitativamente segundo o método de Hartree, modificado de Lowry, que dosa aminoácidos e peptídeos (Hartree, 1972). Inicialmente foi preparada a solução A composta de: 50 mL de bicarbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1 M; 0,5 mL de sulfato de cobre 1% e 0,5 mL de tartarato de sódio potássico. Em tubos de ensaios foi adicionado 1 mL de cada amostra e em seguida foram adicionados 5 mL da solução A. Os tubos foram agitados em vórtice e deixados em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 0,5 mL da solução B em cada tubo de ensaio. A solução B foi preparada por diluição do reagente fenol Folin-Ciocalteu em água em uma proporção de 1:2. Os tubos foram novamente agitados e após 30 minutos de repouso cada amostra foi analisada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660 nm. Esse método utiliza como curva padrão a soro albumina bovina.

#### 3.2.3.2 - MÉTODO DE BRADFORD

Bradford (1976) descreveu um método para dosagem de peptídeos com peso molecular acima de 5000 Da. Aminoácidos livres e pequenos peptídeos não reagem nesse método. O reagente de Bradford consiste em adicionar 100 mg de Azul Brilhante de Coomassie G-250 em 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85% e completar o volume para 1 L com água destilada (Bradford, 1976). Essa mistura foi filtrada a vácuo com papel de filtro até ser analisada em espectrofotômetro a 595 nm e obter uma absorvância entre 0,6-0,7.

O procedimento para a análise das amostras de enzima foi realizado adicionando 5 mL do reagente de Bradford a 100 µL de cada amostra convenientemente diluída em água mili-Q. A mistura foi agitada em vórtice e mantida em repouso por 5 minutos. A absorbância das amostras foi lida em comprimento de onda de 595 nm e em seguida a concentração de proteínas em cada amostra foi obtida utilizando curva de calibração do padrão soro albumina bovina (BSA) válida em uma faixa de concentração de 0 a 0,6 g.L-1.

#### 3.2.4 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA - MÉTODO NIPAB

A atividade enzimática das amostras de caldo de cultura dialisadas e centrifugadas foram medidas através da análise colorimétrica (405 nm) do ácido p-nitro-anilino benzóico liberado durante a hidrólise de 66 mg/L do ácido 6-nitro-3-fenilacetamido benzóico (NIPAB), em 50 mM de tampão fosfato pH 7,5 a 25°C (Kutzbach e Rauenbusch, 1974). Segundo o método define-se unidade de atividade enzimática como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol do substrato por minuto a 25°C. O valor da atividade foi calculado a partir da equação 1.

$$\text{Atividade} = \frac{\text{Abs}/\text{min} \times V_{\text{Total}}}{9,09 \times V_{\text{Enzima}}} \times \text{Diluição} = \text{U/mL} \quad \text{Eq. 1}$$

#### 3.2.5 - OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS DE AGAR 3%-AGAROSE ME 6% (M/M) E AGAROSE ME 10% (M/M)

As partículas de agar 3%-agarose ME 6% (m/m) e agarose ME 10% (m/m) foram preparadas gotejando em vaselina líquida mantida a temperatura ambiente e com agitação mecânica, uma solução aquosa aquecida a 100°C, contendo agar 3% - agarose ME 6% (m/m) ou agarose ME 10% (m/m). As partículas eram formadas instantaneamente,

quando a solução entrava em contato com a vaselina. Ao término do gotejamento, as partículas foram peneiradas e lavadas abundantemente com água destilada para a completa remoção da vaselina. Em seguida foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio e armazenadas em água destilada para posterior imobilização da PGA.

### **3.2.6 - ATIVAÇÃO DOS SUPORTES COM GLICIDOL – OBTENÇÃO DO GEL GLICERIL-AGAROSE**

A ativação consistiu na eterificação dos suportes com glicidol (2,3-epoxi-1-propanol) na presença de NaOH e NaBH<sub>4</sub> (Guisán, 1988).

Inicialmente, os suportes foram lavados abundantemente com água destilada e, em seguida, filtrados a vácuo. Depois de filtrados, os suportes foram pesados e o procedimento de ativação foi realizado seguindo protocolo já estabelecido (Guisán, 1988).

Para cada 20 g de agarose filtrada foi adicionado 5,71 mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados, sob agitação mecânica e em banho de gelo, 9,52 mL de solução de NaOH 1,7 M contendo 271,4 mg de NaBH<sub>4</sub> e por último 6,86 mL de glicidol, adicionados lentamente para garantir que a temperatura não ultrapassasse 20 °C. Essa mistura reacional foi mantida sob agitação mecânica por 18 horas à temperatura ambiente. Com o término do período de ativação, o gel foi lavado abundantemente com água destilada e mili-Q para garantir que o pH do filtrado (agarose) estivesse neutro.

Para as partículas de agar 3%-agarose ME 6% (m/m) e agarose ME 10% (m/m) a etapa de entrecruzamento se fez necessária para que essas partículas adquirissem resistência mecânica. Nesse caso, em banho de gelo e utilizando agitação mecânica, para cada 20 g de suporte, foram adicionados 200 mL de solução de NaOH 2M contendo 1,2 g de NaBH<sub>4</sub> e por último 20 mL de epícloridrina. Essa mistura reacional foi mantida sob agitação mecânica por

24 h à temperatura ambiente. Após esse período as partículas foram lavadas abundantemente com a água destilada e mili-Q e a etapa de ativação iniciada, seguindo o protocolo já descrito e por um período de 24 horas.

### 3.2.7 - OXIDAÇÃO DOS SUPORTES – OBTENÇÃO DO GEL GLIOXIL-AGAROSE

O gel de agarose, previamente ativado, foi suspenso em água destilada na proporção de 1:10 ( $V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$  da suspensão). A massa de periodato de sódio necessária para oxidação máxima do gel foi calculada de acordo com a equação 2. Para o gel de agarose 6BCL foram oferecidos 120  $\mu\text{moles}$  de aldeído/mL de gel enquanto que para as partículas de agar 3%-agarose ME 6% (m/m) e agarose ME 10% (m/m) foram oferecidos 250  $\mu\text{moles}$  de aldeído/mL de gel.

$$\text{Massa de NaIO}_4 = \frac{(\mu\text{moles aldeído/mL gel}) \times \text{Volume de gel} \times \text{MM}_{\text{NaIO}_4}}{1 \times 10^6} \quad \text{Eq. 2}$$

As reações de oxidação, tanto do gel de agarose 6BCL quanto das partículas de agar 3%-agarose ME 6% (m/m) e agarose ME 10% (m/m), ocorreram por 2 horas, sob agitação mecânica. Em seguida, os suportes foram abundantemente lavados com água destilada e mili-Q para garantir que o pH do filtrado (agarose) estivesse neutro e posteriormente filtrados a vácuo para a etapa de imobilização.

### 3.2.8 - QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPOS ALDEÍDO DOS SUPORTES

A quantificação do número de grupos aldeído presentes na superfície do suporte foi realizada através da medida do periodato de sódio não consumido (sobrenadante) na etapa de oxidação dos grupos glicéris (Guisán, 1988). Esse método baseia-se na reação do

periodato ( $\text{IO}_4^-$ ) não consumido com iodeto ( $\text{I}^-$ ) em excesso para garantir que iodo na forma de íon tri-iodeto ( $\text{I}_3^-$ ) seja formado (Eq. 3), pois iodo na forma  $\text{I}_2$  é muito volátil. O iodo na forma do íon tri-iodeto ( $\text{I}_3^-$ ) foi posteriormente quantificado por colorimetria.



Foi preparado anteriormente um volume maior de solução de periodato de sódio para que uma alíquota fosse retirada e servisse de referência da reação. Inicialmente, 100  $\mu\text{L}$  da solução de referência e 3 mL de uma mistura 1:1 de iodeto de potássio 10% m/v e bicarbonato de sódio saturado (solução 1) foram adicionados a uma cubeta e um comprimento de onda que tivesse como resposta absorvância em torno de 0,8 foi fixado. Em tempos determinados, alíquotas foram retiradas do sobrenadante e estas reagiram com a solução 1 para mensurar o consumo de periodato. A presença de bicarbonato de sódio foi necessária para que a oxidação do iodeto fosse desprezada.

### 3.2.9 - IMOBILIZAÇÃO DA PGA

Inicialmente foi preparada uma solução de ácido fenilacético 100 mM em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 aproximadamente. O ácido foi adicionado e o pH dessa solução controlado em 10,05. O ácido fenilacético, durante o período de imobilização, atua como inibidor protegendo o sítio ativo da enzima contra alterações em sua estrutura e preservando sua atividade catalítica. A enzima, previamente centrifugada, foi adicionada a essa solução e o pH novamente ajustado para 10,05 com hidróxido de sódio. A essa solução foi adicionado o suporte (agarose 6BCL ou partículas agarose ME 10% (m/m)) em uma razão de 1:10 (Volume de suporte : Volume total de solução). O tempo de reação foi de 3 horas

para a agarose 6BCL e de 24 horas para as partículas de agarose ME 10% (m/m) em temperatura ambiente. Ao término desse período a reação foi finalizada com adição do agente redutor suave (borohidreto de sódio), em uma concentração de 1 mg por mL de solução de imobilização, e a reação se processou por mais 30 minutos. No final do processo, o derivado foi lavado com tampão fosfato 100 mM, pH 8 e bastante água destilada e mili-Q. O derivado foi armazenado em tampão fosfato 100 mM, pH 8. A atividade dos derivados foi medida pelo método PDAB.

### 3.2.10 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA - MÉTODO PDAB

O método PDAB (p-dimetilamino benzaldeído) baseia-se na formação de base de Schiff pela reação entre o 6-APA, produzido durante a hidrólise da penicilina G, com o PDAB gerando um produto colorido o qual é monitorado espectrofotometricamente em 415 nm (Balasingham *et al.*, 1972).

Inicialmente foi preparada uma solução 4% de penicilina G (PG) em tampão fosfato 100 mM e pH 8. A hidrólise da penicilina G foi realizada em um reator encamisado e a temperatura mantida a 37°C. A solução de PG 4% m/v foi adicionada ao reator e depois de atingida a temperatura desejada, a enzima também foi adicionada. Em tempos determinados foram retiradas amostras de 250µL e estas foram adicionadas a uma cubeta já contendo 3,75 mL da solução de PDAB. Após 2,5 minutos a absorbância foi medida. O reagente PDAB foi preparado a partir da seguinte proporção em volume: 1 parte de PDAB 0,5% m/v em metanol, 4 partes de ácido acético 20% v/v e 2 partes de solução de hidróxido de sódio 0,05 M. A concentração de 6-APA foi obtida empregando uma curva de calibração previamente preparada. A partir dos valores de concentração de 6-APA foi construído um gráfico de

concentração *versus* tempo e a tangente da curva foi usada para calcular as atividades enzimáticas (Eq.4).

$$At = \frac{\mu \text{ mol 6APA} / \text{mL min} \times \text{Vol (mL)}}{m_{\text{derivado}}} = UI / g_{\text{derivado}} \text{ ou } At = \frac{\mu \text{ mol 6APA} / \text{mL min} \times \text{Vol (mL)}}{V_{\text{enzima}}} = UI / \text{mL}_{\text{enzima}} \quad \text{Eq. 4}$$

Uma unidade internacional (UI) é definida com a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de 6-APA a partir de hidrólise da penicilina G em 1 minuto a 37°C em pH 8,0.

### 3.2.11 - OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS DE ALGINATO

As partículas de alginato-PGA-agarose 6BCL foram obtidas gotejando uma solução composta de alginato 2% m/v e PGA-agarose 6BCL em cloreto de cálcio 0,5 M sob agitação.

### 3.2.12 - SÍNTESE DE AMPICILINA

As reações enzimáticas de síntese de ampicilina, realizadas para avaliar o éster metílico e os ésteres sintetizados (etílico e isopropílico), foram conduzidas em reator de batelada encamisado com agitação mecânica em um volume reacional de 30 mL, concentração de 6-APA e dos diferentes ésteres de 10 mM e 50 mM respectivamente, 25°C e pH 6,5. A quantidade de enzima (Recordatti) em todos os experimentos foi de 0,3 g contendo  $258 \pm 25$  UI/g.

As reações enzimáticas de síntese de ampicilina para avaliar o desempenho do biocatalisador agar 3%/agarose ME 6% ((m/m)) foram realizadas em reator batelada,

encamisado, com agitação mecânica. Volume reacional foi de 20 mL para todos os ensaios. Concentração de 6-APA e dos diferentes ésteres (metílico e etílico) de 250 mM e 25 mM, respectivamente. Reações foram realizadas com temperatura controlada a 25°C e em dois valores de pH: 6,5 e 6,2. A quantidade de enzima em todos os experimentos foi de 3 g contendo  $219 \pm 3$  UI/g. Aliquotas de 30  $\mu$ L foram retiradas do meio reacional, diluídas adequadamente na própria fase móvel e em seguida analisadas em HPLC.

As reações enzimáticas de síntese de ampicilina, em meio heterogêneo (com os cristais de produtos), para levantamento das velocidades iniciais, foram realizadas em reator batelada encamisado, temperatura controlada a 25°C em pH 6,0; 6,2 e 6,5 sob agitação mecânica. Volume reacional de 20 mL para todos os ensaios. As concentrações iniciais de 6-APA e diferentes ésteres (metílico, etílico e isopropílico) foram de 300 mM e 150 mM respectivamente, e de ampicilina e D-FG foram de 60 mM. A atividade aparente medida nas partículas de PGA-agarose ME 10% m/v foi de 250UI/g<sub>gel</sub> e no suporte PGA-agarose 6BCL co-envolvida em alginato 2% m/v foi de 150UI/g<sub>gel</sub>. Em todos os experimentos utilizaram-se 2 g de catalisador. Dois tipos de amostra foram analisados: uma alíquota foi removida utilizando filtro (0,20  $\mu$ m) na ponteira de uma micropipeta, a fim de separar sólidos da solução, e outra alíquota do sistema heterogêneo foi retirada para caracterização do conjunto reacional (sem o filtro e, portanto, coletando também os cristais).

As reações enzimáticas de síntese de ampicilina para estudos cinéticos foram realizadas em reator batelada encamisado, temperatura controlada a 25°C em pH 6,0 e 6,2, sob agitação mecânica. Volume reacional de 50 mL para todos os ensaios. As concentrações iniciais de 6-APA, éster etílico, ampicilina e D-FG são apresentadas na Tabela 5. Em todos os experimentos, foram utilizadas 5 g de PGA imobilizada em agarose 6BCL co-envolvida em alginato 2% m/v contendo 150 UI/g<sub>gel</sub>. Em caso de sistemas heterogêneos duas amostras foram analisadas: uma alíquota foi removida utilizando filtro (0,20  $\mu$ m), a fim de separar

sólidos da solução e a outra alíquota do sistema heterogêneo foi retirada, sem o filtro, para caracterização do conjunto reacional.

Tabela 5 – Concentrações iniciais dos reagentes no estudo cinético a pH 6,0 e 6,2.

<b>CONCENTRAÇÃO (mM)</b>			
<b>6-APA</b>	<b>ÉSTER ETILICO</b>	<b>AMPICILINA</b>	<b>D(-) FG</b>
300	300	-	-
300	200	-	-
300	200	60	60
300	150	-	-
300	150	60	60
300	50	-	-
150	300	-	-
100	150	-	-
100	150	60	60
100	50	-	-
200	150	-	-
200	150	60	60
200	50	-	-

A reação enzimática de síntese de ampicilina em batelada alimentada foi realizada em reator encamisado, temperatura controlada a 25°C, pH 6,0, sob agitação mecânica. Volume reacional final de 70 mL. As concentrações iniciais de 6-APA, éster etílico, ampicilina e D(-)-FG foram 300 mM, 200 mM, 60 mM e 60 mM respectivamente. Nesse experimento foram utilizadas 10 g de PGA imobilizada em agarose 6BCL co-envolvida em alginato 2% contendo 150 UI/g<sub>gel</sub>.

### 3.2.13 - ANÁLISE EM HPLC

As concentrações de éster, 6-APA, ampicilina e fenilglicina foram determinadas usando cromatografia líquida de alto desempenho (CLEA, ou HPLC, da sigla inglesa) nas seguintes condições:

- ↳ Coluna C18 Phenomenex, 110Å, 5µm, 150 x 4,6 mm;
- ↳ Temperatura de 25°C;
- ↳ Vazão de 1,0 mL/min;

- ↳ Comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 225 nm;
- ↳ Fase móvel: 35% de acetonitrila, 65% de água Mili-Q, potássio fosfato monobásico 5 mM, dodecil sulfato de sódio 5 mM, ácido fosfórico para ajustar o pH em 3.

### 3.3 - ENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO

O ensaio de precipitação no ponto isoelétrico teve como objetivo verificar a eficiência de separação da ampicilina a partir de uma mistura de cristais de ampicilina e fenilglicina obtida das sínteses realizadas.

Uma massa da mistura de ampicilina e fenilglicina foi pesada de forma a ultrapassar o limite de solubilidade dos compostos. Em seguida a mistura, mantida a temperatura ambiente, foi solubilizada com uma solução de NaOH concentrado, elevando-se o pH a 8,5. Uma filtração desta solução foi realizada para obter praticamente os cristais de fenilglicina. O filtrado contendo uma mistura de ampicilina e fenilglicina foi então acidificado com HCl concentrado baixando-se o pH para 4,95 (ponto isoelétrico da ampicilina). A ampicilina precipitada foi separada por filtração da solução mãe. A Figura 19 apresenta a seqüência de etapas utilizadas nos experimentos de precipitação no ponto isoelétrico.

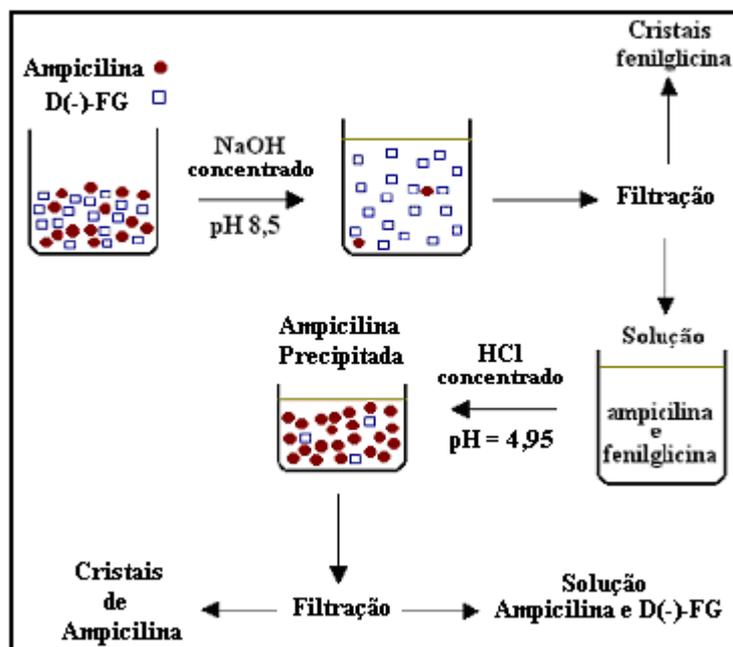


Figura 19 - Representação esquemática da seqüência utilizada nos ensaios de precipitação no ponto isoelétrico da ampicilina (reproduzida de Vieira, 2003).

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 4.1. PRÉ – CONCENTRAÇÃO DA PENICILINA G ACILASE (PGA)

A diálise do caldo de cultura, proveniente de biorreator, contendo PGA, foi realizada com o intuito de verificar a influência desta técnica na atividade da enzima recuperada e na concentração de proteínas. Conforme já explicado no item 3.2.2 a diálise permite a retirada de solutos de baixo peso molecular e a retenção das moléculas protéicas e a centrifugação permite a retirada de peptídeos. As condições de diálise, o corte das membranas utilizadas e as condições de centrifugação estão descritos em materiais e métodos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados obtidos na etapa de centrifugação/diálise e diálise/centrifugação. Ensaios em triplicata.

	<b>Atividade NIPAB ± dp (UI/mL)</b>	<b>Atividade Específica* (UI/mg)</b>	<b>Lowry ± dp C (mg/mL)</b>	<b>Bradford ± dp C (mg/mL)</b>
Caldo de cultura	133,4 ± 2	3,2	42,0 ± 2	29,4 ± 1
<b>Método 1 – Centrifugação seguida de diálise</b>				
Centrifugada	189,7 ± 4	6,5	29,3 ± 2	20,4 ± 1
Dialisada 6h	147,4 ± 2	7,0	21,0 ± 5	9,6 ± 1
Dialisada 20h	166,0 ± 10	7,3	22,6 ± 1	12,2 ± 1
Dialisada 32h	107,6 ± 7	6,0	18,0 ± 1	7,5 ± 1
<b>Método 2 – Diálise seguida de centrifugação</b>				
Dialisada por 32 h	98,0 ± 9	3,0	33,0 ± 1	30,5 ± 2
Centrifugada	123,4 ± 5	6,6	18,7 ± 2 × 10 <sup>-1</sup>	3,3 ± 3 × 10 <sup>-1</sup>

\*Proteínas medidas pelo método de Lowry na atividade específica

De acordo com as análises de proteínas realizadas, verifica-se, nos métodos 1 e 2, que ocorreu uma redução na concentração protéica o que mostra que está ocorrendo uma parcial purificação do caldo, como era desejado.

Quanto à atividade enzimática, para o método 2, verificou-se um decréscimo no seu valor quando se procedeu diretamente à diálise do caldo de cultura (133,4 UI/mL para 98,0 UI/mL – perda de 26%) voltando a aumentar quando esse dialisado foi centrifugado (98,0 UI/mL para 123,4 UI/mL – ganho de 25%). Verificou-se também, nesse caso, que o valor da atividade específica não variou quando se procedeu à diálise do caldo (3,2 para 3,0 UI/mg<sub>proteína</sub>) tendo um ligeiro aumento depois da centrifugação desse dialisado (3,0 para 4,6 UI/mg<sub>proteína</sub>).

Para o método 1 também verificou-se um aumento no valor da atividade enzimática quando o caldo de cultura foi inicialmente centrifugado (133,4 UI/mL para 189,7 UI/mL – ganho de 42%) e uma redução quando foi realizada a diálise desse centrifugado nos três diferentes tempos (6, 20 e 32 h). Essa redução na atividade está de acordo com dados relatados na literatura como o apresentado por Pinotti, 2003, que verificou uma redução de aproximadamente 30% na atividade recuperada após realizar a diálise. Analisando os valores obtidos para a atividade específica foi verificado que houve um acréscimo no seu valor (3,2 para 6,5 UI/mg<sub>proteína</sub>) com a etapa inicial de centrifugação. Procedendo a diálise desse centrifugado, verificou-se que não houve variação significativa nos valores de atividade específica nos três diferentes tempos (6, 20 e 32 h).

Assim, o caldo de cultura contendo PGA, para as futuras imobilizações, foi apenas centrifugado a 4°C, 11 000 ×g por 30 min.

## 4.2 - IMOBILIZAÇÃO DA PGA NOS DIFERENTES SUPORTES

Antes do procedimento de imobilização foi realizado o processo de concentração da PGA centrifugada utilizando um sistema de ultrafiltração AMICON ULTRA da Millipore com NMWL de 50 kDa. A atividade da solução de PGA concentrada utilizada nas imobilizações, medida pelo método PDAB, foi de 1200 UI/mL.

Seguindo a metodologia do item 3.2.8 mediu-se a quantidade de grupos aldeídos nos diferentes suportes. A Tabela 7 apresenta os valores obtidos na etapa de oxidação dos suportes.

Tabela 7 – Quantidade de grupos aldeídos obtidos durante a oxidação dos suportes.

SUPORTE	$\mu\text{mol de aldeído/mL}_{\text{gel}}$
Agar 3% - Agarose ME 6% (m/m)	138
Agarose ME 10%	200
Agarose 6BCL (Pharmacia)	80

Na Tabela 8, observa-se o valor de atividade do sobrenadante ao longo da imobilização nas partículas de 1 mm de Agar 3%/Agarose ME 6% (m/m). Deixou-se o sistema reagindo até completar às 24 horas de imobilização, a fim de aumentar os enlaces enzima-suporte, favorecendo assim, a estabilidade das ligações covalentes. O tempo de imobilização nesse suporte foi de 24 horas, pois como se tratava de uma partícula bem maior que a agarose 6BCL esperava-se que ocorressem atrasos difusionais.

Tabela 8 – Atividade enzimática do sobrenadante da imobilização nas partículas de agar 3%/agarose ME 6% (m/m).

Tempo de imobilização (h)	Atividade (UI/mL) PDAB
0	943
3	111
5	86
18	-
24	-

A Figura 21 mostra um gel de eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) de amostras do sobrenadante ao longo da imobilização. O desaparecimento das bandas das amostras do sobrenadante ao longo do tempo indica a migração da enzima para a matriz de Agar 3% - Agarose ME 6% (m/m).

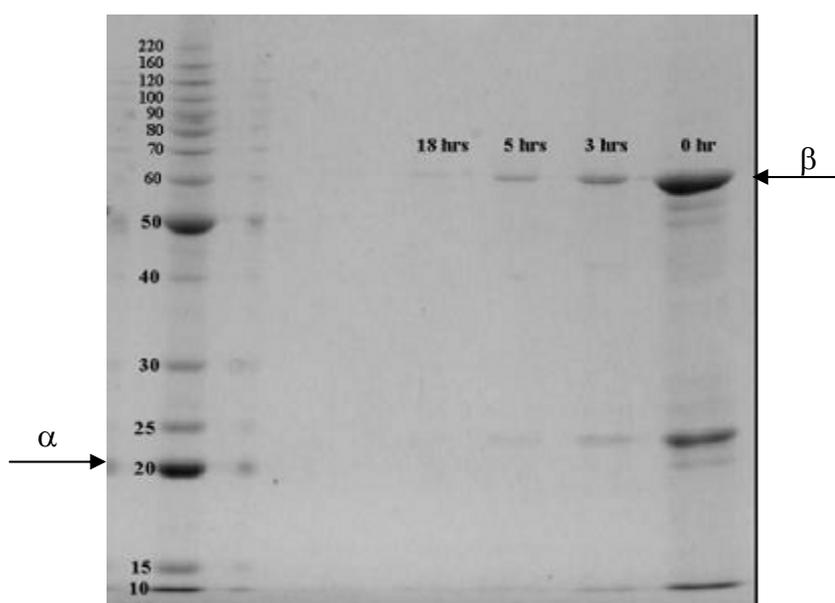


Figura 21 – Eletroforese das amostras de sobrenadante ao longo das 24 horas de imobilização.

A diferença entre a atividade recuperada e a do sobrenadante pode ter várias causas: uma é a existência de limitação difusional intrapartícula na medida de atividade da enzima imobilizada, para as altas cargas aqui utilizadas; outra é uma possível perda da configuração terciária e quaternária de parte das moléculas de enzima durante as 24 horas de imobilização a pH 10,05. Não se pode descartar uma perda de atividade em decorrência da imobilização (cinética inerente se distanciando da intrínseca) em razão de impedimentos estéricos do acesso dos substratos ao sítio ativo da enzima, ou mesmo em razão de uma deformação desse sítio em algumas moléculas de enzima em consequência das ligações multipontuais com o suporte.

A Tabela 9 apresenta as atividades medidas nos diferentes derivados pelo método PBAD. Para as partículas de agar 3% - agarose ME 6% (m/m) e agarose ME 10% (m/m) o tempo de imobilização foi de 24 h, pois como se trata de partículas com diâmetro de aproximadamente 1 mm levou-se em consideração a existência de atrasos difusionais também no processo de imobilização.

Tabela 9 – Atividade medida nos diferentes derivados pelo método PDAB.

<b>SUORTE</b>	<b>Tempo de Imobilização (h)</b>	<b>Atividade <math>\pm</math> dp (UI/g<sub>suporte</sub>)</b>
Agar 3% - Agarose ME 6% (m/m)	24	210 $\pm$ 18
Agarose ME 10% (m/m)	24	250 $\pm$ 3
Agarose 6BCL (Pharmacia)	3	500 $\pm$ 4

#### **4.3 - CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS – DIÂMETRO MÉDIO**

As partículas formadas apresentaram diâmetros médios na ordem de milímetros portanto a determinação do diâmetro médio foi realizada usando a técnica de

análise de imagem em um contador de partículas com a cooperação do laboratório de tecnologia ambiental do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

O biocatalisador composto por agar 3%-agarose ME 6% (m/m), agarose ME 10% (m/m) e agarose 6BCL ( $0,25 \pm 6$  mm) envolvida em alginato 2% apresentaram partículas com diâmetro médio de  $1,3 \pm 7 \times 10^{-2}$  mm,  $1,4 \pm 8 \times 10^{-2}$  mm e  $2,1 \pm 6 \times 10^{-2}$  mm, respectivamente. As Figuras 22, 23 e 24 apresentam fotografias das partículas dos diferentes biocatalisadores.

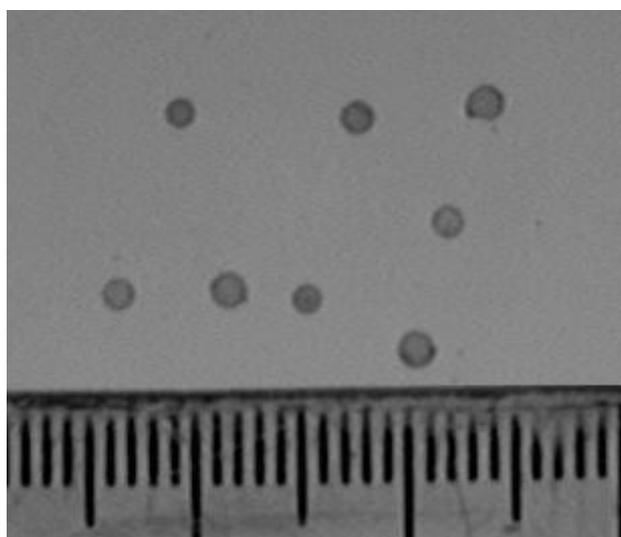


Figura 22 – Fotografia do biocatalisador agar 3% - agarose ME 6% (m/m).

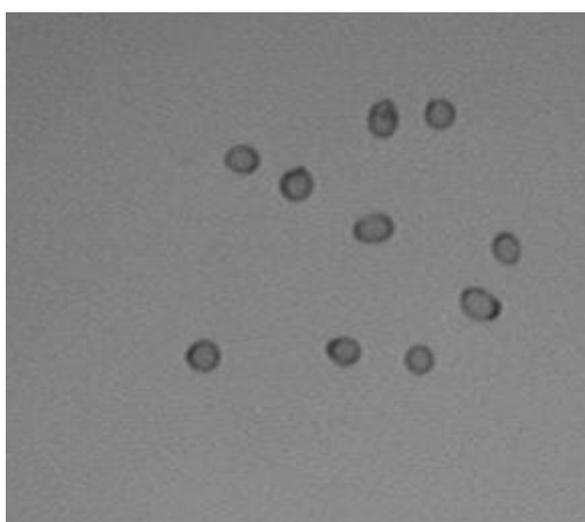


Figura 23 – Fotografia do biocatalisador agarose ME 10% (m/m).

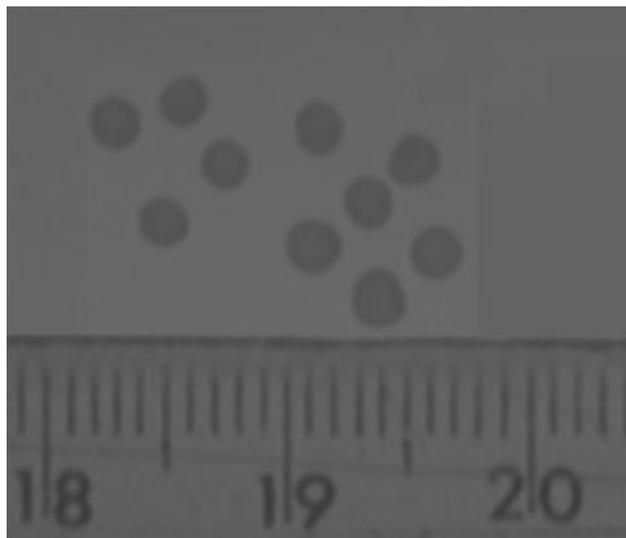


Figura 24 – Fotografia do biocatalisador alginato - agarose 6BCL.

A atividade final no biocatalisador alginato-agarose 6BCL foi de 150 UI/g sendo determinada de acordo com a atividade enzimática obtida para a PGA-agarose 6BCL pelo método PDAB,  $500 \pm 4$  UI/g. Não foi possível realizar a medida da atividade desse biocatalisador a partir do método PDAB, pois a presença de fosfato, presente no tampão utilizado para solubilizar a penicilina G, provoca afastamento das cadeias poliméricas do gel de alginato de cálcio devido à remoção dos íons cálcio e as enzimas aprisionadas fisicamente tendem a lixiviar para o meio reacional. A medida de atividade também foi realizada sem o tampão fosfato, porém a velocidade de reação foi muito alta não sendo possível controlar o pH nem com o auxílio do pH-stat. Nesse caso foi adicionado um grande volume de NaOH diluindo dessa forma a enzima no meio reacional.

#### 4.4 - SÍNTESE DE AMPICILINA

##### 4.4.1 - SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA UTILIZANDO OS DIFERENTES ÉSTERES DE CADEIA LATERAL

A síntese cineticamente controlada de ampicilina foi realizada a partir de éster metílico comercial (EMFG), etílico (EEFG) e isopropílico de fenilglicina (EIFG), previamente sintetizados, e de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Os ensaios iniciais foram realizados empregando Penicilina G Acilase comercial, RECORDATI, com atividade enzimática de  $258 \pm 25$  UI/g medida pelo método PDAB, à temperatura de 25°C e com o pH do meio reacional mantido a 6,5. A concentração inicial de 6-APA e dos diferentes ésteres foi a mesma em todos os ensaios, 10 mM e 50 mM respectivamente (abaixo dos seus limites de solubilidade). A utilização de baixa concentração de 6-APA, embora tenda a diminuir a seletividade da enzima, aumenta a velocidade tanto de síntese quanto de hidrólise, para uma dada concentração de éster e atividade enzimática por volume de reator, como reportado na literatura para o EMFG (Ferdanandez-Lafuentes *et al.*, 1998, Ospina *et al.*, 1996 e Ribeiro *et al.*, 2006). Nestas condições, avaliou-se a influência dos diferentes ésteres na produção enzimática de ampicilina.

O gráfico da Figura 25 mostra os perfis de concentrações de ampicilina obtidos em ensaios de síntese enzimática. Os resultados mostram que um máximo de ampicilina foi obtido em torno de 45 minutos de reação quando usados EMFG e EEFG. Com o aumento do tempo reacional observa-se uma queda na concentração de ampicilina, resultado de uma velocidade de hidrólise maior que a velocidade de síntese. Os resultados para estes dois substratos não mostram nenhuma diferença significativa. Contudo, nos ensaios de síntese utilizando o EIFG, o comportamento do perfil de concentração de ampicilina se distingue daqueles obtidos para os demais ésteres. Embora a velocidade inicial de síntese de ampicilina

utilizando o EIFG pareça não se diferenciar das demais curvas, com o avanço da reação observa-se um distanciamento das curvas devido a uma queda na velocidade de reação de síntese de ampicilina para este substrato.

O gráfico da Figura 26 mostra o perfil de produção do produto secundário, fenilglicina (indesejado), em ensaios de síntese enzimática de ampicilina. Os resultados mostram uma menor hidrólise dos substratos de éster etílico e isopropílico (EEFG e EIFG) em relação ao éster metílico (éster comumente utilizado em estudos de síntese cineticamente controlada de ampicilina). A maior produção de fenilglicina nas reações com o éster metílico quando comparada aos outros éteres se dá devido a maior facilidade da molécula de água reagir com esse substrato (menor impedimento estérico). Os resultados mostram que a utilização de EEFG não reduziu a velocidade de síntese de ampicilina nas condições deste ensaio e, além disso, diminuiu a velocidade de hidrólise do éster, mostrando grande potencial para aumentar a seletividade da rota enzimática. Do ponto de vista ambiental, os resultados obtidos da síntese de ampicilina empregando EEFG são animadores, uma vez que um dos subprodutos gerado, o etanol, apresenta menor toxicidade na manipulação do reator, quando comparado com o metanol, normalmente utilizado na literatura.

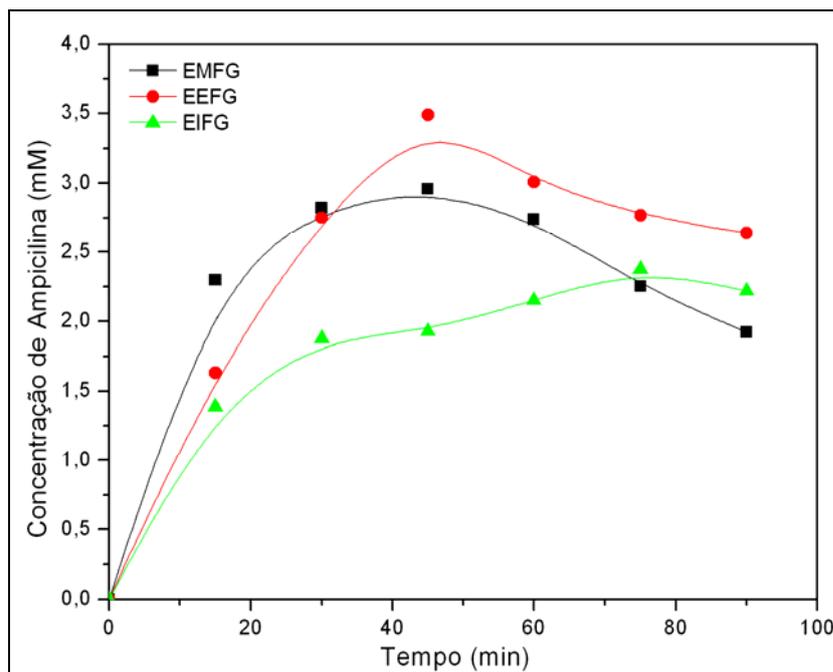


Figura 25 – Perfil de concentração de ampicilina obtido em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,5.  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA 10 mM e  $C_{\text{inicial}}$  dos diferentes ésteres 50 mM. Enzima comercial Recordati – 2,6 UI/mL<sub>reator.</sub>.

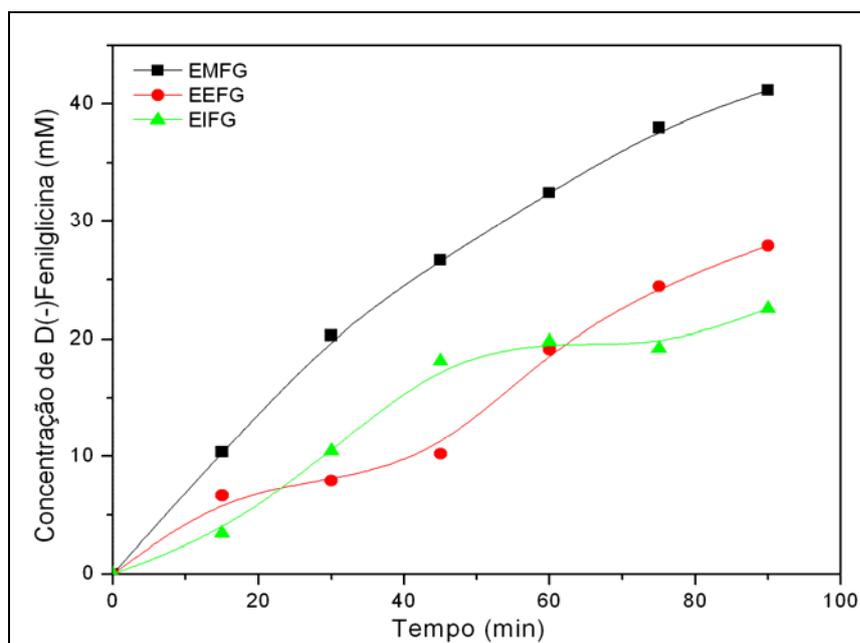


Figura 26 – Perfil de concentração de D(-) fenilglicina obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,5.  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA 10 mM e  $C_{\text{inicial}}$  dos diferentes ésteres 50 mM. Enzima comercial Recordati – 2,6 UI/mL<sub>reator.</sub>.

Nos estudos realizados para avaliar a velocidade de hidrólise não enzimática dos diferentes ésteres (ensaios em branco, sem a presença do catalisador enzimático), não foram observadas variações significativas das concentrações dos ésteres ao longo de 90 minutos. Estes resultados obtidos corroboram com aqueles apresentados na literatura, que

demonstram que a velocidade de hidrólise inespecífica para concentrações menores que 100 mM decai para zero, implicando uma melhora na seletividade, S/H, da síntese enzimática de ampicilina para baixas concentrações de ésteres (Ribeiro *et al.*, 2005).

A Figura 27 apresenta as seletividades *versus* tempo obtidas na síntese de ampicilina com os três ésteres.

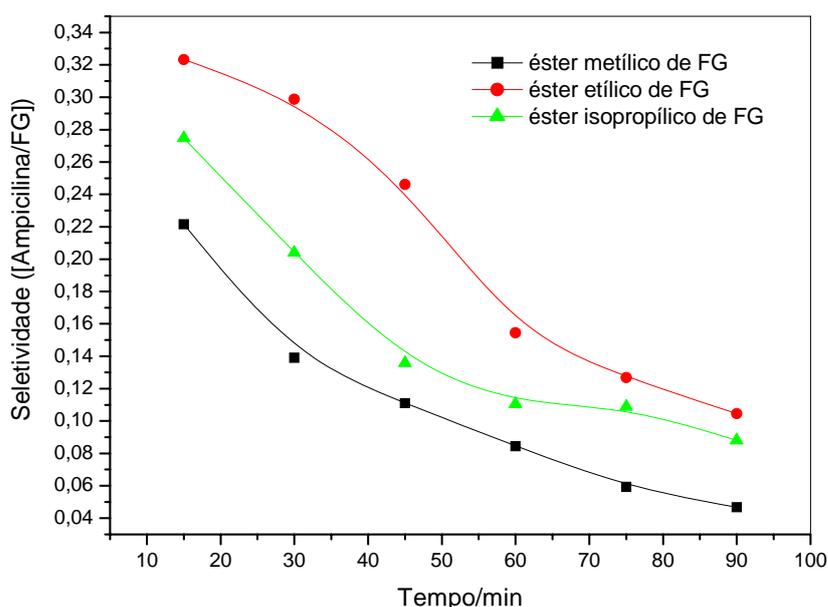


Figura 27 – Perfis das seletividades, (S/H=Ampicilina/Fenilglicina), obtidos na síntese de ampicilina empregando os ésteres metílico, etílico e isopropílico previamente sintetizados.

Verifica-se pela Figura 27 que as maiores seletividades na reação de síntese de ampicilina são obtidas com o éster etílico e isopropílico. Como já foi visto nos gráficos acima não houve uma diferença significativa para os ésteres metílico e etílico na reação de síntese, porém para o éster metílico a velocidade de hidrólise foi maior o que provocou uma diminuição da seletividade de reação para esse substrato.

#### 4.4.2 - SÍNTESE DE AMPICILINA – AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES SUBSTRATOS COM O BIOCATALISADOR AGAR 3%-AGAROSE 6% ME (M/M)

A síntese cineticamente controlada de ampicilina, para avaliar o desempenho do biocatalisador agar 3%-agarose 6% ME (m/m), foi realizada a partir dos ésteres metílico (EMFG) e etílico (EEFG) de fenilglicina e do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Os ensaios foram realizados a 25°C, pH 6,5 e 6,2, utilizando como catalisador partículas com atividade enzimática aparente de  $210 \pm 18$  UI/g, medida pelo método PDAB. A concentração inicial de 6-APA e dos diferentes ésteres foi sempre a mesma, 250 mM e 25 mM, respectivamente. A utilização de alta concentração de 6-APA foi escolhida como a mais conveniente, pois a baixa razão éster/núcleo diminui a perda de éster por hidrólise, ou seja, aumenta a seletividade da reação (Ribeiro *et al.*, 2005).

As Figuras 28 e 29 apresentam as sínteses realizadas em pH 6,5 e pH 6,2 com os diferentes ésteres. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para: rendimento (R), seletividade (S) e produtividade (P) para diferentes ésteres e dois valores de pHs.

Tabela 10 – Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH.

Éster	pH	R (%)	S	P (mmol/UI/min) × 10 <sup>5</sup>
<b>Metílico</b>	6,5	61 ± 8	$1,6 \pm 4 \times 10^{-1}$	$2,6 \pm 2 \times 10^{-6}$
	6,2	67 ± 1	$2,0 \pm 1 \times 10^{-1}$	$2,1 \pm 2 \times 10^{-6}$
<b>Etílico</b>	6,5	67 ± 1	$1,2 \pm 2 \times 10^{-1}$	$1,8 \pm 1 \times 10^{-6}$
	6,2	71 ± 4	$2,2 \pm 4 \times 10^{-1}$	$1,7 \pm 1 \times 10^{-6}$

Valores calculados no ponto de maior rendimento, seletividade e produtividade. 30 min de reação.

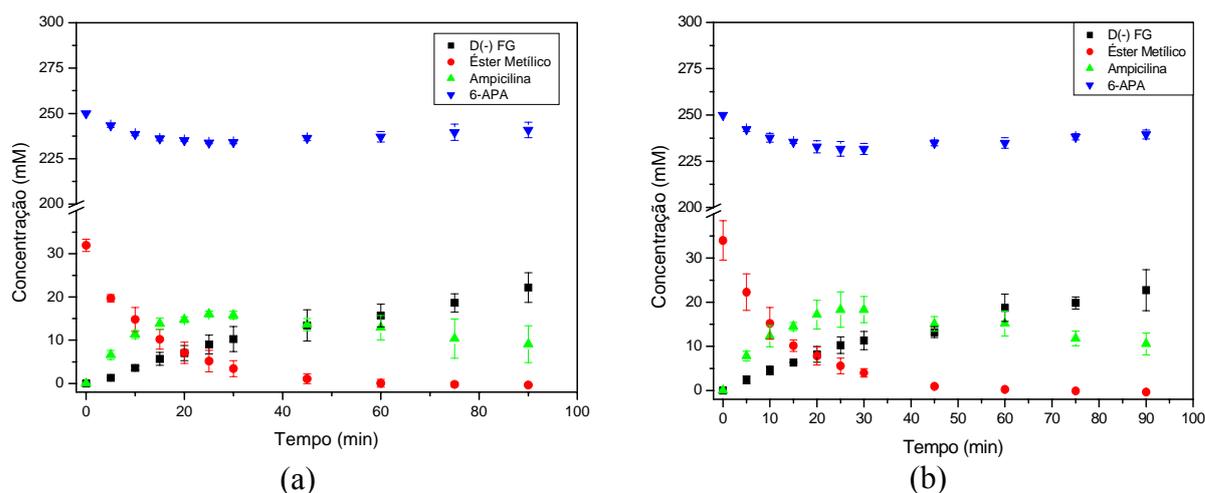


Figura 28 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos na síntese enzimática de ampicilina a 25°C: a) pH 6,5 e b) pH 6,2.  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA 250 mM e  $C_{\text{inicial}}$  éster metílico 25 mM, com desvios-padrão de triplicatas.

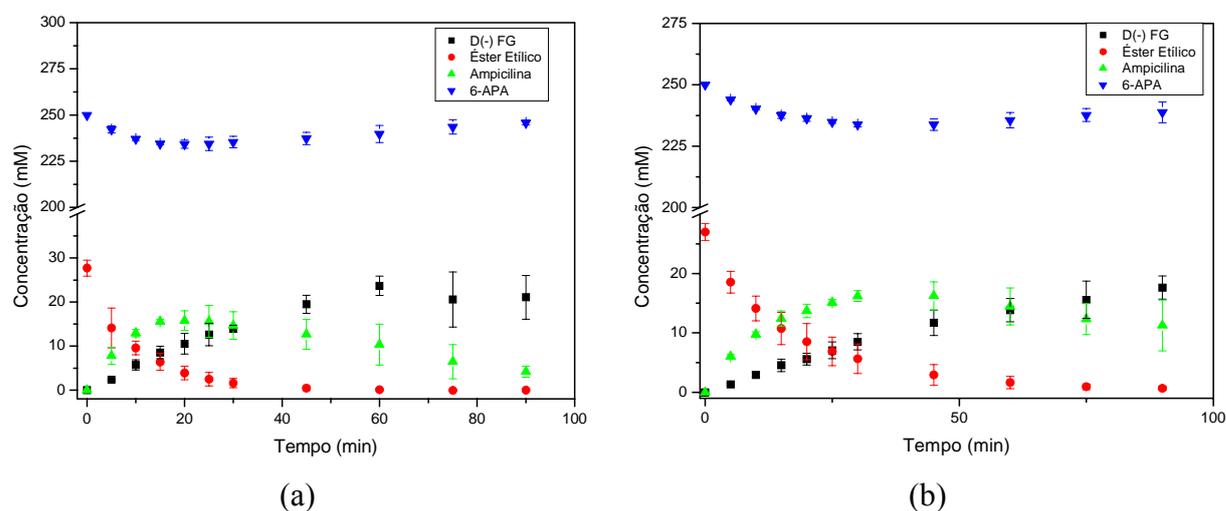


Figura 29 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C: a) pH 6,5 e b) pH 6,2.  $C_{\text{inicial}}$  de 6-APA 250 mM e  $C_{\text{inicial}}$  éster etílico 25 mM, com desvios-padrão de triplicatas.

A velocidade da reação é favorecida quando se trabalha em pHs maiores, entretanto a seletividade é prejudicada. Em função disso, utilizando éster metílico de fenilglicina como doador acil, é comum na literatura a escolha de pH 6,5 na síntese enzimática cineticamente controlada de penicilinas semi-sintéticas como um compromisso entre seletividade e produtividade (Ospina *et al.*, 1996; Gonçalves *et al.*, 1998 e Ferreira, 2004). Nossos resultados mostraram uma pequena queda de produtividade quando se reduziu o pH de 6,5 para 6,2 no caso do éster metílico. Isso está de acordo com os dados obtidos por

diversos autores (Ospina *et al.*, 1996; e Ferreira, 2004). Essa pequena redução do pH, porém, levou a um aumento de cerca de 25% na seletividade da reação após 30 min de ensaio, ao se utilizar o éster metílico de fenilglicina como substrato. Quando se utiliza o derivado etílico, observou-se que a seletividade aumentou 83% em 30 min de reação (vide Figura 30 e Tabela 10). Além disso, a produtividade não diminuiu com a redução do pH na mesma proporção para o éster etílico e metílico. Esses resultados evidenciam a necessidade de otimizar o pH para cada derivado do doador acil. Além disso, mostram que o éster etílico pode ser mais vantajoso que o metílico, pois além de liberar etanol em vez de metanol, tem rendimentos e seletividades próximas ou melhores que o éster metílico de fenilglicina, ao menos nas condições estudadas aqui.

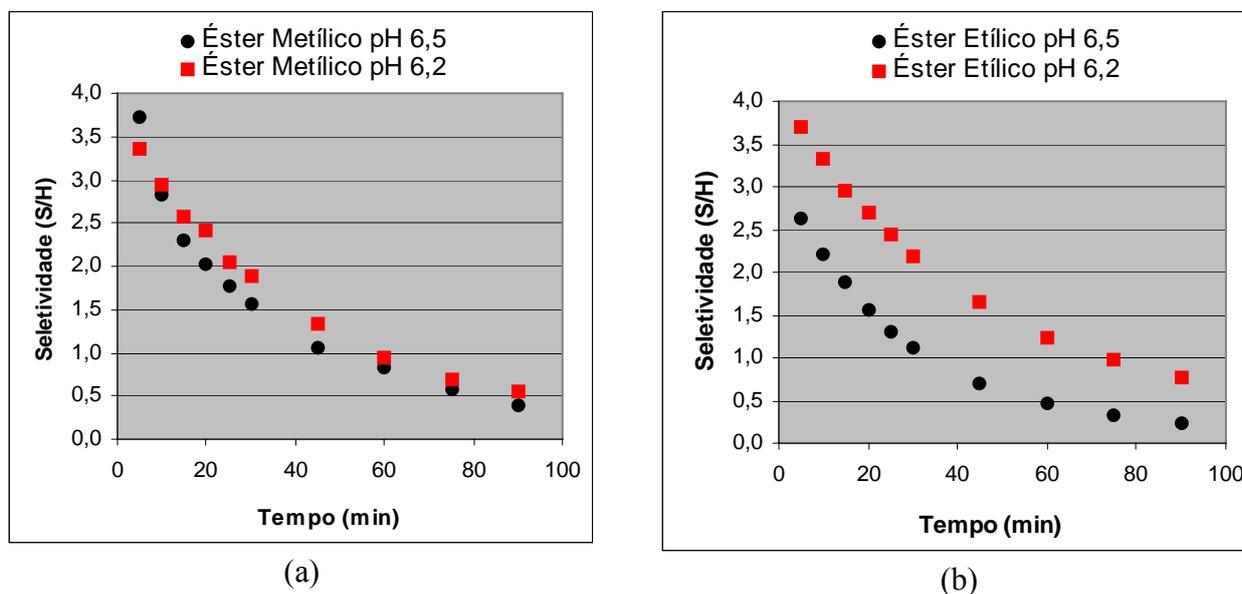


Figura 30 – Seletividade (S/H) ao longo da reação de síntese enzimática de ampicilina a 25°C utilizando diferentes ésteres de fenilglicina: a) éster metílico e b) éster etílico.

Após cada ensaio a atividade do biocatalisador foi medida e foi verificado que este não sofreu nenhuma desativação. Durante os ensaios de síntese pôde-se observar que a integridade das partículas de biocatalisador não foi afetada significativamente pela agitação do reator.

#### 4.4.3 - SÍNTESE DE AMPICILINA – VELOCIDADES INICIAIS

O estudo de velocidades iniciais da síntese cineticamente controlada de ampicilina foi realizado a partir dos ésteres metílico (EMFG), etílico (EEFG) e isopropílico (EIFG) de D(-)-fenilglicina e do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Os ensaios utilizaram Penicilina G Acilase imobilizada em dois diferentes suportes, a 25°C, pH 6,0; 6,2 e 6,5. A concentração inicial de 6-APA e dos diferentes ésteres foi sempre a mesma, 300 mM e 150 mM, respectivamente. Ampicilina e D(-)-FG foram adicionadas no início da reação a fim de favorecer a precipitação do antibiótico via supersaturação. Como já discutido anteriormente, a cristalização do antibiótico no reator é essencial para aumentar a seletividade do processo, pois o antibiótico cristalizado não será atacado pela enzima. A utilização de alta razão 6-APA/Éster foi mantida para diminuir a perda de éster por hidrólise.

Segundo Youshko *et. al.*, 2002, quando a síntese enzimática de ampicilina é realizada em uma concentração inicial de 6-APA (núcleo  $\beta$ -lactâmico) abaixo da saturação a seletividade aumenta com o decréscimo do pH. A enzima está imobilizada em suporte poroso, então, é esperado que um gradiente de pH aconteça no interior da partícula de biocatalisador, com um valor mínimo no seu centro (Ribeiro, 2007). Em pHs maiores são esperadas taxas de reações mais altas, porém a seletividade seria reduzida (Ospina *et. al.*, 1996, Ferreira *et. al.*, 2004).

As Tabelas 11 e 12 mostram os resultados obtidos para rendimento (R), seletividade (S) e produtividade (P) do processo. A queda na seletividade foi verificada para os ésteres etílico e isopropílico utilizando ambos os catalisadores: agarose ME 10% (m/m) (Tabela 11) e alginato-PGA-agarose 6BCL (Tabela 12). Um valor máximo de seletividade ( $2,4 \pm 5 \times 10^{-2}$ ) foi alcançado realizando a síntese de ampicilina em pH 6,0, éster isopropílico com agarose ME 10% (m/m) - ensaio 7. Pode-se observar que, em uma situação mais próxima

---

do processo industrial, isto é, utilizando catalisadores heterogêneos e semeando cristais de produto desde o início da reação, a influência do pH sobre os índices de desempenho da reação (R, S e P) não é monotônico, ao contrário do que a literatura indica para situações com enzima solúvel e/ou sem presença de cristais. Esse fato se deve, certamente, à maior complexidade do sistema aqui estudado, que sofre a interferência de vários outros fenômenos além da cinética enzimática: transporte de massa intra- e extra-partícula de catalisador (com reflexos em perfis de pH intrapartícula, como já mencionado anteriormente); equilíbrio de fases sólido-líquido de mistura multicomponente cuja composição se altera ao longo do tempo e que tem componentes cuja solubilidade é fortemente influenciada pelo pH; cinética de cristalização, aí incluído o transporte de massa para a superfície dos cristais. Os resultados aqui obtidos, assim, são conseqüências da conjugação desses diferentes fenômenos, o que pode explicar o comportamento não-monotônico dos índices com respeito ao pH medido no seio da solução.

Considerando os três critérios de avaliação da síntese, temos que para o éster isopropílico o melhor ensaio de síntese foi o realizado em pH 6,0 com alginato-PGA-agarose 6BCL (ensaio 16). A Figura 31 apresenta o perfil de concentração de reagentes e produtos na mistura reacional heterogênea e a composição dos produtos em solução para este ensaio com desvios-padrão de triplicatas.

Tabela 11 – Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizando como catalisador agarose ME 10% (m/m). Excesso de 6-APA

			Agarose 10% (m/m)		
Éster	pH	n°	S	R (%)	P (mmol/UI/min)
Metílico	6,0	1	$1,7 \pm 7 \times 10^{-1}$	$38,5 \pm 4^*$ $63,8 \pm 7^{**}$	$9,2 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-5}$
	6,2	2	$2,6 \pm 6 \times 10^{-1}$	$46,7 \pm 5^*$ $68,9 \pm 2^{**}$	$1,1 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
	6,5	3	$1,6 \pm 2 \times 10^{-1}$	$51,9 \pm 5^*$ $64,1 \pm 4^{**}$	$1,3 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
Etilico	6,0	4	$2,5 \pm 3 \times 10^{-1}$	$23,8 \pm 2^*$ $65,9 \pm 2^{**}$	$5,7 \times 10^{-5} \pm 6 \times 10^{-6}$
	6,2	5	$2,5 \pm 2 \times 10^{-1}$	$24,6 \pm 1^*$ $63,8 \pm 4^{**}$	$5,9 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$
	6,5	6	$1,6 \pm 5 \times 10^{-1}$	$20,3 \pm 2^*$ $57,5 \pm 5^{**}$	$4,9 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-6}$
Isopropílico	6,0	7	$2,5 \pm 2 \times 10^{-1}$	$27,7 \pm 3^*$ $64,2 \pm 2^{**}$	$6,6 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$
	6,2	8	$2,3 \pm 3 \times 10^{-1}$	$25,0 \pm 3^*$ $63,0 \pm 6^{**}$	$6,2 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$
	6,5	9	$1,8 \pm 2 \times 10^{-2}$	$36,5 \pm 3^*$ $59,0 \pm 2^{**}$	$4,4 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-6}$

Meio heterogêneo com precipitação de Ampicilina e D(-)-FG. Concentrações iniciais: 6-APA 300 mM Éster 150 mM com germinação de Ampicilina e D(-)-FG, 60 mM. Valores calculados no tempo de máxima seletividade, rendimento e produtividade, 25 minutos. (S) Seletividade: Ampicilina sintetizada / D-FG produzida; \*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster inicial (%); \*\*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster consumido por BM (%); (P) Produtividade: Ampicilina sintetizada (mmol)/ UI/min; Volume: 20 mL; Catalisador: 2 g 250 UI/g) OBS: Valores de (P) e (R) globais são calculados utilizando os valores nominais de concentração inicial. (S) é a seletividade instantânea, igual à razão das velocidades de reação obtidas pelas derivadas das curvas de concentração *versus* tempo, excluindo t(0) nominal e n° = número do ensaio.

Tabela 12 – Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL. Excesso de 6-APA

Alginato-PGA-agarose 6BCL					
Éster	pH	N	S	R (%)	P (mmol/UI/min)
Metílico	6,0	10	$1,7 \pm 2 \times 10^{-2}$	$20,8 \pm 1^*$ $62,7 \pm 2^*$	$7,0 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-6}$
	6,2	11	$2,1 \pm 2 \times 10^{-1}$	$27,9 \pm 3^*$ $62,5 \pm 3^{**}$	$9,3 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$
	6,5	12	$1,8 \pm 3 \times 10^{-1}$	$35,7 \pm 4^*$ $61,2 \pm 2^{**}$	$1,2 \times 10^{-4} \pm 8,0 \times 10^{-6}$
Etilico	6,0	13	$1,9 \pm 2 \times 10^{-2}$	$13,9 \pm 1 \times 10^{-1*}$ $68,2 \pm 1^{**}$	$5,6 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-7}$
	6,2	14	$2,0 \pm 2 \times 10^{-1}$	$19,9 \pm 2^*$ $62,1 \pm 1^{**}$	$8,0 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$
	6,5	15	$1,8 \pm 3 \times 10^{-1}$	$21,6 \pm 2^*$ $54,1 \pm 2 \times 10^{-1**}$	$8,6 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-5}$
Isopropílico	6,0	16	$2,5 \pm 3 \times 10^{-1}$	$15,8 \pm 1^*$ $56,1 \pm 5^{**}$	$6,9 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$
	6,2	17	$1,6 \pm 1 \times 10^{-1}$	$17,0 \pm 2^*$ $53,8 \pm 1^{**}$	$6,8 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$
	6,5	18	$1,5 \pm 3 \times 10^{-1}$	$9,2 \pm 8 \times 10^{-2*}$ $41,3 \pm 4 \times 10^{-1**}$	$3,7 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-7}$

Meio heterogêneo com precipitação de Ampicilina e D(-)-FG. Concentrações iniciais: 6-APA 300 mM Éster 150 mM com germinação de Ampicilina e D(-)-FG, 60 mM. Valores calculados no tempo de máxima seletividade, rendimento e produtividade, 25 minutos. (S) Seletividade: Ampicilina sintetizada / D-FG produzida; \*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster inicial (%); \*\*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster consumido por BM (%); (P) Produtividade: Ampicilina sintetizada (mmol)/ UI/min; Volume: 20 mL; Catalisador: 2 g (150 UI/g). OBS: Valores de (P) e (R) globais são calculados utilizando os valores nominais de concentração inicial. (S) é a seletividade instantânea, igual s à razão das velocidades de reação obtidas pelas derivadas das curvas de concentração *versus* tempo, excluindo t(0) nominal e n° = número do ensaio.

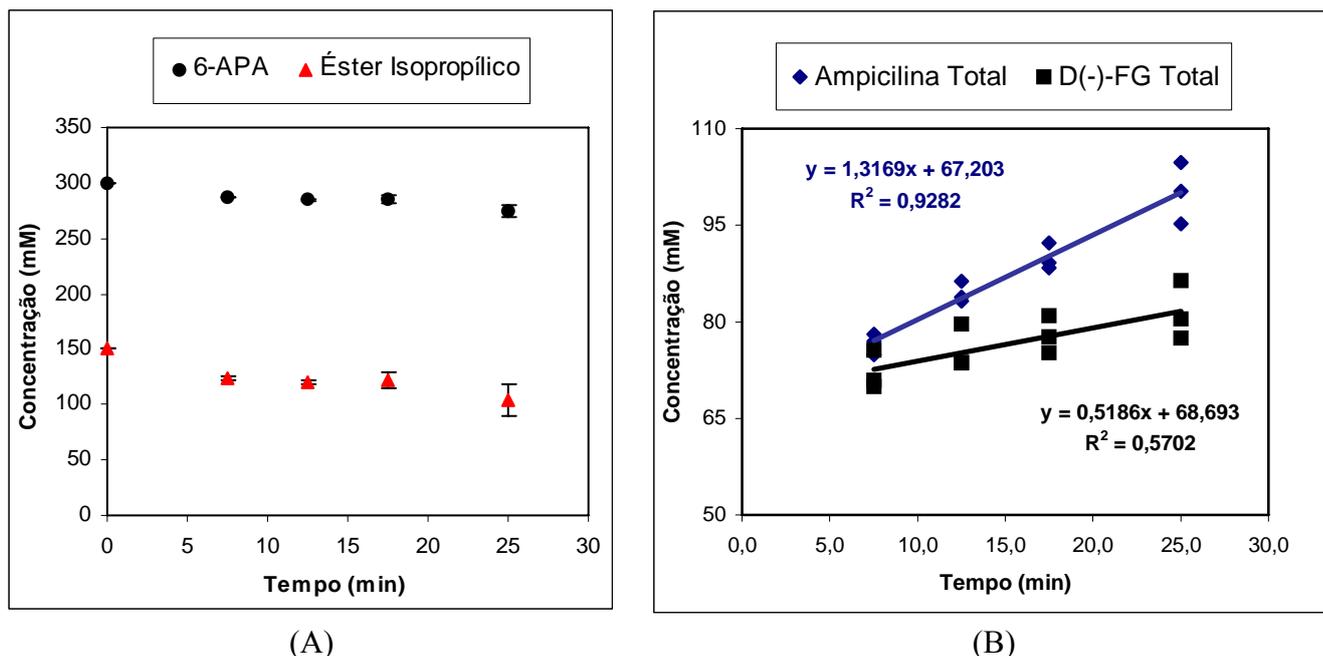


Figura 31 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0.  $C_{\text{inicial}}$ : 6-APA 300 mM, éster isopropílico 150 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução (cristais + solúveis).

Avaliando os dados obtidos verificou-se, para ambos os catalisadores, que um valor de máxima produtividade foi alcançado em pH 6,2 voltando a diminuir em pH 6,0 com exceção apenas do éster isopropílico, para o qual não se nota variação de produtividade ao se variar o pH de 6,2 para 6,0 com os diferentes catalisadores (ensaios 7-8 e 16-17). Máxima produtividade foi alcançada quando a síntese de ampicilina foi realizada com éster metílico, em pH 6,5 (ensaios 3 –  $1,3 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$  e 12 -  $1,2 \times 10^{-4} \pm 6 \times 10^{-6}$ ), porém a seletividade caiu a 1,6 e 1,8. O melhor resultado de S e P para o éster metílico foi obtido realizando a síntese em pH 6,2 com agarose ME 10% (m/m) - ensaio 2. A Figura 32 apresenta o perfil de concentração de reagentes e produtos na mistura reacional heterogênea e a composição dos produtos em solução para o ensaio 2, com desvios-padrão de triplicatas.

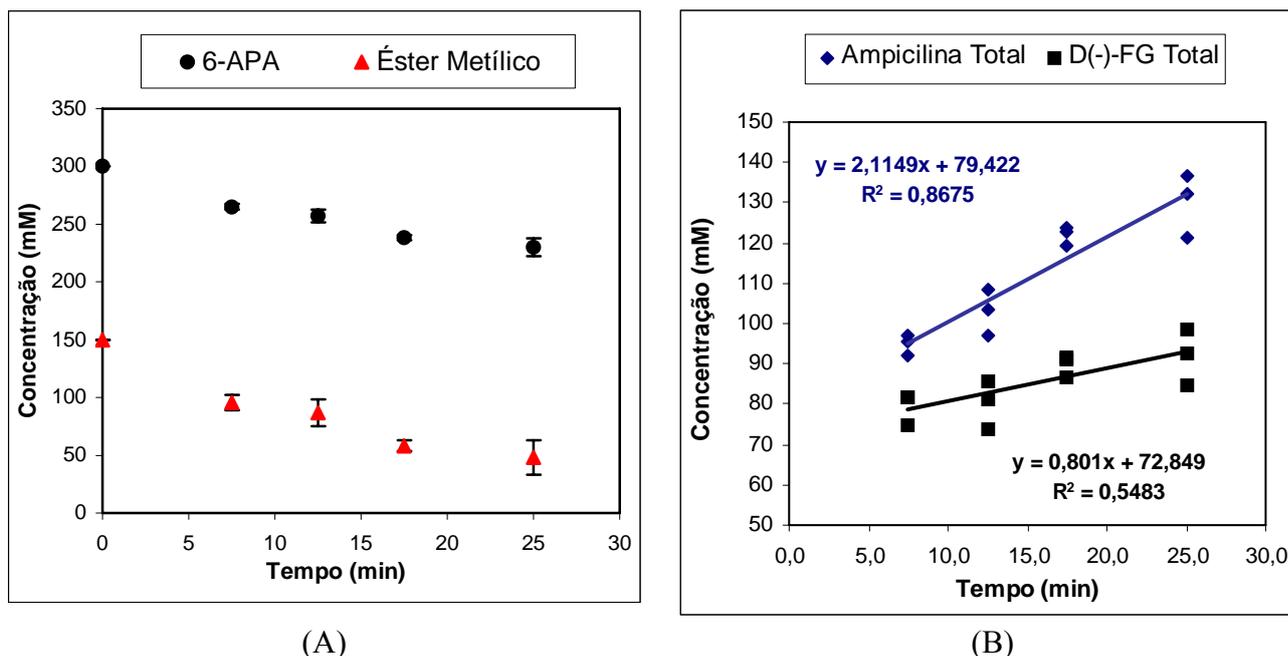


Figura 32 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. Cínicial: 6-APA 300 mM, éster metílico 150 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução (cristais + solúveis).

Para o éster etílico, pH 6,2 com alginato-PGA-agarose 6BCL, obteve-se a segunda maior produtividade (ensaio 14 –  $8,0 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$ ), com seletividade  $2,0 \pm 2 \times 10^{-1}$  e rendimento 62% (valores iguais aos obtidos com o éter metílico). A Figura 33 apresenta o perfil de concentração de reagentes e produtos na mistura reacional heterogênea e a composição dos produtos em solução para o ensaio 14 com desvios-padrão em triplicata.

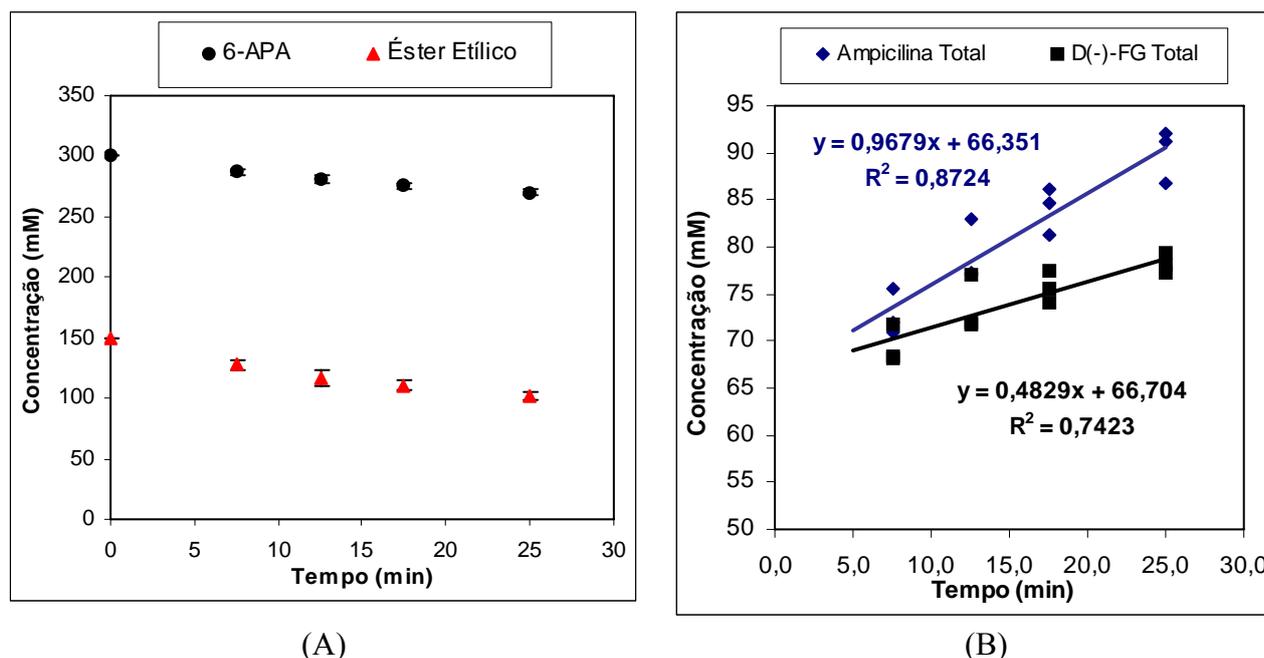


Figura 33 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. C inicial: 6-APA 300 mM, éster etílico 150 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução (cristais + solúveis).

Outro critério avaliado foi o rendimento da reação. O valor máximo obtido, bem próximo do rendimento máximo obtido com éster metílico, foi de 66% realizando a síntese de ampicilina em pH 6,0, éster etílico com agarose 10% (m/m) - ensaio 4. Nesse caso a seletividade da reação também foi favorecida ( $2,5 \pm 3 \times 10^{-1}$ ), porém houve uma queda no valor de produtividade de 1,4 vezes quando comparado com a reação com o éster etílico, pH 6,2, alginato-PGA-agarose 6BCL (ensaio 14), onde o rendimento foi de aproximadamente 62% (muito próximo do obtido para o éster etílico, pH 6,0, agarose 10% (m/m) – ensaio 4).

Avaliando de forma global seletividade, rendimento e produtividade conclui-se que uma estratégia promissora seria realizar a síntese utilizando éster etílico, catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL em pH 6,2. Mais uma vez vale lembrar que o éster etílico tem por base uma rota com etanol como insumo, o que representa uma vantagem adicional do ponto de vista da “química verde” com relação à rota baseada no éster metílico.

Os resultados de solubilidade apresentados por Youshko *et al.*, 2000, mostram que a 25°C e na faixa de pH utilizada neste trabalho (6,0-6,5), a solubilidade da D(-)-FG é

maior que a da ampicilina. Conforme apresentado na Figura 34 verifica-se que os dados de solubilidade obtidos para D(-)-FG e ampicilina variaram de acordo com o doador acil utilizado. A solubilidade da ampicilina torna-se maior que a da D(-)-FG com o decorrer da reação para os ésteres metílico e etílico.

Outra informação que podemos obter a partir da Figura 34 é o fato da solubilidade tanto da D(-)-FG quanto da ampicilina aumentarem com o consumo dos ésteres e do 6-APA. Esses dados não estão de acordo com o apresentado por Youshko *et al.*, 2000, cuja solubilidade da ampicilina decresce com a diminuição da concentração de éster metílico, porém na ausência de 6-APA e em solução aquosa, enquanto que a solubilidade da D(-)-FG permanece constante. Segundo Takano *et al.*, 2002, a 25°C a solubilidade da ampicilina aumentou com a adição de cloreto de potássio no meio. Como o sistema reacional aqui estudado trata-se de uma solução multicomponente, uma série de fatores pode influenciar nesse aumento de solubilidade da ampicilina e D(-)-FG, dentre eles estão: o aumento da força iônica do meio devido a adição de NaOH durante o curso da reação para ajuste de pH e a presença de diferentes moléculas.

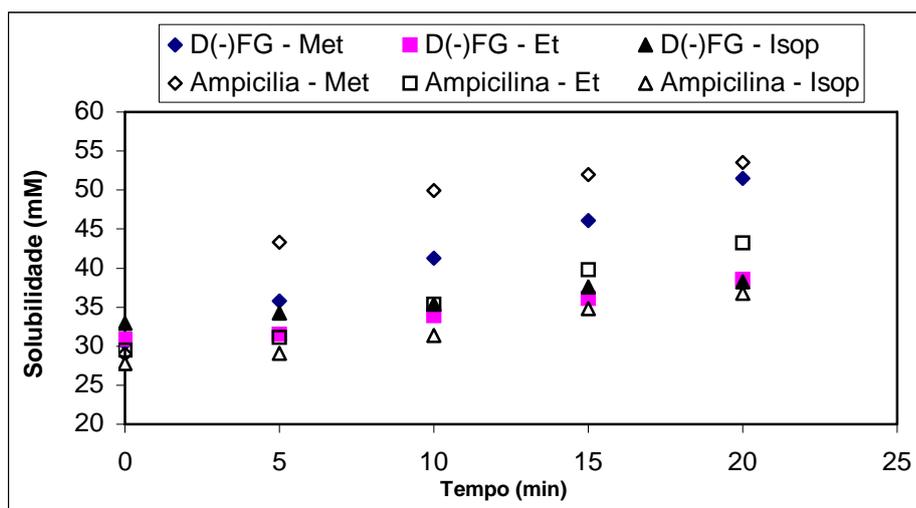


Figura 34 – Solubilidade de D(-) FG e ampicilina durante a reação de síntese realizada com os diferentes ésteres. Ensaio 11, 14 e 16 (excesso de 6-APA).

---

Após cada ensaio de velocidade inicial, biocatalisador foi peneirado e lavado. Como as partículas possuíam diâmetro maior que 1,0 mm foi possível realizar uma análise visual para identificar e separar possíveis partículas rompidas.

Comparando os dois biocatalisadores verificou-se que as partículas de alginato-PGA-agarose 6BCL possuíam resistência mecânica superior as partículas de agarose 10% (m/m). Mesmo com uma menor resistência mecânica, pôde-se notar que a maioria das partículas de agarose 10% (m/m) estavam intactas, então as partículas rompidas foram separadas por peneiramento e pinça e as inteiras foram reutilizadas.

A análise da estrutura dos dois biocatalisadores foi realizada no Laboratório de Caracterização e Estrutura do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As Figuras 35 e 36 apresentam as micrografias das partículas de agarose 10% (m/m) antes e após ensaio de síntese.

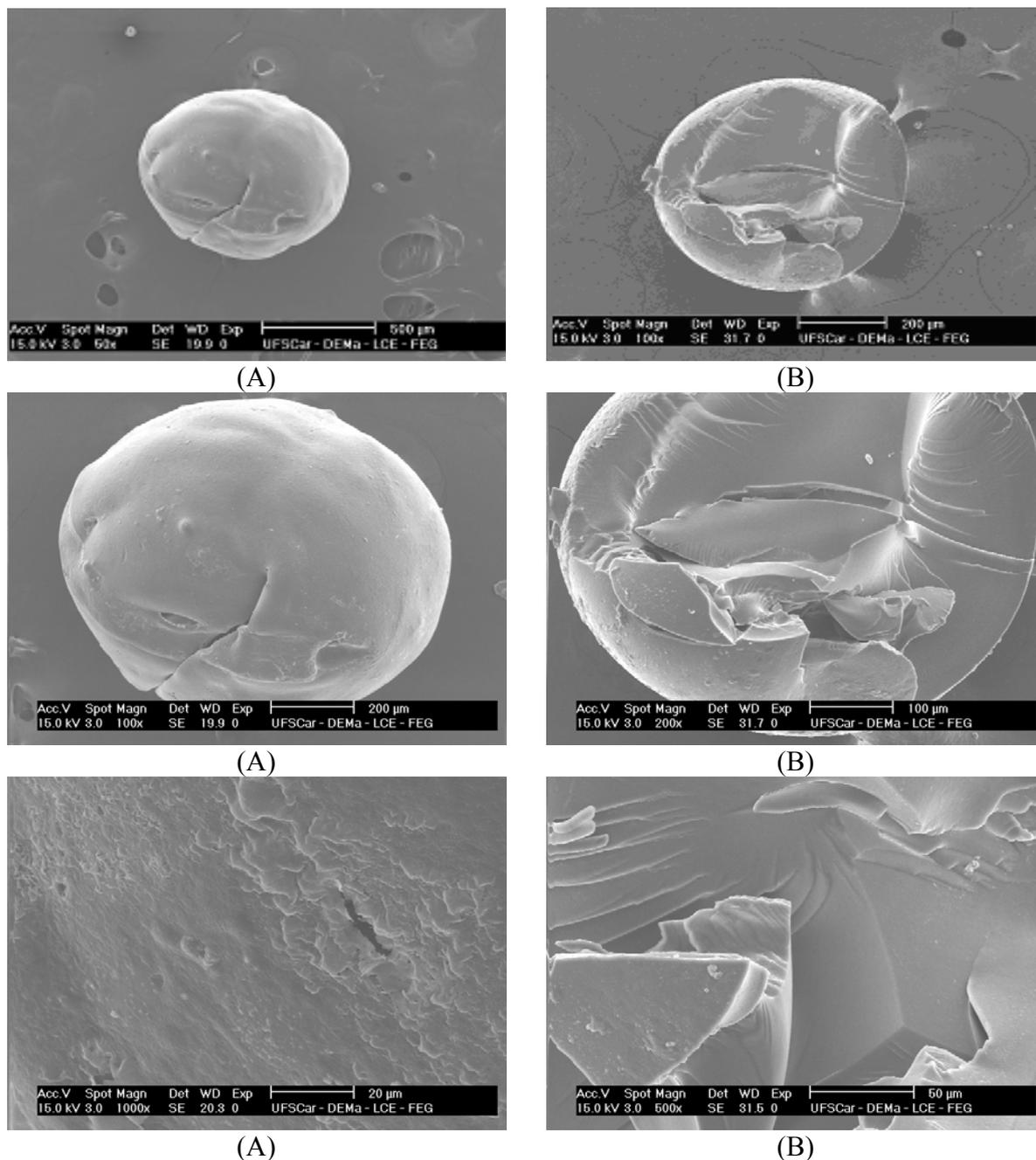


Figura 35 - Micrografia da partícula de agarose 10% (m/m) antes da síntese. (A) partícula inteira, (B) corte da partícula.

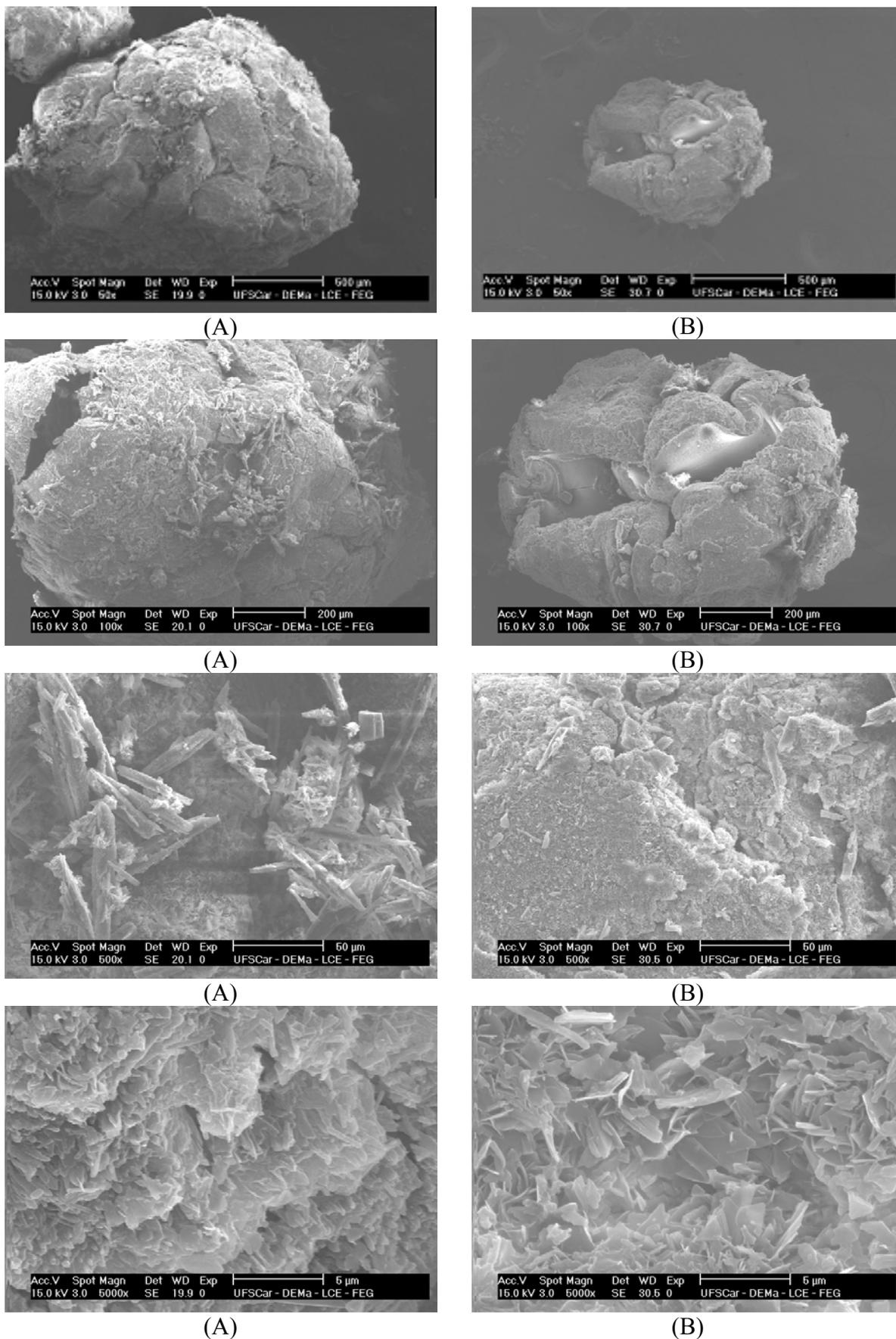


Figura 36 - Micrografia da partícula de agarose 10% (m/m) após a síntese. (A) partícula inteira, (B) corte da partícula

Após as reações de síntese foi verificado que uma parte dos cristais formados permanecia no interior dos biocatalisadores. Essa presença de cristais no suporte já havia sido verificada anteriormente por Ferreira, 2004. A retirada desses cristais foi realizada mantendo os biocatalisadores sob agitação, em água no caso da agarose 10% (m/m) e cloreto de cálcio 0,5 M no caso do alginato-PGA-agarose 6BCL. Após o procedimento de lavagem, nenhum cristal foi observado no interior do biocatalisador alginato-PGA-agarose 6BCL (Figura 41).

As Figuras 37 a 42 apresentam as micrografias das partículas de alginato-PGA-agarose 6BCL antes da síntese e depois da síntese sem procedimento de lavagem e com procedimento de lavagem. As demais imagens de MEV são apresentadas no Apêndice B e C.

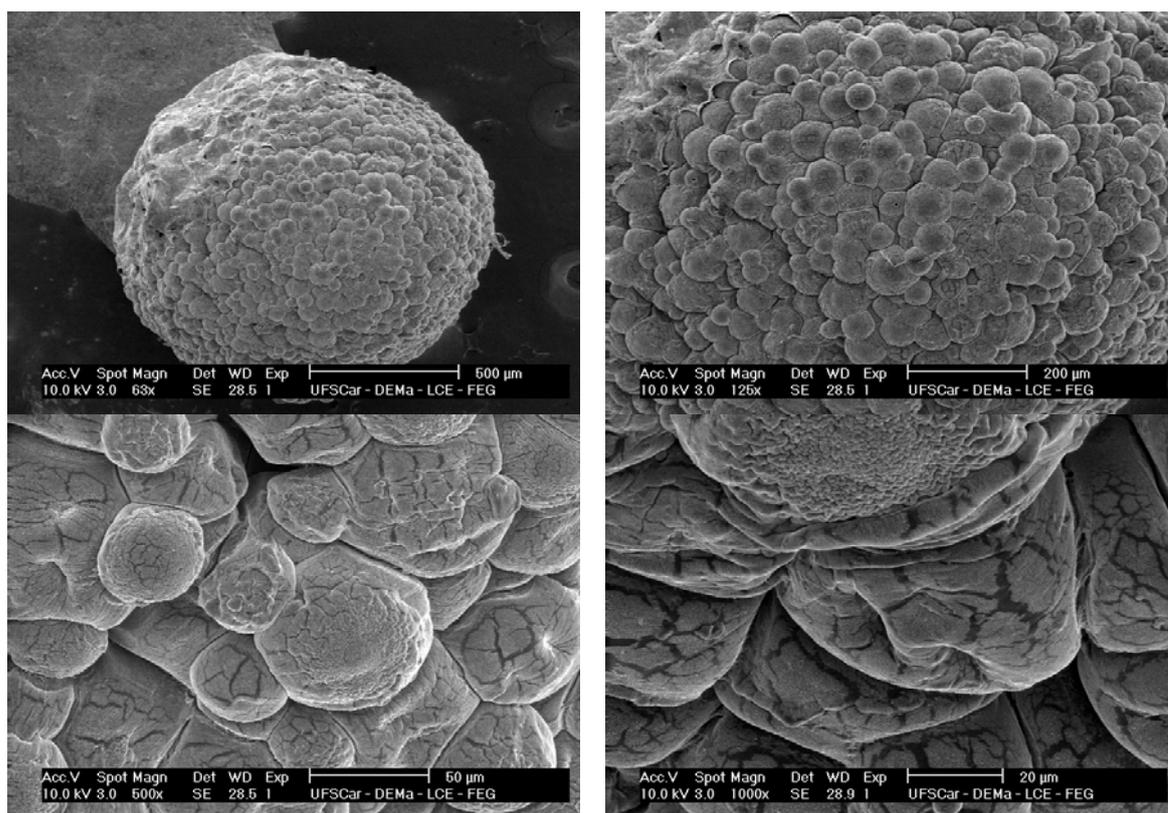


Figura 37 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL antes da síntese. Partícula inteira.

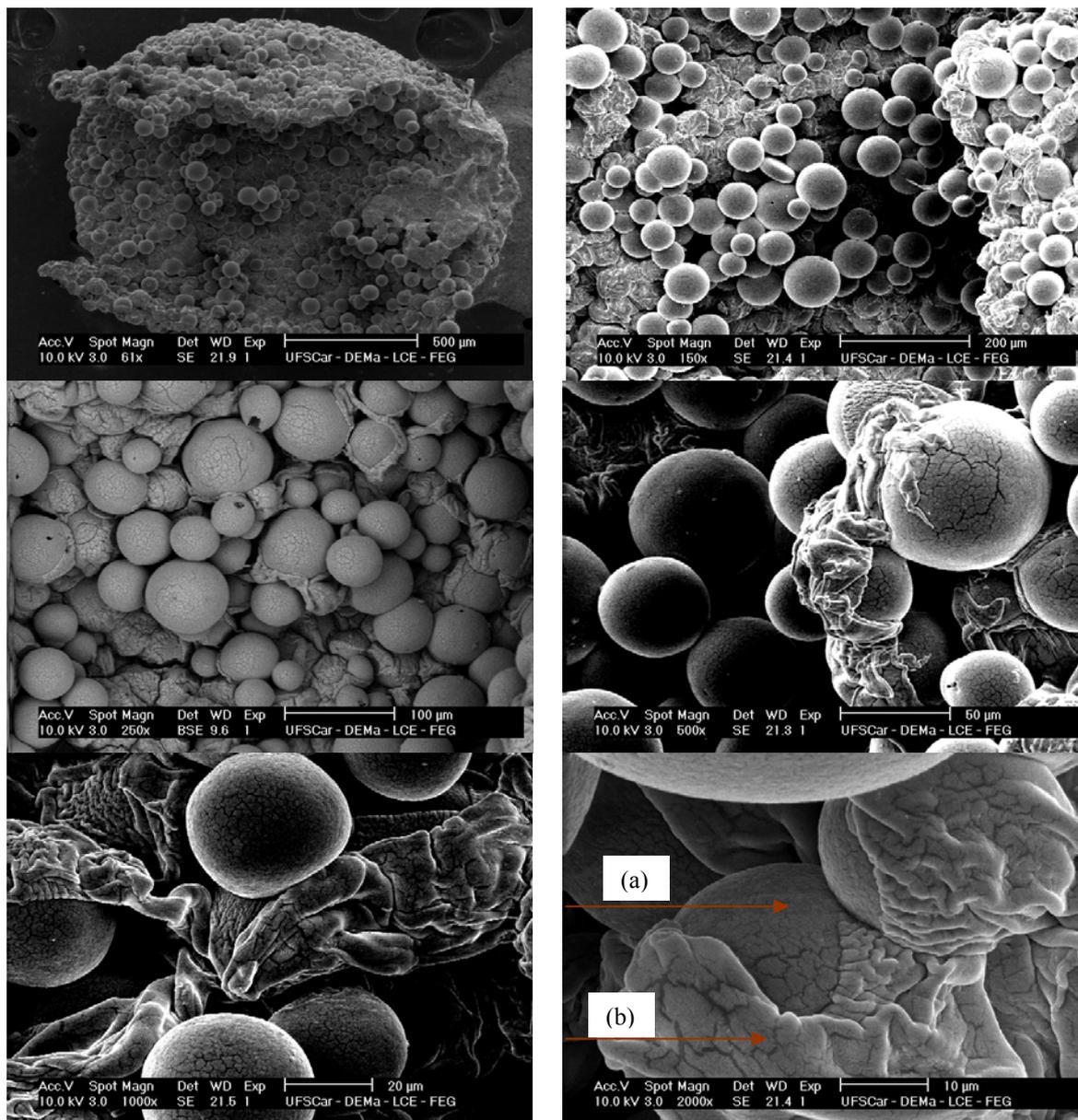


Figura 38 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL antes da síntese. Corte da partícula. (a) agarose 6BCL e (b) gel de alginato.

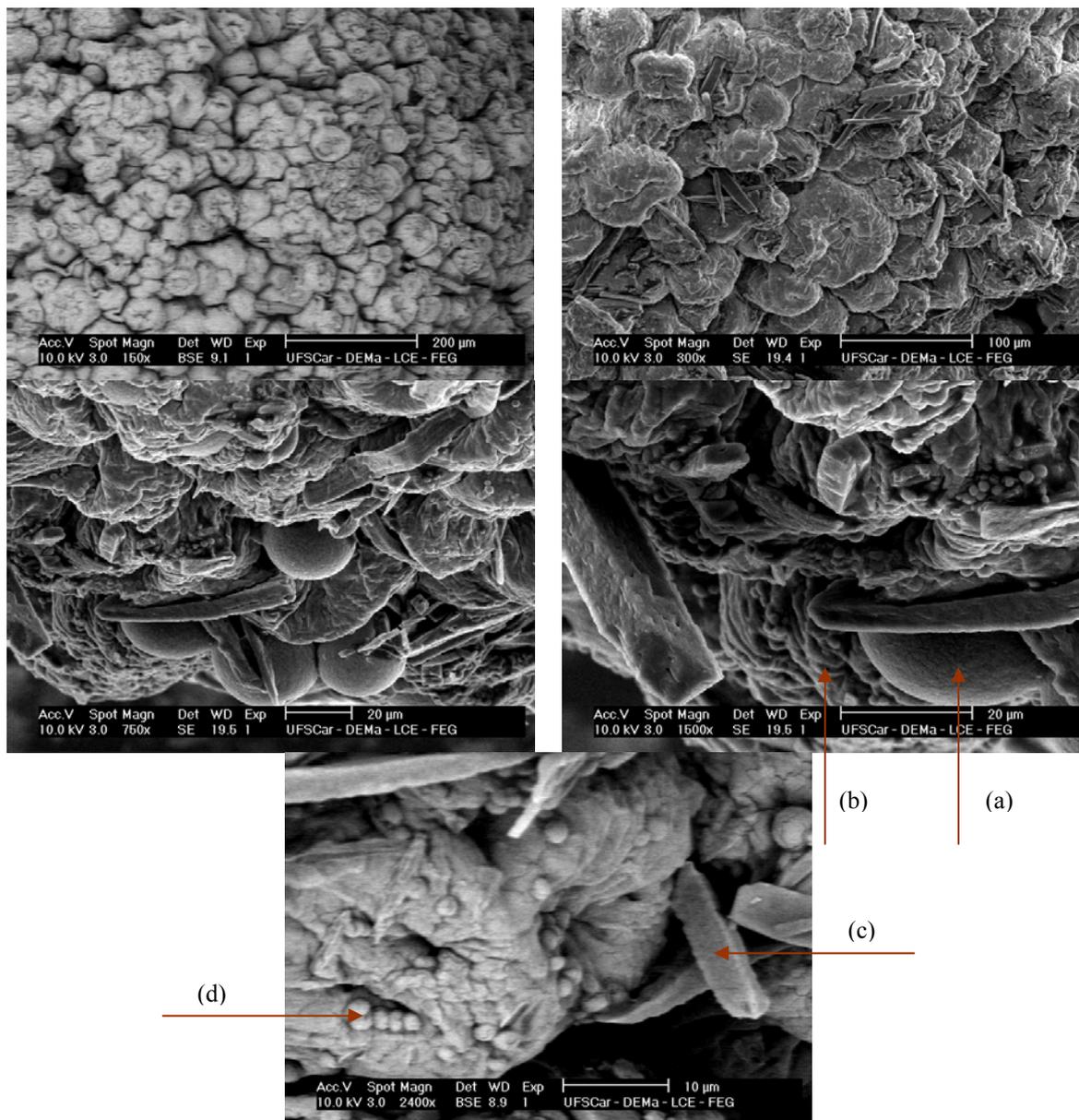


Figura 39 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após a síntese, sem lavagem. Partícula inteira. (a) agarose 6BCL, (b) gel de alginato, (c) e (d) cristais.

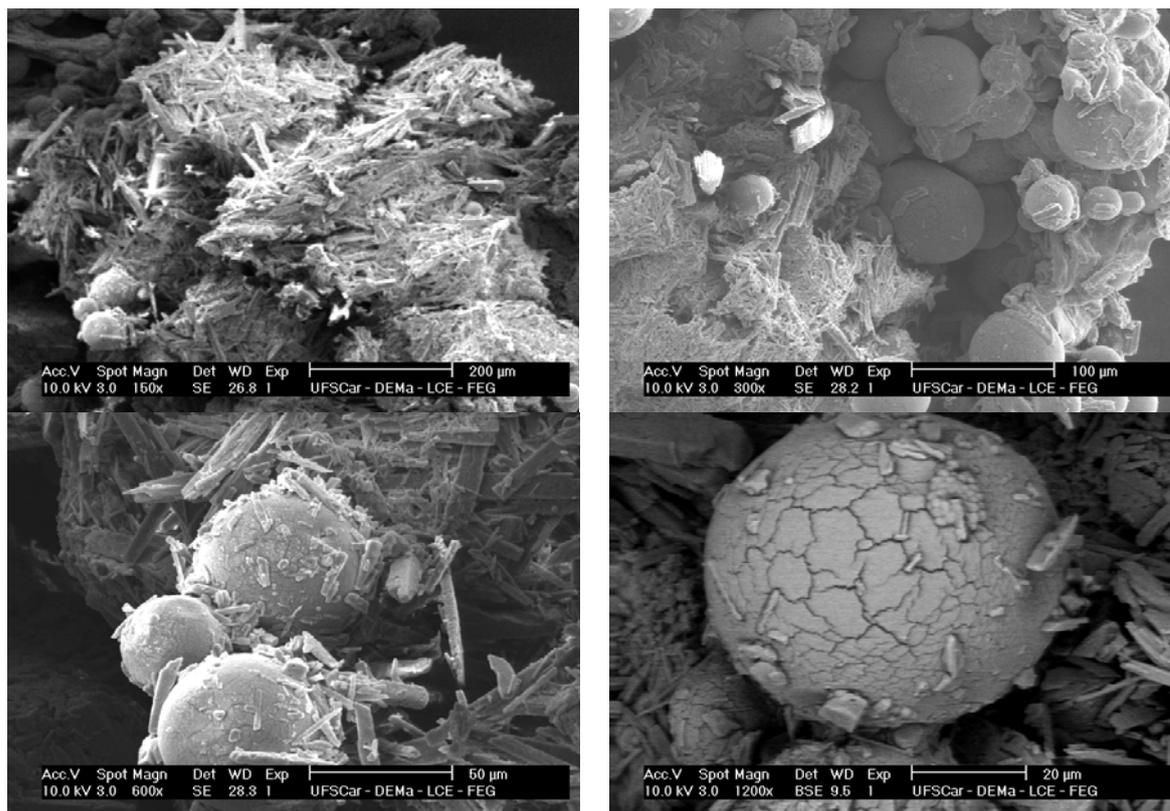


Figura 40 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após a síntese, sem lavagem. Corte da partícula.

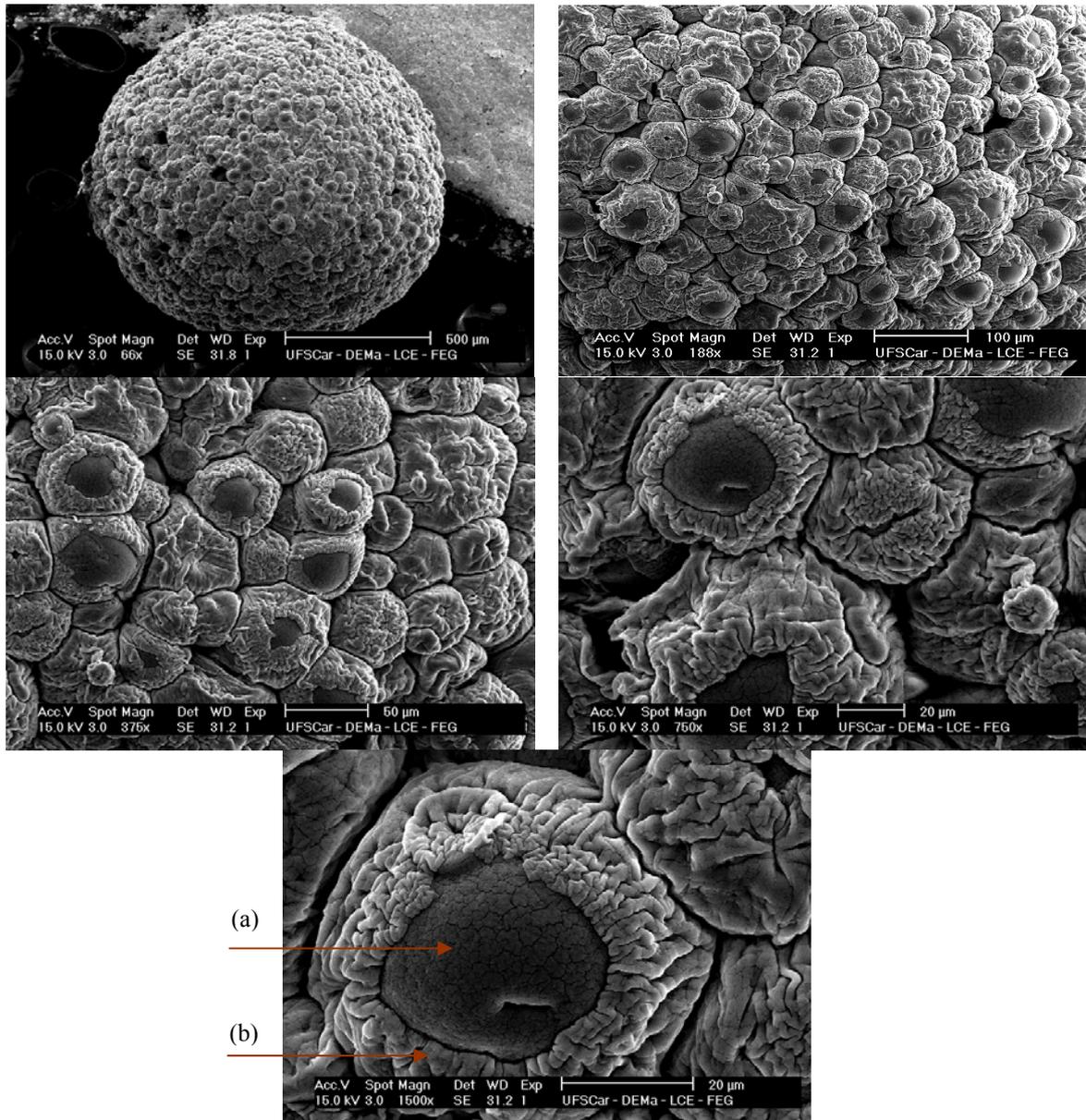


Figura 41 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após síntese, com lavagem. Partícula inteira. (a) agarose 6BCL e (b) gel de alginato.

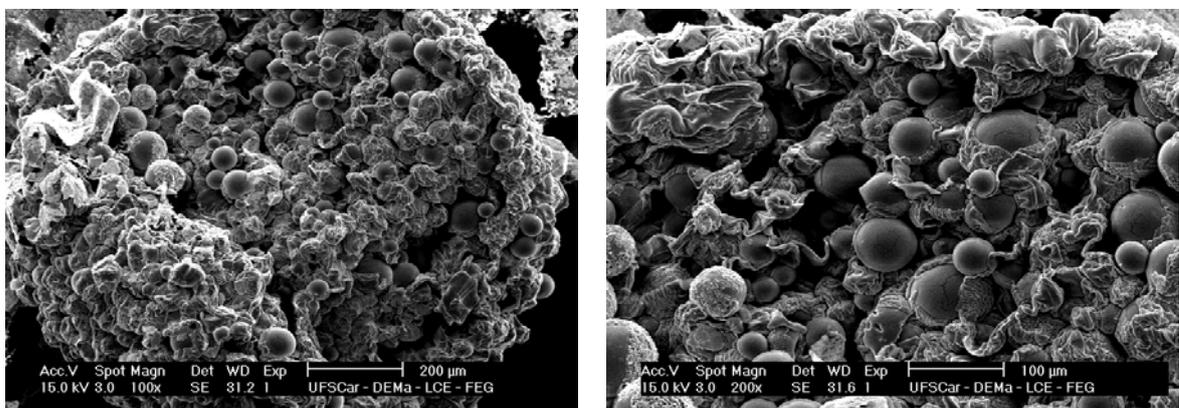


Figura 42 - Micrografia da partícula de alginato-PGA-agarose 6BCL após a síntese, com lavagem. Corte da partícula.

---

Após cada conjunto de ensaios, ou seja, finalizado o estudo de pH para cada éster com a agarose 10% (m/m), a atividade deste biocatalisador após lavagem foi medida pelo método PDAB e nenhuma desativação foi verificada. A atividade do biocatalisador alginato-PGA-agarose 6BCL não pôde ser verificada, pois como já mencionado a presença de fosfato provoca afastamento das cadeias poliméricas do gel de alginato de cálcio desestabilizando-o.

Como uma tentativa para medir a atividade da agarose 6BCL, a partícula de alginato foi posta em contato com tampão fosfato para retirar a agarose que estava aprisionada, porém a atividade aparente medida foi em torno de 50% menor quando comparada com as mesmas partículas antes do co-envolvimento. Essa redução de atividade pode ser atribuída a dificuldade de remover o alginato de cálcio presente nos poros dessa partícula. O procedimento de imobilização fornece a enzima uma estabilização de 10.000 vezes (Mateo *et al.*, 2000), portanto não é esperado que ocorra desativação do catalisador nas condições da síntese (25°C e pH 6,0-6,5). Considerando também que não houve desativação no catalisador agarose 10% (m/m) e que o co-envolvimento com gel de alginato é apenas um aprisionamento físico e, portanto não altera as propriedades da enzima, considera-se que também não houve desativação do catalisador PGA-agarose 6BCL.

Finalizados os estudos de pH, natureza do substrato e catalisadores com excesso de 6-APA, avaliou-se também a síntese de ampicilina, nas mesmas condições experimentais, para excesso de éster. As Tabelas 13 e 14 mostram os resultados obtidos para: rendimento (R), seletividade (S) e produtividade (P) do processo.

Tabela 13 – Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizando como catalisador agarose ME 10% (m/m). Excesso de Éster.

Éster	pH	n°	Agarose 10% (m/m)		
			S	R (%)	P (mmol/UI/min)
Metílico	6,0	19	$1,3 \pm 6 \times 10^{-2}$	$62,0 \pm 1^*$ $57,8 \pm 4 \times 10^{-1}^{**}$	$1,5 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-6}$
	6,2	20	$1,1 \pm 2 \times 10^{-2}$	$67,5 \pm 7^*$ $55,5 \pm 3^{**}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-5}$
	6,5	21	$0,7 \pm 1 \times 10^{-1}$	$65,4 \pm 2^*$ $46,3 \pm 5^{**}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 6 \times 10^{-6}$
Etilico	6,0	22	$1,1 \pm 2 \times 10^{-2}$	$66,7 \pm 4^*$ $54,9 \pm 5 \times 10^{-1}^{**}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 9 \times 10^{-6}$
	6,2	23	$0,9 \pm 2 \times 10^{-1}$	$65,2 \pm 2^*$ $50,8 \pm 1^{**}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 8 \times 10^{-6}$
	6,5	24	$0,7 \pm 1 \times 10^{-1}$	$66,1 \pm 8^*$ $44,5 \pm 1^{**}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-5}$
Isopropílico	6,0	25	$1,1 \pm 9 \times 10^{-2}$	$61,1 \pm 7^*$ $54,1 \pm 1^{**}$	$1,5 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-5}$
	6,2	26	$0,8 \pm 9 \times 10^{-2}$	$67,5 \pm 4^*$ $49,3 \pm 1^{**}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
	6,5	27	$0,6 \pm 8 \times 10^{-2}$	$90,9 \pm 1^*$ $43,4 \pm 1^{**}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$

Meio heterogêneo com precipitação de Ampicilina e D(-)-FG. Concentrações iniciais: 6-APA 150 mM Éster 300 mM com germinação de Ampicilina e D(-)-FG, 60 mM. Valores calculados no tempo de máxima seletividade, rendimento e produtividade, 25 minutos. (S) Seletividade: Ampicilina sintetizada / D-FG produzida; \*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / 6-APA inicial (%); \*\*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster consumido por BM (%); (P) Produtividade: Ampicilina sintetizada (mmol)/ UI/min; Volume: 20 mL; Catalisador: 2 g (250 UI/g). OBS: Valores de (P) e (R) globais são calculados utilizando os valores nominais de concentração inicial. (S) é a seletividade instantânea, igual à razão das velocidades de reação obtidas pelas derivadas das curvas de concentração *versus* tempo, excluindo t(0) nominal e n° = número do ensaio.

Tabela 14 – Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com os diferentes ésteres e pH utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL. Excesso de Éster.

Éster	pH	n°	Alginato-PGA-agarose 6BCL		
			S	R (%)	P (mmol/UI/min)
Metílico	6,0	28	$1,3 \pm 2 \times 10^{-1}$	$25,9 \pm 2^*$ $46,1 \pm 9 \times 10^{-1}$ **	$1,0 \times 10^{-4} \pm 7 \times 10^{-6}$
	6,2	29	$1,2 \pm 1 \times 10^{-1}$	$31,2 \pm 3^*$ $46,7 \pm 3^{**}$	$1,2 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
	6,5	30	$1,0 \pm 2 \times 10^{-1}$	$34,3 \pm 5^*$ $38,5 \pm 4^{**}$	$1,4 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-5}$
Etilico	6,0	31	$1,2 \pm 1 \times 10^{-1}$	$24,4 \pm 2^*$ $49,4 \pm 1^{**}$	$9,8 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$
	6,2	32	$1,1 \pm 6 \times 10^{-2}$	$26,5 \pm 3^*$ $45,8 \pm 3 \times 10^{-1**}$	$1,0 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
	6,5	33	$0,9 \pm 3 \times 10^{-2}$	$14,2 \pm 2^*$ $34,9 \pm 2^{**}$	$5,6 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-6}$
Isopropílico	6,0	34	$1,3 \pm 2 \times 10^{-1}$	$24,4 \pm 2^*$ $54,7 \pm 1^{**}$	$9,8 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-6}$
	6,2	35	$1,2 \pm 1 \times 10^{-1}$	$88,5 \pm 2^*$ $51,8 \pm 1^{**}$	$1,1 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
	6,5	36	$1,0 \pm 3 \times 10^{-2}$	$33,0 \pm 2^*$ $44,7 \pm 2^{**}$	$1,3 \times 10^{-4} \pm 9 \times 10^{-6}$

Meio heterogêneo com precipitação de Ampicilina e D(-)-FG. Concentrações iniciais: 6-APA 150 mM Éster 300 mM com germinação de Ampicilina e D(-)-FG, 60 mM. Valores calculados no tempo de máxima seletividade, rendimento e produtividade, 25 minutos. (S) Seletividade: Ampicilina sintetizada / D-FG produzida; \*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / 6-APA inicial (%); \*\*(R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster consumido por BM (%); (P) Produtividade: Ampicilina sintetizada (mmol)/ UI/min; Volume: 20 mL; Catalisador: 2 g (150 UI/g). OBS: Valores de (P) e (R) globais são calculados utilizando os valores nominais de concentração inicial. (S) é a seletividade instantânea, igual à razão das velocidades de reação obtidas pelas derivadas das curvas de concentração *versus* tempo, excluindo t(0) nominal e n° = número do ensaio.

Comparando os dados apresentados nas Tabelas 11 e 12 com os dados das Tabelas 13 e 14, pôde ser verificado que maiores rendimentos, Ampicilina sintetizada / Éster consumido por balanço de massa (%), foram alcançados nos experimentos com excesso de 6-APA. Esse resultado já era esperado, pois uma menor concentração de éster diminui sua perda por hidrólise favorecendo o rendimento da reação.

Analisando os dados de produtividade, verifica-se que excesso de éster provoca efeito bastante significativo, ou seja, favoreceu a produtividade da reação de síntese, pois alta concentração de 6-APA atua inibindo a reação de síntese (Ribeiro, 2007).

Em sínteses cineticamente controladas a seletividade da reação é essencial, portanto utilizar excesso de éster torna-se uma alternativa pouco atrativa sob esse aspecto, pois sua hidrólise é favorecida perdendo-se assim, D-FG (que precisará ser novamente esterificada antes de ser reciclada). A dependência da seletividade com a concentração de éster foi confirmada nos experimentos de síntese realizados com excesso de éster. Os valores de seletividade, apresentados nas Tabelas 13 e 14, chegaram a diminuir até mais de duas vezes quando comparados com os valores obtidos com excesso de 6-APA (Tabelas 11 e 12).

As Figuras 43, 44 e 45 apresentam o perfil de concentração de reagentes e produtos na mistura reacional heterogênea e a composição dos produtos em solução para os ensaios 29, 32 e 34, com desvios-padrão de triplicatas.

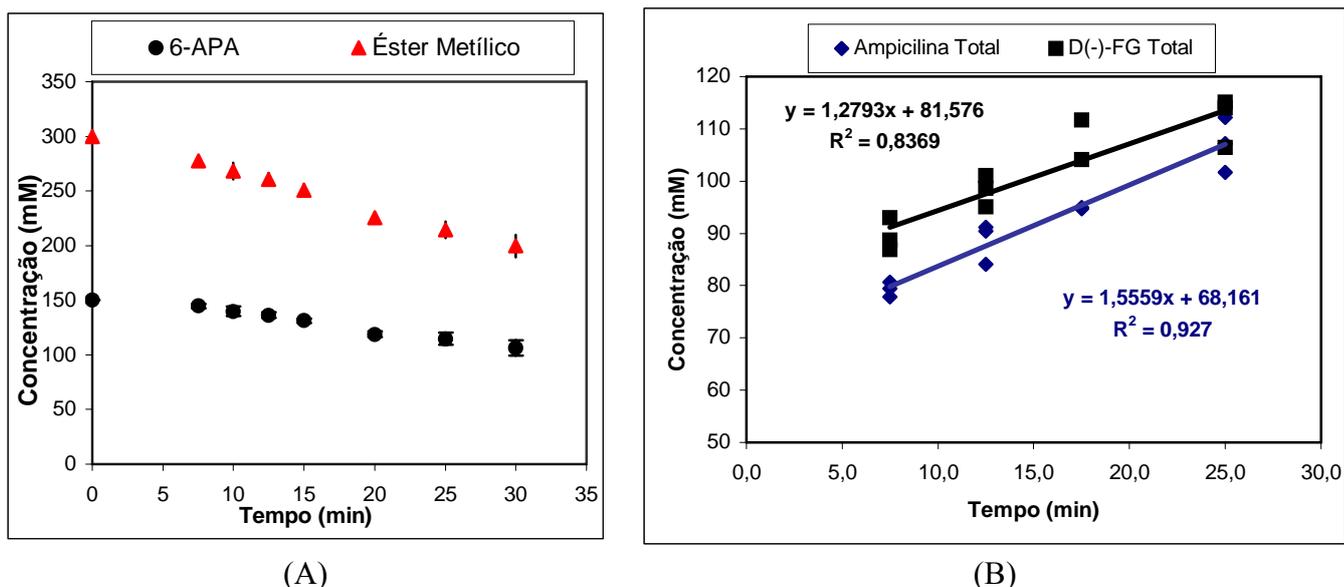


Figura 43 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. Cínicial: 6-APA 150 mM, éster metílico 300 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução.

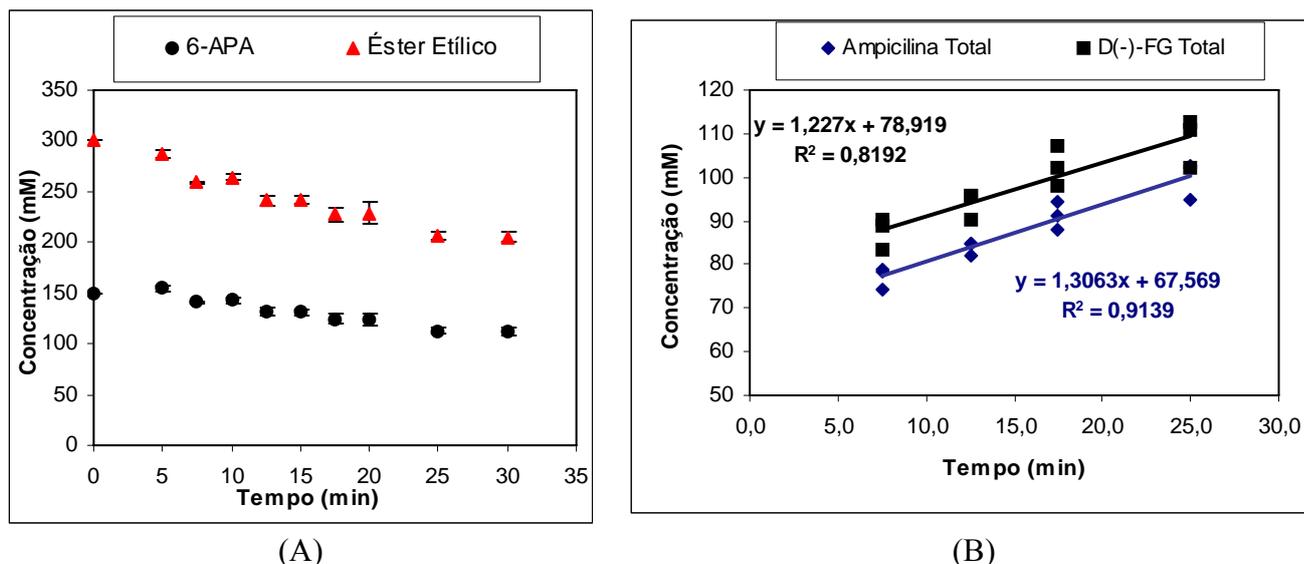


Figura 44 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,2. Cinicial: 6-APA 150 mM, éster etílico 300 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. (A) Concentração total na mistura reacional (cristais + solúveis), (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução.

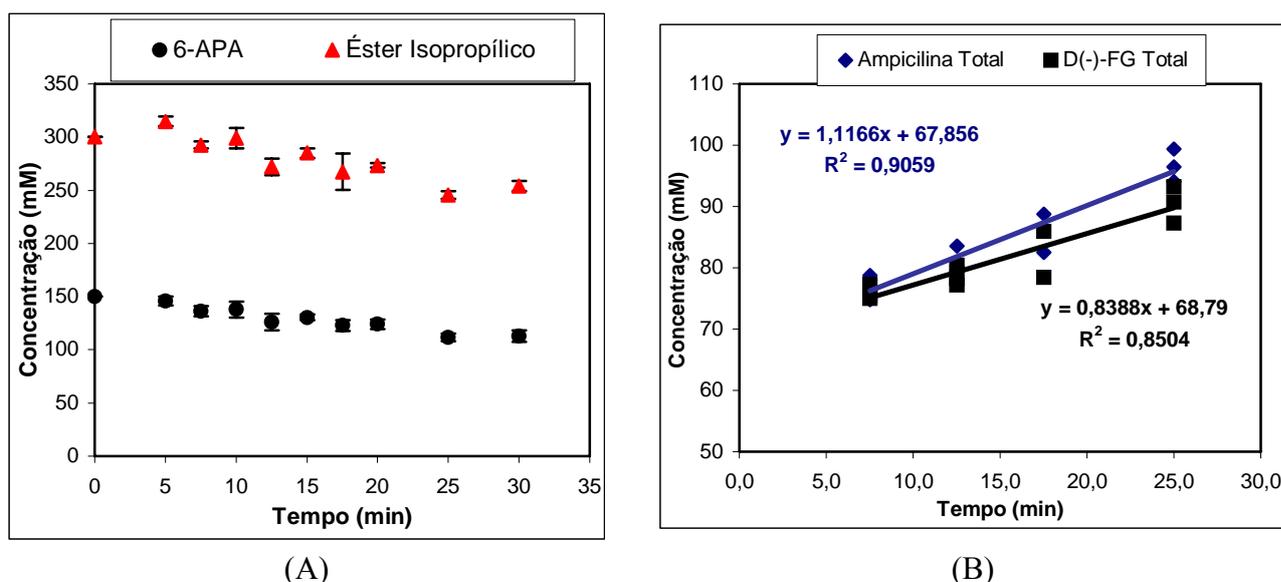


Figura 45 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. Cinicial: 6-APA 150 mM, éster isopropílico 300 mM, ampicilina 60 mM e D-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. (A) Concentração total na mistura reacional (cristais + solúveis), (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução.

A Figura 46 apresenta o perfil da curva de solubilidade da ampicilina e D(-)-FG para os ensaios 29, 32 e 34. Os resultados de solubilidade mostram que, no início da reação, para os três doadores acil, a solubilidade da D(-)-FG está bem próxima da solubilidade da ampicilina, tornando-se superior com o decorrer da reação (após 15 minutos de reação). O

gráfico mostra também que as solubilidades são mais elevadas na presença do éster metílico, seguido pelo éster etílico e por último pelo éster isopropílico.

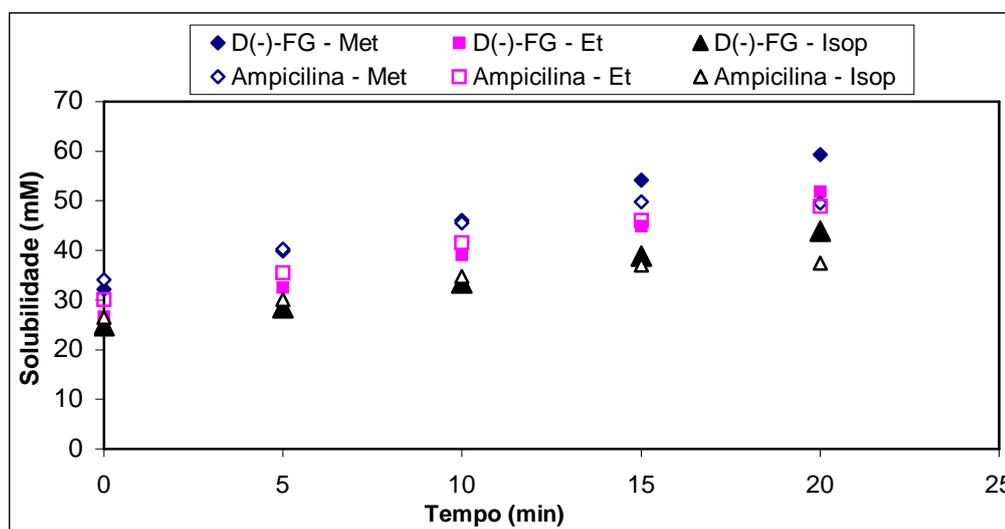


Figura 46 – Solubilidade da D(-) FG e ampicilina durante a reação de síntese realizada com os diferentes ésteres. Ensaios 29, 32 e 34 (excesso de éster).

Comparando os gráficos de solubilidade da ampicilina e D(-)-FG com excesso de 6-APA e excesso de éster, Figuras 34 e 46, verifica-se um aumento de ambas as solubilidades quando a reação de síntese foi iniciada com excesso de éster. Porém, em ambas as situações, as solubilidades da ampicilina e D(-)-FG aumentaram com o consumo de éster – e conseqüente geração de álcool.

#### 4.4.4 - PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO

O ensaio de precipitação no ponto isoelétrico teve como objetivo verificar a eficiência da seqüência de etapas para purificação do antibiótico, aplicadas a uma mistura de cristais, contendo ampicilina e fenilglicina, obtidos a partir da síntese enzimática de ampicilina, para posterior reutilização da ampicilina nas sínteses. A Tabela 15 apresenta o rendimento do processo e a grau de pureza da ampicilina obtida.

Tabela 15 - Rendimento e grau de pureza da ampicilina obtida no processo de precipitação no ponto isoelétrico a temperatura ambiente.

	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Pureza (%) ± d.p</b>
<b>Ampicilina</b>	63,3 ± 2	96 ± 1

Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados por Vieira, 2003. A

Figura 47 apresenta um cromatograma obtido em HPLC da ampicilina precipitada.

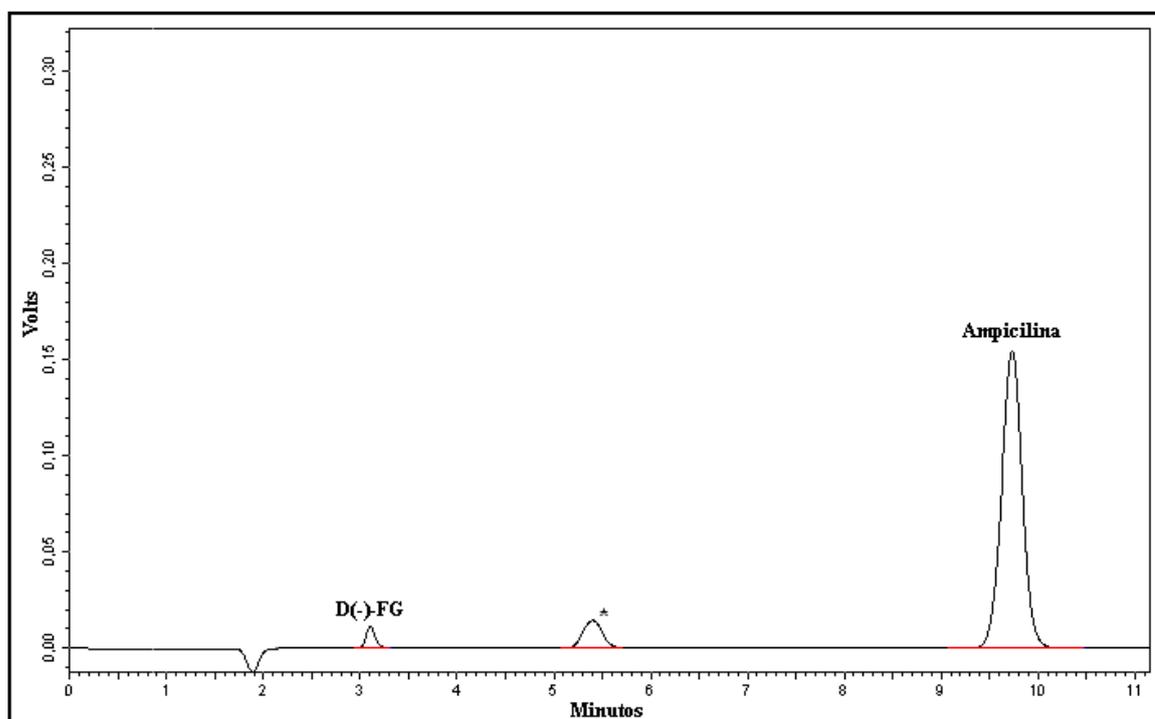


Figura 47 – Cromatograma da amostra de ampicilina purificada analisada em HPLC. \*Impureza não identificada.

#### 4.4.5 - SÍNTESE DE AMPICILINA – ESTUDO CINÉTICO

Na síntese cineticamente controlada de ampicilina diversas variáveis interferem no desempenho da síntese, porém nem todas exercem forte influência. Ferreira, 2004 estudou a síntese de ampicilina sob diferentes condições e verificou que a melhor condição operacional deve ser um compromisso entre seletividade, rendimento e produtividade.

Nessa etapa do desenvolvimento do trabalho, a síntese de ampicilina foi realizada a partir de éster etílico de D(-)-fenilglicina (50-300 mM) e de 6-APA (100-300 mM) a 25°C, pH 6,0 e 6,2. Os ensaios utilizaram Penicilina G Acilase imobilizada em agarose 6BCL co-envolvida em gel de alginato 2% (alginato-PGA-agarose 6BCL). Em alguns experimentos, ampicilina e D(-)-FG foram adicionadas no início da reação a fim de verificar um possível efeito inibitório dos produtos nas reações de síntese e hidrólise.

A Tabela 16 mostra os valores máximos de seletividade, rendimento e produtividade obtidos nas sínteses de ampicilina com éster etílico a 25°C e pH 6,0.

Tabela 16 – Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com o éster etílico e pH 6,0 utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL.

	<b>6-APA (mM)</b>	<b>Éster (mM)</b>	<b>AMP (mM)</b>	<b>D(-)-FG (mM)</b>	<b>S</b>	<b>R (%)</b>	<b>P (mmol/UI/min)</b>
1	100	50	-	-	1,7 (30')	62,3 (30')	2,1 x 10 <sup>-5</sup> (30')
2	100	150	-	-	1,3 (30')	56,1 (30')	4,2 x 10 <sup>-5</sup> (30')
3	100	150	60	60	1,1 (30')	53,3 (30')	6,9 x 10 <sup>-5</sup> (30')
					1,3 (40')	55,7 (40')	6,6 x 10 <sup>-5</sup> (40')
4	150	300	-	-	1,1 (40')	51,7 (40')	6,3 x 10 <sup>-5</sup> (40')
					1,2 (60')	54,5 (60')	5,9 x 10 <sup>-5</sup> (60')
5	200	50	-	-	3,0 (50')	74,8 (50')	1,9 x 10 <sup>-5</sup> (50')
					2,6 (70')	72,4 (70')	1,7 x 10 <sup>-5</sup> (70')
6	200	150	-	-	2,1 (40')	67,1 (40')	4,6 x 10 <sup>-5</sup> (40')
					2,0 (50')	66,9 (50')	4,5 x 10 <sup>-5</sup> (50')
7	200	150	60	60	2,1 (40')	68,0 (40')	6,1 x 10 <sup>-5</sup> (40')
					2,2 (50')	68,6 (50')	5,7 x 10 <sup>-4</sup> (50')
8	300	50	-	-	3,8 (41')	79,2 (41')	1,7 x 10 <sup>-5</sup> (41')
					3,6 (71')	78,1 (70')	1,5 x 10 <sup>-5</sup> (70')
9	300	150	-	-	2,6 (30')	72,5 (30')	4,4 x 10 <sup>-5</sup> (30')
10	300	150	60	60	2,2 (30')	68,8 (30')	5,6 x 10 <sup>-5</sup> (30')
11	300	200	-	-	1,9 (50')	65,8 (50')	4,7 x 10 <sup>-5</sup> (50')
					2,3 (100')	66,9 (100')	4,2 x 10 <sup>-5</sup> (100')
12	300	200	60	60	2,1 (40')	68,2 (40')	6,8 x 10 <sup>-5</sup> (40')
					2,4 (50')	70,5 (50')	5,9 x 10 <sup>-5</sup> (50')
					2,5 (70')	71,7 (70')	5,9 x 10 <sup>-5</sup> (70')
13	300	300	-	-	1,6 (30')	62,2 (30')	6,0 x 10 <sup>-5</sup> (30')
					2,2 (40')	69,1 (40')	6,1 x 10 <sup>-5</sup> (40')
					2,0 (50')	66,2 (50')	6,2 x 10 <sup>-5</sup> (50')
					2,0 (60')	66,5 (60')	5,9 x 10 <sup>-5</sup> (60')

(S) Seletividade: Ampicilina sintetizada / D(-)-FG produzida; (R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster consumido por BM (%); (P) Produtividade: Ampicilina sintetizada (mmol)/UI/min.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 16 pode ser verificado que maiores rendimentos são alcançados quando se aumenta a concentração de 6-APA frente à concentração de éster. No experimento 1 (100 mM de 6-APA e 50 mM de éster), o rendimento foi de 62% caindo a 56% com o aumento de éster para 150 mM (experimento 2). À medida que se aumentou a concentração de 6-APA o rendimento foi favorecido, passando de 56% a 72% (300 mM de 6-APA e 150 mM de éster – experimento 9).

O efeito favorável do 6-APA no rendimento de síntese foi verificado apenas até 150 mM de éster. Nos experimentos realizados com concentração acima de 150 mM (experimentos 11 e 13) notou-se uma queda de rendimento, passando de 72% a 62%. Esse resultado já era esperado, pois como já foi visto anteriormente, à medida que a razão 6-APA/éster diminui mais éster estará disponível no meio reacional favorecendo desta forma a reação de hidrólise e desfavorecendo a seletividade da reação.

Resultados obtidos por Gonçalves, 2001, mostraram que a hidrólise da amoxicilina sofre inibição para altas concentrações de 6-APA e éster. Ferreira 1999, também verificou que a hidrólise da ampicilina é fortemente inibida na presença de éster metílico. Nos resultados aqui apresentados esse efeito inibitório também foi verificado quando se utilizou alta concentração de ambos os substratos. Nos experimentos 1 e 9 a razão 6-APA/éster foi mantida, porém o rendimento teve um aumento passando de 62% para 72%. Seletividade e produtividade também foram favorecidas variando de 1,7 a 2,6 e  $2,1 \times 10^{-5}$  a  $4,4 \times 10^{-5}$ .

Comparando os experimentos realizados em meio homogêneo com os realizados em meio heterogêneo (semeando cristais de ampicilina e D(-)-FG no início da reação) só foram verificadas variações negativas de rendimento e seletividade nos experimentos 9 e 10 onde o rendimento passou de 72% a 69% e a seletividade de 2,6 para 2,2. Em todos os outros experimentos (2 e 3, 6 e 7, 11 e 12) o efeito foi positivo, porém com pequenas variações. Nota-se, em todos os experimentos em meio heterogêneo, uma melhora

bastante significativa na produtividade da reação chegando a alcançar valor 1,6 vezes superior (experimento 2 –  $4,2 \times 10^{-5}$  e experimento 3 –  $6,9 \times 10^{-5}$ ). Com os resultados apresentados não foi verificado um possível efeito inibitório dos produtos na reação de síntese de ampicilina.

A Figura 48 apresenta o perfil de concentração de reagentes e produtos na mistura reacional onde se alcançou o melhor conjunto de resultados para rendimento, seletividade e produtividade, com desvios-padrão de triplicata. (experimento 12).

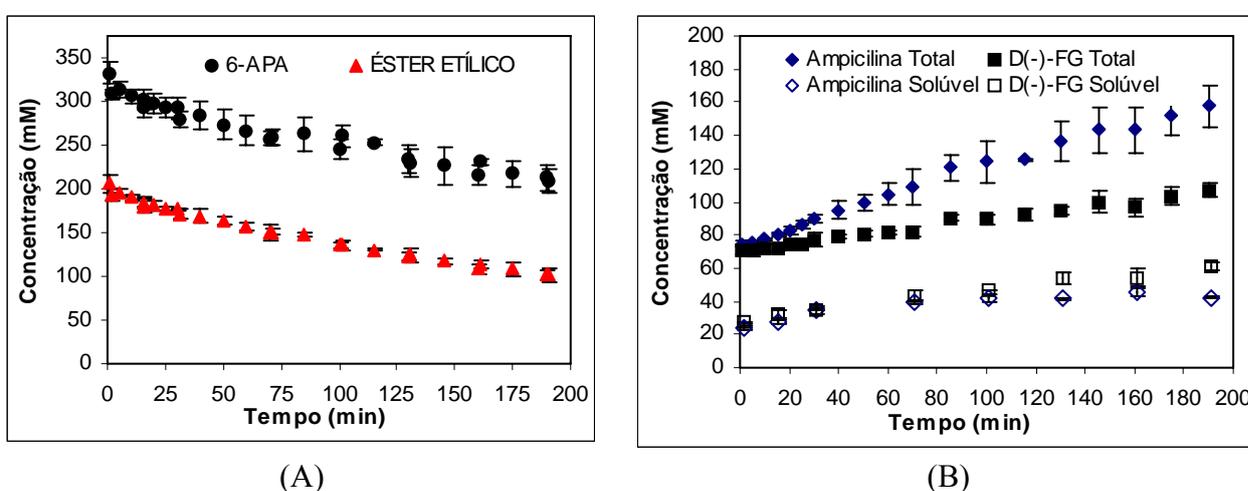


Figura 48 – Perfis de concentração de reagentes e produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. Cincial: 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. (A) Concentração total na mistura reacional, (B) Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução (Total = cristais + solúveis).

A Figura 48 B nos mostra mais uma vez o perfil crescente da concentração de ampicilina e D(-)-FG em solução com o consumo de substrato.

Uma hipótese a ser verificada é se uma possível diferença de grau de cristalinidade e/ou estrutura cristalina do precipitado formado durante a síntese com relação aos cristais semeados no início da reação (produto comercial) poderia estar afetando a cinética de cristalização – e, portanto, a seletividade da síntese. Para testar essa hipótese, uma nova reação foi realizada semeando os cristais obtidos no laboratório durante as sínteses anteriores. A Figura 49 mostra os dados obtidos nesse ensaio. Mais uma vez, o mesmo perfil foi

encontrado descartando a hipótese de diferença na estrutura entre os cristais de ampicilina e D(-)-FG comercial e os precipitados obtidos durante a síntese.

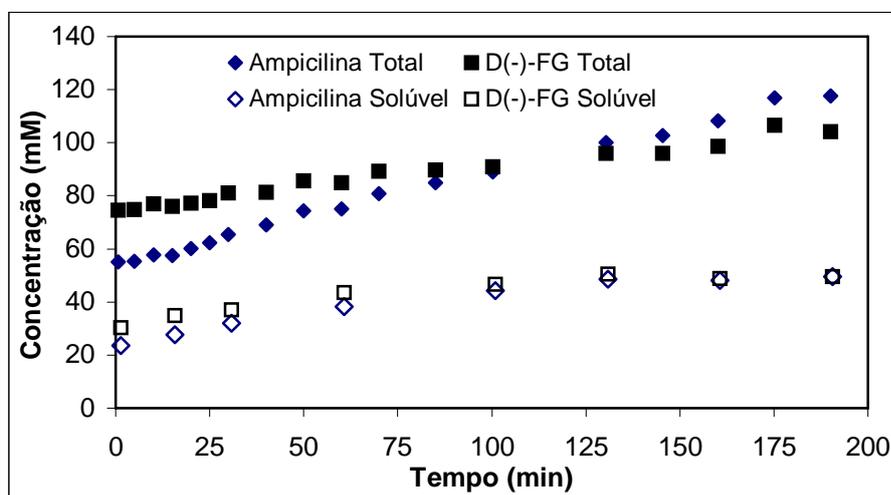


Figura 49 – Perfis de concentração dos produtos obtidos em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. Cínical: 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 50 mM e D(-)-FG 70 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>. Concentração de D(-)-FG e ampicilina em solução (Total = cristais + solúveis).

Outra hipótese investigada foi de que o tempo estipulado para que o conteúdo de solúveis alcançasse o equilíbrio não era suficiente, pois durante as reações esse tempo foi fixado em 15 minutos. Dessa forma um ensaio foi realizado simulando as condições reacionais e utilizado os cristais de ampicilina e D(-)-FG comerciais. A Figura 50 mostra o resultado obtido durante uma hora. Pode ser visto pela Figura apresentada que os 15 minutos estipulados durante as reações foram suficientes para que os limites de solubilidade da ampicilina e D(-)-FG fossem alcançados.

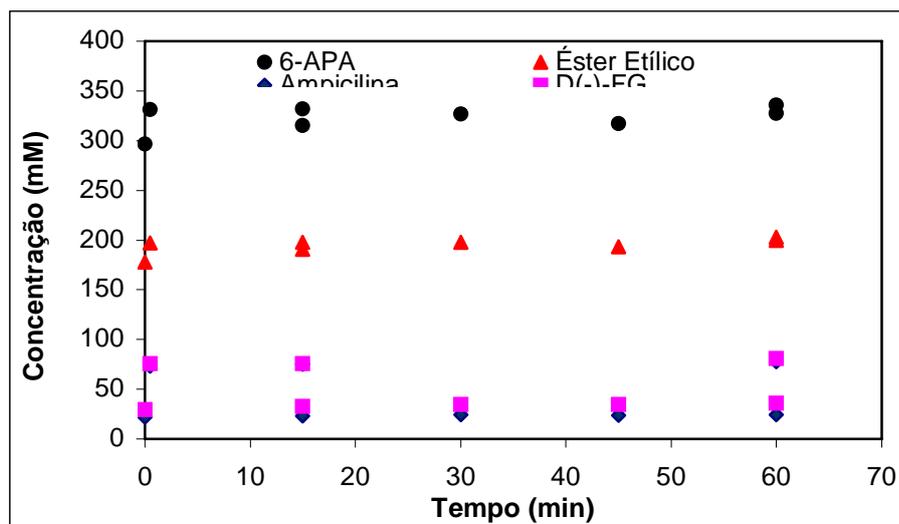


Figura 50 – Perfis de concentração dos reagentes e produtos da síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C inicial: 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM.

Descartadas as hipóteses de diferença nas estruturas cristalinas e tempo insuficiente para alcançar o limite de solubilidade, recaímos mais uma vez na hipótese de que o conteúdo de álcool formado no meio reacional pode estar influenciando no aumento de solubilidade dos compostos.

A Figura 51 apresenta o perfil de seletividade ao longo da reação. A diminuição da seletividade ao longo do curso da reação é mais uma indicação que a alta razão 6-APA/éster contribui para a melhora na seletividade. Nota-se nessa curva um aumento de seletividade no início da reação. Esse aumento inicial pode ser atribuído a possíveis efeitos difusivo das moléculas de D(-)-FG e ampicilina no catalisador.

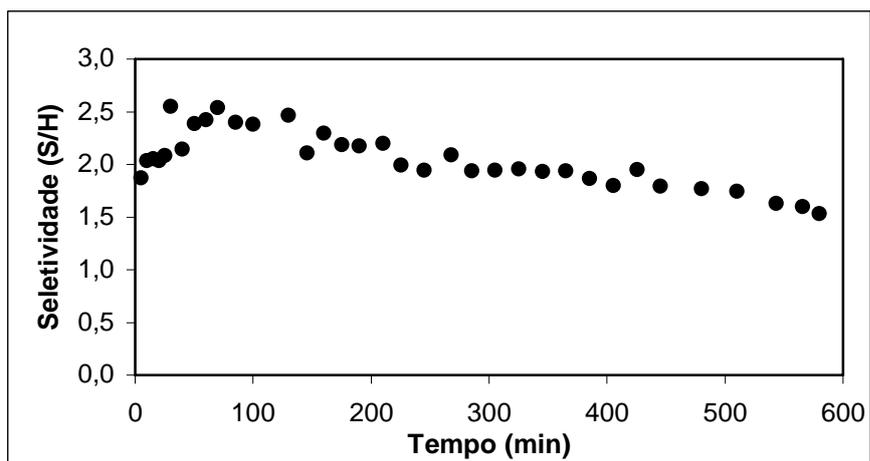


Figura 51 – Perfis da seletividade em síntese enzimática de ampicilina a 25°C, pH 6,0. C inicial: 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 15 UI/mL<sub>Reator</sub>.

A Tabela 17 mostra os valores máximos de seletividade, rendimento e produtividade obtidos nas sínteses de ampicilina com éster etílico a 25°C e pH 6,2.

Tabela 17 – Resultados obtidos nas sínteses de ampicilina com o éster etílico e pH 6,2 utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL.

	<b>6-APA (mM)</b>	<b>Éster (mM)</b>	<b>AMP (mM)</b>	<b>D(-)-FG (mM)</b>	<b>S</b>	<b>R (%)</b>	<b>P (mmol/UI/min)</b>
14	100	50	-	-	1,7 (30')	62,5 (30')	$2,6 \times 10^{-5}$ (30')
15	100	150	-	-	1,1 (30')	53,1 (30')	$4,5 \times 10^{-5}$ (30')
16	100	150	60	60	0,8 (30')	45,3 (30')	$6,9 \times 10^{-5}$ (30')
					0,8 (40')	43,4 (40')	$7,0 \times 10^{-5}$ (40')
17	150	300	-	-	1,1 (40')	53,3 (40')	$7,8 \times 10^{-5}$ (40')
					0,9 (60')	48,2 (60')	$6,9 \times 10^{-5}$ (60')
18	200	50	-	-	1,8 (50')	63,6 (50')	$2,1 \times 10^{-5}$ (50')
					2,0 (70')	66,7 (70')	$1,9 \times 10^{-5}$ (70')
19	200	150	-	-	1,5 (40')	59,8 (40')	$5,1 \times 10^{-5}$ (40')
					2,0 (50')	66,4 (50')	$5,0 \times 10^{-5}$ (50')
20	200	150	60	60	1,2 (40')	55,4 (40')	$7,8 \times 10^{-5}$ (40')
					1,3 (50')	57,3 (50')	$6,9 \times 10^{-5}$ (50')
21	300	50	-	-	2,5 (40')	71,2 (40')	$1,6 \times 10^{-5}$ (40')
					3,5 (71')	77,7 (71')	$1,6 \times 10^{-5}$ (71')
22	300	150	-	-	2,3 (30')	70,1 (30')	$5,2 \times 10^{-5}$ (30')
23	300	150	60	60	1,9 (50')	65,6 (50')	$5,7 \times 10^{-5}$ (50')
					2,1 (70')	67,4 (70')	$5,5 \times 10^{-5}$ (70')
24	300	200	-	-	2,0 (50')	67,1 (50')	$6,5 \times 10^{-5}$ (50')
					1,9 (100')	65,9 (100')	$5,3 \times 10^{-5}$ (100')
26	300	200	60	60	1,7 (40')	63,0 (40')	$8,6 \times 10^{-5}$ (40')
					2,3 (50')	69,6 (50')	$8,1 \times 10^{-5}$ (50')
					2,1 (70')	68,0 (70')	$6,9 \times 10^{-5}$ (70')
26	300	300	-	-	1,8 (30')	63,8 (30')	$8,8 \times 10^{-5}$ (30')
					1,7 (40')	63,1 (40')	$8,5 \times 10^{-5}$ (40')
					1,6 (50')	61,9 (50')	$8,3 \times 10^{-5}$ (50')
					1,8 (60')	64,8 (60')	$7,9 \times 10^{-5}$ (60')

(S) Seletividade: Ampicilina sintetizada / D(-)-FG produzida; (R) Rendimento: Ampicilina sintetizada / Éster consumido por BM (%); (P) Produtividade: Ampicilina sintetizada (mmol)/UI/min.

Comparando os resultados obtidos nos dois pHs (Tabelas 16 e 17) verifica-se que as sínteses realizadas em pH 6,0 favoreceram a melhora do rendimento e seletividade enquanto que a produtividade foi favorecida a pH 6,2. Experimentalmente, já foi observado que pHs maiores diminuem a adsorção do núcleo no sítio ativo da enzima e esse efeito desfavorece a reação de síntese. Por outro lado, pHs maiores também favorecem a dissociação do NH<sub>2</sub> do 6-APA na direção da forma desprotonada, condição necessária para que ocorra o ataque nucleofílico do 6-APA ao complexo acil-enzima, favorecendo a reação de síntese. Nos resultados apresentados, a produtividade foi fortemente favorecida quando se realizaram as

sínteses no pH 6,2. Esse efeito foi bem menos significativos nos experimentos onde a concentração de éster era baixa (experimentos 1 e 14, 2 e 15, 5 e 18 e 8 e 21).

#### 4.4.6 - SÍNTESE DE AMPICILINA – BATELADA ALIMENTADA

Como etapa final dos ensaios de síntese uma reação em batelada alimentada foi realizada. De acordo com resultados obtidos por Ribeiro, 2006, três estágios distintos podem ser claramente vistos em uma operação ótima do reator.

No primeiro estágio, é alcançada a saturação de ampicilina e D(-)-FG e a concentração de éster é aumentada a fim de aumentar a velocidade de síntese de ampicilina. No segundo estágio, as concentrações de substratos e produtos na fase aquosa permanecem constantes, ou quase constantes, no caso do éster. Assim, as velocidades de reação são mantidas constantes em um ponto de alta seletividade (síntese/hidrólise). No terceiro e último estágio, a alimentação de éster é aumenta e a alimentação de 6-APA é reduzida de forma a minimizar sua concentração no reator, pois este é o reagente de maior custo.

A primeira parece ser uma fase de transição onde os produtos alcançam o limite de solubilidade e começam a cristalizar e os reagentes a manter uma concentração onde haja maior seletividade. Esta fase pode ser retirada do processo industrial, começando a reação com reator semeado de produtos, isto é, com o reator no limite de solubilidade dos produtos e, portanto já na segunda fase onde a produção de antibiótico se dá de maneira contínua e em estado quase estacionário. Nesta fase, quando os produtos já estão cristalizados, e, portanto suas concentrações em solução são constantes e iguais aos limites de solubilidade, a seletividade aumenta com a concentração de 6-APA.

O experimento de síntese de ampicilina em batelada alimentada foi realizado a partir de éster etílico de D(-)-fenilglicina (200 mM) e do 6-APA (300 mM) a 25°C e pH 6,0

utilizando como catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL. Cristais de ampicilina (60 mM) e D(-)-FG (60 mM) foram semeados no início da reação. Uma maior quantidade de biocatalisador, quando comparado ao experimento em batelada, foi empregada para tentar diminuir o tempo de reação. Alimentação dos reagentes em estado sólido foi realizada em forma de pulso, o que gera uma queda brusca do pH. Neste caso, adição manual de NaOH, para ajuste de pH, foi realizada durante toda a síntese, sendo o volume adicionado anotado e o controle foi realizado com o auxílio de uma proveta.

A Figura 52 mostra os perfis de concentração de substratos e produtos obtidos na síntese de ampicilina em reator semi-contínuo.

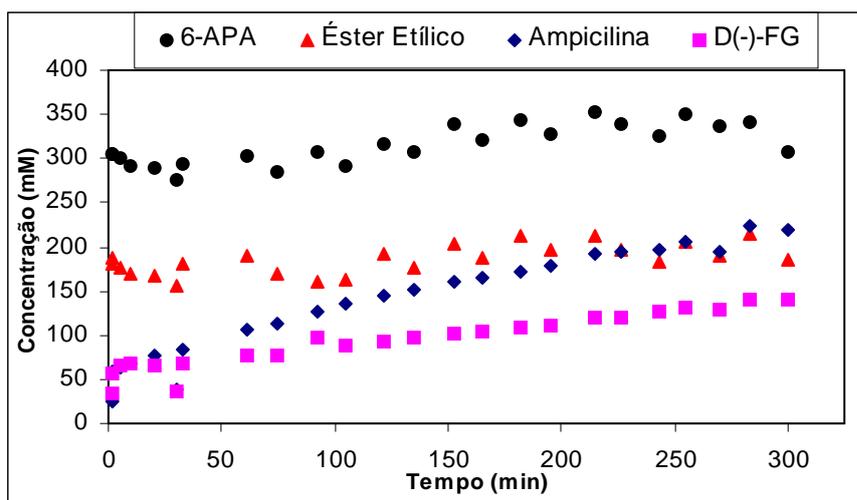


Figura 52 - Perfis de concentração dos reagentes e produtos da síntese enzimática de ampicilina em reator semi-contínuo com alimentação de reagentes em pulsos a 25°C, pH 6,0. C inicial: 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 21,4 UI/mL<sub>Reator</sub>

A seletividade inicial ( $S = 3,5$  em 30') obtida foi maior que a encontrada no experimento em batelada ( $S = 2,5$  em 70'), porém ainda ficou um pouco inferior a seletividade ( $S = 4$ ) encontrada por Ferreira, 2004, utilizando biocatalisador industrial (Recordatti) envolto em pectina na síntese de ampicilina com éster metílico a 25 °C e pH 6,5. Ao longo da reação, a seletividade foi decrescendo e seu valor alcançou um valor mínimo de

2,0 em 4 horas de reação, permanecendo constante até o término da reação em 5 horas. A Figura 53 mostra o perfil encontrado para seletividade da reação em batelada alimentada.

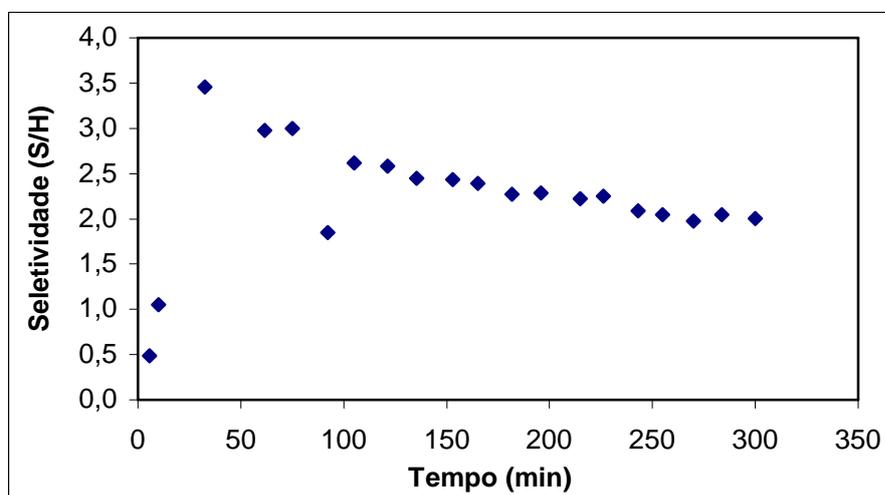


Figura 53 – Perfil da seletividade em síntese enzimática de ampicilina em reator semi-contínuo a 25°C, pH 6,0. Cincial: 6-APA 300 mM, éster etílico 200 mM, ampicilina 60 mM e D(-)-FG 60 mM. 21,4 UI/mL<sub>Reator</sub>.

## 5 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, as principais conclusões foram:

- ↳ Durante as sínteses de ampicilina em meio homogêneo utilizando catalisador industrial Recordatti, a utilização de éster etílico de D-fenilglicina (EEFG), além de não reduzir a velocidade de síntese de ampicilina, também diminuiu a velocidade de hidrólise do éster, mostrando grande potencial para aumentar a seletividade da rota enzimática. Além disso, o subproduto da síntese é etanol, menos impactante ambientalmente que outros alcoóis;
- ↳ O biocatalisador agar-agarose com diâmetro médio de  $1,3 \pm 7 \times 10^{-2}$  mm foi testado na síntese de ampicilina, com os ésteres metílico e etílico em dois valores de pH (6,2 e 6,5) e os resultados mostraram que o éster etílico apresentou rendimentos e seletividades melhores que o éster metílico de fenilglicina sendo o pH 6,2 mais favorável à síntese;
- ↳ PGA imobilizada e, em seguida, envolvida em gel de alginato 2% com  $2,1 \pm 6 \times 10^{-2}$  mm de diâmetro e PGA imobilizada em partículas de agarose ME 10% (m/m) com  $1,4 \pm 8 \times 10^{-2}$  mm de diâmetro foram testadas na síntese de ampicilina com cristalização simultânea dos produtos em três diferentes pHs (6,0; 6,2 e 6,5) utilizando os ésteres metílico, etílico e isopropílico com excesso de 6-APA e temperatura de 25°C. Avaliando de forma global seletividade, rendimento e produtividade concluiu-se que uma estratégia promissora seria realizar a síntese utilizando éster etílico, catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL em pH 6,2. As reações também foram realizadas com excesso de éster, porém a seletividade foi drasticamente reduzida;

- 
- ↪ No estudo cinético, sínteses foram realizadas em várias condições iniciais de concentração de substrato (6-APA e EEFG) em pH 6,0 e 6,2 com o catalisador alginato-PGA-agarose 6BCL. Em alguns casos cristais de ampicilina e D(-)-FG foram semeados no início da reação. Maiores rendimentos e seletividades foram alcançados quando se aumentou a concentração de 6-APA frente à concentração de éster. Efeito inibitório na hidrólise do antibiótico foi verificado quando se utilizou alta concentração de ambos os substratos. Em geral, os experimentos realizados em meio heterogêneo (semeando cristais de ampicilina e D(-)-FG no início da reação) favoreceram rendimento, seletividade e produtividade da reação. O pH mais baixo (pH 6,0) favoreceu a melhora do rendimento e seletividade enquanto que a produtividade foi favorecida no pH mais alto (pH 6,2);
  - ↪ A melhor condição operacional obtida no estudo cinético foi utilizada para a síntese em reator batelada alimentada, com alta concentração dos substratos. Uma melhora no desempenho do reator com respeito a rendimento e seletividade foi alcançada;
  - ↪ Os derivados utilizados não perderam atividade depois dos inúmeros ensaios de síntese. O biocatalisador alginato-PGA-agarose 6BCL apresentou melhor resistência mecânica que o catalisador PGA-agarose ME (10% (m/m)).

---

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliceweb.mdic.gov.br. Site do Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior, do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Consultado no dia 15 de janeiro de 2007.
- Chandel, A.K.; rao, L.V.; Narasu, M.I.; Singh, O.V. The realm of penicillin G acylase in  $\beta$ -lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, pp. 199–207, 2008.
- Arroyo, M.; De la Mata, I.; Acebal, C.; Castillon, P.M. Biotechnological applications of penicillin acylases: state of the art. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, pp. 507–14, 2003.
- Balasingham, K.; Warburton, D.; Dunnill, P.; Lilly, M.D. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 276, pp. 250-256, 1972.
- Batigalha, F.; Leite, G. A.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C. and Cass, Q. B. Synthesis and Application of Phenylglycine Methyl and Ethyl Esters in Enzymatic Synthesis of Ampicillin. In: 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Ipanema, SC, 2007.
- Belter, P.A.; Cussler, E.L.; Wei-Shou, H. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, Wiley-interscience, 1988.
- Bock, A.; Wirth, R.; Schmid, G.; Schumacher, G.; Lang, G.; Buckel, P. The Penicillin Acylase From *Escherichia-Coli* Atcc11105 Consists Of 2 Dissimilar Subunits. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 20, n. 2, pp.135-139, 1983.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248-254, 1976.
- Bruggink, A.; Roy, P.D. *Synthesis of beta-Lactam antibiotics (Chapter I)*. 1st. ed. Netherlands: Kluwer, 2001.
- Bruggink, A.; Roos, E.C.; de Vroom, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Organic Process Research & Development*, v. 2, pp. 128-133, 1998.
- Bryjak, J.; Trochimczuk, A.W. Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 573-578, 2006.
- Calleri, E.; Temporini, C.; Massolini, G. & Caccialanza, G. Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, n. 2, pp.243-258, 2004.

- Cao, L.; van Langen, L.M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of beta-lactam antibiotics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, n. 4-6, pp. 665-670, 2001.
- Cecchini D.A.; Serra I.; Ubiali D.; Terreni M.; Albertini, A.M. New active site oriented glyoxyl-agarose derivatives of *Escherichia coli* penicillin G acylase. *BMC Biotechnology*. v. 7, pp. 54, 2007.
- Clausen, K.; Dekkers, R. M. Beta-lactam antibiotic produced by enzymatic acylation of amino precursor - improves yield and reduces consumption of acylating agent. US6048708-A, 2000.
- Chisti, Y.; Moo-Young, M. Fermentation technology, bioprocessing, scale-up and manufacture. In: Moses V, Cape RE, editors. *Biotechnology: The Science and the Business*. New York: Harwood Academic Publishers, 1991. pp. 167–209.
- Cole, M. Penicillins and Other Acylamino Compounds Synthesized by Cell-Bound Penicillin Acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. Journal*. v. 115, pp. 747-756, 1969.
- Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros *Quim. Nova*, v. 27, n°. 4, pp. 623-630, 2004.
- De Souza, V.R.; Silva, A.C.G.; Pinotti, L.M.; Araújo, H.S.S.; Giordano, R.L.C. Characterization of the penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, pp. 105–11, 2005.
- Diago, J.; Ludescher, J.  $\beta$ -lactam production. US Patent n° 5.719.276, 1998.
- Diender, M.B.; Straathof, A.J.J.; Van Der Does, T.; Zomerdijk, M.; Heijnen, J.J. Course of pH during the formation of amoxicillin by a suspension-to-suspension reaction. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, pp. 576, 2000.
- Diender, M.B.; Straathof, A.J.J.; van der Wielen, L.A.M.; Ras, C.; Heijnen, J.J. Feasibility of the thermodynamically controlled synthesis of amoxicillin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, n. 1-4, pp. 249-253, 1998.
- Draget, K.I.; Skjak-Braek, G.; Smidsrod, O. Alginate based new materials. *International Journal Biological Macromolecules*, v. 21, pp. 47-55, 1997.
- Duggleby, H.J.; Tolley, S.P.; Hill, C.P.; Dodson, E.J.; Dodson, G.; Moody, P.C.E. Penicillin Acylase Has A Single-Amino-Acid Catalytic Center. *Nature*, v. 373, n. 6511, pp. 264-268, 1995.
- Elander, R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, pp. 385-392, 2003.

- Ertesvag, H.; Valla, S. Biosynthesis and Applications of Alginates, Polymer Degradation and Stability, v. 59, pp. 85-91, 1998.
- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Guisan, J.M. The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized Penicillin G acylase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, n. 5, pp. 305-310, 1998.
- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Piatkowska, B.; Guisan, J.M. Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: Evaluation and optimization of different synthetic approaches. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, n. 1, pp. 9-14, 1996.
- Fernandez-Lafuente, R.F.; Rosell, C.M.; Guisán, J.M. The use of stabilised penicillin acylase derivatives improves the design of kinetically controlled synthesis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 101, pp. 91-97, 1995.
- Fernandez-Lafuente, R. Síntesis de Antibióticos  $\beta$ -Lactámicos Sintetizada por Derivados Inmovilizados-Estabilizados de Penicilina G Acilasa. Tesis. Instituto de Catalisis Y Petroleoquímica, Madrid, 1992.
- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Guisan, J.M. Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, pp. 898-905, 1991.
- Ferreira, A.L.O.; Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C. Nonconventional Reactor for Enzymatic Synthesis of Semi-Synthetic  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 46, n. 23, pp. 7695-7702, 2007.
- Ferreira, A.L.O. Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado. Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, Brasil, 2004a (Tese).
- Ferreira, A.L.O.; Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C. Improving Selectivity And Productivity Of The Enzymatic Synthesis Of Ampicillin With Immobilized Penicillin G Acylase. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 21, n. 4, pp. 519-529, 2004b.
- Ferreira, J.S.; Straathof, A.J.J.; Franco, T.T.; van der Wielen, L.A.M. Activity and stability of immobilized penicillin amidase at low pH values. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 27, pp. 29-35, 2004.
- Flores, G.; Soberón, X.; Osuna, J. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. *Protein Science*, v. 13, pp. 1677-1683, 2004.
- Funduenanu, G.; Nastruzzi, C.; Carpov, A.; Desbrieres, J.; Rinaudo, M. Physicochemical characterization of Ca-alginate microparticles produced by different methods. *Biomaterials*, v. 20, pp. 1427-1435, 1999.

- 
- Gabor, M.E.; de Vries, E. J.; Janssen, D.B. A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, pp. 182-190, 2005.
- Ghosh, A.C.; Bora, M.M; Dutta, N.N. Developments in liquid membrane separation of beta-lactam antibiotics. *Bioseparation*, v 6, pp. 91-105, 1996.
- Giordano, R.C.; Ribeiro, M.P.A.; Giordano, R.L.C. Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnology Advances*, v. 24, n. 1, pp. 27-41, 2006.
- Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; Ferreira, A. L. O. Process for protection of insoluble enzymatic biocatalysts, biocatalyst obtained thereof and bioreactor with the immobilized biocatalyst. U.S. Patent Application 10/536,426, 2005; European Patent Application 03 773 360-7, 2005; Indian Patent Application 2272/DELNP/2005, 2005; and Chin. Patent Application 200380107752-8, 2005.
- Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; Ferreira, A. L. O. Process for protection of insoluble enzymatic biocatalysts, biocatalyst obtained thereof and bioreactor with the immobilized biocatalyst (in Port.). Braz. Patent Application PI 0205242-3, 2003.
- Giordano, R.C.; Giordano, R.L.C.; Ferreira, A.L.O. Protection of insoluble enzymatic biocatalysts consists of a physical integrity and catalytic activity enhancer for prolonged separation of the biocatalyst. Patent no. WO2004050822-A1, 2003.
- Gonçalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Giordano, R.L.C. The role of 6-aminopenicillanic acid on the kinetics of amoxicillin enzymatic synthesis catalyzed by penicillin G acylase immobilized onto glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 4, pp. 464-471, 2002.
- Gonçalves, L.R.B. Estudo cinético da síntese enzimática de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em agarose. Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, Brasil, 2001a (Tese).
- Gonçalves, L. R. B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. A kinetic study of the synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 84–86, pp. 931-945, 2000.
- Gonçalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J.M.; Giordano, R.L.C. Influência do pH e da temperatura na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em gel de agarose. *Ciência & Engenharia*, v. 7, n. 2, pp. 45-48, 1998.
- Gonçalves, L.R.B. Estudo do processo de produção de etanol a partir de amido liqüefeito, com enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina. Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, Brasil, 1996, (Dissertação).

- Guisán, J. M. Immobilization of Enzymes and Cells. 2º Edição, Editora Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006.
- Guisán, J. M.; Fernandez-Lafuente R.; Rodrigues, V.; Bastida, A.; Blanco, R. M.; Álvaro, G. Enzyme Stabilization by Multipoint Attachment to activated Pré-Existing Suports. Stability and Stabilization of Enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastricht, The Netherlands, 22-25, November, 1992.
- Guisán, J.M. Aldeyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, pp. 375-382, 1988.
- Hartree, E. F. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, pp. 422-7, 1972.
- He, J.; Li, X.; Evans, D.G.; Duan, X.; Li, C. A new support for the immobilization of penicillin acylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11. pp. 45-53, 2005.
- Hernández-Jústiz, O. A.; Terreni, M.; Pagani, G.; García, J.L.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R. Evaluation of different enzymes as catalysts for the production of b-lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, pp. 336-343, 1999
- Hernández-Jústiz, O.A. Ingeniería y Diseño de Biocatalizadores y Bioprocesos de Síntesis Enzimática de Antibióticos  $\beta$ -Lactámicos, Universidad Politécnica de Madrid, Spain. 1996 (tesis doctoral).
- Heilmann, S.M.; Drtina, G.J.; Eitzman, P.D.; Haddad, L.C; Coleman, P.L; Hyde, F.W.; et al. Cartridge filter systems containing immobilized enzymes: Part I. Concept and features. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 45, pp. 1–9, 2007.
- Hou, J.P.; Poole, J.W. Amino Acid Nature of Ampicillin And Related Penicillins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, n. 12, pp. 1510-1515, 1969.
- Illanes, A. Biotecnología de Enzimas. Ediciones Universitárias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.
- Ilhan, F.; Kraemer, D. Enzymatic preparation of amino-substituted beta-lactam antibiotics, e.g. ampicillin or cefaclor. US6218138-B1, 2001.
- Kaasgaard, S.G.; Veitland, U. Process for preparation of b-lactams utilizing combined concentration of acylating agent plus b-lactam derivative of at least 400mM. US patent nº 5.525.483, 1996.
- Kaasgaard, S.G., Karlsen, L. Process for separation of two solid components. WO Patente nº 92/12782, 1992.

- Kasche, V. Ampicillin and cephalosporin synthesis catalysed by *E. coli* penicillin amidase. Yield due to substrate recycling. *Biotechnology Letters*, v. 7, pp. 877-882, 1985.
- Kasche, V.; Haufler, U.; Zollner, R. Kinetic-studies on the mechanism of the penicillin amidase-catalyzed synthesis of ampicillin and benzylpenicillin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, v. 365, n. 12, pp.1435-1443, 1984.
- Kato, K. Kinetics of acyl transfer by  $\alpha$ -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 44, n°5, pp. 1083-1088, 1980a.
- Kato, K.; Kawahara, K.; Takahashi, T. Enzymatic synthesis of amoxicillin by the cell-bound  $\alpha$ -amino ácido ester hidrolase de *Xanthomonas citri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 44, n. 4, pp. 821-825, 1980b.
- Kim, G.M.; Lee, S.B. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics in water-methanol mixtures: effect of cosolvent content and chemical nature on reaction rates and yields. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 1, pp. 201-211, 1996a.
- Kim, G.M.; Lee, S.B. Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: interaction of organic solvents with enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 1, pp. 181-190, 1996b.
- Korolkovas, A.; de França, F.F.A.C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2000.
- Kutzbach, C.; Rauenbusch, E. Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* v. 354, pp. 45-53, 1974.
- Llanes, F.; Ryan, D.H.; Marchessaut, R.H. Magnetic nanostructured Composites Using Alginates of Different M/G Ratios as Polymeric Matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 27, pp. 35-40, 2000.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2° ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- Lehninger, A.L. – *Bioquímica: componentes moleculares das células*, São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2a edição, v. 1, 1976, cap. 8 e 9.
- Lima, A.W.O; Angnes, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. *Química Nova*. v. 22, n° 2, pp. 229-245, 1999.
- Lopez-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, v. 116, n° 1, pp.1-10, 2005.

- Louwrier, A.; Knowlest, S.J. The aim of industrial enzymic amoxicillin production: characterization of a novel carboamylase enzyme in the form of a crude cell-free extract. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 25, pp. 143-149, 1997.
- Lummer, K.; Rieks, A.; Galunsky, B.; Kasche, V. pH dependence of penicillin amidase enantioselectivity for charged substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1433, pp. 327-334, 1999.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, pp. 680-685, 1970.
- Marzo, A.; Dal Bo, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *Journal of Chromatography A*, 812, pp. 17–34, 1998.
- Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B.C.C.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 274-2810, 2006.
- Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, pp. 509–515, 2000.
- Margolin, A.L.; Svedas, V.K.; Berezin, I.V. Substrate-specificity of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 616, nº. 2, pp.283-289, 1980.
- Menezes, J.C.; Alves, T.P.; Cardoso, J.P. *Biotechnologia Microbiana: A Produção de Penicilina*, cap. 12, 15 pp. IN: *Biotechnologia: Fundamentos e Aplicações*, N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL, 2000.
- Messing, R. A. *Immobilized enzymes for industrial reactors*. London: Academic Press, Inc. LTD. 1975.
- Moe, S. T.; Draget, K. I.; Skjak-Brek, G.; Smidsrod, O.; Stephen, A. M. *Food polysaccharides and their applications*. Cap. 9: Alginates, pp. 245–286, 1995.
- Nagai, Y; Kusumi, T. New Chiral Anisotropic Reagents for Determining the Absolute Configuration of Carboxylic Acids. *Tetrahedron Letters*, v. 36, nº. 11, pp. 1853-1856, 1995.
- Nathwani, D.; Wood, M.J. Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, v. 45, nº. 6, pp. 866-894, 1993.

- Nielson, J.; Johansen, C. L.; Jacobsen, M.; Krabben, P.; Villadsen, J. Pellet Formation and Fragmentation in Submerged Cultures of *Penicillium chrysogenum* and Relation to Penicillin Production. *Biotechnology Progress*, v. 11, pp. 93-98, 1995.
- Novella, I.S; Fargues, C.; Grevillot, G. Improvement of extraction of penicillin acylase from *E. coli* cells by a combines use of chemical methods. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 379–82, 1994.
- Ospina, S.; Barzana, E.; Ramirez, O.T.; Lopez Munguia, A. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, nº. 6, pp.462-469, 1996a.
- Ospina, S.; Barzana, E.; Ramírez, O.T. e López-Munguía, A. Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin: a whole cell *E. coli* recombinant penicillin amidase biocatalyst. *Biotechnology Progress*, v. 11, pp. 464-71, 1996b.
- Ospina, S. Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.53, pp. 205-214, 1992.
- Parmar, A.; Kumar, H.; Marwaha, S.S; Kennedy, J.F. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnology Advances*, v. 18, pp. 289–301, 2000.
- Pereira, G. H. A. Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil. (Dissertação de Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 1996.
- Pinotti, L. M. Produção e purificação de penicilina G acilase. Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, Brasil, 2003 (Tese).
- Polderman-Tijmes, J.J. Biochemical characterization of alpha-amino acid ester hydrolases. 2004. Tese. University of Groningen, The Netherlands, 2004.
- Ribeiro, M. P. A. Operação ótima de reator para síntese enzimática de ampicilina com cristalização simultânea dos produtos. Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, Brasil, 2007 (Tese).
- Ribeiro, M. P. A., Pinto, J.M., Giordano, R.C. Dynamic optimization approaches for the enzymatic synthesis of ampicillin. 17th International Congress of Chemical Engineering (CHISA), Prage, 2006.
- Ribeiro, M. P. A.; Ferreira, A. L. O.; Giordano, R. L. C.; Giordano, R. C. Selectivity of the enzymatic synthesis of ampicillin by *E. coli* PGA in the presence of high concentrations of substrates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 33, pp. 81-86, 2005.

- Rolinson, G. N.; Geddes, A.M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). Review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, pp. 3–8, 2007.
- Rudolph, E.S.J.; Zomerdijk, M.; Luyben, K.C.A.M.; van der Wielen, L.A.M. Correlating the phase behaviour of semi-synthetic antibiotics and their precursors in water+1-butanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, v. 160, pp. 903-912, 1999.
- Santana, M. Estudo experimental da solubilidade dos compostos presentes na síntese enzimática de ampicilina. *Engenharia Química, UFBA, Salvador, Brasil*, 2007 (Dissertação).
- Santana, V. C. O. Papel dos Antibióticos na Resistência Bacteriana. *Revista Cesumar - Ciências Humanas e Sociais Aplicadas*, v. 11, nº 1, pp 129-138, jan./jun.2006.
- Savidge, T.A. In: Vandamme, E.J, editor. *Biotechnology of Industrial Antibiotics-Drugs and Pharmaceutical Sciences*, v. 2. New York: Dekker, p. 172–224, 1984.
- Sengupta, S.; Modak, J.M. Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme processes. *Chemical Engineering Science*, v. 56, nº. 11, pp.3315-3325, 2001.
- Shewale, J.G; Deshpande, B.S; Sudhakaran, V.K; Ambedkar, S.S. Penicillin acylases: applications and potentials. *Process Biochemistry*. v. 25, pp. 97–103, 1990.
- Shewale, J.G; Sivaraman, H. Penicillin acylase enzyme production its applications in the manufacture of 6-APA. *Process Biochemistry*, v. 24, nº. 1, pp. 46–54, 1989.
- Sio, C.F.; Quax, W.J. Improved b-lactam acylases and their use as industrial biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 349–355, 2004.
- Spieß, A.; Schlothauer, R.C.; Hinrichs, J.; Scheidat, B.; Kasche, V. pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of  $\beta$ -lactam hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 62, pp. 267-277, 1999.
- Smidsrod, O.; Draget, K. I.; Berghstahl, E. D. Food Colloids – proteins, lipids and polysaccharides. *Alginate Gelation Technologies*, pp.279-293, 1997.
- Smidsrod, O.; Skak-Braek, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends of Biotechnology*, v.8, pp.71-78, 1990.
- Sriamornsak, P. Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. *European Journal Pharmacology and Biopharmacy*, v. 46, pp. 233-226. 1998.
- Tavares, W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*. Livraria Atheneu Editora, Rio de Janeiro, 1994.

- Terreni, M.; Pagani, G.; Ubiali, D.; Fernández-Lafuente, R.; Mateo, C.; Guisán, J.M. Modulation of Penicillin Acylase Properties via Immobilization Techniques: One-Pot Chemoenzymatic Synthesis of Cephmandole from Cephalosporin C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, pp. 2429–2432, 2001.
- Thykaer, J.; Nielsen, J. Metabolic engineering of  $\beta$ -lactam production. *Metabolic Engineering*, v. 5, Issue 1, pp. 56-69, 2003.
- Trevisan, H.C.; Mei, L.H.I.; Zanin, G.M. Preparation of silica with controlled pore sizes for enzyme immobilization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, pp. 71-77, 2000.
- Tsuji, A.; Nakashima, E.; Hamano, S.; Yamana, T. Physicochemical properties of amphoteric  $\beta$ -lactam antibiotics I: stability, solubility and dissociation behavior of amino penicillins as a function of pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 67, n<sup>o</sup>. 8, pp. 1059-1066, 1978.
- 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, pp. 72–75, 2000.
- Van der Wielen, L.A.M.; Van Buel, M.J.; Straathof, A.J.J.; Luyben, K.C.A.M. Modelling the Enzymatic Deacylation of Penicillin G: Equilibrium and Kinetic Considerations. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 15, pp. 121-146, 1997.
- Velten, F.; Laue, C.; Schrezenmeir, J. The effect of alginate and hyaluronate on the viability and function of immuno isolated neonatal rat islets. *Biomaterials*, v. 20, pp. 2161-2167, 1999.
- Vieira, M.F. Separação de ampicilina produzida enzimaticamente por reação entre éster metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2003, (tese).
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C.W. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 931.
- Wegman, M.A.; Janssen, M.H.A.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. Towards biocatalytic synthesis of beta-lactam antibiotics. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 343, n<sup>o</sup>. 6-7, pp.559-576, 2001.
- Youshko, M.I.; Kangenm, L.M.; Vroom, E.; Rantwijk, F.; Sheldon, R.A.; Svedas, V.K. Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: A new approach to optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 5, pp. 589-593, 2002.
- Youshko, M.I.; Van Langen, L.M.; De Vroom, E.; Moody, H.M.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A.; Svedas, V.K. Penicillin acylase catalyzed synthesis of ampicillin in “aqueous

---

solution-precipitate” systems. High reactants concentration and supersaturation effect. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, pp. 509-515, 2000.

Youshko, M.I.; Svedas, V.K. Kinetics of ampicillin synthesis catalyzed by penicillin acylase from E-coli in homogeneous and heterogeneous systems. Quantitative characterization of nucleophile reactivity and mathematical modeling of the process. *Biochemistry-Moscow*, v. 65, n°. 12, pp. 1367-1375, 2000.

## APÊNDICE A

## CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES DE D(-)-FENILGLICINA

As Figuras A1 – A3 apresentam os espectros de massas dos ésteres metílico, etílico e isopropílico após recristalização com acetato de etila.

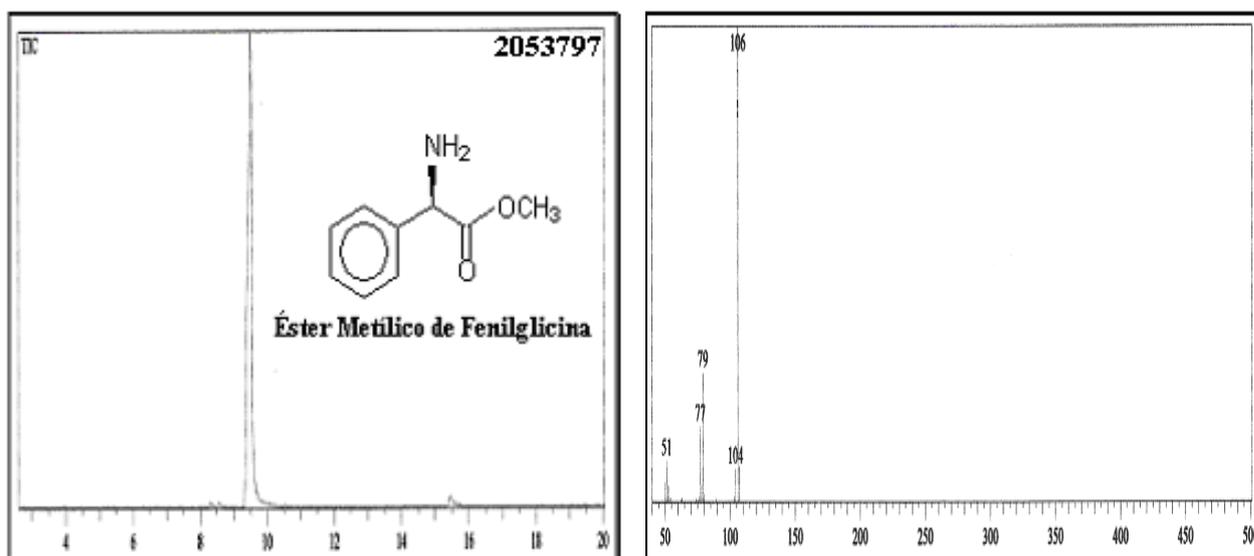


Figura A1 - Espectro de massa obtido para o éster metílico após etapa de recristalização.

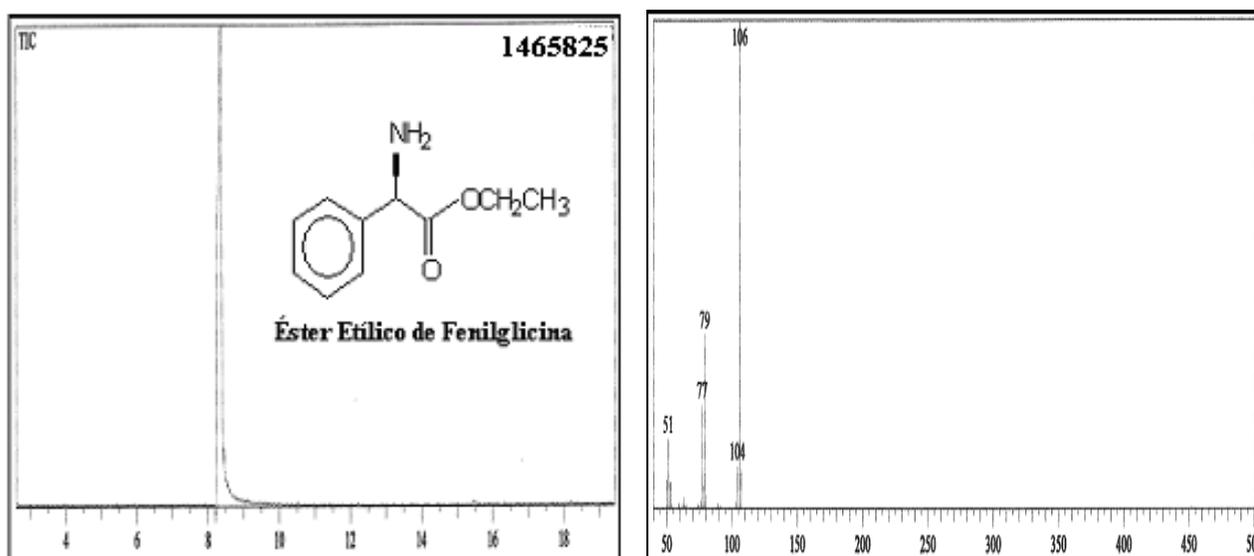


Figura A2 - Espectro de massa obtido para o éster etílico após etapa de recristalização.

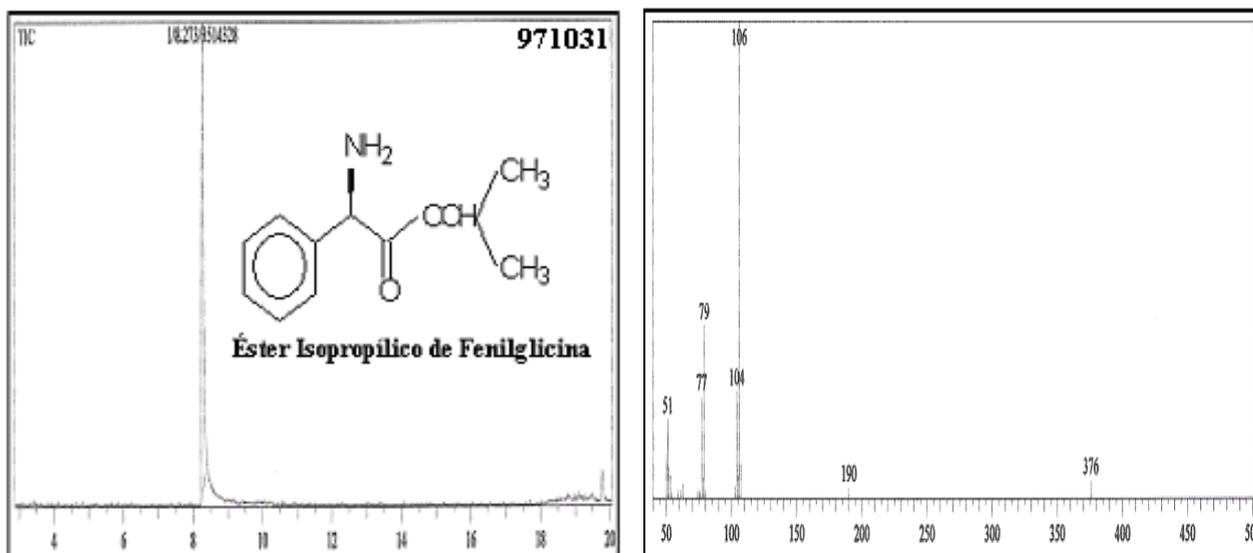


Figura A3 - Espectro de massa obtido para o éster isopropílico após etapa de recristalização.

A caracterização dos ésteres foi realizada pela análise de seus espectros de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e análise elementar.

No espectro de infravermelho dos ésteres, observa-se o desaparecimento de uma banda intensa entre 1550 e 1650 cm<sup>-1</sup>, referente à deformação axial do grupamento carboxilato característico da carbonila do ácido carboxílico da fenilglicina (Figura A4) e o aparecimento de uma banda intensa entre 1710 e 1750 cm<sup>-1</sup>, referente à deformação axial da ligação C=O da carbonila de ésteres, confirmando a esterificação. As Figuras A5-A7 ilustram os espectros de infravermelho dos produtos obtidos na síntese dos ésteres: metílico, etílico e isopropílico, respectivamente.

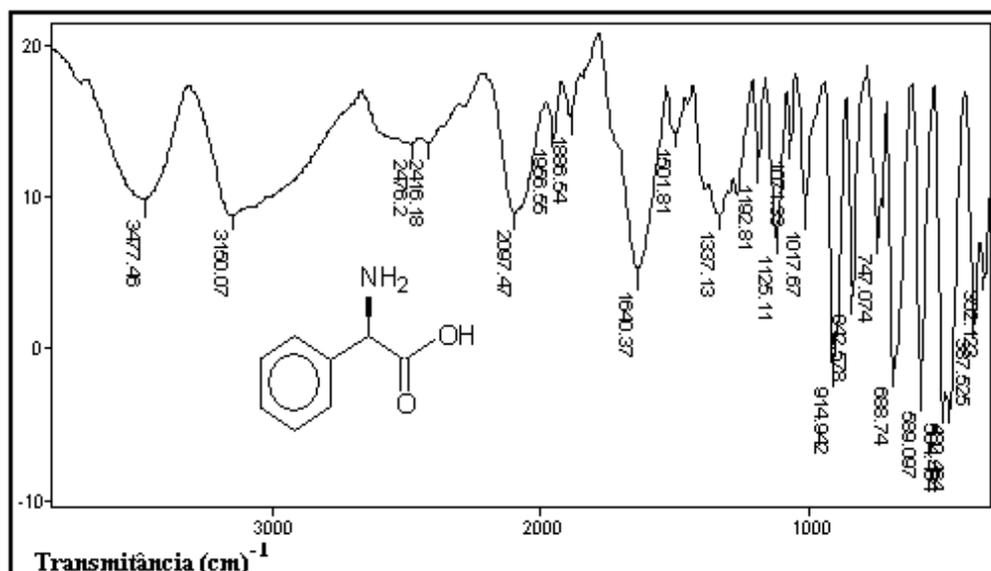


Figura A4 - Espectro de infravermelho da D(-)-fenilglicina.

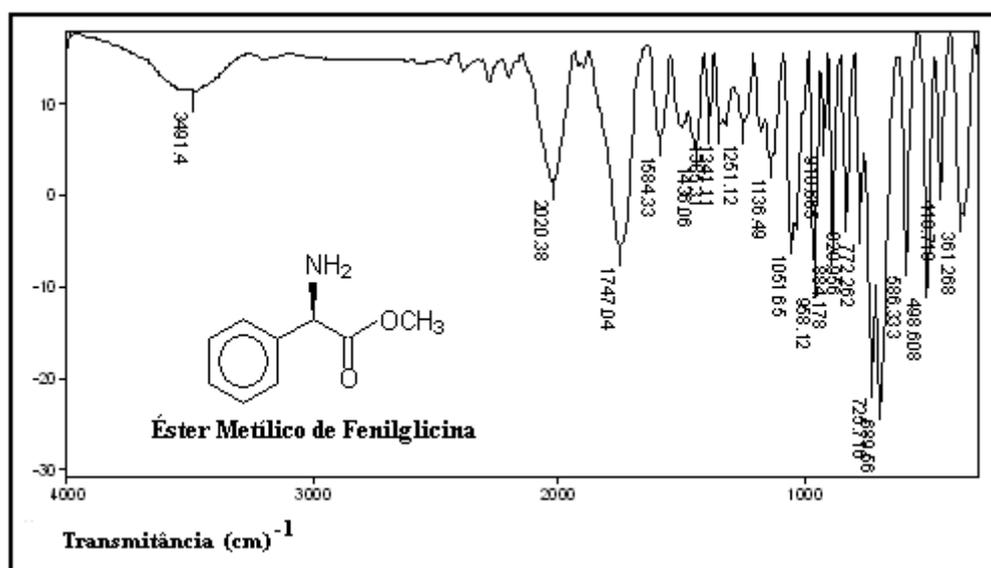


Figura A5 - Espectro de infravermelho obtido do produto da síntese do éster metílico de fenilglicina.

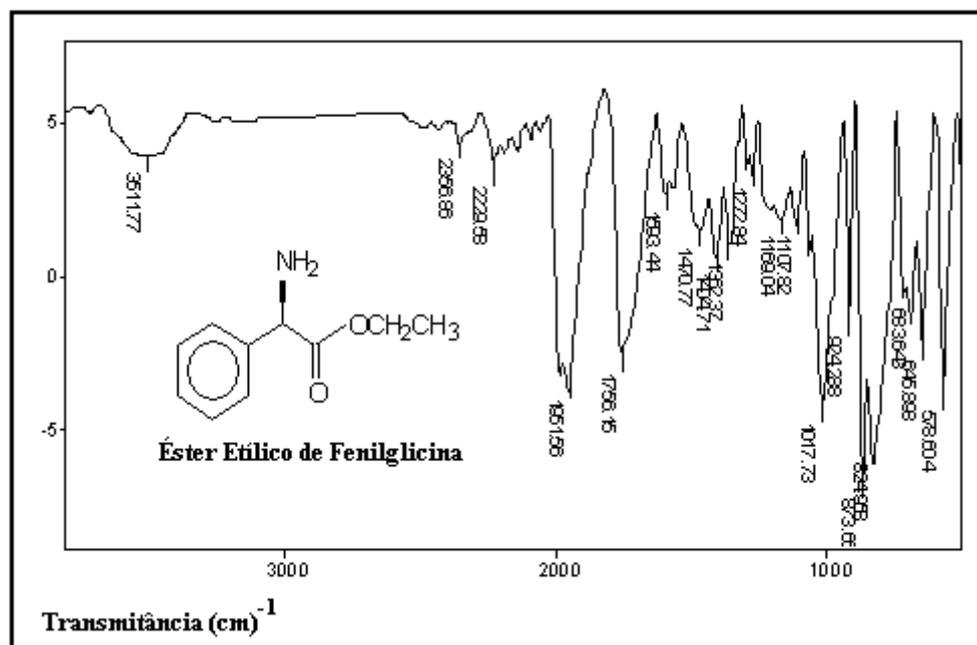


Figura A6 - Espectro de infravermelho obtido do produto da síntese do éster etílico de fenilglicina.

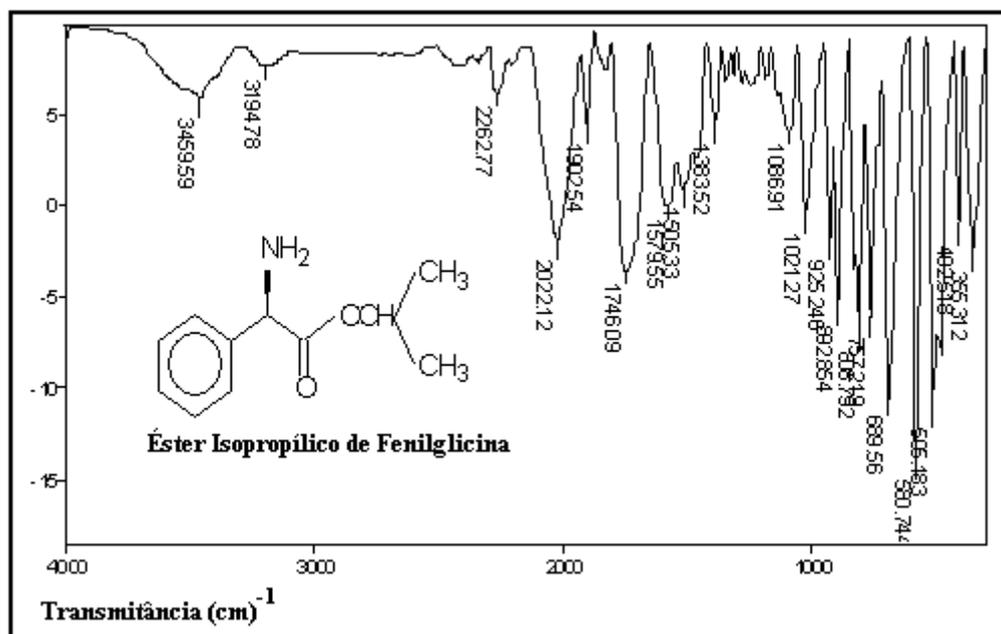


Figura A7 - Espectro de infravermelho obtido do produto de síntese do éster isopropílico de fenilglicina

Os produtos de síntese também foram caracterizados pela técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H). No espectro obtido do produto da síntese de éster metílico, (Figura A8), observa-se um sinal em 7.26 ppm referente aos prótons do anel aromático, um singlete em 3.71 ppm referente ao próton do carbono  $\alpha$  do grupamento amina e um singlete em 1.58 ppm referente aos prótons metilênicos.

No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido da síntese do éster etílico (Figura A9), observa-se um multipletto entre 7.26 e 7.53 ppm, referente aos prótons do anel aromático, um singlete em 5.10 ppm referente ao hidrogênio do carbono  $\alpha$  ao grupamento amina, um quadrupletto em 4.14 ppm referente aos hidrogênios do grupo  $\text{CH}_2$  do radical etila, e um triplete em 1.16 ppm, referente aos hidrogênios do grupo  $\text{CH}_3$  da etila, conforme apresentado na Figura A8.

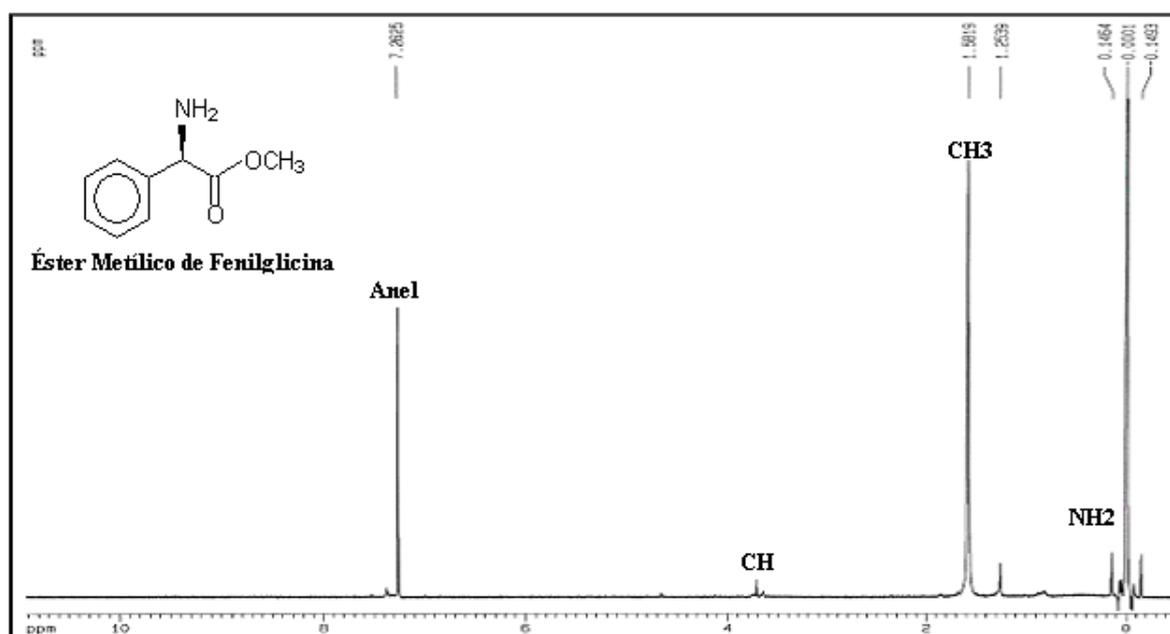


Figura A8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido do produto da síntese do éster metílico de fenilglicina.

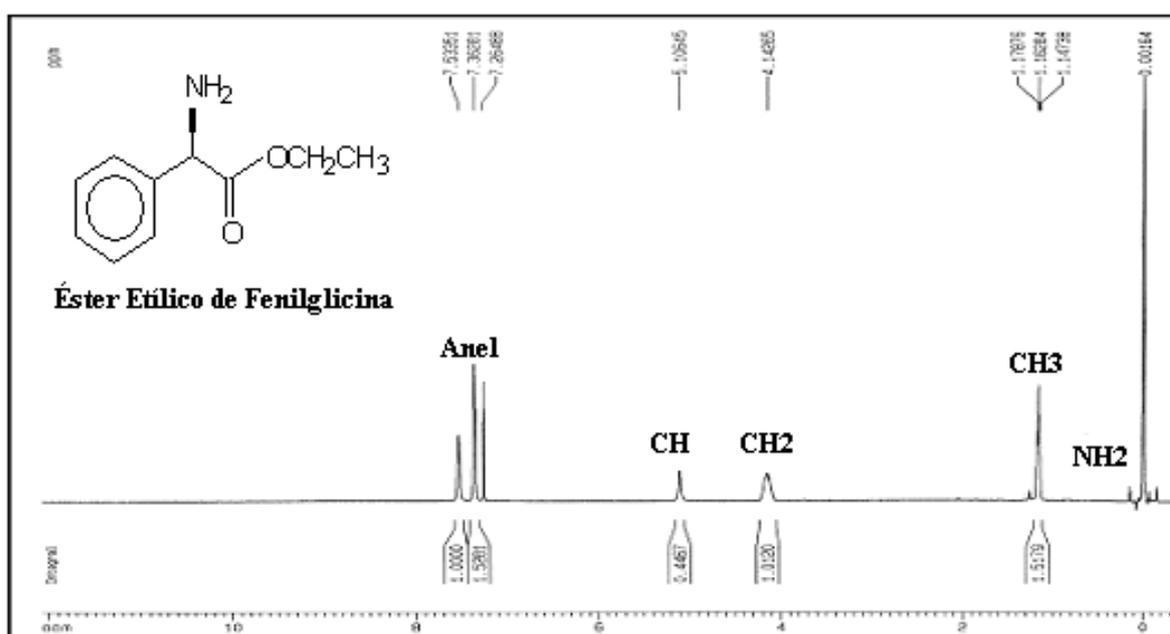
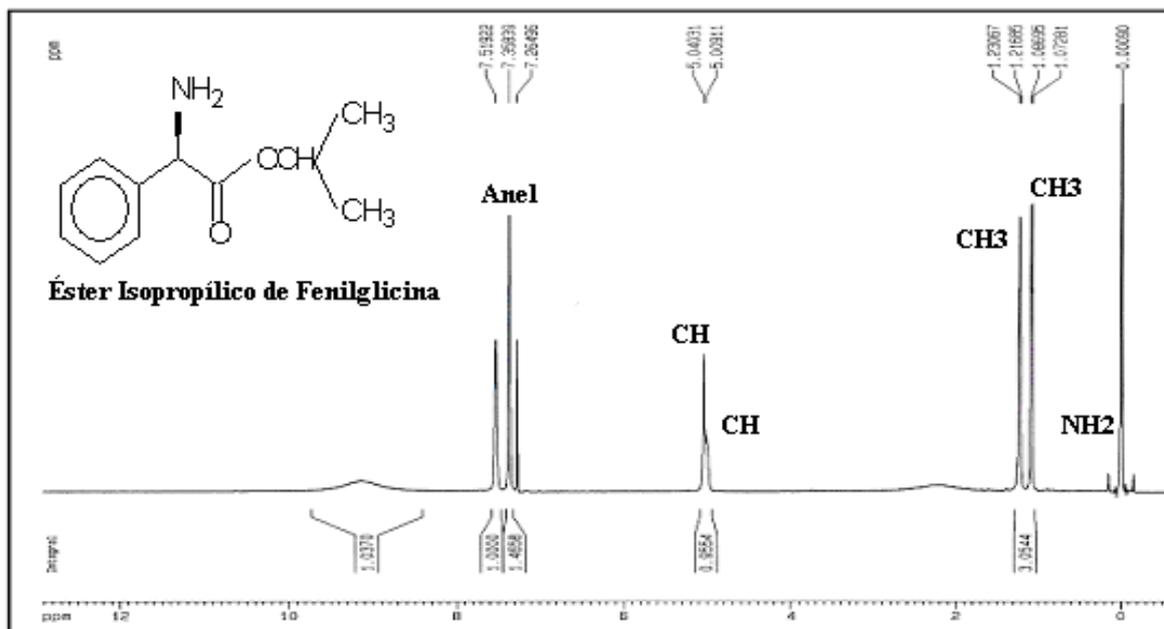


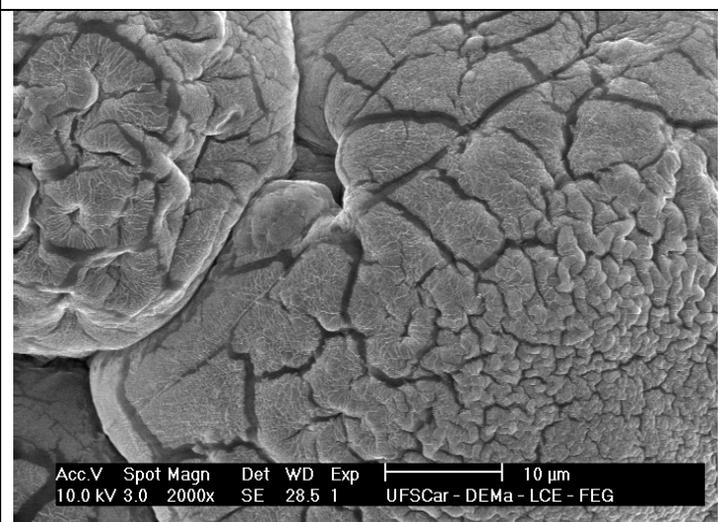
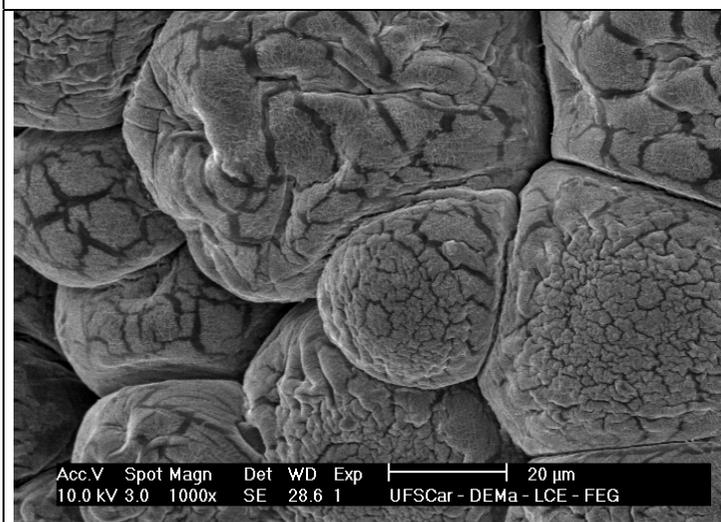
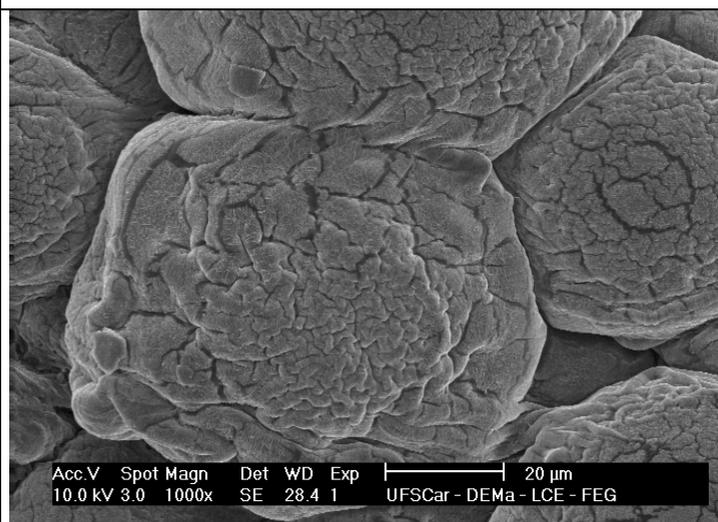
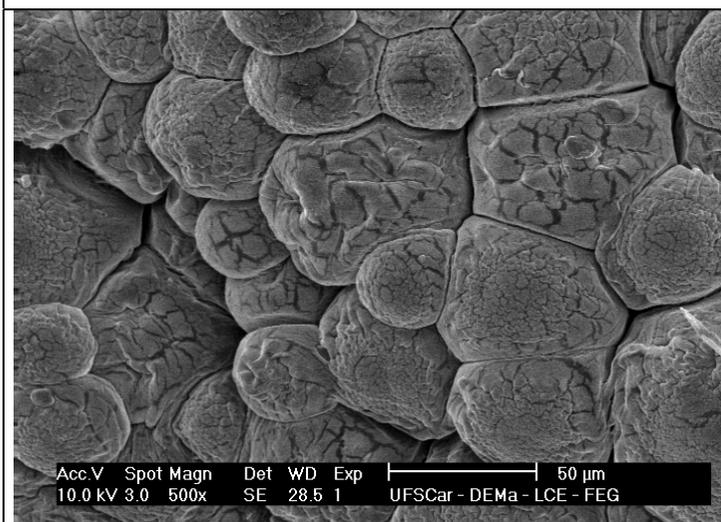
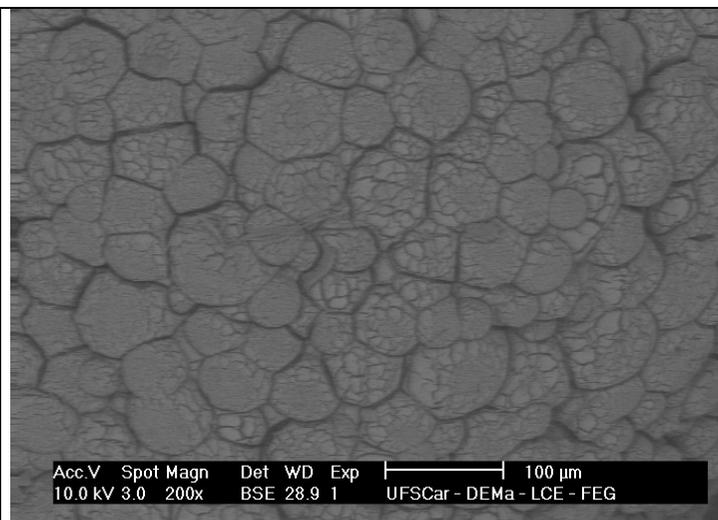
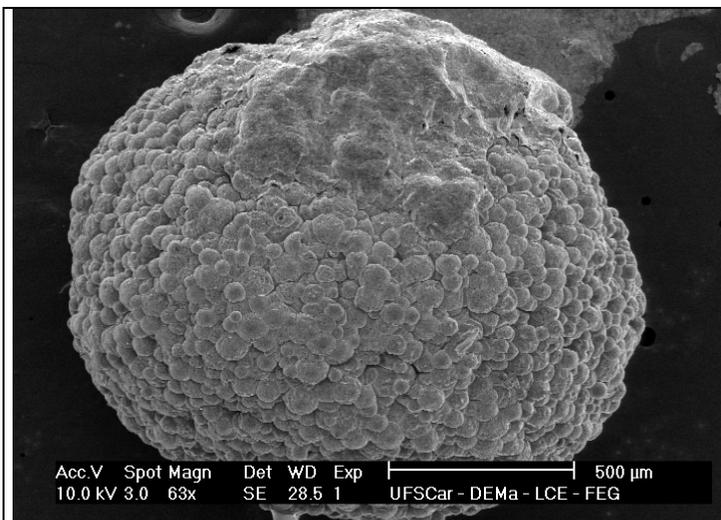
Figura A9 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido do produto de síntese do éster etílico de fenilglicina.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto da síntese do éster isopropílico de fenilglicina (Figura A10), apresentam um multiplete entre 7.26 e 7.51 ppm, referente aos hidrogênios do anel aromático, um multiplete entre 5.01 e 5.04 ppm, referente aos hidrogênios do grupo CH do radical isopropil e do carbono  $\alpha$  do grupamento amina, além de dois dupletos em 1.23 e 1.07 ppm referente às metilas do grupo isopropil.

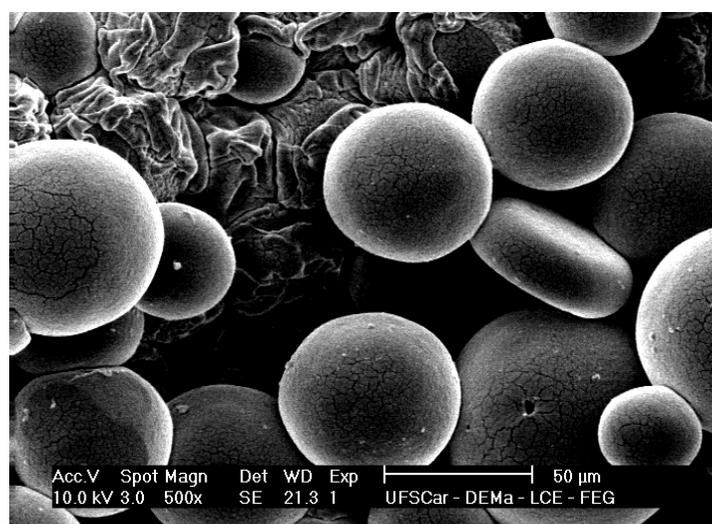
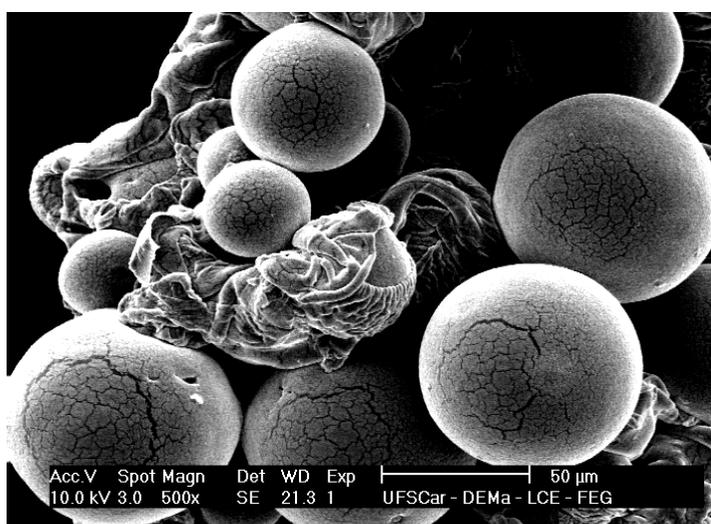
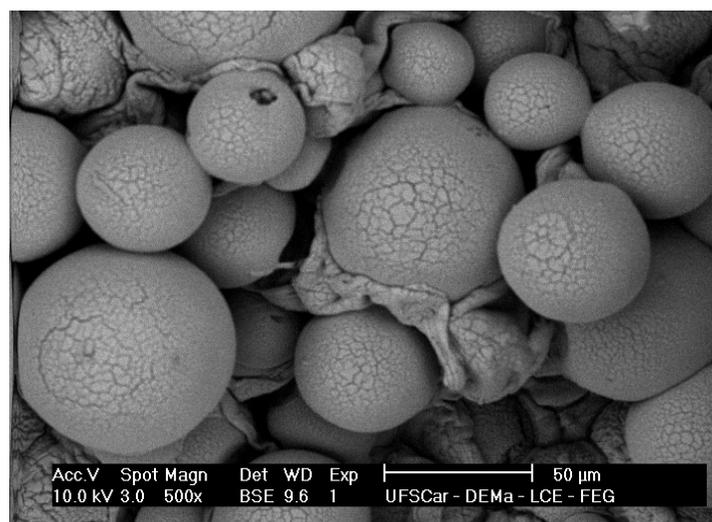
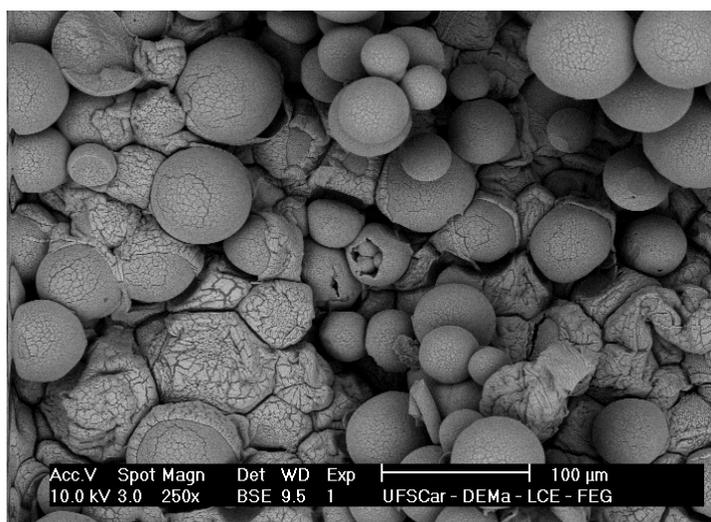
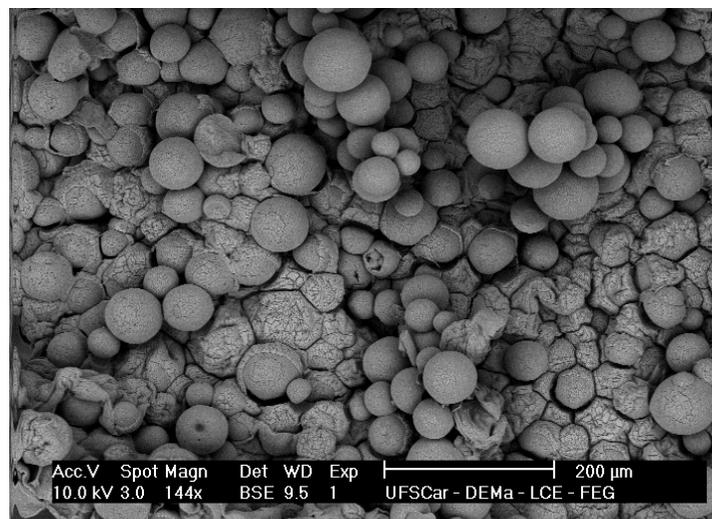
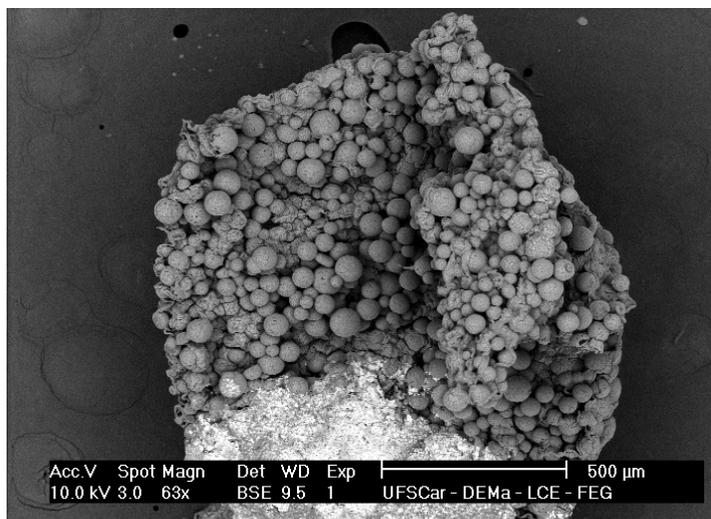


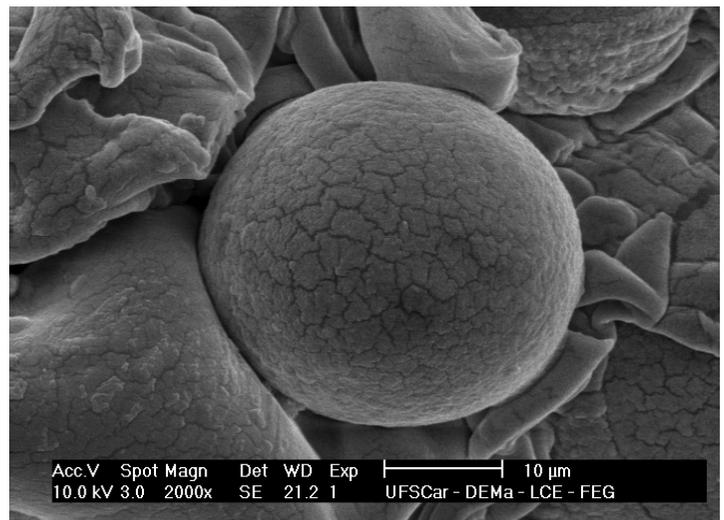
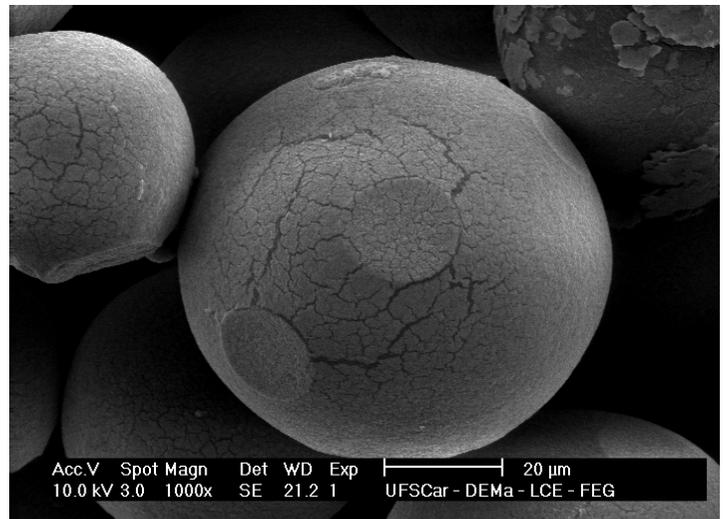
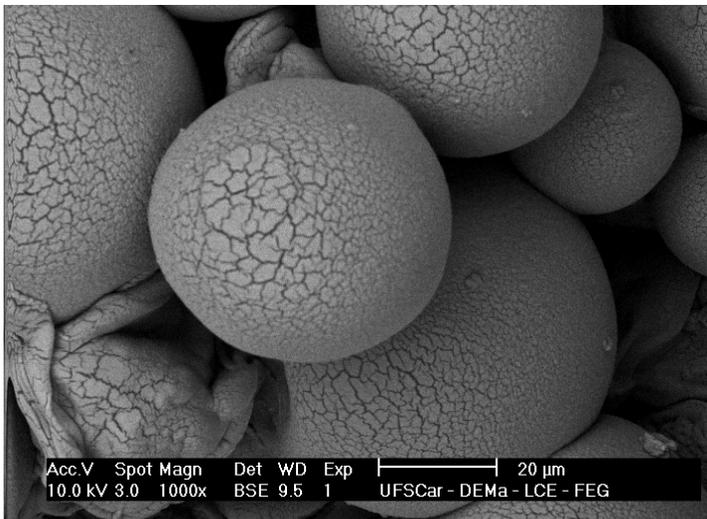
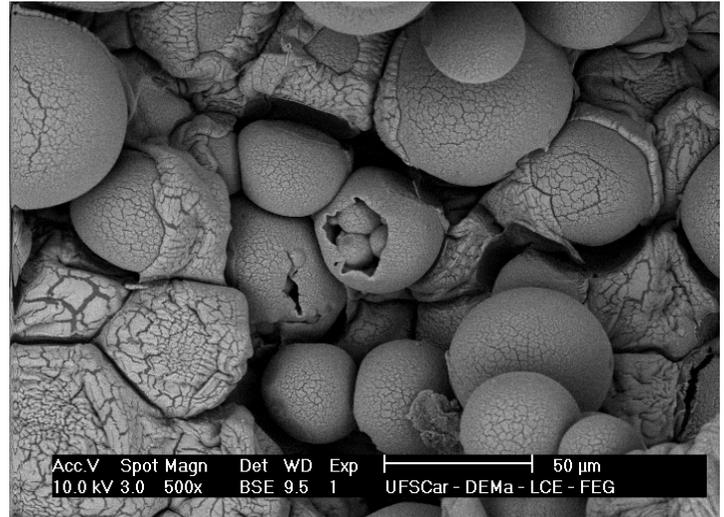
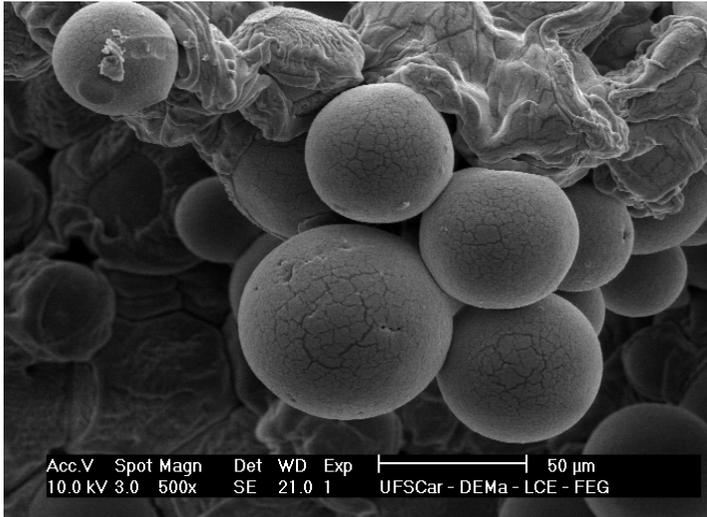
APÊNDICE B

B.1 - MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV) - PARTÍCULA INTEIRA ANTES DAS SÍNTESES

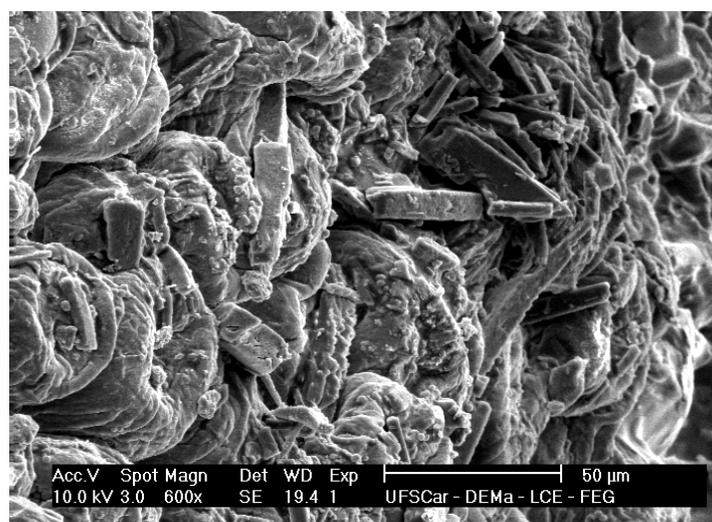
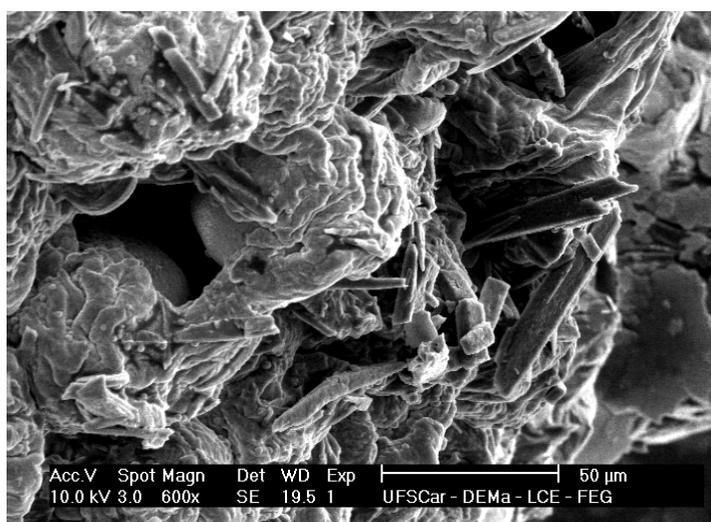
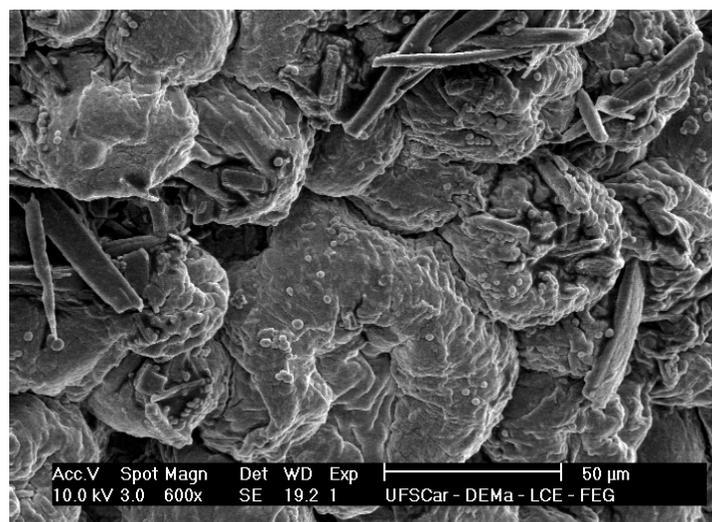
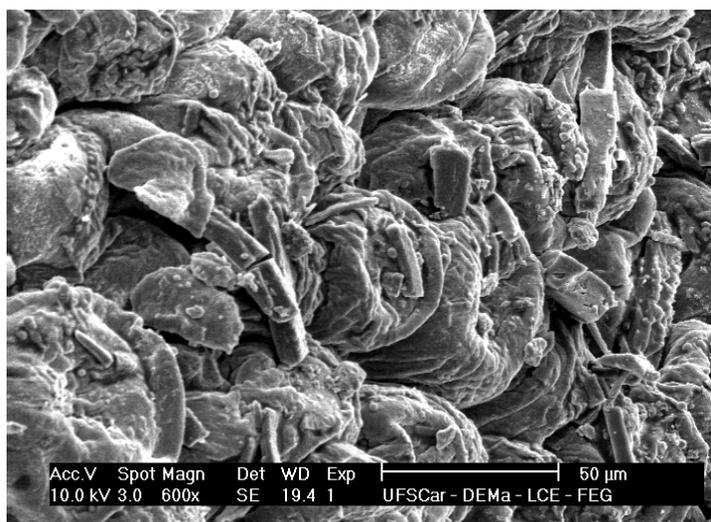
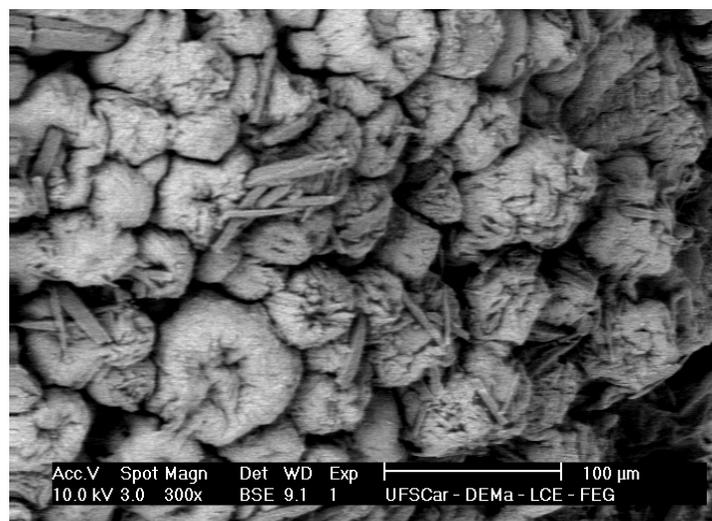
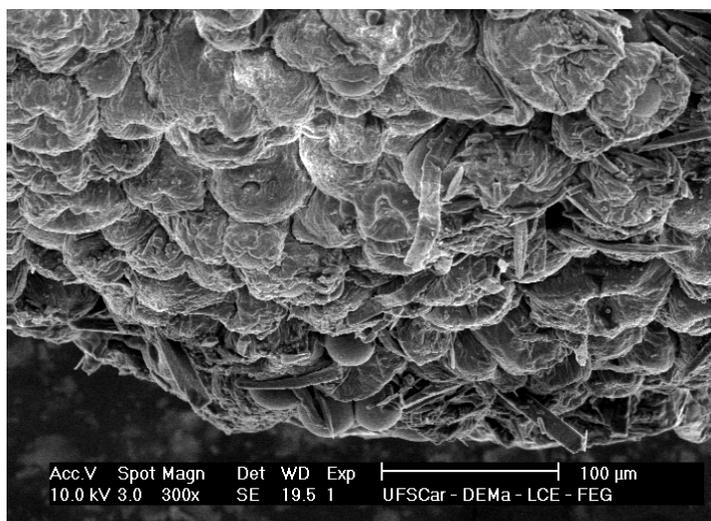


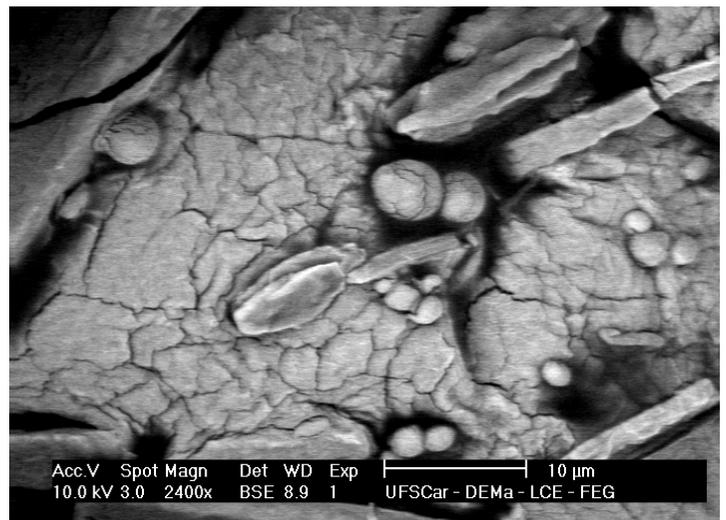
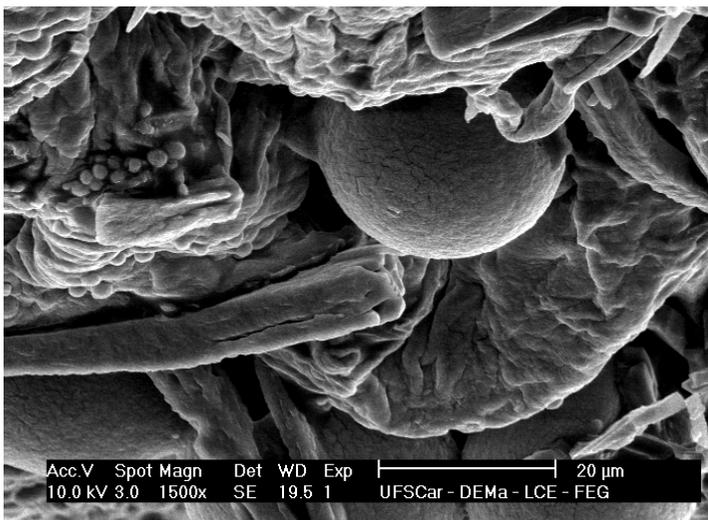
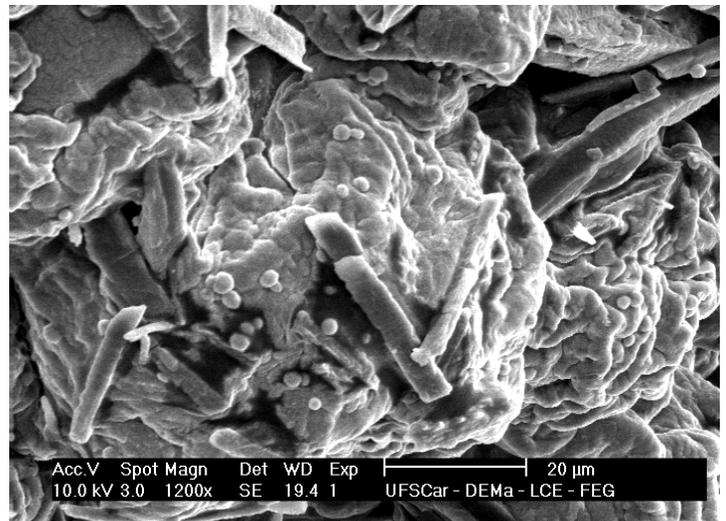
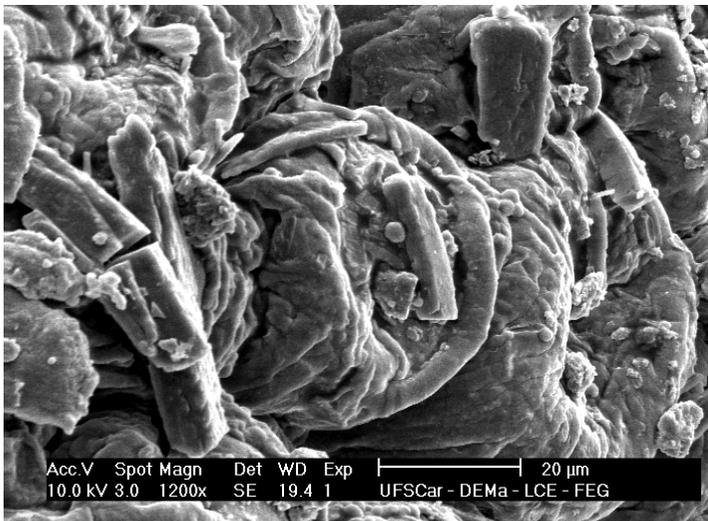
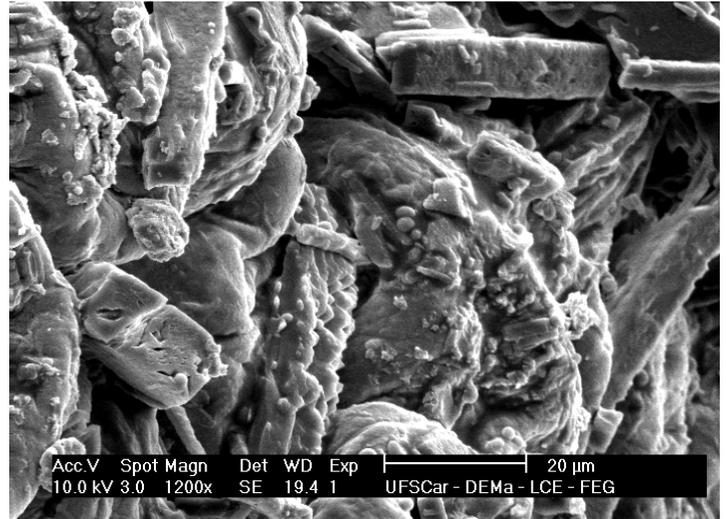
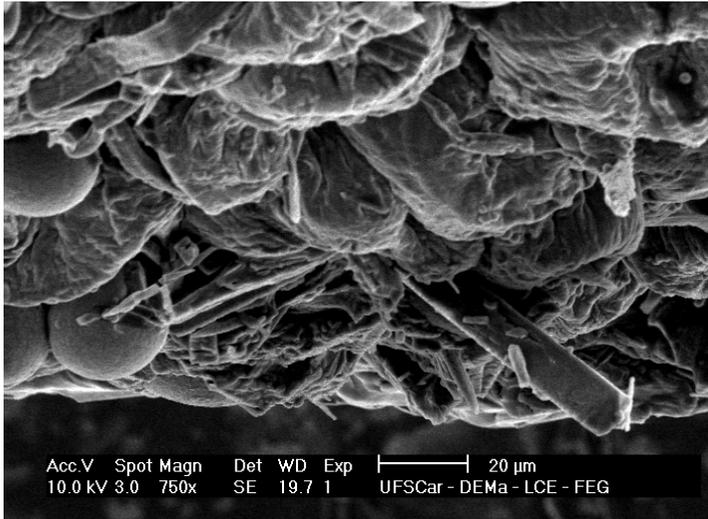
**B.2 - MICROSCOPIA ELETRONICA E VARREDURA (MEV) – CORTE DA PARTÍCULA ANTES DAS SÍNTESES**

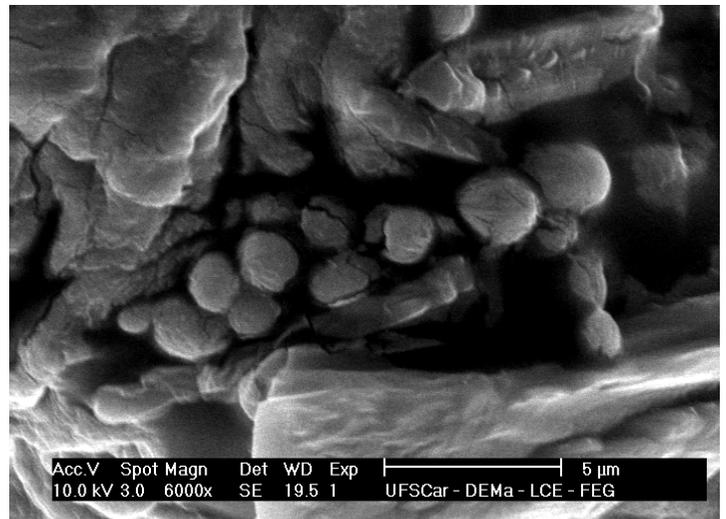
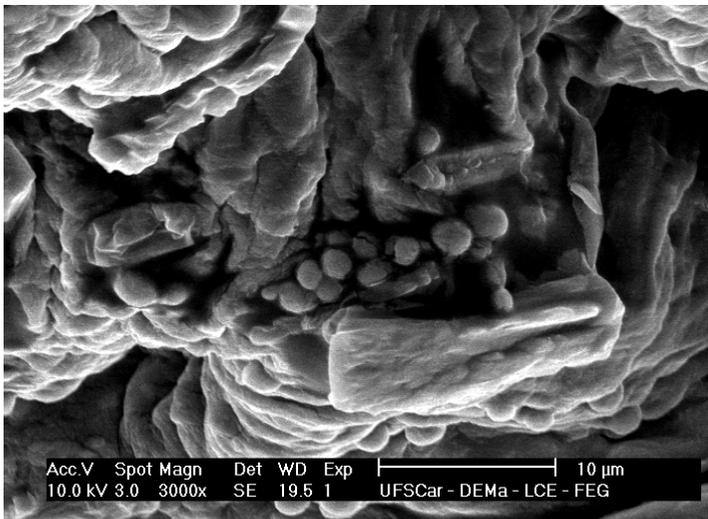
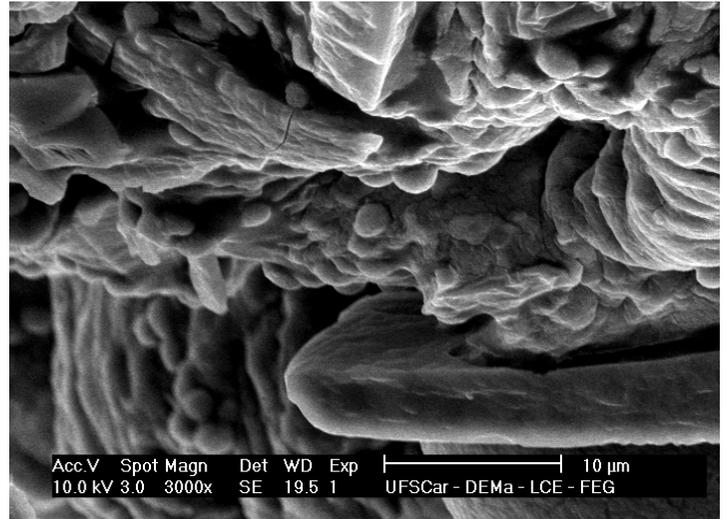




**B.3 - MICROSCOPIA ELETRONICA E VARREDURA (MEV) –PARTÍCULA INTEIRA APÓS SÍNTESE**







**B.4 - MICROSCOPIA ELETRONICA E VARREDURA (MEV) – CORTE DA PARTÍCULA APÓS SÍNTESES**

