

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

**SANDRA CERQUEIRA PEREIRA**

**INOVAÇÕES NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE**  
**AMOXICILINA**

**SÃO CARLOS**

**2012**

**SANDRA CERQUEIRA PEREIRA**

**INOVAÇÕES NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE  
AMOXICILINA**

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**

**2012**

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

P436is      Pereira, Sandra Cerqueira.  
              Inovações na síntese enzimática de amoxicilina / Sandra  
              Cerqueira Pereira. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
              162 f.

              Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
              2012.

              1. Biotecnologia. 2. Penicilina G acilase. 3. Amoxicilina. 4.  
              Síntese enzimática. 5. Líquidos iônicos. 6. Processo  
              integrado verde. I. Título.

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

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **SANDRA CERQUEIRA PEREIRA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 27 DE ABRIL DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:



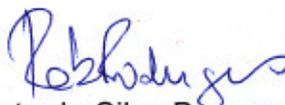
Roberto de Campos Giordano  
**Orientador / UFSCar**



Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro  
**UFSJ**



Marcelo Fernandes Vieira  
**UEM**



Roberta da Silva Bussamara Rodrigues  
**UFRGS**



Paulo Waldir Tardioli  
**UFSCar**

*Aos meus amados pais, Osório e Olga, exemplos de vida, integridade e sabedoria, meus eternos educadores, iluminaram meu caminho ensinando que a mais importante forma de se viver é através da infindável busca pelo conhecimento,*

***MINHA HOMENAGEM***

*À minha família e aos amigos, pelo apoio, generosidade e compreensão, com carinho,*

***OFEREÇO E DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por ter me proporcionado a felicidade de concluir este trabalho e por ter me acolhido com um amor imensurável nos momentos em que mais precisei;*

*Aos meus pais, Osório e Olga, meus irmãos, Leonardo e Soraia, minha “tia-mãe”, Maria da Pena, meu avô, Sebastião, e a toda família, pelo amor, incentivo, carinho e, sobretudo, pela compreensão nos momentos de ausência;*

*À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Engenharia Química, pela oportunidade de realização deste Doutorado;*

*A todos os professores do Departamento de Engenharia Química, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica e crescimento profissional, além de todos os funcionários que fazem parte deste feliz ambiente em que pude conviver;*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;*

*Ao professor Roberto de Campos Giordano, pela orientação, ensinamentos, estímulo e, especialmente, pela paciência e dedicação;*

*À professora Raquel de Lima Camargo Giordano, pela atenção e apoio absoluto;*

*Ao professor Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro, por ter me acompanhado nos primeiros passos dentro da Engenharia Química, como amigo e incentivador;*

*À professora Roberta Bussamara, pela generosidade e empenho ímpar, sempre presente mesmo à distância, fortalecendo não só o andamento da pesquisa científica como também os eternos laços de amizade;*

*Ao grupo de pesquisa do professor Jairton Dupont, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela cooperação para a realização deste trabalho e, em especial, à Graciane Marin;*

*Ao grupo de pesquisa da professora Silvana Mattedi, da Universidade Federal da Bahia, pela colaboração, especialmente, ao professor Miguel Iglesias.*

*A todos os professores, funcionários e estudantes do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelo aprendizado e incondicional disponibilidade de infraestrutura para a concretização deste Doutorado.*

*A todos os queridos amigos e compartes de trabalho, pelo incentivo em todos os momentos, trocas de conhecimento, convívio, carinho, pelas boas risadas e aventuras vividas.*

*Finalmente, agradeço a todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, seja direta ou indiretamente, com palavras de consolo e incentivo, ou trabalhando lado a lado na construção deste sonho que se realiza, a minha eterna e sincera gratidão.*

*“Quem vence sem riscos triunfa sem glórias”*

**AUGUSTO CURY**

## RESUMO

PEREIRA, Sandra Cerqueira, D.Sc., Universidade Federal de São Carlos, Abril de 2012. **Inovações na síntese enzimática de amoxicilina.** Orientador: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano.

Penicilina G acilase (PGA, E.C.3.5.1.11) de *Escherichia coli* é uma enzima de grande importância industrial, amplamente utilizada para a hidrólise de penicilina G, produzindo o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), que é uma molécula chave para a síntese de penicilinas semi-sintéticas, dentre elas, a amoxicilina, que possui um amplo espectro de ação contra uma variedade de infecções bacteriológicas. Industrialmente, a amoxicilina é produzida por meio de processos químicos, os quais requerem condições drásticas de reação, diversos passos de proteção e desproteção de grupos reativos para impedir reações hidrolíticas não seletivas, utilização de solventes organoclorados com geração de resíduos não recicláveis, que são tóxicos e nocivos ao meio ambiente. A síntese enzimática é uma alternativa mais interessante do ponto de vista ambiental e econômico. A tendência da indústria farmacêutica é o desenvolvimento de métodos enzimáticos para a produção destes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, incluindo a amoxicilina. Entretanto, um dos principais impedimentos para a sua implementação industrial é o rendimento limitado, em decorrência de reações laterais de hidrólise indesejáveis, que levam à formação do subproduto (*p*-hidroxifenilglicina, POHFG) durante todo o andamento da reação. Este inconveniente pode ser parcialmente evitado reduzindo a atividade da água ( $a_w$ ) no meio. Para esta finalidade, os líquidos iônicos (LIs) surgiram como uma alternativa aos meios orgânicos convencionais, devido à sua elevada estabilidade térmica e química, não inflamabilidade, fácil reciclagem e pressão de vapor desprezível. Neste contexto, este trabalho pesquisou o desenvolvimento de um processo integrado “verde” para a recuperação, reutilização e reciclo do subproduto (POHFG) da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina, empregando PGA imobilizada em Sepabeads® em um meio de reação totalmente aquoso (tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5), e avaliou a atividade catalítica deste biocatalisador na presença de diferentes LIs como cossolventes para estas reações sintéticas, em termos de seletividade (síntese/hidrólise, relação S/H) e conversão do substrato ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). A recuperação do subproduto (POHFG) da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meio totalmente aquoso foi realizada eficientemente, atingindo uma pureza final de 99% para a POHFG, a qual foi reutilizada com sucesso para a produção do substrato éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG), atingindo uma conversão de 93%. Em seguida, o EEPOHFG foi reciclado ao reator (sem qualquer purificação adicional) para outra batelada de síntese enzimática de amoxicilina, seguindo o perfil característico que é esperado para estas reações sintéticas. Este processo integrado “verde” gerou como resíduo o sal cloreto de sódio (NaCl) que é inerte e inofensivo. Além disso, a avaliação da utilização de LIs como cossolventes para as reações de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina apresentou resultados promissores. Um acréscimo de 400% na seletividade foi observado para as reações realizadas na presença de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF<sub>6</sub>), como cossolvente na concentração de 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) em relação à reação padrão realizada em meio totalmente aquoso. De maneira similar, este número alcançou mais do que 350% para as reações conduzidas em bis(trifluormetilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.NTf<sub>2</sub>) na mesma fração volumétrica, enquanto que para tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.BF<sub>4</sub>) houve apenas um ligeiro aumento na seletividade (cerca de 57%). A mais elevada conversão de 6-APA foi obtida empregando BMI.NTf<sub>2</sub> como cossolvente na

concentração de 71% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ), representando um aumento de mais do que 36% em comparação à reação padrão aquosa. Nenhuma desativação da enzima foi observada após as reações em qualquer um dos LIs, e a integridade física das partículas do biocatalisador foi integralmente mantida. Os resultados deste trabalho colaboraram para o avanço no estudo da síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas através do emprego de tecnologias mais “verdes”.

**Palavras-chave:** Penicilina G Acilase. Amoxicilina. Síntese Enzimática. Líquidos Iônicos. Processo Integrado “Verde”.

## ABSTRACT

PEREIRA, Sandra Cerqueira, D.Sc., Federal University of São Carlos, April of 2012. **Innovations in the enzymatic synthesis of amoxicillin**. Advisor: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano.

Penicillin G acylase (PGA, E.C.3.5.1.11) from *Escherichia coli* is an enzyme of great industrial importance, widely used for the hydrolysis of penicillin G, producing the 6-aminopenicillanic acid (6-APA), which is a key molecule for the synthesis of semi-synthetic penicillins. Among them, amoxicillin has a broad spectrum of activity against a variety of bacteriological infections. Industrially, amoxicillin is produced by chemical processes, which require drastic reaction conditions, several steps of protection and deprotection of reactive groups in order to prevent non-selective hydrolytic reactions, use of organochloride solvents with non-recyclable waste generation, which are toxic and harmful to the environment. The enzymatic synthesis is a more attractive alternative from the environmental point of view and economic. The tendency of the pharmaceutical industry is the development of enzymatic methods to produce these  $\beta$ -lactam semi-synthetic antibiotics, including amoxicillin. Nevertheless, a major obstacle to its industrial implementation is the limited yield, as a consequence of undesirable hydrolytic side-reactions, which lead to the formation of the by-product (*p*-hydroxyphenylglycine, POHPG) throughout the course of the reaction. This drawback can be partially avoided by reducing the water activity ( $a_w$ ) in the medium. For this purpose, ionic liquids (ILs) have emerged as an alternative to conventional organic media due to their high thermal and chemical stability, non-flammability, easy recycling, and negligible vapor pressure. Within this context, this work researched the development of an integrated “green” process for the recovery, reuse and recycle of the by-product (POHPG) of the kinetically controlled enzymatic synthesis of amoxicillin, employing PGA immobilized on Sepabeads® in a totally aqueous medium reaction (sodium phosphate buffer 100 mM, pH 6.5), and assessed the catalytic activity of this biocatalyst in the presence of different ILs as cosolvents for these synthetic reactions, in terms of selectivity (synthesis/hydrolysis, S/H ratio) and conversion of the substrate 6-aminopenicillanic acid (6-APA). The recovery of the by-product (POHPG) of the kinetically controlled enzymatic synthesis of amoxicillin in a totally aqueous reaction medium was done efficiently, achieving a final purity of 99% for the POHPG, which was successfully reused for the production of the substrate *p*-hydroxyphenylglycine ethyl ester (POHPGEE), achieving a conversion of 93%. Then, POHPGEE was recycled to the reactor (without any further purification) for another batch of enzymatic synthesis of amoxicillin, following the characteristic profile that is expected for these synthetic reactions. This integrated “green” process generated sodium chloride (NaCl) as waste, which is an inert and harmless salt. Moreover, the assessment of the use of ILs as cosolvents for the reactions of kinetically controlled enzymatic synthesis of amoxicillin presented promising results. An increase of 400% in the selectivity was observed for the reactions carried out in the presence of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMI.PF<sub>6</sub>), as cosolvent at a concentration of 75% ( $V_{IL}/V_{WATER}$ ) in relation to the standard reaction performed in totally aqueous medium. Similarly, this figure reached more than 350% for reactions conducted in 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide (BMI.NTf<sub>2</sub>) at the same volume fraction, while for 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMI.BF<sub>4</sub>) there was only a slight increase in selectivity (about 57%). The highest conversion of 6-APA was achieved using BMI.NTf<sub>2</sub> as cosolvent at a concentration of

71% ( $V_{IL}/V_{WATER}$ ), representing an increase of more than 36% compared to standard aqueous reaction. No deactivation of the enzyme was observed after the reactions in any of the ILs, and the physical integrity of the biocatalyst particles was entirely maintained. The results of this work collaborated for the advance in the study of the enzymatic synthesis of semi-synthetic penicillins through the use of technologies more “green”.

**Keywords:** Penicillin G Acylase. Amoxicillin. Enzymatic Synthesis. Ionic Liquids. Integrated “Green” Process.

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>14</b>
1.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	18
1.1.1. <i>Objetivos Específicos</i> .....	19
1.2. <i>Organização do Trabalho</i> .....	19
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>22</b>
2.1. <i>Antibióticos <math>\beta</math>-Lactâmicos</i> .....	22
2.1.1. <i>Penicilinas Naturais</i> .....	25
2.1.2. <i>Penicilinas Semi-Sintéticas</i> .....	26
2.1.2.1. <i>Amoxicilina</i> .....	27
2.2. <i>Produção de Antibióticos <math>\beta</math>-Lactâmicos</i> .....	28
2.3. <i>Enzimas: Catalisadores Biológicos</i> .....	29
2.3.1. <i>Penicilina G Acilase</i> .....	30
2.3.2. <i>Imobilização de Enzimas</i> .....	34
2.4. <i>Síntese Enzimática de Antibióticos <math>\beta</math>-Lactâmicos</i> .....	38
2.4.1. <i>Síntese Termodinamicamente Controlada</i> .....	39
2.4.2. <i>Síntese Cineticamente Controlada</i> .....	40
2.4.2.1. <i>Otimização da Síntese Enzimática de Antibióticos <math>\beta</math>-Lactâmicos</i> .....	42
2.5. <i>Solventes Orgânicos</i> .....	43
2.5.1. <i>Penicilina G Acilase em Meios Orgânicos</i> .....	45
2.6. <i>Líquidos Iônicos</i> .....	50
2.6.1. <i>Líquidos Iônicos em Reações Enzimáticas</i> .....	53
2.6.1.1. <i>Penicilina G Acilase em Líquidos Iônicos</i> .....	55
2.6.2. <i>Toxicidade dos Líquidos Iônicos</i> .....	58
2.6.3. <i>Líquidos Iônicos Próticos</i> .....	61
2.7. <i>Outras abordagens</i> .....	62
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>66</b>
3.1. <i>Introdução</i> .....	66
3.2. <i>Materiais e Métodos</i> .....	67

3.2.1. Enzima, Reagentes e Outros Materiais de Consumo .....	67
3.2.2. Equipamentos e Afins .....	68
3.2.3. Procedimento Experimental .....	69
3.2.3.1. Recuperação da <i>p</i> -Hidroxifenilglicina .....	69
3.2.3.2. Síntese do Éster Etílico da <i>p</i> -Hidroxifenilglicina.....	70
3.2.3.3. Caracterização do Éster Etílico da <i>p</i> -Hidroxifenilglicina .....	73
3.2.3.3.1. Dados Espectrais do Éster Etílico da <i>p</i> -Hidroxifenilglicina .....	75
3.2.3.4. Atividade Enzimática .....	75
3.2.3.5. Síntese Enzimática de Amoxicilina em Meio Aquoso .....	75
3.2.3.6. Método Analítico .....	76
3.3. Resultados e Discussão .....	77
3.3.1. Recuperação da <i>p</i> -Hidroxifenilglicina.....	77
3.3.2. Síntese do Éster Etílico da <i>p</i> -Hidroxifenilglicina.....	81
3.3.3. Caracterização do Éster Etílico da <i>p</i> -Hidroxifenilglicina.....	83
3.3.4. Reciclo do Subproduto ao Reator de Síntese de Amoxicilina .....	92
3.4. Conclusões .....	95

## **CAPÍTULO 4 .....**

4.1. Introdução .....	97
4.2. Materiais e Métodos.....	98
4.2.1. Enzima, Reagentes e Outros Materiais de Consumo .....	98
4.2.2. Equipamentos e Afins .....	100
4.2.3. Procedimento Experimental.....	101
4.2.3.1. Atividade Enzimática .....	101
4.2.3.1.1. Método do PDAB .....	101
4.2.3.1.2. Método do NIPAB .....	103
4.2.3.2. Estabilidade Enzimática .....	104
4.2.3.2.1. Estabilidade de PGA-SEPABEADS em BMI.PF <sub>6</sub> .....	104
4.2.3.2.2. Estabilidade de PGA-SEPABEADS em Meio Aquoso .....	105
4.2.3.2.3. Estabilidade de PGA-LIVRE em BMI.PF <sub>6</sub> .....	106
4.2.3.3. Estabilidade dos Substratos.....	106
4.2.3.4. Síntese de Amoxicilina.....	108
4.2.3.5. Índices de Desempenho da Reação .....	110

4.2.3.6. Atividade Termodinâmica da Água .....	110
4.2.3.7. Viscosidade .....	111
4.2.3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura .....	111
4.2.3.9. Método Analítico .....	111
4.2.3.9.1. Líquidos Iônicos Apróticos .....	112
4.2.3.9.2. Líquidos Iônicos Próticos .....	112
4.3. Resultados e Discussão .....	112
4.3.1. Estabilidade Enzimática.....	112
3.3.2. Estabilidade dos Substratos .....	119
3.3.3. Síntese de Amoxicilina.....	122
4.4. Conclusões .....	138
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>140</b>
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>143</b>
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>146</b>

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Em 1928, o microbiologista escocês Alexander Fleming conseguiu identificar um fungo do gênero *Penicillium* capaz de produzir uma substância que impedia o crescimento das culturas de *Staphylococcus* (Muñiz *et al.*, 2007). Esta substância recebeu o nome de penicilina (Kong *et al.*, 2010). O descobrimento da penicilina é um marco na história da humanidade, já que foi o primeiro antibiótico que apresentou uso prático no ser humano (Demain & Elander, 1999). A necessidade de agentes quimioterápicos durante o período da Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945) alavancou a produção de penicilina, o que deu origem a uma nova era para a medicina – a era dos antibióticos.

As penicilinas são uma importante classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, caracterizados pela presença de um grupamento químico denominado anel  $\beta$ -lactâmico. A fusão de um anel tiazolidina a este anel  $\beta$ -lactâmico dá origem a um núcleo  $\beta$ -lactâmico que é comum a todas as penicilinas, chamado de ácido 6-amino penicilânico, 6-APA (Pelczar Jr. *et al.*, 1996; Menezes *et al.*, 2000). A integridade deste núcleo  $\beta$ -lactâmico é fundamental para a eficácia biológica do antibiótico, enquanto a cadeia lateral é determinante para as características específicas do fármaco, tais como seu espectro de atividade antibacteriano, seu grau de estabilidade frente a condições ácidas, seu nível de sensibilidade na presença de enzimas penicilinases e suas propriedades farmacocinéticas (Korolkovas & de França, 2000).

As penicilinas que são diretamente sintetizadas por microrganismos são denominadas penicilinas naturais, por exemplo, a penicilina G (Nielson *et al.*, 1995). Em 1957, o 6-APA foi descoberto, possibilitando a síntese de novos tipos de penicilinas não encontradas na natureza, denominadas penicilinas semi-sintéticas (Rolinson & Geddes, 2007). Alta eficácia, baixa toxicidade, maior espectro de ação, maior facilidade de absorção pelo organismo e resistência ao suco gástrico, são as principais vantagens das penicilinas semi-sintéticas em comparação às penicilinas naturais. Além disso, as penicilinas naturais são mais sensíveis à degradação enzimática pelas penicilinases, conhecidas como  $\beta$ -lactamases (Wang *et al.*, 1999).

Amoxicilina é o nome popularmente conhecido para o antibiótico  $\beta$ -lactâmico ácido 6-[D(-)- $\alpha$ -amino-*p*-hidroxifenilacetamido] penicilânico, inicialmente apresentado pela patente Britânica nº 1.382.409 (*apud* Ward, 1987). Trata-se de uma importante penicilina semi-sintética que ocupa uma posição de destaque entre os antibióticos mais amplamente receitados na prática médica, devido ao seu amplo espectro de atividade contra uma grande variedade de infecções bacteriológicas, elevada taxa de absorção e ótima estabilidade sob condições ácidas, possibilitando sua administração por via oral (Louwrier & Knoelest, 1997).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos estão entre os produtos farmacêuticos mais aplicados clinicamente, constituindo um dos mais importantes mercados biotecnológicos do mundo (Kurochkina *et al.*, 2011). A produção industrial destes antibióticos é realizada por meio de processos químicos que requerem diversas etapas de proteção e desproteção de grupos reativos com a utilização de solventes organoclorados, que são tóxicos e de difícil manejo, gerando resíduos não recicláveis e prejudiciais ao meio ambiente (Ospina *et al.*, 1996; Bruggink *et al.*, 1998; Youshko *et al.*, 2002). Ademais, o processo químico necessita de temperatura baixa (-30 °C), acarretando um longo tempo de reação.

A síntese química de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos apresenta elevados rendimentos. Entretanto, esta prática industrial tem sido restrita a países cuja regulamentação ambiental ainda não é tão rigorosa. Na atualidade, o Brasil importa inteiramente os princípios ativos destes medicamentos. Dados anunciados pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (MDIC) mostraram que as importações brasileiras de ampicilina e amoxicilina alcançaram 37 milhões de dólares em 2011, e a amoxicilina é responsável por mais de 93% desse montante, apontando o grande valor da amoxicilina não só para a área da saúde como também para a economia do Brasil (<http://aliceweb.mdic.gov.br>).

A conscientização da necessidade de utilização de tecnologias sustentáveis e a criação de leis de proteção ambientais mais rígidas têm conduzido à procura por rotas alternativas para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, e a tendência da indústria farmacêutica é o desenvolvimento de procedimentos de catálise enzimática neste setor (Egorov *et al.*, 2000). A síntese enzimática destes antibióticos é conhecida desde quando Cole (1969) descobriu que a enzima penicilina G acilase (PGA) também era capaz de catalisar a transferência de um grupo acil para o 6-APA. Contudo, a síntese enzimática ainda não é competitiva com os processos químicos convencionais (Giordano *et al.*, 2006).

A catálise da hidrólise de penicilina G para a produção de 6-APA é a aplicação industrial mais significativa da PGA (E.C.3.5.1.11), pois o 6-APA é uma molécula chave na produção de penicilinas semi-sintéticas (Arroyo *et al.*, 2003). Leveduras, bolores e bactérias produzem PGA. Mas, a mais utilizada é a PGA de *Escherichia coli* ATCC 11105 (Rajendhran & Gunasekaran, 2004). PGA é um heterodímero. A subunidade  $\beta$  (69 kDa, 557 aminoácidos) é responsável pela atividade catalítica e a subunidade  $\alpha$  (20,5 kDa, 209 aminoácidos) tem o papel de reconhecer a cadeia lateral do substrato (Böck *et al.*, 1983; Brüns *et al.*, 1985).

A síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, catalisada pela PGA, pode ser conduzida por meio de duas rotas. A síntese termodinamicamente controlada (STC) é a reação inversa à hidrólise do antibiótico e seu rendimento depende apenas da constante de equilíbrio termodinâmico do processo (Diender *et al.*, 1998). Para que a síntese ocorra, o grupo amino do 6-APA e o grupo carboxílico do doador acil necessitam estar neutros, entretanto, não existe um pH no qual estes substratos estariam majoritariamente nesta condição (Margolin *et al.*, 1980). Além disso, o equilíbrio da reação é fortemente deslocado no sentido da hidrólise do antibiótico em meio totalmente aquoso.

A síntese cineticamente controlada (SCC) demanda o uso de um derivado ativado do doador acil, por exemplo, um éster, contornando a necessidade do grupo carboxílico neutro, requerido pela STC (Fernández-Lafuente *et al.*, 1996). O substrato ativado reage com o núcleo  $\beta$ -lactâmico e o antibiótico é formado. Assim, a SCC é a rota mais factível para a produção enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. Em adição, o rendimento da SCC é resultado do balanço da cinética de três diferentes reações, todas catalisadas pela PGA, a síntese do antibiótico (atividade sintetase), a hidrólise do substrato ativado (atividade esterase) e a hidrólise do antibiótico recém sintetizado (atividade amidase).

A SCC de amoxicilina gera *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) e álcool (correspondente à cadeia lateral que foi empregada) como subprodutos continuamente formados durante a reação, como um resultado da ação hidrolase da PGA. Por este motivo, uma metodologia de recuperação e reutilização da POHFG para a síntese do substrato ativado (por exemplo, um éster) pode ser desenvolvida para possibilitar a reciclagem ao reator de síntese enzimática de amoxicilina. Vale ressaltar que o éster metílico é o substrato padrão utilizado para a síntese enzimática de amoxicilina. Contudo, o éster etílico é menos nocivo, porque o éster metílico além de gerar metanol durante a síntese do antibiótico também emprega metanol em seu próprio processo de produção, cuja toxicidade agrava o impacto desta rota. Já o etanol é um insumo mais “verde”.

O rendimento da reação é um dos critérios utilizados para avaliar o desempenho da SCC de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. Contudo, o rendimento em meio totalmente aquoso é limitado em decorrência das reações de hidrólise tanto do antibiótico quanto do substrato ativado, as quais se tornaram o principal obstáculo para a implementação industrial da síntese enzimática destes antibióticos (Gabor *et al.*, 2005). As reações hidrolíticas laterais podem ser parcialmente evitadas reduzindo a atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) do meio reacional. Logo, a maximização da seletividade (síntese/hidrólise, relação S/H) em direção ao antibiótico é um ponto chave para a economia do processo enzimático (Ribeiro *et al.*, 2005).

Uma maneira de minimizar as reações hidrolíticas laterais na SCC é a utilização de cossolventes orgânicos (Illanes *et al.*, 2003). Pesquisas sobre a síntese enzimática de diversos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos nestes meios têm sido intensamente realizadas, com a finalidade de buscar melhores rendimentos sintéticos e seletividades (Travascio *et al.*, 2002; Wei & Yang, 2003; Aguirre *et al.*, 2006; Chow *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009). Todavia, mesmo apresentando alguns bons resultados, os solventes orgânicos têm a desvantagem de serem voláteis, inflamáveis, comumente tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente, em oposição, portanto, à característica “verde” da catálise enzimática.

Neste cenário, os líquidos iônicos (LIs) têm surgido como solventes que podem substituir os meios orgânicos em vários processos biotecnológicos (Zhang *et al.*, 2011). LIs são sais orgânicos que existem como líquidos abaixo de uma temperatura limite, geralmente 100 °C (Quijano *et al.*, 2010). Estes materiais têm sido considerados como uma classe promissora de “solventes verdes”, especialmente devido à sua pressão de vapor desprezível

(Ranke *et al.*, 2007). Além disso, outras características como o fato de não serem materiais inflamáveis e oferecerem elevada estabilidade térmica e química também contribuem para esta peculiaridade “verde” dos LIs (Dupont, 2004; Jain *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2006).

LIs são tipicamente formados por cátions orgânicos combinados com uma variedade de ânions que apresentam uma carga negativa fortemente deslocalizada (Filice *et al.*, 2010). Os LIs constituídos pelo cátion imidazólio ( $IM^+$ ) são os mais aplicados em biotecnologia, principalmente aqueles baseados nos ânions hexafluorofosfato ( $PF_6^-$ ), tetrafluorborato ( $BF_4^-$ ) e bis(trifluorometilsulfonil)imida ( $NTf_2^-$ ) (Roosen *et al.*, 2008; Sureshkumar & Lee, 2009; Quijano *et al.*, 2010). Em adição, as propriedades físico-químicas dos LIs podem ser adaptadas pela escolha de diferentes combinações de cátions e ânions bem como dos grupos substituintes (Moniruzzaman *et al.*, 2010; Zhao, 2010).

Existem poucos dados bibliográficos sobre reações enzimáticas catalisadas pela PGA em LIs, a maioria envolve os processos catalisados por lipases (Gamba *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2009; Kobayashi, 2011). Entre as reações enzimáticas catalisadas pela PGA, Basso *et al.* (2005) reportaram que  $a_w$  deve ser próxima a 0,8 para garantir a atividade enzimática de PGA na presença de LIs. Em outro estudo, de los Ríos *et al.* (2007) relataram que o tempo de meia vida da PGA em LIs foi notavelmente melhor do que em isopropanol, sendo cerca de 2000 vezes maior, o que foi corroborado por Hernández-Fernández *et al.* (2009). Assim, o emprego de LIs na síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos pode ser uma alternativa promissora.

## 1.1. Objetivo Geral

A adoção da catálise enzimática e o uso de reagentes e solventes que podem contribuir para uma redução dos impactos ambientais fazem parte do escopo da química “verde”. Com esta motivação, esta tese de doutorado teve como objetivo avançar no estudo da síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, especificamente, amoxicilina, buscando contribuir na tentativa de tornar a rota enzimática industrialmente competitiva. Este estudo se integra a uma linha de pesquisa atualmente em andamento no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

### 1.1.1. Objetivos Específicos

**i.** Desenvolvimento de uma metodologia para realizar a recuperação do subproduto (*p*-hidroxifenilglicina) da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina a partir de uma mistura de cristais constituída por amoxicilina e *p*-hidroxifenilglicina.

**ii.** Reutilização do subproduto recuperado (*p*-hidroxifenilglicina) para a produção do substrato éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina, por meio de uma reação de esterificação, empregando etanol como o reagente em excesso.

**iii.** Identificação e caracterização do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina sintetizado por meio das técnicas espectrométricas de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas.

**iv.** Integração do processo de recuperação da *p*-hidroxifenilglicina através da subsequente reciclagem do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina para o reator de síntese enzimática de amoxicilina em meio totalmente aquoso.

**vi.** Investigação da estabilidade enzimática da PGA, na forma livre e imobilizada, na presença do líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, com a incubação do biocatalisador em diferentes temperaturas.

**vii.** Análise da viabilidade de utilização dos diversos tipos de líquidos iônicos, próticos e apróticos, através de testes de estabilidade dos substratos da síntese enzimática de amoxicilina na presença destes solventes.

**viii.** Avaliação da atividade catalítica da PGA na síntese cineticamente controlada de amoxicilina utilizando diferentes líquidos iônicos como cossolventes, sendo a reação em meio aquoso escolhida como referência para comparações de desempenho.

## 1.2. Organização do Trabalho

Esta tese de doutorado foi organizada em capítulos.

O capítulo 2, “Revisão Bibliográfica”, apresenta define antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, descrevendo suas informações estruturais, seu mecanismo de ação e sua importância, com destaque para amoxicilina, além do processo de produção industrial, mostrando as condições reacionais drásticas que são empregadas. Em seguida, os mecanismos de ação da PGA em meio aquoso, as técnicas de imobilização e os tipos de rotas enzimáticas são abordados. Posteriormente, os solventes orgânicos e os líquidos iônicos são apontados como cossolventes para a síntese de antibióticos, dando ênfase às implicações no processo enzimático. Outros aspectos importantes tais como: os avanços obtidos na síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e a toxicidade dos líquidos iônicos, são também comentados.

O capítulo 3, “Síntese Enzimática de Amoxicilina em Meio Totalmente Aquoso”, descreve os pontos avaliados para o desenvolvimento de uma metodologia integrada de reaproveitamento do subproduto que possa ser aplicada eficientemente na síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas. Este processo integrado “verde” abrangeu a recuperação do subproduto (*p*-hidroxifenilglicina) da síntese cineticamente controlada de amoxicilina a partir de uma mistura de cristais tipicamente constituída por amoxicilina e *p*-hidroxifenilglicina, seguida pela etapa de reutilização da *p*-hidroxifenilglicina para a produção de éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina, o qual foi subsequentemente reciclado ao reator de síntese enzimática para produção adicional de amoxicilina em meio de reação totalmente aquoso.

O capítulo 4, “Síntese Enzimática de Amoxicilina na Presença de Líquidos Iônicos”, apresenta todo o estudo que foi realizado para a utilização de líquidos iônicos como possíveis cossolventes no meio de reação para a síntese enzimática desta penicilina semi-sintética. Inicialmente, conduziu-se uma pesquisa da estabilidade da PGA em um dos líquidos iônicos mais amplamente utilizados em bioprocessos, o hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF<sub>6</sub>). Em seguida, foram realizados testes de estabilidade dos substratos desta reação enzimática na presença de diversos líquidos iônicos (próticos e apróticos). Finalmente, após esta pré-seleção de líquidos iônicos, avaliou-se a atividade catalítica da PGA na síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meios de reação contendo líquidos iônicos, em comparação à reação em meio totalmente aquoso, avaliando-se o desempenho em termos de seletividade e conversão.

O capítulo 5, “Conclusões Finais”, apresenta um resumo dos resultados mais importantes que foram encontrados nesta tese de doutorado.

O capítulo 6, “Propostas Futuras”, descreve algumas sugestões para dar continuidade ao presente trabalho de doutoramento.

E por fim, no capítulo 7, “Referências Bibliográficas”, estão incluídas todas as citações que foram indicadas no decorrer dos capítulos anteriores.

# CAPÍTULO 2

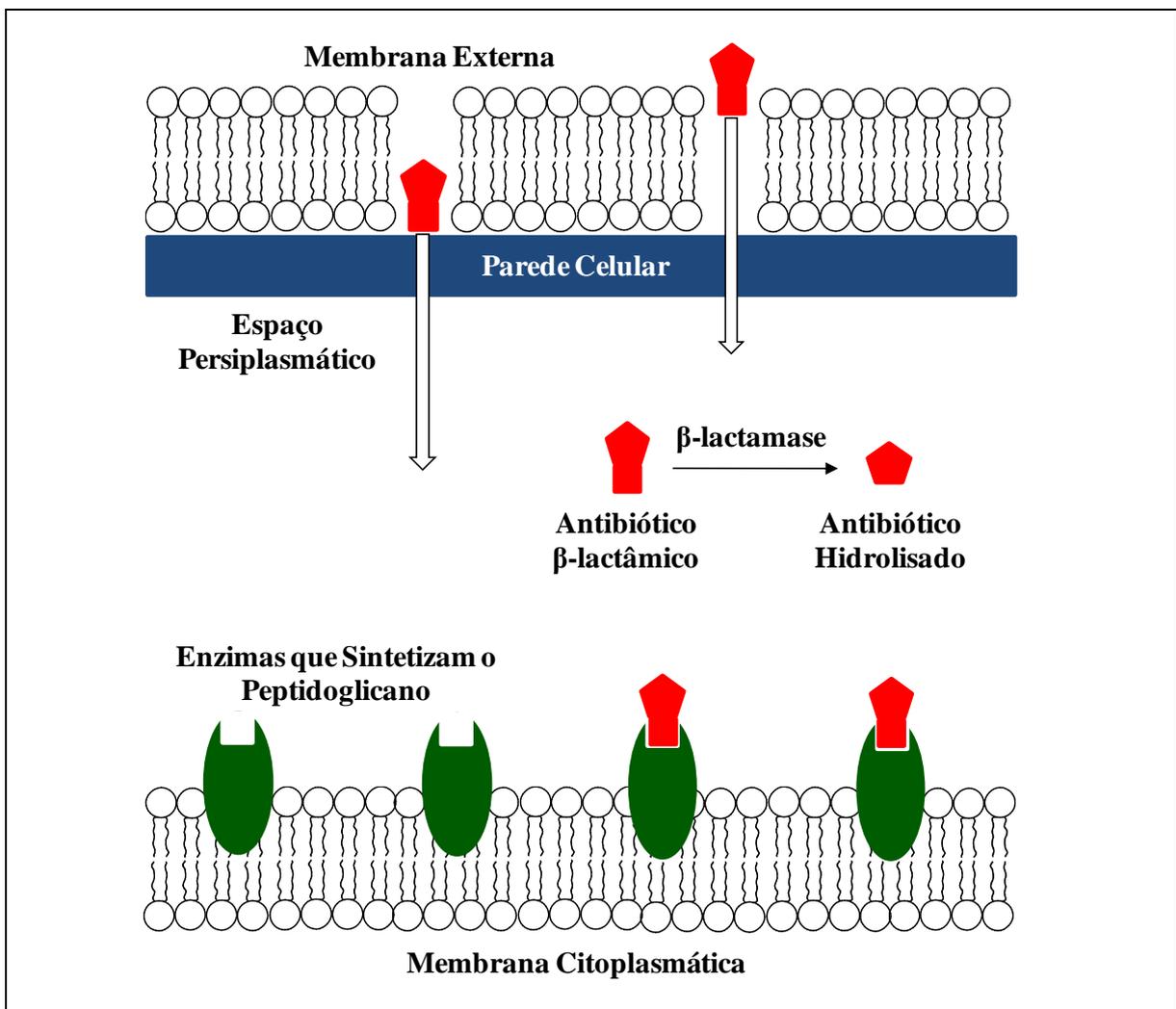
## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo é composto por uma revisão da literatura sobre os principais aspectos que estão relacionados à síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, buscando um melhor entendimento do contexto em que se insere este trabalho.

### 2.1. Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos

Os antibióticos são substâncias químicas específicas produzidas por organismos vivos, bem como seus análogos estruturais obtidos por síntese ou semi-síntese, que são capazes de inibir, em concentrações baixas, os processos vitais de uma ou mais espécies de microorganismos (Korolkovas & de França, 2000). São utilizados para várias finalidades, principalmente no tratamento de moléstias infecciosas (Santana, 2006; Guimarães *et al.*, 2010). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são caracterizados pela presença de um grupamento químico denominado anel  $\beta$ -lactâmico, que é composto por três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. Nesta categoria de antibióticos encontram-se as penicilinas e as cefalosporinas (Korolkovas & de França, 2000).

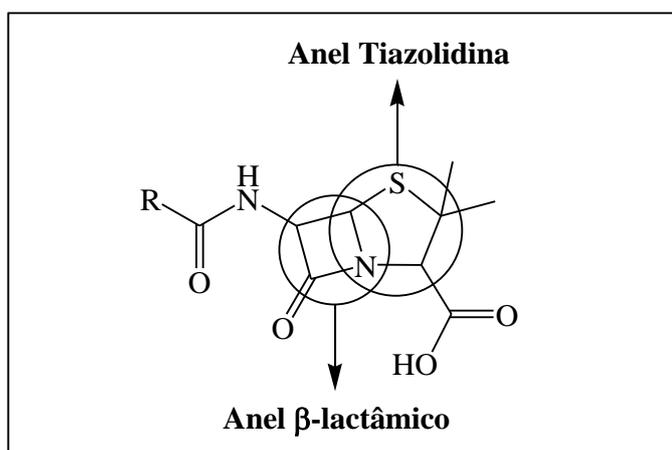
Estes fármacos exercem sua função bactericida inibindo a ação da transpeptidase, enzima bacteriana que catalisa a biossíntese da última etapa da formação das paredes celulares rígidas, conforme mostra a Figura 2.1 (Polderman-Tijmes, 2004). Em resultado, a pressão osmótica do citoplasma causa ruptura desta parede e morte subsequente do microrganismo (Wang *et al.*, 1999). O anel  $\beta$ -lactâmico intacto é essencial para a atividade biológica, ao passo que a cadeia lateral determina o espectro de ação antibacteriano, a sensibilidade do antibiótico aos ácidos e às enzimas  $\beta$ -lactamases e suas propriedades farmacocinéticas (Korolkovas & de França, 2000).



**Figura 2.1.** Representação esquemática da ação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram negativas, adaptado de Wang *et al.* (1999). Estes fármacos se difundem através da membrana externa e causam inativação de enzimas transpeptidases, que estão envolvidas na biossíntese da parede celular. Adicionalmente, observa-se a ação de enzimas  $\beta$ -lactamases, que tornam o antibiótico ineficaz.

A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico que encontrou uso prático no ser humano, é creditada ao microbiologista escocês Alexander Fleming no ano de 1928 (Demain & Elander, 1999). Fleming conseguiu identificar um fungo do gênero *Penicillium* capaz de produzir uma substância que inibia o crescimento de suas culturas de *Staphylococcus* (Muñiz *et al.*, 2007). Esta substância recebeu o nome em função dos microrganismos que lhe deram origem, chamando-se assim penicilina (Kong *et al.*, 2010). Durante a Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945), a demanda de agentes quimioterápicos impulsionou a produção de penicilina, iniciando-se uma nova era para a medicina – a era dos antibióticos.

Penicilinas são antibióticos  $\beta$ -lactâmicos caracterizados pela presença de um anel tiazolidina fundido ao anel  $\beta$ -lactâmico, ao qual se liga por sua vez à cadeia lateral (Pelczar Jr. *et al.*, 1996). A fusão destes dois anéis dá origem a um núcleo que é comum a todas as penicilinas, o ácido 6-amino penicilânico, 6-APA (Menezes *et al.*, 2000). Quaisquer alterações químicas neste núcleo  $\beta$ -lactâmico podem ocasionar a inativação do antibiótico (Korolkovas & de França, 2000; Gonçalves, 2001). A fórmula estrutural das penicilinas foi determinada no ano de 1940 por Dorothy Crowfoot Hodgkin, e sua composição química geral está ilustrada na Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Estrutura química geral de todas as penicilinas, indicando o anel  $\beta$ -lactâmico e o anel tiazolidina, que juntos constituem o agente antibiótico, também conhecido como núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos estão entre os antibióticos mais utilizados clinicamente, tanto na medicina humana quanto na veterinária, representando um dos principais mercados biotecnológicos do mundo (Ghosh *et al.*, 1996; Kurochkina *et al.*, 2011). O desenvolvimento

do mercado mundial de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos tem sido significativo, totalizando 45.000 toneladas em 2000 em comparação às 4.000 toneladas comercializadas em 1970 (Bruggink & Roy, 2001). Estes produtos compõem aproximadamente 65% do comércio total de antibióticos, com vendas anuais de aproximadamente 15 bilhões de dólares, dos quais cerca de 5 bilhões de dólares são devidos às penicilinas (Elander, 2003).

Nos dias de hoje, o Brasil importa integralmente os princípios ativos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com uma contribuição crescente da China e Índia como os principais países fornecedores, restando aos laboratórios aqui instalados formular o medicamento e/ou envasá-los, além da distribuição do produto final no mercado. Informações fornecidas pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio, MDIC (<http://aliceweb.mdic.gov.br>) mostram que as importações brasileiras de ampicilina e amoxicilina alcançaram um valor de 37 milhões de dólares somente no ano de 2011, com a amoxicilina correspondendo a mais de 93% desse total, como pode ser visto pela Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Importação brasileira de ampicilina e amoxicilina (<http://aliceweb.mdic.gov.br>).

ANO	AMPICILINA		AMOXICILINA	
	MILHÕES (\$)	TONELADAS	MILHÕES (\$)	TONELADAS
2007	1,7	40,5	20,0	701,6
2008	3,0	48,8	24,0	703,8
2009	3,5	83,1	22,5	733,9
2010	2,6	58,1	37,9	841,1
2011	2,3	44,7	34,7	1161,6

### 2.1.1. Penicilinas Naturais

As penicilinas sintetizadas por microrganismos são denominadas penicilinas naturais. Estes antibióticos são produzidos por certas espécies de fungos do gênero *Penicillium*

(Nielson *et al.*, 1995). As mais importantes são a penicilina G e a penicilina V. Além da diferença estrutural, as penicilinas G e V também diferem em estabilidade. A penicilina G é degradada no estômago pelo suco gástrico, inviabilizando sua administração oral, sendo utilizada por via intramuscular ou intravenosa (Nathwani & Wood, 1993; Korolkovas & de França, 2000). A penicilina G é a única penicilina natural disponível no mercado atualmente (Marzo & Dal Bo, 1998).

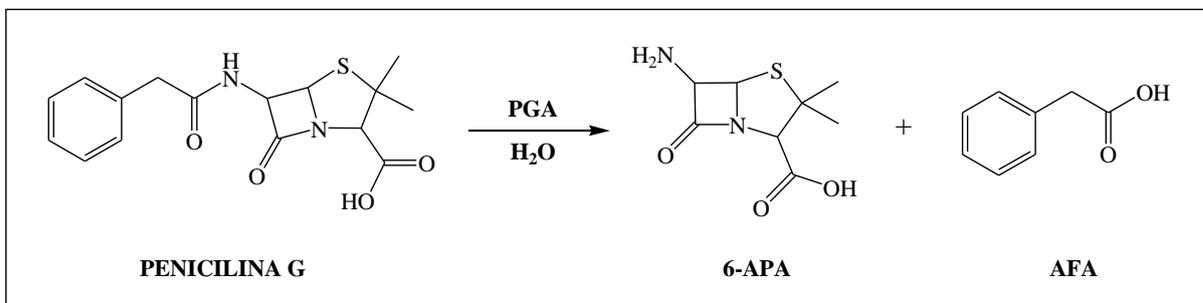
As penicilinas naturais podem ser destruídas por enzimas penicilinases, conforme mostrou a Figura 2.1. Essas enzimas abrem o anel  $\beta$ -lactâmico através da hidrólise da ligação C-N, sendo também denominadas  $\beta$ -lactamases (Wang *et al.*, 1999). Essa abertura impede a penicilina de atuar no bloqueio da formação da parede celular bacteriana, não combatendo a infecção. Bactérias produtoras desta enzima são consideradas resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Quando as penicilinas foram introduzidas para uso hospitalar na década de 40, mostraram grande utilidade no tratamento de infecções, porém, microrganismos produtores de penicilinases não eram eficientemente combatidos.

### **2.1.2. Penicilinas Semi-Sintéticas**

Em 1957, o núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA) foi descoberto e obtido em quantidades consideráveis, o que serviu como ponto de partida para a síntese química de diversos derivados de penicilina (Nathwani & Wood, 1993). O 6-APA pode ser produzido por meio da reação de hidrólise enzimática da penicilina G catalisada pela enzima penicilina G acilase (PGA), como mostrado na Figura 2.3. É possível adicionar cadeias laterais diferentes a este anel central, criando novos tipos de penicilinas que não são encontradas na natureza. Estas penicilinas são denominadas semi-sintéticas.

A quebra da ligação amida formada entre o grupo amino primário do núcleo  $\beta$ -lactâmico e o grupo carboxila da cadeia lateral da penicilina G gera o 6-APA, como pode ser visto pela Figura 2.3 (Arroyo *et al.*, 2003). A condensação do 6-APA às diferentes cadeias laterais possibilita a síntese de penicilinas semi-sintéticas variadas (Giordano *et al.*, 2006; Rolinson & Geddes, 2007). Dentre as vantagens das penicilinas semi-sintéticas em relação às naturais podem ser citadas: alta eficácia, baixa toxicidade, maior espectro de ação

antimicrobiana, maior facilidade de absorção pelo organismo e resistência ao suco gástrico, possibilitando sua administração via oral.

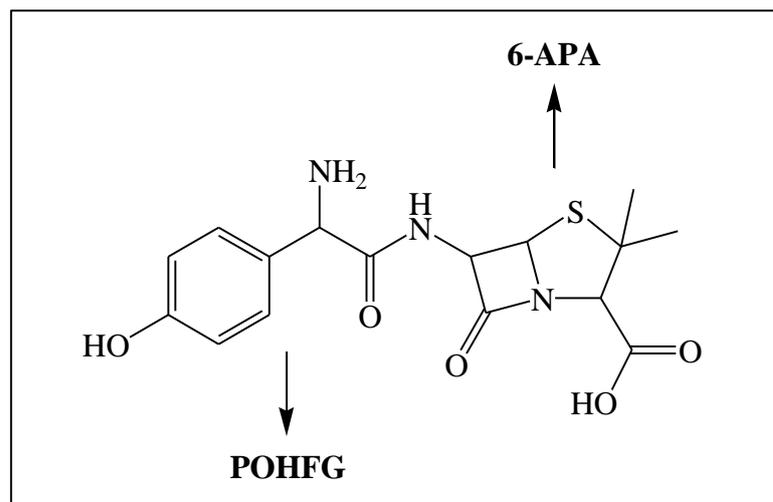


**Figura 2.3.** Reação de hidrólise enzimática da penicilina G catalisada pela enzima penicilina G acilase (PGA) para a produção de 6-APA, com formação de ácido fenilacético (AFA) como subproduto (Arroyo *et al.*, 2003).

### 2.1.2.1. Amoxicilina

Ácido 6-[D(-)- $\alpha$ -amino-*p*-hidroxifenilacetamido] penicilânico, popularmente mais conhecido pela denominação amoxicilina, é uma importante penicilina semi-sintética, que foi primeiramente descrita pela patente Britânica nº 1.382.409 (*apud* Ward, 1987). A amoxicilina consiste de duas partes fundamentais, como apresentado pela Figura 2.4. Uma parte é aquela que contém o anel  $\beta$ -lactâmico, conhecida como núcleo antibiótico ou 6-APA, e a outra é aquela que compreende a cadeia lateral modificada, também denominada doador acil, neste caso, a *p*-hidroxifenilglicina, o que a diferencia de todas as outras penicilinas semi-sintéticas (Wegman *et al.*, 2001; Arroyo *et al.*, 2003).

A amoxicilina é derivada da ampicilina (patenteada em 1961). Pesquisas adicionais em 1964 mostraram que a introdução de um grupo *p*-hidroxi na cadeia lateral da ampicilina conduzia a uma expressiva melhora na absorção desta substância após a administração oral (Rolinson & Geddes, 2007). Este fármaco é um dos antibióticos mais amplamente prescritos na prática clínica, devido não somente ao seu amplo espectro de atividade contra uma grande variedade de infecções bacteriológicas ocasionadas por microrganismos Gram positivos e negativos, como também à sua elevada taxa de absorção e ótima estabilidade sob condições ácidas, o que permite sua ingestão oralmente (Kosmidis *et al.*, 1972; Tsuji *et al.*, 1978; Louwrier & Knoelest, 1997).



**Figura 2.4.** Estrutura química da amoxicilina, indicando a cadeia lateral *p*-hidroxifenilglicina (POHFG), que a diferencia de todas as outras penicilinas semi-sintéticas, e o núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA).

## 2.2. Produção de Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos

Tradicionalmente, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos são produzidos em escala industrial por meio de processos químicos (Bruggink *et al.*, 1998). Contudo, devido à complexidade e às condições drásticas dessas reações químicas, esses processos apresentam algumas desvantagens. A síntese química convencional destes fármacos exige diversas etapas de proteção e desproteção dos grupos reativos para evitar reações de hidrólise não seletivas (Ospina *et al.*, 1996; Youshko *et al.*, 2002). Para tanto, são necessários solventes organoclorados, que são tóxicos e de difícil manejo, e ainda ocasionam a geração de resíduos não recicláveis e nocivos ao meio ambiente.

Os solventes organoclorados podem ser cancerígenos, sendo indesejáveis tanto como resíduos quanto como impurezas presentes no produto final, ainda que apenas como traços (Diago & Ludescher, 1998). Adicionalmente, o procedimento de síntese química destes produtos farmacêuticos ocorre a temperatura extremamente baixa (-30 °C), o que acarreta um longo tempo de reação. Deste modo, apesar dos elevados rendimentos que são alcançados, a síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos pela rota química tem sido limitada a países cuja regulamentação ambiental ainda não é tão rigorosa, enquanto aos outros países resta a importação destes importantes medicamentos.

Nos últimos anos, a crescente preocupação em relação ao meio ambiente e a criação de leis de proteção ambientais mais rígidas vêm incentivando a busca por rotas alternativas para a produção de antibióticos. A tendência da indústria farmacêutica é o desenvolvimento de métodos enzimáticos neste setor (Egorov *et al.*, 2000). A síntese enzimática, por ocorrer em meio aquoso, temperatura ambiente e pH neutro, se torna mais atrativa quando comparada à rota química. No entanto, um dos principais obstáculos à sua industrialização é a busca por melhores rendimentos, sendo conhecida apenas uma planta que utiliza a rota enzimática para a produção de cefalosporina (Wegman *et al.*, 2001).

A substituição da rota química de produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos por uma reação de síntese enzimática utilizando a PGA é conhecida há várias décadas, desde quando Cole (1969) descobriu que a PGA também era capaz de catalisar a reação de transferência do grupo acil para o núcleo antibiótico (6-APA). Após esta descoberta, o processo enzimático tem sido alvo de muitas investigações, e mostra-se bastante interessante, uma vez que as enzimas são proteínas que apresentam elevada eficiência catalítica operando em condições suaves de reação, além de sua alta seletividade e especificidade frente ao substrato (Clausen & Dekker, 2000; Youshko *et al.*, 2000; Bruggink, 2001).

### **2.3. Enzimas: Catalisadores Biológicos**

Os catalisadores são substâncias que aumentam a velocidade de uma reação química sem que, ao término do processo, tenham sofrido qualquer alteração, e, com esta finalidade, operam diminuindo a energia de ativação sem, contudo, afetar o equilíbrio químico das reações. É importante mencionar que energia de ativação é definida como a quantidade de energia requerida para romper a configuração eletrônica estável de qualquer molécula para que os elétrons possam ser reorganizados, possibilitando as diversas transformações químicas. As enzimas são proteínas globulares especializadas em catalisar uma variedade de reações que ocorrem ininterruptamente em todos os organismos vivos (Lehninger *et al.*, 1984).

As propriedades funcionais de cada enzima dependem essencialmente do número e distribuição dos resíduos de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica, ou seja, dependem da estrutura primária da proteína. Já a capacidade catalítica de cada biocatalisador

depende da manutenção da sua estrutura nativa, ou seja, depende da conservação da sua conformação tridimensional, representada pela estrutura terciária da proteína. As mais suaves alterações no meio reacional podem comprometer a conformação nativa da enzima ocasionando o desenovelamento da proteína e, com isso, a perda parcial ou total de sua funcionalidade biológica (Illanes, 1994).

As enzimas são biocatalisadores altamente específicos no reconhecimento do substrato da reação, e essa especificidade é uma propriedade imprescindível das enzimas enquanto catalisadores biológicos (Lehninger *et al.*, 1984). 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 acontecer. Adicionalmente, as enzimas são capazes de atuar seletivamente, discriminando isômeros de um composto quiral.

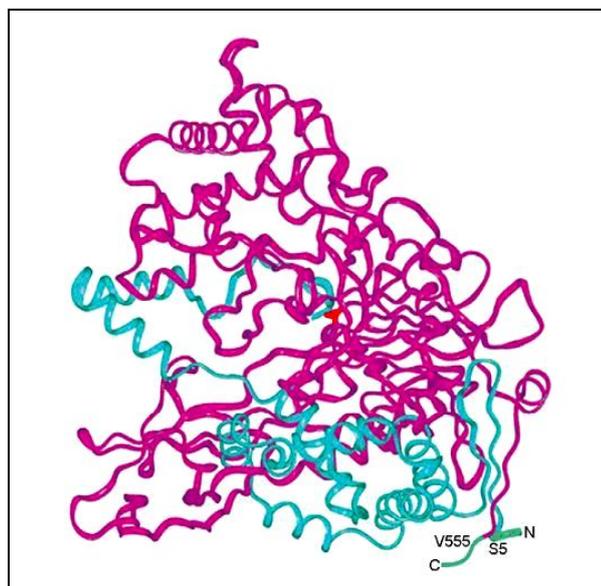
As enzimas são moléculas inerentemente lábeis, o que pode ser bastante acentuado quando se utilizam sistemas de reação não-aquosos, por exemplo, solventes orgânicos ou líquidos iônicos, onde sua vida útil pode ser extremamente reduzida (Gupta, 1992). Esta possibilidade de inativação das enzimas é causada pelas mudanças conformacionais que ocorrem em sua estrutura tridimensional cataliticamente ativa, as quais são ocasionadas pelas condições reacionais a que são submetidas. De acordo com isso, ao trabalhar com reações enzimáticas em meios não-aquosos é necessária a utilização de biocatalisadores mais robustos, capazes de suportar condições reacionais adversas (Klibanov, 1997).

### **2.3.1. Penicilina G Acilase**

A enzima penicilina G acilase (PGA, E.C.3.5.1.11), também conhecida como penicilina amidase, penicilina amidohidrolase ou penicilina aciltransferase, é uma enzima amplamente utilizada em vários processos biotecnológicos. Sua aplicação industrial mais expressiva é a catálise da hidrólise de penicilina G para a produção de 6-APA (Parmar *et al.*, 2000), intermediário chave na produção de penicilinas semi-sintéticas (Arroyo *et al.*, 2003). PGA também pode ser utilizada para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos,

catalisando a condensação de um grupo acil a um núcleo  $\beta$ -lactâmico, por exemplo, 6-APA (Rolinson & Geddes, 2007).

Bactérias, fungos e leveduras produzem PGA (Rajendhran & Gunasekaran, 2004). Entretanto, a mais utilizada e estudada é a PGA de *Escherichia coli* ATCC 11105 (Calleri *et al.*, 2004). A Figura 2.5 apresenta a estrutura dimérica da PGA, em que a subunidade  $\alpha$  (209 aminoácidos, 20.500 Da) é responsável pelo reconhecimento da cadeia lateral do substrato e a subunidade  $\beta$  (557 aminoácidos, 69.000 Da) pela atividade catalítica (Böck *et al.*, 1983; Brüns *et al.*, 1985; Duggleby *et al.*, 1995). O sítio ativo da enzima é rodeado por resíduos de ambas as subunidades, permanecendo no fundo de uma depressão cônica (Flores *et al.*, 2004; Chandel *et al.*, 2008).



**Figura 2.5.** Estrutura da PGA. A imagem mostra que esta enzima é um heterodímero, cuja subunidade maior,  $\beta$ , está indicada na cor rosa e a subunidade menor,  $\alpha$ , na cor azul. Em vermelho, no centro da molécula, o resíduo catalítico serina terminal está representado (Flores *et al.*, 2004).

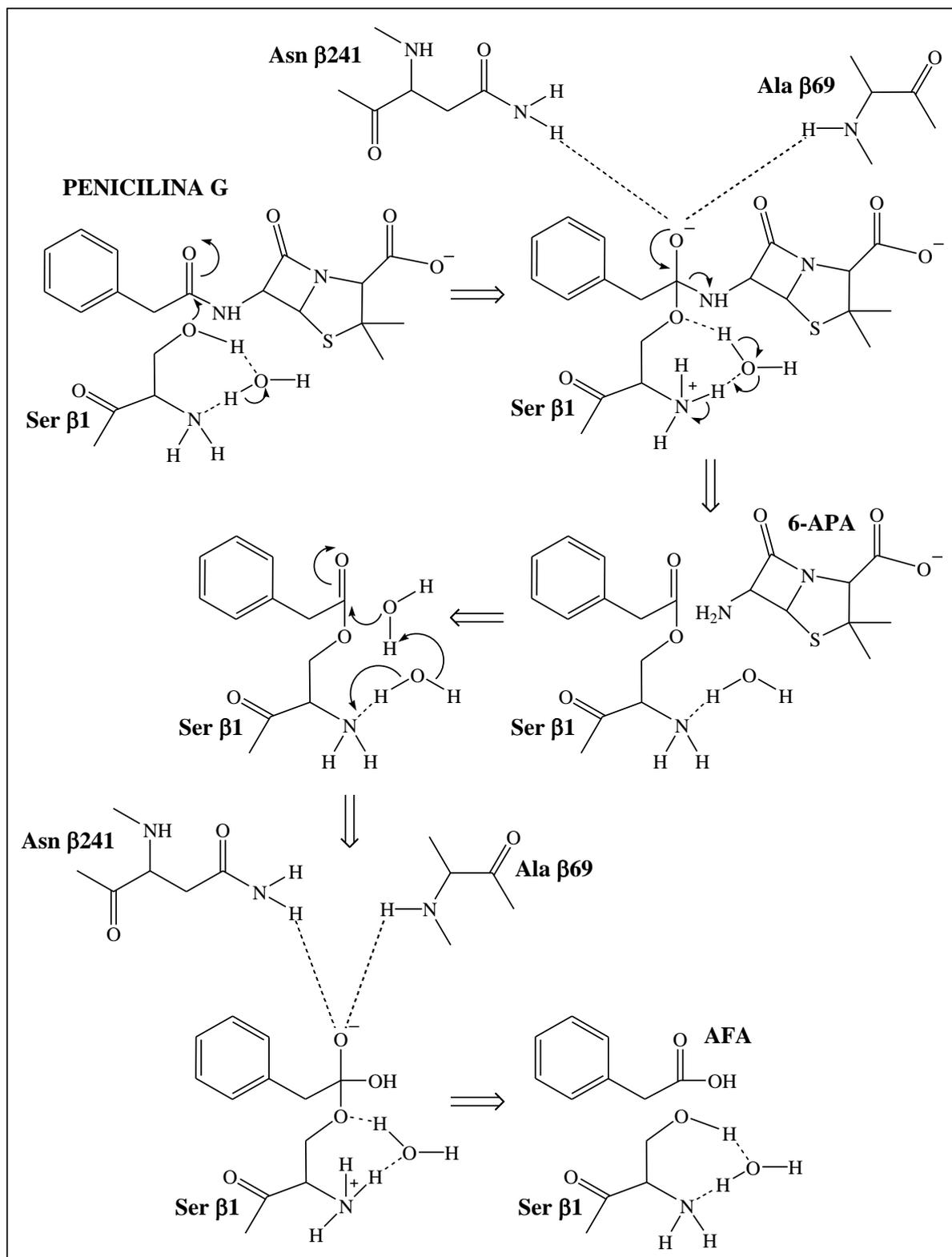
O modo de ação da PGA é complexo e ainda não totalmente consensual na literatura (Giordano *et al.*, 2006). A Figura 2.6 apresenta o mecanismo catalítico da PGA proposto para a hidrólise da penicilina G. De acordo com Duggleby *et al.* (1995), a enzima promove um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila de ligações éster ou amida. Neste aspecto, PGA é semelhante à serina protease. No entanto, ao invés de uma tríade catalítica, PGA apresenta

apenas um único resíduo como o centro catalítico, a serina  $\beta 1$  (Duggleby *et al.*, 1995). Além disso, a nucleofilicidade do  $O\gamma$  é aumentada pelo grupo  $\alpha$ -amino da serina terminal, o que faz a PGA ser classificada como uma hidrolase N-terminal (Done *et al.*, 1998).

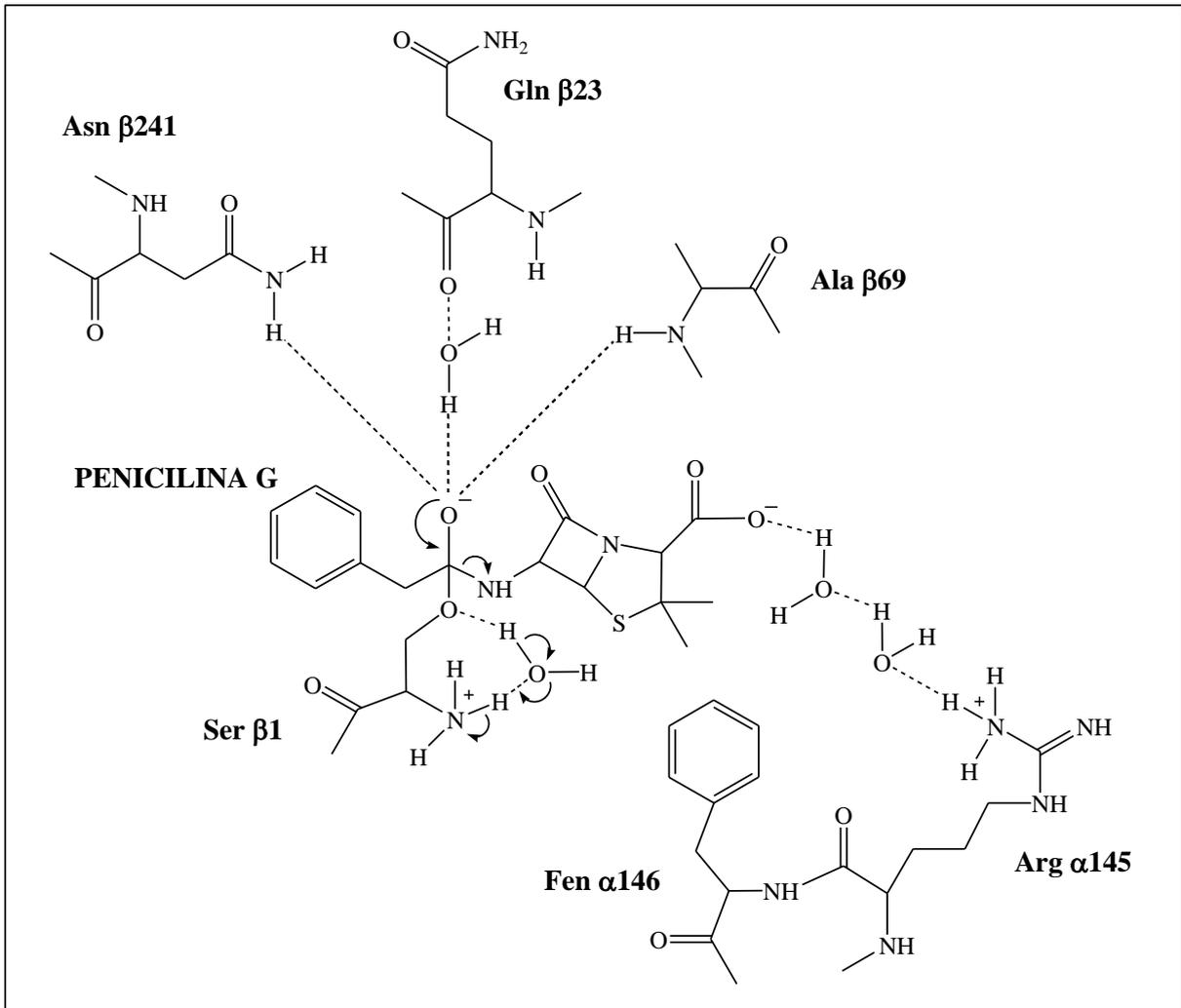
Duggleby *et al.* (1995) mostraram o papel da molécula “ponte” (água) atuando como uma base virtual neste mecanismo, bem como a função exercida pelo grupo  $\alpha$ -amino do resíduo serina N-terminal (Ser  $\beta 1$ ) na atividade catalítica da PGA. Segundo Duggleby *et al.* (1995), o grupo  $\alpha$ -amino deve estar desprotonado para que possa se ligar à molécula de água adjacente, por meio de ligação de hidrogênio, conforme pode ser visto pelo esquema na Figura 2.6. De acordo com os autores, a etapa de formação do intermediário acil-enzima ocorre depois do ataque nucleofílico do  $O\gamma$ , que está situado em uma posição favorável do carbono carbonílico (Duggleby *et al.*, 1995). Posteriormente, a função da água atuando como uma base virtual foi questionada por McVey *et al.* (2001), os quais reportaram que ocorre um ataque nucleofílico direto da Ser  $\beta 1$  sobre a ligação amida.

O oxianion resultante desta primeira etapa do mecanismo é estabilizado pelo  $N\delta$  da asparagina (Asn)  $\beta 241$ , bem como pelo grupo amino da cadeia principal da alanina (Ala)  $\beta 69$  (Figura 2.6). Posteriormente, Alkema *et al.* (2000) reportaram que o oxigênio da glutamina (Gln)  $\beta 23$  também faz uma ligação de hidrogênio, através de uma molécula de água, com o oxianion, conforme mostra a Figura 2.7. Adicionalmente, Alkema *et al.* (2000) sugeriram que ocorre uma interação da arginina (Arg)  $\alpha 145$  com a carboxila do anel tiazolidina do núcleo  $\beta$ -lactâmico (Figura 2.7). A etapa de desacilação do complexo acil-enzima ocorre por ataque nucleofílico da molécula de água, como pode ser visto na Figura 2.6 (Duggleby *et al.*, 1995).

Baseado no mecanismo para a hidrólise da penicilina G proposto por Duggleby *et al.* (1995), foi sugerido um mecanismo para a síntese de ampicilina, onde o ataque nucleofílico da molécula de água é substituído pelo ataque nucleofílico do núcleo  $\beta$ -lactâmico (Ospina *et al.*, 1996). Os autores reportaram que a PGA catalisa reações de transferência de um grupo acil através da formação de um intermediário acil-enzima e, em seguida, na desacilação, este intermediário reage com o núcleo  $\beta$ -lactâmico formando o antibiótico e regenerando a enzima, como apresentado pela Figura 2.8 (Ospina *et al.*, 1996). A formação do complexo acil-enzima é consensual, mas, não há ainda unanimidade sobre a última etapa do mecanismo, isto é, a desacilação do complexo acil-enzima (Giordano *et al.*, 2006).



**Figura 2.6.** Mecanismo de ação catalítica da PGA para a reação de hidrólise da penicilina G proposto por Duggleby *et al.* (1995). A molécula de água atua como uma base virtual e o grupo  $\alpha$ -amino aumenta a nucleofilicidade do  $O\gamma$  da Serina  $\beta 1$ . A etapa de desacilação do intermediário acil-enzima acontece por ataque nucleofílico de uma molécula de água.

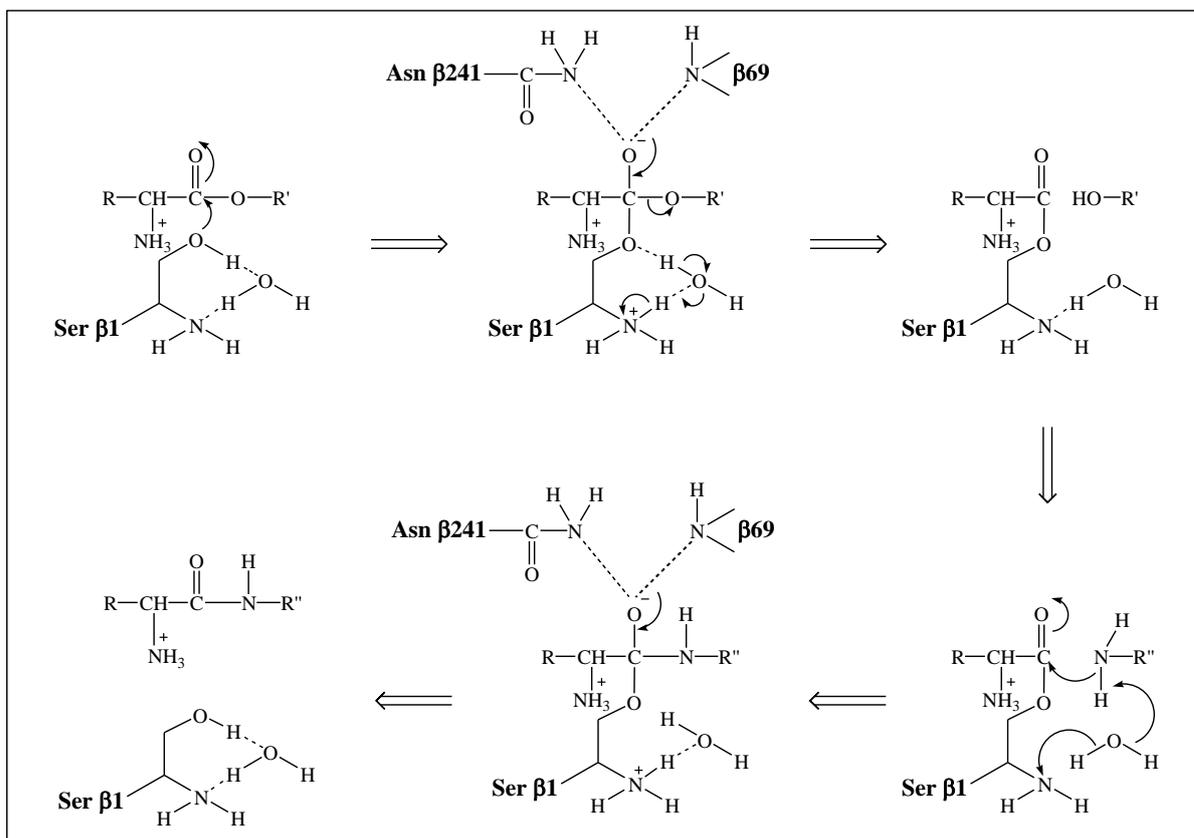


**Figura 2.7.** Esquema de um passo intermediário do mecanismo catalítico da hidrólise enzimática de penicilina G catalisada pela PGA, em que pode ser observada a interação da Arg  $\alpha$ 145 com o grupo carboxílico do anel tiazolidina (que faz parte do núcleo  $\beta$ -lactâmico, 6-APA) e a ligação de hidrogênio com o oxigênio da Gln  $\beta$ 23, através de uma molécula de água (Alkema *et al.*, 2000).

### 2.3.2. Imobilização de Enzimas

A viabilidade comercial de uma enzima depende de sua estabilidade operacional e da possibilidade de sua reutilização. Apesar das excelentes perspectivas que apresentam como biocatalisadores, sua aplicação industrial representa elevado custo, pois, na forma livre são solúveis em água. Sua separação do produto final muitas vezes é inviável economicamente, por isso, são difíceis de serem reutilizadas, podendo, também, ocorrerem perdas durante o

processo (Bryjak & Trochimczuk, 2006; Heilmann *et al.*, 2007). As enzimas também estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos que podem acontecer durante sua estocagem ou utilização (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

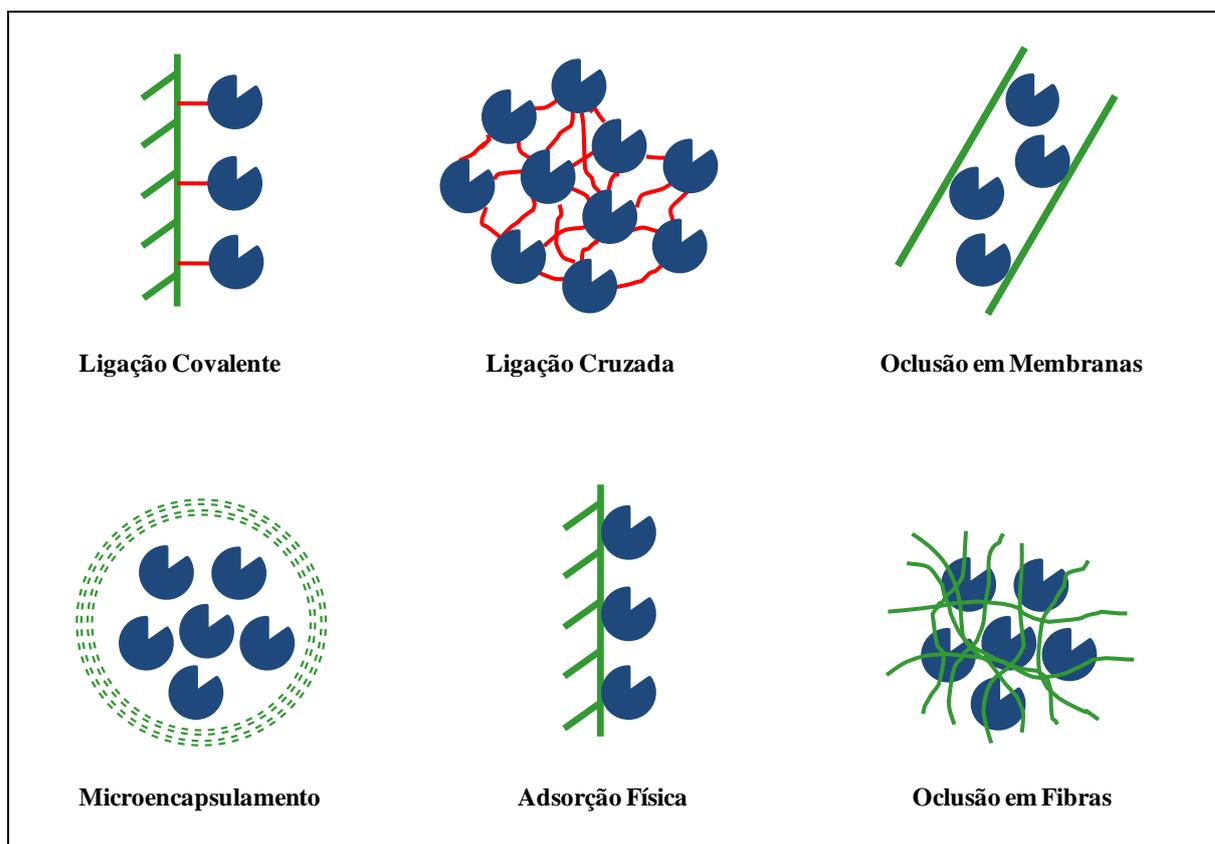


**Figura 2.8.** Mecanismo catalítico proposto para a reação de síntese de antibióticos β-lactâmicos semi-sintéticos, catalisada pela PGA, proposto por Ospina *et al.* (1996). O substrato pode ser um éster ou uma amida. Além disso, para a síntese enzimática de antibióticos, o 6-APA passa a ser o responsável pelo ataque nucleofílico ao intermediário acil-enzima (Ospina *et al.*, 1996).

Neste contexto, inúmeras técnicas para a imobilização de enzimas têm sido exaustivamente desenvolvidas nos últimos anos com a finalidade de reduzir o custo operacional dos processos enzimáticos na prática industrial. Se a reação puder ser realizada em biocatálise heterogênea, a separação da enzima do sistema reacional será facilitada, permitindo sua recuperação e, com isso, possibilitando sua subsequente reutilização (Calleri *et al.*, 2004; Cecchini *et al.*, 2007). Em adição, alguns métodos de imobilização de enzimas podem promover uma significativa estabilização da enzima quando comparada à sua forma

nativa (solúvel), ou seja, biocatalisadores mais robustos são obtidos, o que minimiza os riscos de degradação frente às variações de temperatura e pH (Phadtare *et al.*, 2002).

A expressão “imobilização de enzimas” se refere a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida de espaço que conservam suas propriedades catalíticas e podem ser utilizadas repetida e continuamente (Guisán, 2006). A técnica de imobilização de enzimas pode ocorrer através de três principais métodos: o aprisionamento físico, a ligação cruzada ou a ligação da enzima a um suporte sólido, que pode ser através de adsorção física ou ligação química, conforme a Figura 2.9 (Parmar *et al.*, 2000; Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Guisán (1988), em um trabalho pioneiro, descreveu a imobilização e estabilização de PGA através da ligação covalente multipontual ao suporte glioxil-agarose.



**Figura 2.9.** Alguns métodos que são amplamente utilizados para a imobilização de enzimas. (Arquivo próprio).

A imobilização de PGA tem sido realizada por várias estratégias, a maioria delas visando a produção de 6-APA, portanto, elas não são necessariamente adequadas para a

síntese de antibióticos, onde a seletividade e a estabilidade operacional do biocatalisador são críticos (Arroyo *et al.*, 2002). Dentre as técnicas de imobilização, a ligação covalente a suporte sólido é uma das mais amplamente utilizadas (Wilson *et al.*, 2004; Betancor *et al.*, 2006). No método de imobilização por ligação covalente, o suporte ativado se combina quimicamente a grupos funcionais da enzima não essenciais para sua atividade catalítica. Diversos catalisadores na forma de partículas insolúveis estão disponíveis comercialmente (Giordano *et al.*, 2006).

A ligação covalente multipontual a suportes sólidos é um sistema de imobilização muito estável e tem sido utilizada no caso de várias enzimas (Gupta, 1991; Martinek *et al.*, 1977). A formação de uma ligação rígida proteína-suporte confere estabilização cinética e termodinâmica para a estrutura tridimensional da proteína imobilizada, induzindo uma proteção da enzima contra possíveis agentes desnaturantes que poderiam provocar o processo de desenovelamento (Žuža *et al.*, 2009). Entre os grupos reativos que podem ser utilizados para a ativação do suporte, glioxil e epóxi parecem ser bastante adequados (Guisán, 1988; Blanco *et al.*, 1989; Mateo *et al.*, 2002; Illanes *et al.*, 2003).

A ligação covalente multipontual a géis de agarose ativados é uma das técnicas mais efetivas em termos de estabilização da enzima e os derivados de PGA resultantes exibem uma maior estabilidade em temperaturas elevadas e em solventes orgânicos (Alvaro *et al.*, 1990; Fernández-Lafuente *et al.*, 1996; Abian *et al.*, 2003). Glioxil-agarose, suporte hidrofílico ativado com grupos aldeído (Estruch *et al.*, 2008), tem sido descrito como um sistema de imobilização adequado para produzir proteínas imobilizadas/estabilizadas via ligação covalente multipontual (Mateo *et al.*, 2005). Os grupos glioxil são aldeídos lineares que formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas (Blanco & Guisán, 1989).

Suportes ativados com grupos epóxi são considerados uma boa alternativa para realizar com facilidade a imobilização covalente multipontual de enzimas tanto em escala de laboratório quanto industrial (Mateo *et al.*, 2000). Os grupos epóxi são capazes de reagir com diferentes grupos nucleofílicos na superfície protéica (por exemplo, amino, hidroxila e tiol) para formar ligações extremamente fortes com modificação química mínima da proteína (Mateo *et al.*, 2000). É possível encontrar comercialmente diversos suportes ativados com grupos epóxi que são recomendados para imobilizar proteínas (por exemplo, Eupergit<sup>®</sup> e Sepabeads<sup>®</sup>). De acordo com Mateo *et al.* (2007), epóxi-agarose está disponível, mas não é

recomendado para este objetivo. As propriedades mecânicas apresentadas por Sepabeads<sup>®</sup> têm superado um dos principais problemas do suporte Eupergit<sup>®</sup>. Os suportes Sepabeads<sup>®</sup> podem ser utilizados em qualquer meio reacional, sem que ocorra inchaço das partículas, como também em todos os tipos de reatores, ocasionando ruptura mínima das partículas, mesmo sob uma agitação vigorosa (Mateo *et al.*, 2007). A imobilização de PGA em suportes ativados com grupos epóxi tem sido realizada com sucesso, apresentando efeitos positivos em termos de estabilização da enzima, e os resultados mostraram que o derivado enzimático PGA-Sepabeads<sup>®</sup> é 100 vezes mais estável do que PGA-Eupergit<sup>®</sup> C (Mateo *et al.*, 2002).

A produção de biocatalisadores livres de suportes (*carrier-free*) tem ganhado destaque nos últimos anos (Mateo *et al.*, 2007). Os *cross-linked enzyme crystals*, CLECs, são cristais de enzimas com ligações cruzadas a reagente bifuncional, geralmente, glutaraldeído (Haring & Schreier, 1999). A cristalização é uma operação complexa e requer enzimas com elevada pureza (Xie *et al.*, 2009). Os *cross-linked enzymes aggregates*, CLEAs, constituem uma boa alternativa aos CLECs, uma vez que são produzidos por precipitação convencional de proteínas seguida por ligações cruzadas a reagente bifuncional, sendo aplicados com sucesso na síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos (Cao *et al.*, 2001).

A escolha do suporte mais adequado para a imobilização de uma determinada enzima depende das características do processo em que o conjunto enzima-suporte será aplicado. Geralmente, um bom suporte para a imobilização de enzimas deve apresentar as seguintes propriedades: alta resistência mecânica, resistência ao ataque microbiano, caráter hidrofóbico ou hidrofílico (dependendo da aplicação proposta), alta área superficial e porosidade, além de baixo custo. Em adição, cada método de imobilização tem limitações específicas e, para uma aplicação em particular, é necessário desenvolver um procedimento simples e barato que resulte em boa atividade catalítica e estabilidade operacional do derivado enzimático resultante do procedimento de imobilização.

## **2.4. Síntese Enzimática de Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos**

Antigamente, a disposição de resíduos não era encarada como um problema tão sério quanto nos dias de hoje. Entretanto, deve ser levada em conta a carência de conscientização a

respeito do impacto ambiental que estes processos poderiam ocasionar e, conseqüentemente, de regulamentações ambientais rígidas. Se for considerada a quantidade de resíduo gerado por kg de produto formado, percebe-se, nitidamente, a necessidade de diminuição de resíduos nas indústrias de química fina e farmacêutica (Wegman *et al.*, 2001).

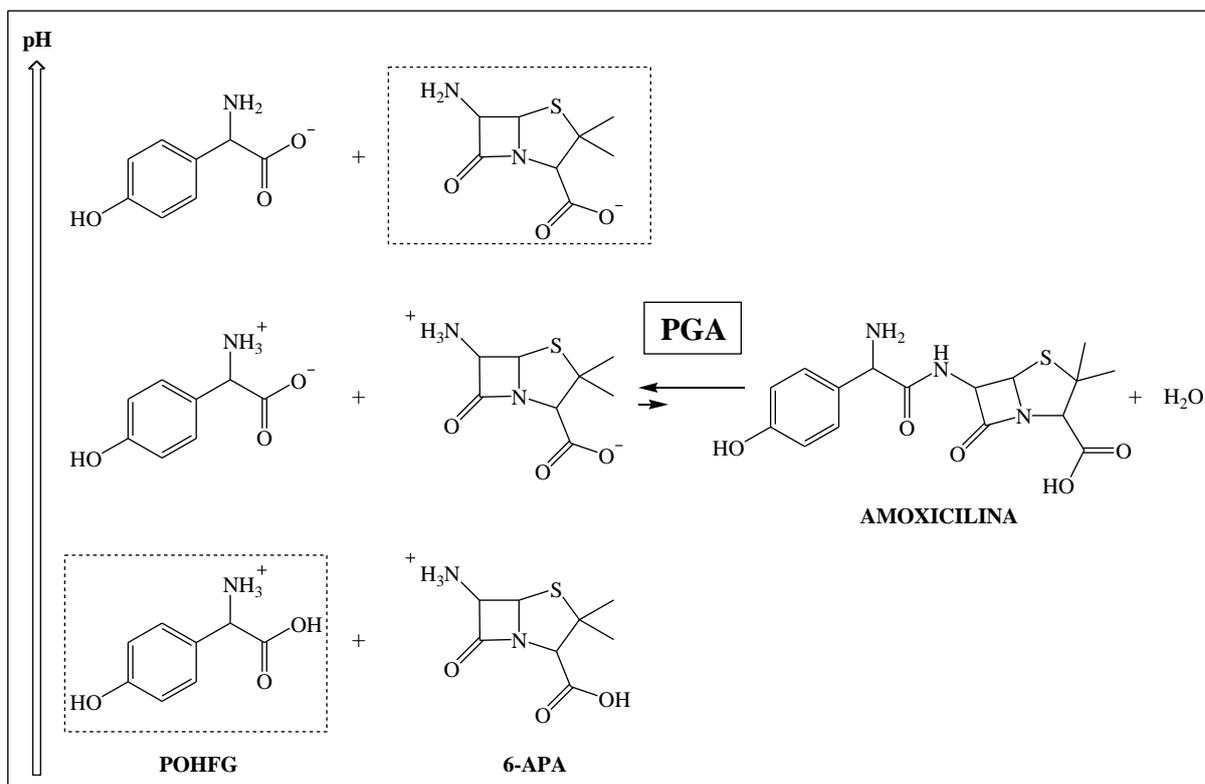
Neste cenário, o desenvolvimento de processos industriais enzimáticos é a tendência da atualidade (Egorov *et al.*, 2000). A síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos pode ser realizada através de duas abordagens: síntese termodinamicamente controlada (STC), onde se tem, simplesmente, a reação inversa à hidrólise do antibiótico  $\beta$ -lactâmico (Diender *et al.*, 1998), e a síntese cineticamente controlada (SCC), mais comum na literatura científica para a produção de penicilinas semi-sintéticas. Na SCC é necessário o uso de um derivado ativado do doador da cadeia lateral acil, tal como um éster ou uma amida, para promover a acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico (Fernández-Lafuente *et al.*, 1996).

#### **2.4.1. Síntese Termodinamicamente Controlada**

Na STC, o rendimento depende apenas da constante de equilíbrio termodinâmico do processo. No caso da amoxicilina, ocorreria uma condensação direta entre o 6-APA e a *p*-hidroxifenilglicina (POHFG), como é mostrado na Figura 2.10. Para que esta reação ocorra, o grupo amino do 6-APA e o grupo carboxílico da POHFG devem estar neutros (Margolin *et al.*, 1980). Contudo, esta configuração não ocorre na faixa de pH operacional da PGA, ou seja, não há valor de pH onde os substratos estariam predominantemente em um estado não-ionizado, como é requerido para a ação da PGA (Duggleby *et al.*, 1995). Assim, a estratégia de controle cinético pode ser considerada a rota mais factível para a produção enzimática de penicilinas semi-sintéticas, incluindo a amoxicilina.

Apesar de a STC ser considerada a mais simples, esta estratégia enzimática apresenta ainda como desvantagem o forte deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da hidrólise do antibiótico em meio totalmente aquoso. Neste sentido, solventes orgânicos podem ser utilizados como cossolventes no sistema reacional para atuar na redução da atividade da água ( $a_w$ , propriedade termodinâmica) e no aumento da constante de dissociação aparente do doador acil (Fernández-Lafuente *et al.*, 1991; Rosell *et al.*, 1998). Entretanto, a utilização de

solventes orgânicos pode se tornar um grande obstáculo para o processo sintético, pois dependendo da natureza do meio orgânico empregado, este pode afetar negativamente a estabilidade e atividade catalítica da enzima.



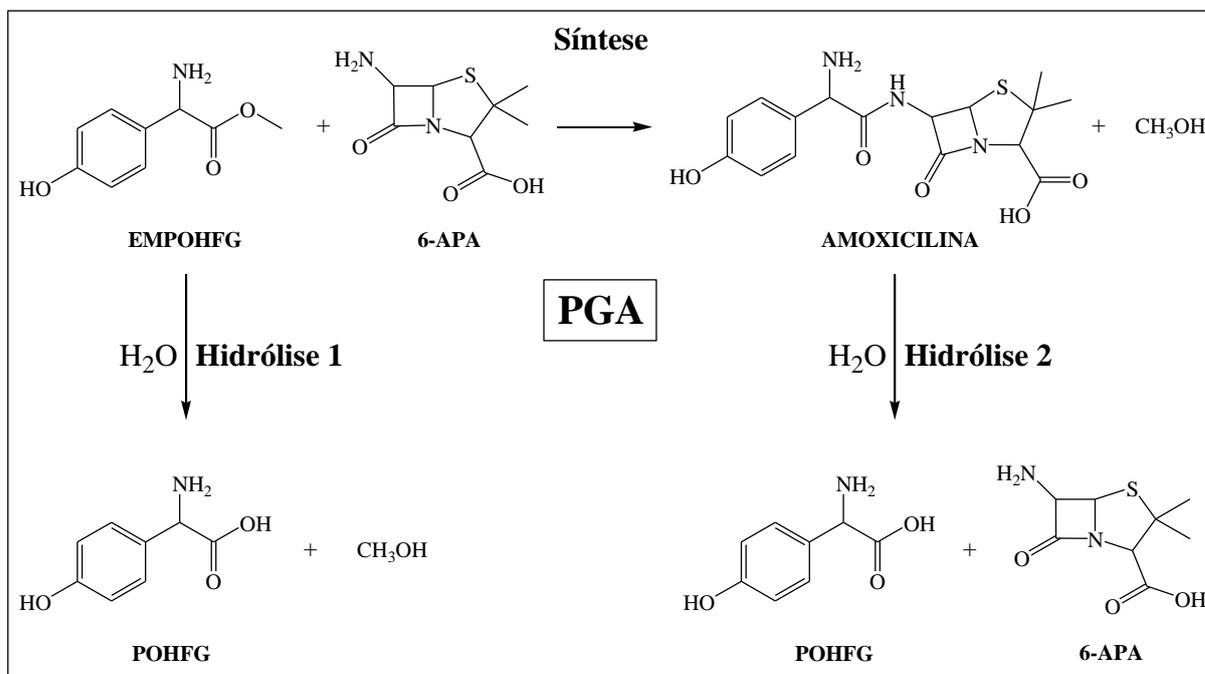
**Figura 2.10.** Síntese termodinamicamente controlada (STC) de amoxicilina catalisada pela penicilina G acilase (PGA). Para a síntese ocorrer, o grupo amino do núcleo antibiótico (6-APA) e o grupo carboxílico do doador acil (*p*-hidroxifenilglicina, POHFG) devem estar neutros, como mostra as linhas pontilhadas (Margolin *et al.*, 1980).

## 2.4.2. Síntese Cineticamente Controlada

Na SCC, o rendimento é determinado pelo balanço da cinética de três diferentes reações, todas catalisadas pela mesma enzima: a síntese do antibiótico, a hidrólise do derivado ativado do doador acil e a hidrólise do antibiótico recém sintetizado (Fernández-Lafuente *et al.*, 1996), conforme mostra a Figura 2.11. Na estratégia de controle cinético, a ativação do substrato contorna a necessidade do grupo carboxílico neutro, requerido pela rota de controle termodinâmico. O substrato ativado reage com o núcleo  $\beta$ -lactâmico e produz o antibiótico.

Nesta reação, PGA atua como transferase. Contudo, PGA é também hidrolase. Assim, 6-APA e moléculas de água competem no ataque nucleofílico ao intermediário acil-enzima.

A Figura 2.11 exemplifica as reações que estão envolvidas na SCC de amoxicilina, sendo todas catalisadas pela PGA. Para este esquema, o éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG) foi empregado como o substrato ativado. Neste conjunto de reações série-paralelo, o substrato EMPOHFG reage com o 6-APA para formar amoxicilina e o álcool correspondente (neste caso, o metanol), enquanto a hidrólise do EMPOHFG produz POHFG e o mesmo álcool. A hidrólise da amoxicilina previamente formada gera 6-APA e POHFG. Estas reações hidrolíticas são as principais desvantagens para a prática industrial da síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas (Gabor *et al.*, 2005).



**Figura 2.11.** Síntese cineticamente controlada (SCC) de amoxicilina catalisada pela PGA a partir do derivado ativado do doador acil éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG) e do núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA). Nestas reações, a PGA atua como uma transferase (para a reação de síntese do antibiótico) e como uma hidrolase, promovendo duas reações laterais indesejáveis (a hidrólise 1, do derivado ativado do doador acil, e a hidrólise 2, da amoxicilina recém sintetizada).

Ao se alcançar o equilíbrio termodinâmico, o antibiótico recém produzido pela rota de controle cinético, por se tratar de um produto intermediário, é quase todo hidrolisado pela

atividade amidase da PGA. Entretanto, ao se interromper a reação antes que a velocidade da hidrólise do antibiótico seja maior do que a velocidade de síntese do mesmo, pode se alcançar uma concentração de antibiótico maior do que a concentração no equilíbrio termodinâmico, conseguindo-se, desta maneira, um valor máximo transitório (Schroën *et al.*, 1999). Este aspecto também colabora para fazer com que a SCC seja a estratégia enzimática mais propícia para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

A comunidade científica tem concentrado esforços para aperfeiçoar a SCC de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos através de ferramentas fundamentais que compõem a engenharia enzimática, ou seja, investigação de diferentes condições reacionais (engenharia da reação), projeção de diferentes biocatalisadores (engenharia do catalisador) e avaliação dos tipos de reatores enzimáticos (engenharia do reator). Isso porque ao contrário da STC, na estratégia SCC, qualquer modificação na fonte da enzima (diversos microrganismos expressam PGA), no tipo de imobilização ou nas condições de reação pode ocasionar uma variação nas velocidades das reações e, assim, uma alteração do rendimento e seletividade do processo (Hernández-Jústiz *et al.*, 1999).

Em consequência da diversidade de variáveis que podem influenciar nesta rota sintética de produção de penicilinas semi-sintéticas (SCC), é necessária uma apreciação cautelosa dos inúmeros fatores que estão envolvidos nestas reações enzimáticas, incluindo as propriedades da enzima, dos substratos e do sistema reacional (pH, temperatura, força iônica do meio, efeitos inibitórios dos substratos e produtos, presença de solventes orgânicos como cossolventes e a concentração dos mesmos, concentração de reagentes, entre outros). Esta análise cuidadosa contribui para a compreensão geral do processo e para a utilização eficiente do controle cinético para síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

#### **2.4.2.1. Otimização da Síntese Enzimática de Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos**

O aperfeiçoamento da metodologia para a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é complicado e dispendioso; contudo, é necessário para viabilizar economicamente a prática industrial destes processos enzimáticos. Uma vez que a SCC é a abordagem mais factível para a produção de penicilinas semi-sintéticas, deve-se levar em conta a busca pelo

ponto de máxima seletividade em antibiótico, ou seja, minimizar as reações hidrolíticas (hidrólise do substrato ativado e do antibiótico recém sintetizado) que competem com a reação sintética. Além disso, aspectos importantes tais como: a produtividade, o rendimento do éster e a conversão do 6-APA, também devem ser utilizados para avaliar o desempenho das reações enzimáticas. O Quadro 2.1 apresenta a definição de todos estes índices para o caso da síntese enzimática de amoxicilina.

**Quadro 2.1.** Critérios utilizados para avaliar o desempenho da síntese cineticamente controlada (SCC) de penicilinas semi-sintéticas, exemplificados para a síntese enzimática de amoxicilina. Neste caso, as reações empregaram o éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG) como derivado ativado do doador acil. Os índices são calculados em função do tempo de reação (*t*).

<p><b>CONVERSÃO DE 6-APA</b> (6-APA consumido/concentração inicial de 6-APA)</p>	$X(t) = \frac{C_{6-APA}^{Inicial} - C_{6-APA}^{(t)}}{C_{6-APA}^{Inicial}}$
<p><b>PRODUTIVIDADE</b> (concentração de amoxicilina/tempo de reação)</p>	$P(t) = \frac{C_{AMOX}^{(t)} - C_{AMOX}^{Inicial}}{t}$
<p><b>SELETIVIDADE</b> (concentração de amoxicilina/concentração de <i>p</i>-hidroxifenilglicina)</p>	$S(t) = \frac{C_{AMOX}^{(t)} - C_{AMOX}^{Inicial}}{C_{POHFG}^{(t)} - C_{POHFG}^{Inicial}}$
<p><b>RENDIMENTO DE ÉSTER</b> (concentração de amoxicilina/concentração inicial de éster)</p>	$R(t) = \frac{C_{AMOX}^{(t)} - C_{AMOX}^{Inicial}}{C_{EMPOHFG}^{Inicial}}$

## 2.5. Solventes Orgânicos

O comportamento das enzimas em solventes orgânicos não é ainda completamente compreendido. Desde o trabalho de Zaks & Klivanov (1984), em que estudaram a biocatálise na presença de solventes orgânicos, tem sido questionado se o meio completamente aquoso é

essencial para a manutenção da conformação ativa das enzimas. Neste sentido, um importante aspecto, mais do que a concentração de água no sistema reacional, é sua disponibilidade para a molécula de enzima, a fim de sustentar suas propriedades catalíticas, ou seja, a quantidade de água disponível para a enzima (hidratação da enzima) está intimamente relacionada à medida de  $a_w$  do meio de reação (Bell *et al.*, 1995).

O rendimento é um alvo chave que pode ser utilizado para avaliar o desempenho da estratégia empregada no desenvolvimento de um processo enzimático para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos (Illanes *et al.*, 2003). Entretanto, observa-se que o rendimento em meio totalmente aquoso é limitado em decorrência das reações hidrolíticas tanto do antibiótico, reação inversa à síntese na rota termodinamicamente controlada (Kim & Lee, 1996; Diender *et al.*, 1998; Schroën *et al.*, 1999), quanto do derivado ativado do doador acil, competindo com a reação de síntese na rota cineticamente controlada (Kim & Lee, 1996; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998).

Várias abordagens têm sido realizadas com a finalidade de aumentar o rendimento. Dentre elas, Illanes *et al.* (2003) reportaram que uma redução da  $a_w$  do sistema pode reduzir parcialmente as reações hidrolíticas competidoras na SCC e deslocar o equilíbrio em direção à síntese na STC. O uso de solventes orgânicos é uma alternativa para reduzir  $a_w$ . A presença destes cossolventes promove a estabilização de formas não-iônicas dos grupos ionizáveis pela mudança nas suas constantes de ionização (Fernández-Lafuente *et al.*, 1991). Este efeito na constante de ionização é apenas produzido no grupo carboxílico do doador acil, não sendo observado para o grupo amino do 6-APA (Rosell *et al.*, 1998).

Os solventes orgânicos podem afetar diretamente as propriedades catalíticas de uma enzima, tanto positiva como negativamente, dependendo da natureza dos mesmos. Pequenas mudanças conformacionais na estrutura terciária da enzima podem ocasionar modificações no seu sítio ativo e afetar suas propriedades catalíticas (Abian *et al.*, 2001). Neste sentido, a presença dos solventes orgânicos como cossolventes no meio reacional pode levar a uma diminuição do rendimento da reação ao inibir a atividade catalítica da enzima ou desestabilizar sua estrutura tridimensional. Considerando esses efeitos opostos, um projeto criterioso do meio de reação é necessário para alcançar maior rendimento.

É relevante ressaltar que na STC é imprescindível a utilização de cossolventes orgânicos para diminuir  $a_w$  do sistema e deslocar o equilíbrio em direção à formação do

antibiótico, além de possibilitar a estabilização da forma não-iônica do grupo carboxílico do doador acil, como é requerido para a enzima agir (Duggleby *et al.*, 1995; Rosell *et al.*, 1998). Contudo, na estratégia SCC, a utilização desses cossolventes não é rigorosamente indispensável, pois ao cessar a reação antes que a velocidade de hidrólise do antibiótico seja maior que a velocidade de síntese, a concentração do antibiótico pode ser maior que o valor de equilíbrio termodinâmico.

### 2.5.1. Penicilina G Acilase em Meios Orgânicos

Tendo em mente necessidades econômicas e ambientais, a biocatálise tornou-se uma alternativa interessante para tentar substituir a síntese química convencional de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, porém, os índices de desempenho, tais como produtividade e rendimento, ainda precisam ser melhorados para uma implementação efetiva do processo enzimático em escala industrial (Wegman *et al.*, 2001). Neste cenário, nos últimos anos, inúmeras pesquisas vêm investigando a possibilidade de substituição do meio aquoso tradicional por um sistema de reação contendo cossolventes orgânicos, na busca por um progresso na eficiência da síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, catalisada pela PGA.

Fernández-Lafuente *et al.* (1991) estudaram a influência da natureza e concentração de diversos solventes orgânicos na STC da penicilina G. Os autores classificaram os solventes em suaves, intermediários e fortes, com relação ao aumento no valor do pKa do grupo carboxílico do ácido fenilacético (AFA), e relataram que o uso de cossolventes parecia refletir em dois efeitos opostos: uma diminuição da atividade enzimática como consequência do efeito deletério da presença do solvente orgânico e um aumento na atividade sintética como consequência do aumento na concentração da forma não-iônica do grupo carboxílico do doador acil AFA, que é a única forma ativa no processo sintético.

Concentrações muito altas de solventes apolares levam à melhor situação do ponto de vista termodinâmico, mas podem piorar a atividade enzimática. Fernández-Lafuente *et al.* (1991) reportaram que a utilização de concentrações moderadas de solventes “fortes” (por exemplo, dimetilformamida) proporciona as melhores possibilidades para simultaneamente apresentar boa atividade sintética e bons rendimentos sintéticos em uma ampla faixa de

condições experimentais. Em adição, solventes “intermediários” (por exemplo, butanodiol) podem atuar como nucleófilos, promovendo reações indesejáveis, e solventes “suaves” (por exemplo, glicerol) podem tornar o meio muito viscoso causando problemas de transporte de massa quando do aumento de escala do reator.

Kim & Lee (1996) investigaram o efeito de vários solventes orgânicos nas reações de SCC de pivampicilina e ampicilina, observando a interação do solvente com a PGA. O estudo mostrou que as velocidades de reação foram significativamente reduzidas pela presença de pequenas quantidades de solventes orgânicos, sendo extremamente baixas na presença de compostos com estrutura em anel e ácidos. Os autores reportaram que as velocidades de reação são menores na presença de solventes mais hidrofóbicos e que a atividade enzimática foi totalmente restabelecida após a remoção dos solventes, indicando que as interações entre os solventes e a enzima são específicas e reversíveis.

Segundo Kim & Lee (1996) a redução da velocidade de reação é principalmente atribuída a efeitos diretos do solvente sobre a enzima. Adicionalmente, Duggleby *et al.* (1995) reportaram que o sítio ativo da PGA é hidrofóbico. Deste modo, Kim & Lee (1996) sugeriram que as interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais dos aminoácidos que compõem o sítio ativo da PGA e os solventes orgânicos têm um papel determinante no efeito inibitório causado pelos solventes hidrofóbicos. Além disso, os autores indicaram que o efeito inibitório ocasionado por compostos ácidos pode ser explicado por interações eletrostáticas entre resíduos positivamente carregados da enzima e moléculas aniônicas.

Erarslan (1995) reportou que entre os solventes orgânicos miscíveis em água mais estudados, os polióis destacam-se por apresentarem os melhores resultados em biocatálise, supostamente por serem estabilizadores de enzimas. Dentre os polióis, destaque significativo para o etilenoglicol, com melhores resultados em termos de rendimento e produtividade (Illanes & Fajardo, 2001). Por conseguinte, o etilenoglicol foi exaustivamente explorado para o estudo da SCC de ampicilina e cefalexina visando a uma maior eficiência da síntese enzimática desses antibióticos (Illanes & Fajardo, 2001; Illanes *et al.*, 2003; Illanes *et al.*, 2004; Illanes *et al.*, 2005; Illanes *et al.*, 2006; Illanes *et al.*, 2007).

De acordo com Erarslan (1995), a explicação mais provável para o comportamento enzimático na presença de polióis é que estes previnem o desenovelamento da proteína através do fortalecimento das ligações de hidrogênio em interações hidrofílicas.

Posteriormente, Arroyo *et al.* (2002) corroboraram esta afirmação descrevendo ainda que os polióis são os solventes orgânicos mais adequados para realizar a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Deste modo, várias pesquisas foram desenvolvidas empregando o etilenoglicol como cossolvente em busca do aperfeiçoamento da SCC de diferentes antibióticos (Aguirre *et al.* 2002; Wei e Yang, 2003; Aguirre *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009).

Aguirre *et al.* (2002) reportaram que o rendimento da SCC de cefalexina e ampicilina foi maior na presença de etilenoglicol do que em meio aquoso. Os autores descreveram que a relação entre as velocidades iniciais da síntese do produto pela hidrólise é adequada para avaliar a SCC, sendo máxima na presença de etilenoglicol 50% (v/v), o que representou uma melhora de 230% em relação ao meio aquoso para a síntese de cefalexina (valor maior do que 1, dificilmente alcançável em meio aquoso) e 133% para ampicilina. Os melhores resultados para cefalexina indicaram que o ácido 7-amino desacetoxicefalosporânico (7-ADCA) é melhor nucleófilo do que 6-APA para estas reações.

Wei & Yang (2003) exploraram a SCC de ampicilina empregando etilenoglicol como cossolvente. Os autores observaram que o rendimento da ampicilina aumentou em até 50%, dependendo da concentração de etilenoglicol aplicada, o que foi explicado pela redução nas reações de hidrólise tanto do éster metílico da fenilglicina (EMFG) quanto da ampicilina. Além disso, os dados experimentais indicaram que o efeito do etilenoglicol no meio reacional diminuiu de maneira mais significativa a hidrólise da ampicilina do que a hidrólise do EMFG, com a relação sintetase/amidase variando de 0,2 a 0,88 quando a concentração de etilenoglicol aumentou de 0 para 40% (v/v).

Zhang *et al.* (2008) avaliaram a síntese enzimática de cefaclor em cossolventes orgânicos catalisada pela PGA de *Kluyvera citrophila* covalentemente imobilizada. Para tanto, os autores empregaram diversos solventes orgânicos, por exemplo, etilenoglicol, glicerol, acetato de etila e polietilenoglicol. Os melhores resultados em termos de rendimento foram encontrados nas reações sintéticas que utilizaram o etilenoglicol como cossolvente, alcançando um rendimento máximo de 91,1% nas seguintes condições de reação: 30% (v/v) de etilenoglicol, 5 °C, pH 6,5 e 3 mol de EMFG por mol de 7-ADCA.

Pan *et al.* (2008) afirmaram que os solventes orgânicos podem apresentar tanto um efeito inibitório sobre a atividade da enzima quanto um efeito deletério sobre a estabilidade do

biocatalisador, mas que com uma seleção cuidadosa do meio orgânico e o uso de derivados enzimáticos robustos, é possível realizar efetivamente a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos na presença de cossolventes. Os autores estudaram a SCC de ampicilina na presença de diversos solventes orgânicos com diferentes polaridades e encontraram que o acetato de etila foi o solvente mais satisfatório para produção enzimática de ampicilina, alcançando rendimento de 95% e seletividade de 1,5.

O metanol é outro solvente orgânico que tem sido utilizado para a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. Apesar de o metanol apresentar alguns resultados promissores, é o etilenoglicol que se destaca dentre os cossolventes mais amplamente estudados com o intuito de melhorar o processo sintético, aumentando o rendimento e minimizando a inativação da enzima (Chow *et al.*, 2007). Ao contrário do panorama de intensas investigações empregando o etilenoglicol, uma análise detalhada do uso de metanol como cossolvente para a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos não estava disponível na literatura científica.

Sabendo dessa carência de informações sobre a utilização de metanol, Chow *et al.* (2007) avaliaram a SCC de amoxicilina na presença deste solvente, utilizando o etilenoglicol para comparação. Os autores observaram que o metanol forneceu uma seletividade melhor do que o etilenoglicol, na concentração máxima de amoxicilina, e descreveram que 10% (v/v) de metanol foram suficientes para aumentar a seletividade em 19%, enquanto que um pequeno aumento na seletividade requer no mínimo 20% (v/v) de etilenoglicol. Contudo, a inibição da produção de amoxicilina ocorre em menores quantidades de metanol do que etilenoglicol (em 60 mM de substratos). Tem sido reportado que os alcoóis de cadeia curta podem se ligar à PGA e a convertem para uma conformação diferente, resultando em uma ativação não-essencial (Arroyo *et al.*, 2001). Em adição a esta observação, uma maior hidrofobicidade dos alcoóis pode resultar em ligação mais efetiva com o sítio ativo da PGA, já que este é composto por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Duggleby *et al.*, 1995). Portanto, Chow *et al.* (2007) puderam explicar o motivo pelo qual ocorre aumento mais efetivo na síntese de amoxicilina em metanol (Log P = -0,77) do que em etilenoglicol (Log P = -1,90), uma vez que o último é menos hidrofóbico.

Fernández-Lafuente *et al.* (1998) relataram que o efeito do metanol na SCC de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos depende da natureza do doador acil empregado, do derivado

enzimático e das condições reacionais. Quando o EMFG é utilizado, a presença de metanol no meio reacional aumenta a relação sintetase/amidase, mas diminui a relação sintetase/esterase, portanto, rendimentos sintéticos são maximizados usando excesso deste doador acil, uma vez que o ponto básico é diminuir a hidrólise do antibiótico recém sintetizado. Ao contrário, ao utilizar o éster metílico do ácido mandélico, o metanol eleva ambas as relações, e os rendimentos aumentam quase 2 vezes (de 38 para 70%).

Gonçalves *et al.* (2003) investigaram os efeitos inibitórios causados pelo metanol sobre as reações laterais que ocorrem durante a síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina, catalisada pela PGA covalentemente imobilizada em glioxil-agarose. Os autores reportaram que a inibição causada pelo metanol foi, principalmente, de natureza não-competitiva, pelo menos na faixa de concentrações que foram avaliadas (até 500 mM). Além disso, os autores relataram que os valores da constante de inibição para o metanol foram ligeiramente menores para o éster do que para o antibiótico (1170 e 1563 mM, respectivamente, para pH 7,5 e 25 °C), e que o pH não parece ter implicação sobre a inibição promovida pelo metanol.

Chen *et al.* (2008) reportaram pela primeira vez a SCC de amoxicilina usando *terc*-pentanol anidro como meio reacional. Os autores mostraram que a atividade catalítica foi mantida em *terc*-pentanol, além de observarem alto rendimento, que nas condições ótimas foi de 90% após 20 horas de reação, ou seja, as reações em meio orgânico levam mais tempo para alcançar o rendimento máximo, comparadas com aquelas em meio aquoso. Adicionalmente, ao avaliarem o efeito da adição de água no meio reacional, observaram que os melhores rendimentos foram realmente obtidos em meio anidro, uma vez que as reações hidrolíticas foram eliminadas nesta condição.

O efeito dos solventes orgânicos sobre as enzimas é principalmente devido à interação destes com a camada de água ligada à molécula protéica, que é essencial para a manutenção da conformação cataliticamente ativa da enzima. Por isso, os solventes orgânicos hidrofóbicos poderiam ser interessantes, pois estes não retiram essa camada essencial de água das enzimas (Bell *et al.*, 1995; Ebert *et al.*, 1998). No entanto, os fenômenos envolvidos nas interações enzima-cossolvente-substratos-água são tão complexos e interligados que a seleção do solvente ideal não pode ser baseada apenas nas suas propriedades físico-químicas; testes cinéticos são essenciais para esta avaliação. A instabilidade da PGA em solventes orgânicos

tem sido uma forte desvantagem para o emprego destes cossolventes no meio reacional (Kim & Lee, 1996). No entanto, isto não ocorre em todos os casos, por exemplo, polióis não têm efeito deletério importante sobre a atividade dessa enzima (Illanes & Fajardo, 2001). Além disso, os progressos nas técnicas de imobilização de enzimas têm possibilitado a construção de biocatalisadores cada vez mais robustos, capazes de suportar condições drásticas de reação (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999; Mateo *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2009). Assim, a utilização de solventes orgânicos como cossolventes no sistema de reação para a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos parece ser uma alternativa interessante (Aguirre *et al.*, 2002).

## 2.6. Líquidos Iônicos

Nos últimos anos, muito esforço tem sido dedicado ao estudo da síntese enzimática de diversos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos na presença de cossolventes orgânicos, com o intuito de alcançar melhores rendimentos sintéticos, empregando tanto a estratégia de controle termodinâmico quanto o controle cinético (Fernández-Lafuente *et al.*, 1991; Kim & Lee, 1996; Rosell *et al.*, 1998; Abian *et al.*, 2001; Aguirre *et al.*, 2002; Illanes *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2008, Du *et al.*, 2009; Bernardino *et al.*, 2010). Contudo, apesar de alguns bons resultados que têm sido relatados, solventes orgânicos têm a desvantagem de serem voláteis, inflamáveis, geralmente tóxicos e danosos ao meio ambiente.

Neste cenário, líquidos iônicos (LIs) têm emergido como solventes que podem ser capazes de substituir os meios orgânicos tradicionais em vários processos biotecnológicos. Um trabalho precursor reportou o uso de LIs como meio de reação em biotransformações, no qual os autores empregaram o hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF<sub>6</sub>) para a hidratação do cianobenzeno, catalisada pela enzima nitrila hidratase (Cull *et al.*, 2000). Quase simultaneamente, Erbedinger *et al.* (2000) descreveram a síntese de aspartame, catalisada pela termolisina, também em BMI.PF<sub>6</sub>. Após estes estudos pioneiros, o emprego de LIs em reações enzimáticas tem sido amplamente investigado.

LIs são sais orgânicos que existem como líquidos abaixo de uma temperatura limite, usualmente cerca de 100 °C (Sheldon, 2001; El Seoud *et al.*, 2007; Quijano *et al.*, 2010). Estes materiais consistem exclusivamente de um conjunto de íons positivos e negativos,

contudo, ao contrário dos sais convencionais, os LIs frequentemente fundem a temperaturas baixas. Isso acontece devido à alta complexidade e grande dimensão dos íons presentes, desfavorecendo energeticamente a estrutura cristalina da fase sólida (Hurley & Wier, 1993). Em outras palavras, grupos funcionais volumosos impedem o empacotamento dos íons em uma estrutura eletrostática ordenada sólida (Cota *et al.*, 2007).

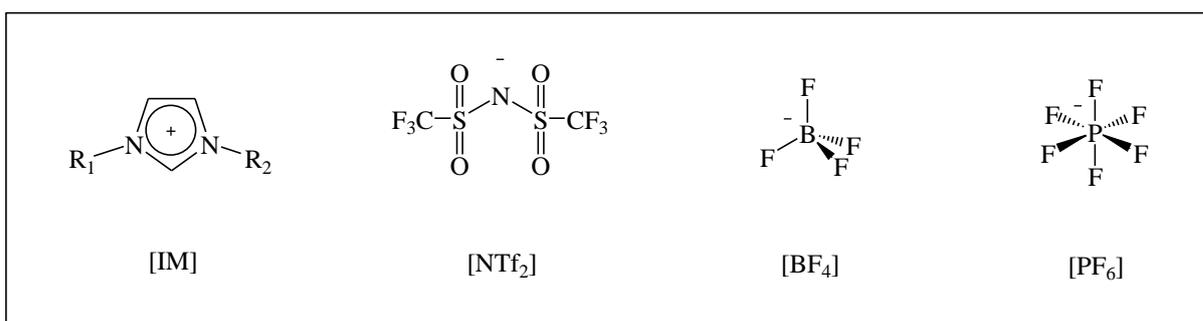
Estes produtos têm sido considerados como uma classe promissora de “solventes verdes”, principalmente devido à sua pressão de vapor desprezível (Sheldon, 2005; Ranke *et al.*, 2007). Além disso, o fato de não serem materiais inflamáveis e apresentarem elevada estabilidade térmica e química também contribui para esta classificação “verde” dos LIs (Dupont, 2004; Jain *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011). Em adição, suas propriedades físico-químicas (condutividade, hidrofobicidade, viscosidade, densidade e solubilidade) podem ser ajustadas pela seleção de diferentes combinações de cátions e ânions bem como dos grupos substituintes (Moniruzzaman *et al.*, 2010; Zhao, 2010).

Outra característica atrativa dos LIs é a capacidade de realizar múltiplas interações de solvatação com compostos orgânicos e inorgânicos (Moniruzzaman *et al.*, 2010). Em todas as soluções, pode haver um número de diferentes (em termos de tipo e força) e muitas vezes simultâneas interações entre o soluto e o solvente. Solventes mais simples (por exemplo, hexano) são limitados em número e tipos de interações de solvatação possíveis com moléculas dissolvidas, enquanto solventes mais complexos, com vários grupos funcionais, são capazes de realizar interações adicionais com moléculas dissolvidas. Esse é o caso dos LIs, que estão entre os solventes mais complexos (Anderson *et al.*, 2002).

A síntese de nitrato de etilamônio por Walden (1914) é geralmente indicada como a precursora da produção deste tipo de material. Sua síntese foi realizada pela adição de ácido nítrico a etilamina, com remoção da água por destilação, dando origem a um sal puro, líquido à temperatura ambiente (*apud* Wasserscheid & Welton, 2002). A maioria dos LIs baseados em 1,3-dialquilimidazólios pode ser preparada por simples *N*-alquilação de *N*-alquilimidazol, frequentemente utilizando haletos de alquila como agentes de alquilação, seguida pela associação com haleto metálico (Neto *et al.*, 2004) ou metátese do ânion (Suarez *et al.*, 1996). A metátese aniônica gera uma variedade de LIs de boa qualidade (Cassol *et al.*, 2006).

LIs típicos são baseados em cátions orgânicos combinados com uma variedade de ânions que apresentam uma carga negativa fortemente deslocalizada (Filice *et al.*, 2010). Os

sais constituídos pelo cátion imidazólio ( $\text{IM}^+$ ) são os LIs mais amplamente investigados em biotecnologia (Quijano *et al.*, 2010). Por outro lado, os ânions, hexafluorfosfato ( $\text{PF}_6^-$ ), tetrafluorborato ( $\text{BF}_4^-$ ) e bis(trifluormetilsulfonil)imida ( $\text{NTf}_2^-$ ) são os mais utilizados (Roosen *et al.*, 2008; Sureshkumar & Lee, 2009). A Figura 2.12 mostra a estrutura química destes íons, que são comuns na composição dos LIs mais frequentemente aplicados em bioprocessos. A Tabela 2.2 apresenta dados qualitativos de solubilidade de alguns LIs (Guisán, 2006).



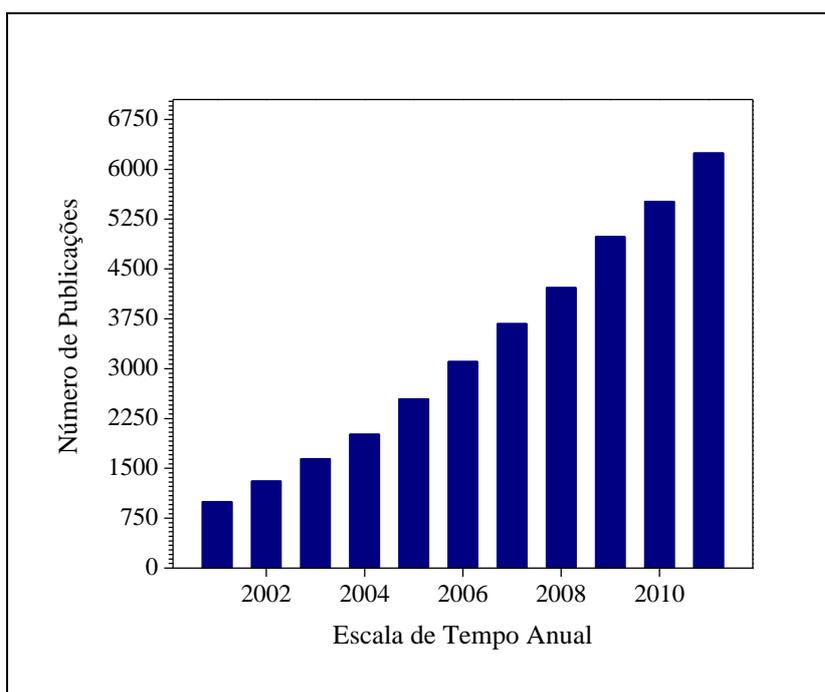
**Figura 2.12.** Estrutura química dos líquidos iônicos comumente utilizados em biotecnologia, cátion imidazólio ( $\text{IM}^+$ ) e ânions bis(trifluormetilsulfonil)imida ( $\text{NTf}_2^-$ ), tetrafluorborato ( $\text{BF}_4^-$ ) e hexafluorfosfato ( $\text{PF}_6^-$ ).

**Tabela 2.2.** Solubilidade qualitativa de alguns líquidos iônicos (Guisán, 2006). O sinal positivo indica que é solúvel e negativo indica que o LI é insolúvel no solvente.

CÁTION	ÂNION	ÁGUA	ACETONITRILA	HEXANO	TOLUENO
EMI	$\text{BF}_4$	+	+	-	-
BMI	$\text{BF}_4$	+	+	-	-
EMI	$\text{PF}_6$	+	+	-	-
BMI	$\text{PF}_6$	-	+	-	-
EMI	$\text{NTf}_2$	-	+	-	-
BMI	$\text{NTf}_2$	-	+	-	-

A utilização dos LIs tem aumentado significativamente em diversos setores de aplicação, por serem considerados produtos químicos extremamente versáteis e menos

prejudiciais ao meio ambiente do que os solventes orgânicos voláteis tradicionalmente empregados. LIs podem ser utilizados industrialmente nas áreas de química e farmacêutica e em aplicações de risco do ponto de vista ambiental (Quijano *et al.*, 2010). Deste modo, o número de trabalhos científicos envolvendo a utilização de LIs nos mais variados campos de pesquisa e desenvolvimento tem aumentado notavelmente na última década, como pode ser observado pela Figura 2.13.



**Figura 2.13.** Publicações empregando líquidos iônicos em diversos campos da pesquisa e desenvolvimento, apontando o considerável crescimento da utilização destes materiais (<http://apps.webofknowledge.com>).

### 2.6.1. Líquidos Iônicos em Reações Enzimáticas

Atividade catalítica e estabilidade das enzimas podem ser fortemente influenciadas pela estrutura dos LIs (Itoh *et al.*, 2001; Moniruzzaman *et al.*, 2010). Em alguns casos, estes solventes foram capazes de melhorar o comportamento das enzimas em comparação aos solventes orgânicos convencionais, em termos de atividade catalítica e enantiosseletividade (Noël *et al.*, 2004), ou de estabilidade enzimática (Kaar *et al.*, 2003). Alguns estudos com lipases mostraram que esta classe de enzimas exibiu estabilidade térmica maior em LIs do que

em solventes orgânicos, sendo sugerido que os primeiros pareciam exercer uma espécie de cobertura protetora no microambiente da enzima (Sheldon *et al.*, 2002; Lozano *et al.*, 2002). A maioria dos processos enzimáticos relatados na literatura utilizando LIs envolve reações que são catalisadas por lipases (Park & Kazlauskas, 2001; Schöfer *et al.*, 2001; Nara *et al.*, 2002; Lozano *et al.*, 2003; Ulbert *et al.*, 2004; Gamba *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2009; Hernández-Fernández *et al.*, 2010; Kobayashi, 2011). Na presença de LIs, lipases catalisam reações de esterificação mais eficientemente do que em meios orgânicos. Por exemplo, lipase de *Candida antarctica* mostrou-se dez vezes mais ativa em LI do que em éter diisopropílico (Lau *et al.*, 2000). Estudos espectroscópicos com lipases mostram que a estabilidade acrescida nos LIs se deve a uma estrutura mais compacta, com maior porcentagem de folhas  $\beta$  (De Diego *et al.*, 2005).

Impurezas (água, haletos e sais orgânicos e inorgânicos) podem alterar drasticamente o comportamento enzimático (Park e Kazlauskas, 2001; van Rantwijk & Sheldon, 2007). Lee *et al.* (2006) relataram que o excesso de cloreto, por exemplo, ocasionou severa desativação de lipases. Alguns LIs contaminados com água podem hidrolisar, proporcionando uma drástica alteração do pH, como é o caso dos LIs compostos pelo ânion  $\text{PF}_6^-$ , inativando a enzima, sendo que em alguns casos, uma simples correção do pH ou aumento da força iônica do sistema tamponante pode resolver o problema. Outra causa de inibição enzimática pode ser a complexação de alguns constituintes dos LIs com íons metálicos presentes no sítio ativo de algumas enzimas (Wasserscheid & Welton, 2002).

A ativação ou inibição de enzimas na presença de LIs podem ser resultado de diversas e complexas interações entre todos os diferentes componentes do meio reacional, tais como: natureza do LI, disponibilidade de água para a enzima, características do biocatalisador imobilizado, tipo e concentração de substratos, pH e força iônica do sistema tamponante, entre outros (Moniruzzaman *et al.*, 2010). Os fatores mais frequentemente utilizados para explicar o comportamento das enzimas na presença de LIs são suas propriedades físico-químicas, tais como polaridade, viscosidade e hidrofobicidade, além das possíveis interações que ocorrem entre estes íons e os outros elementos do sistema (Lai *et al.*, 2011).

LIs têm sido considerados solventes altamente polares (van Rantwijk *et al.*, 2003), com polaridade similar a alcoóis de cadeia curta, como o metanol (Muldoon *et al.*, 2001). A miscibilidade em água exerce grande influência sobre a catálise enzimática, uma vez que afeta

diretamente a atividade da água,  $a_w$ , no sistema. Alguns solventes apresentam tendência a remover água do microambiente que cerca a enzima (Zaks & Klivanov, 1988) e a magnitude deste efeito pode levar a uma hidratação insuficiente e perda da atividade catalítica (Halling, 1994). A extensão deste fenômeno é maior para os solventes hidrofílicos, e, por esta razão, os solventes hidrofóbicos muitas vezes apresentam melhores resultados em reações enzimáticas (Bell *et al.*, 1995).

Wasserscheid & Welton (2002) reportaram que os LIs são fluidos mais viscosos do que os solventes orgânicos convencionalmente aplicados em biotecnologia. Em adição, van Rantwijk & Sheldon (2007) afirmam que a alta viscosidade dos LIs pode retardar mudanças conformacionais de proteínas, permitindo que as enzimas possam manter suas estruturas nativas, e, conseqüentemente, sua atividade catalítica. Entretanto, muitas enzimas são imobilizadas/estabilizadas para propósitos industriais, ou seja, utilizadas como catalisadores heterogêneos. Estas partículas de catalisador estão sujeitas a limitações de transferência de massa dos reagentes/produtos, as quais são fortemente influenciadas pela viscosidade do meio reacional (Kragl *et al.*, 2002).

### **2.6.1.1. Penicilina G Acilase em Líquidos Iônicos**

Como já visto, LIs oferecem possibilidades interessantes para biotransformações (Kragl *et al.*, 2002; Sheldon *et al.*, 2002; Park & Kazlauskas, 2003; Moon *et al.*, 2006; van Rantwijk & Sheldon, 2007; Zhang *et al.*, 2011). As reações enzimáticas na presença de LIs apresentam comportamento cinético e termodinâmico diferente, o que pode levar a melhores desempenhos do que em meio aquoso (Jain *et al.*, 2005). Por isso, há um interesse crescente em aplicações não somente com lipases, mas igualmente com outras enzimas. Existem poucos dados bibliográficos sobre as reações enzimáticas catalisadas pela PGA na presença de LIs como solventes ou cossolventes no meio reacional.

Basso *et al.* (2005) reportaram um estudo sobre a atividade e estabilidade da PGA em seis LIs imidazólicos, variando não só o tamanho da cadeia alquílica ligada ao cátion (butil ou octil), como também os tipos de ânions ( $\text{BF}_4$ ,  $\text{PF}_6$  e  $\text{CH}_3\text{OSO}_3$ ), sendo que os experimentos foram realizados em valores de  $a_w$  controlados. Os autores não descreveram informações

adicionais sobre o biocatalisador, apenas que se tratava de PGA de *E. coli* covalentemente imobilizada em polímero, sem mencionar detalhes sobre suporte ou protocolo de imobilização. Além disso, a atividade catalítica da PGA foi avaliada pela síntese de uma amida a partir de EMFG e metilfenilacetato. Segundo Basso *et al.* (2005),  $a_w$  depende de interações específicas entre solvente e moléculas de água, e estas interações são favoráveis em solventes que solubilizam água, resultando em valores mais baixos de  $a_w$ . Por isso, LIs com o ânion  $PF_6$  apresentaram  $a_w$  maior do que com  $BF_4$  e  $CH_3OSO_3$ , uma vez que o primeiro é o mais hidrofóbico dentre estes ânions avaliados. Os pesquisadores afirmaram ainda que a atividade catalítica de amidases, glicosidases e proteases em meios não-aquosos (solventes orgânicos ou líquidos iônicos) dependem fortemente da  $a_w$  do sistema, e que os LIs não poderiam ser utilizados diretamente para as reações catalisadas pela PGA sem que fossem previamente hidratados até  $a_w$  compatível com a atividade da enzima. Os autores reportaram que o biocatalisador era uma preparação altamente estável e que mantinha totalmente sua atividade original por até várias semanas em tampão, porém, os resultados mostraram que na presença dos LIs compostos por  $CH_3OSO_3$  ocorreu inativação da PGA em poucas horas.

Efeitos deletérios dos sulfatos de alquila já são relatados na literatura (Kaftzik *et al.*, 2004; Lozano *et al.*, 2004). O cátion parece exercer um forte efeito na desnaturação da PGA, uma vez que a enzima mostra maior estabilidade na presença dos LIs formados por cátions com cadeias alquílicas mais curtas, ou seja, é mais estável em butil do que octil. De acordo com Basso *et al.* (2005), PGA se manteve completamente estável na presença de BMI. $PF_6$  e BMI. $BF_4$ , mostrando boa atividade sintética nestes LIs (apesar da alta viscosidade destes meios), ou seja, síntese completa e sem reações laterais de hidrólise dos reagentes e produtos. Contudo, para tanto, foi previamente necessária uma hidratação destes LIs para alcançar valores de  $a_w$  próximos a 0,8. Em um estudo precedente, Basso *et al.* (2001) descreveram que uma PGA covalentemente imobilizada, na presença de solventes orgânicos (diclorometano e tolueno), é ativa somente em valor de  $a_w$  acima de 0,5, mostrando um máximo de atividade catalítica em  $a_w$  próxima a 0,8.

Zhang *et al.* (2006) estudaram a atividade catalítica da PGA na reação de hidrólise da penicilina G empregando vários LIs para compor os meios de reação com a formação de sistemas mono e bifásicos com a água, dependendo da miscibilidade de cada LI. Os autores não descreveram muitas informações sobre o biocatalisador, somente que se tratava de uma PGA de *E. coli* imobilizada em polimetacrilimida. PGA apresentou boa atividade hidrolítica

na mistura composta por 25% (v/v) de dicianamida de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.DCA) e 75% (v/v) de água, porém, a recuperação e reutilização do BMI.DCA pode ser uma desvantagem para o processo, uma vez que é miscível em água.

Ao contrário dos resultados que foram encontrados por Basso *et al.* (2005), cujo estudo avaliou a atividade sintética da PGA, Zhang *et al.* (2006), estudando a hidrólise enzimática de penicilina G para a produção de 6-APA, reportaram que nenhuma atividade hidrolítica foi encontrada para a PGA na presença de BMI.BF<sub>4</sub>. Os autores relataram que PGA apresentou maior estabilidade em BMI.PF<sub>6</sub> do que em tampão e o sistema bifásico ÁGUA/BMI.PF<sub>6</sub> mostrou ser uma ótima alternativa ao sistema aquoso utilizado na indústria para a produção de 6-APA, pois evita efeitos inibitórios (substratos e produtos permanecem dissolvidos na fase aquosa), facilita a recuperação do BMI.PF<sub>6</sub> (simples decantação), e permite a reutilização tanto do BMI.PF<sub>6</sub> quanto da PGA.

De los Ríos *et al.* (2007) avaliaram a estabilidade da PGA de *E. coli* nativa ao ser incubada em LIs e solventes orgânicos com baixo conteúdo de água na temperatura de 40 °C, utilizando a hidrólise da penicilina G como atividade teste e modelos de desativação em série envolvendo duas etapas de primeira ordem (precursor ativo e um estado final com possível atividade diferente de zero). Os pesquisadores descreveram que a desativação completa foi praticamente instantânea em tolueno e diclorometano, e que o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da PGA em isopropanol foi de apenas 0,7 minutos. As constantes de desativação foram muito reduzidas na presença dos LIs e o  $t_{1/2}$  foi notavelmente melhorado com relação ao isopropanol. O  $t_{1/2}$  da PGA em EMI.NTf<sub>2</sub> foi cerca de 2000 vezes maior do que em isopropanol. Os autores afirmaram que o mais importante efeito de estabilização ocasionado pelos LIs em relação ao isopropanol pode ser observado na comparação dos  $t_{1/2}$  dos diferentes ânions para o mesmo cátion, NTf<sub>2</sub> > PF<sub>6</sub> > BF<sub>4</sub>, com a ordem hidrofobicidade destes ânions, BF<sub>4</sub> < PF<sub>6</sub> < NTf<sub>2</sub>, ou seja, o  $t_{1/2}$  aumentou com o aumento da hidrofobicidade. A explicação dada para este fenômeno foi que o aumento na hidrofobicidade do meio permite a preservação da camada de água essencial ao redor da molécula protéica, reduzindo interações diretas proteína-íon.

Adicionalmente, de los Ríos *et al.* (2007) relataram que o cátion exerce um forte efeito na desnaturação, uma vez que PGA é mais estável em LIs contendo o cátion com cadeia alquílica mais curta, o que corrobora pesquisa anterior de Basso *et al.* (2005). Os autores

realizaram ainda um estudo da influência da penicilina G no meio de incubação, constatando que a presença do substrato melhorou muito a estabilidade da enzima em BMI.PF<sub>6</sub> e BMI.BF<sub>4</sub>, mas piorou em BMI.NTf<sub>2</sub>, sugerindo que a maior hidrofobicidade do BMI.NTf<sub>2</sub> ocasionou um aumento do número de moléculas de água livres que devem ter hidrolisado a penicilina G gerando 6-APA e AFA, inibidores da PGA.

Jiang *et al.* (2007) propuseram uma metodologia para melhorar a eficiência da hidrólise enzimática de penicilina G com a utilização de um sistema bifásico composto por uma mistura de LIs (BMI.BF<sub>4</sub> e BMI.PF<sub>6</sub>) e água. Os pesquisadores descreveram que a penicilina G foi hidrolisada na fase aquosa em pH 5, e afirmaram que esta é uma condição melhor para atividade e estabilidade enzimática do que o pH 4 do típico sistema formado por acetato de butila e água. Os autores relataram ainda que o AFA foi transferido para a fase dos LIs, enquanto o 6-APA foi precipitado neste valor de pH, e que estes fatores contribuíram para reduzir a inibição da enzima.

Neste contexto, LIs podem ser empregados como uma alternativa promissora para a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. Como já descrito, na síntese enzimática destes antibióticos, sob a rota de controle cinético, há uma competição entre a reação sintética (síntese do antibiótico) e as reações hidrolíticas (hidrólise do derivado ativado do doador acil e do antibiótico recém sintetizado), todas catalisadas pela PGA. Assim, o sistema reacional deve apresentar o menor valor de  $a_w$  (hidratação da enzima) possível para minimizar estas reações de hidrólise, mas que seja suficiente para manter a enzima na sua conformação cataliticamente ativa. Para tanto, torna-se necessário um controle efetivo da  $a_w$  do meio de reação para garantir esta condição operacional.

## **2.6.2. Toxicidade dos Líquidos Iônicos**

LIs têm se destacado devido às inúmeras aplicações e vantagens que estes materiais apresentam como solventes em potencial para diversos processos químicos e bioquímicos (Moniruzzaman *et al.*, 2010; Quijano *et al.*, 2010). Vale ressaltar que uma das características mais apreciáveis destes solventes é o fato de apresentarem pressão de vapor desprezível (Sheldon *et al.*, 2005), o que impede a emissão de compostos voláteis que poluem a atmosfera

(Zhu *et al.*, 2009). Este fato eleva os LIs a um patamar superior em relação aos solventes orgânicos tradicionalmente utilizados em processos biotecnológicos, pois além de serem voláteis, são frequentemente tóxicos e nocivos ao meio ambiente.

Apesar disso, nem todos os LIs são completamente inócuos. Ao contrário, alguns destes solventes são tão tóxicos quanto os solventes orgânicos convencionais, enquanto outros são relativamente inócuos (Poliakoff & Licence, 2007), mas ainda proporcionam a vantagem de não serem voláteis, minimizando os riscos ambientais. Informações a respeito das propriedades toxicológicas dos LIs são essenciais para avaliar e compreender os riscos que estão associados à sua utilização em escala industrial. Embora alguma informação desse gênero esteja disponível na literatura, estas ainda não são totalmente conclusivas (Poole, 2004; Latala *et al.*, 2005; María, 2008).

Cull *et al.* (2000) avaliaram os efeitos tóxicos/inibitórios de BMI.PF<sub>6</sub> e tolueno sobre *Rhodococcus* R312 através da medida da atividade residual da enzima nitrila hidratase destas células em função do tempo por um período prolongado de mistura em cada um dos sistemas bifásicos (ÁGUA/BMI.PF<sub>6</sub> e ÁGUA/TOLUENO). Os autores desta pesquisa mostraram que o tolueno apresentou um efeito muito mais nocivo sobre a atividade das células em comparação com o BMI.PF<sub>6</sub>, para o qual, durante o período inicial da mistura, a atividade específica da nitrila hidratase chegou a ser uma ordem de magnitude maior que em tolueno. Com isso, sugeriram que o BMI.PF<sub>6</sub> é menos tóxico às células do que o tolueno (Cull *et al.*, 2000).

Segundo Hodgson (2004), dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) é o parâmetro empregado para descrever a dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste (medida em miligramas de substância por quilograma de massa corporal dos indivíduos testados), frequentemente usado como um indicador da toxicidade aguda de uma substância, ou seja, quanto maior a dose que será letal, menos tóxica é considerada. No primeiro estudo da toxicidade em mamíferos, DL<sub>50</sub> de 1400 mg/kg para ratas Wistar foram reportados para tetrafluorborato de 3-hexoiloximetil-1-metilimidazólio (HOMI.BF<sub>4</sub>), e os autores concluíram que tetrafluorboratos podem ser usados com segurança (Pernak *et al.*, 2001).

Garcia *et al.* (2005) afirmaram que geralmente os LIs baseados no cátion 1-butil-3-metilimidazólio (BMI) são pouco biodegradáveis, o que foi posteriormente corroborado por Romero *et al.* (2009). Em trabalho posterior, van Rantwijk & Sheldon (2007) relataram que a toxicidade dos LIs que apresentam o cátion 1-alkil-3-metilimidazólio em sua composição é

relativamente alta e aumenta com o comprimento da cadeia alquílica substituinte. Do mesmo modo, Romero *et al.* (2009) reportaram essa dependência direta da toxicidade dos LIs com o aumento do grupo alquil que compõe o cátion, e asseguraram ainda que o ânion exerce pouco efeito sobre essa toxicidade.

Hernández-Fernández *et al.* (2010) afirmaram que a avaliação do risco apresentado pelos LIs em comparação aos solventes industriais deve considerar não apenas a toxicidade, mas também a exposição, que é presumivelmente reduzida para os LIs. A exposição reduzida é explicada pela pressão de vapor desprezível e por uma possível bioacumulação menor dos LIs. Bioacumulação é definida como a capacidade da molécula penetrar através das membranas celulares e acumular nos organismos, podendo ser medida pelo coeficiente de partição no sistema octanol/água (Hernández-Fernández *et al.*, 2010). Este parâmetro tem sido medido para uma ampla gama de LIs e é significativamente menor do que para os solventes orgânicos Ropel *et al.* (2005).

Moniruzzaman *et al.* (2010) descreveram que os LIs hidrofóbicos, particularmente contendo os ânions PF<sub>6</sub> e NTf<sub>2</sub>, são menos tóxicos às membranas celulares do que os típicos solventes orgânicos aplicados na indústria. Esse estudo foi corroborado por alguns trabalhos anteriores enfocando biocatálise com células inteiras de microrganismos na presença destes LIs, por exemplo, *Lactobacillus kefir* (Pfruender *et al.*, 2006), *E. coli* (Brautigam *et al.*, 2009), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Bacillus cereus* e *Geotrichum candidum* (Matsuda *et al.*, 2006). Wang *et al.* (2009) reportaram outro exemplo bem sucedido de biocatálise com células de *Rhodotorula sp.* AS2.2241 em um sistema bifásico água/BMI.PF<sub>6</sub>.

Em contrapartida, alguns autores reportaram efeitos tóxicos dos LIs em relação a bactérias e leveduras (Lenourry *et al.*, 2005; Ganske & Bornscheuer, 2006). Adicionalmente, Pham *et al.* (2010) descreveram o efeito dos LIs nos organismos que são considerados indicadores ecotoxicológicos, por exemplo, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lemma minor* e *Daphnia magna*, concluindo que os LIs foram potencialmente perigosos para todos os organismos que foram estudados e que o potencial tóxico dos LIs está relacionado ao seu caráter de hidrofobicidade, uma vez que uma maior ecotoxicidade foi encontrada para a série de LIs mais hidrofóbicos.

De acordo com Moniruzzaman *et al.* (2010), inicialmente foi suposto que a toxicidade dos LIs é semelhante ao potencial tóxico dos solventes orgânicos, mas que estas

conclusões ainda são contestáveis, uma vez que inúmeros estudos mostram divergências de informações. Um exemplo destes dados divergentes é o estudo reportado por Lee *et al.* (2005) em que mostraram o efeito tóxico do BMI.PF<sub>6</sub> no crescimento de *E. coli* em concentrações tão baixas quanto 0,5% (v/v), enquanto nenhum efeito tóxico foi encontrado por Pfruender *et al.* (2006) em 20% (v/v) para o mesmo microrganismo. Quijano *et al.* (2010) afirmaram que mais pesquisas são necessárias antes da aplicação dos LIs em escala industrial.

Apesar dos LIs não serem voláteis, reduzindo não só o risco à saúde humana, durante sua manipulação nas operações industriais, como também a poluição atmosférica, em comparação aos solventes orgânicos, a característica “verde” dos LIs depende de outro aspecto importante, ou seja, o impacto de um vazamento acidental para o meio ambiente. Neste sentido, uma avaliação criteriosa de sua bioacumulação, toxicidade e degradabilidade devem ser realizadas (Zhao *et al.*, 2007), ou seja, os riscos de uma possível poluição da água e do solo também devem ser levados em conta (Ranke *et al.*, 2007). Portanto, mais pesquisas são claramente necessárias para explorar as implicações da utilização de LIs.

### 2.6.3. Líquidos Iônicos Próticos

Até o momento, a maioria dos LIs pesquisados tem a composição baseada no cátion alquilimidazólio e, em menor proporção, nos cátions alquilpiridínico e trialquilaminas (Marsh *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2010a). LIs podem ser classificados em dois tipos, apróticos (LIAs) e próticos (LIPs) (Álvarez *et al.*, 2010b). LIPs são produzidos através da combinação de um ácido de Brønsted e uma base de Brønsted (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010). A principal diferença entre os LIPs e os LIAs é que a transferência do próton de um ácido para uma base leva à presença de sítios doadores e aceptores de prótons, que podem ser usados para construir uma rede de ligações de hidrogênio (Greaves & Drummond, 2008). O primeiro LI relatado era prótico, o nitrato de etilamônio, sintetizado em 1914 por Walden (Wasserscheid & Welton, 2002). Posteriormente, Bicak (2005) sintetizou o formiato de 2-hidroxi-etilamônio (2-HEAF), formado pela simples neutralização da monoetanolamina com o ácido fórmico. Em outro estudo, Greaves *et al.* (2006) propuseram a síntese de diversos LIPs que foram formados a partir de aminas primárias e ácidos orgânicos ou inorgânicos. Adicionalmente, Iglesias e colaboradores sintetizaram uma série de LIPs baseados na reação

primeiramente proposta por Bicak (2005), modificando a cadeia alifática do ácido orgânico e/ou usando hidroxilaminas secundárias e terciárias (Cota *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2008). Esta família de LIPs apresenta algumas propriedades, por exemplo, estabilidade e condutividade baixas, que conduziram a uma redução do interesse inicial na utilização destes materiais industrialmente (Kennedy & Drummond, 2009). Entretanto, os LIPs oferecem também algumas outras propriedades e atributos que são igualmente importantes para a avaliação da viabilidade de sua aplicação em escala industrial, tais como o baixo custo e a simplicidade operacional na sua preparação, incluindo os métodos de síntese e purificação, além da baixa toxicidade e potencial biodegradabilidade (Bicak 2005; Greaves *et al.*, 2006; Iglesias *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2010a; Peric *et al.*, 2011).

Uma coleção de LIPs, ligeiramente básicos, foi utilizada para testar sua atividade catalítica em várias reações de condensação aldólicas de alguns compostos carbonílicos, apresentando bons resultados em termos de conversão e seletividade (Cota *et al.*, 2007). A justificativa para o estudo de Cota *et al.* (2007) é o processo de produção industrial que envolve este tipo de reação, uma vez que utiliza bases convencionais (NaOH e KOH) como catalisadores (Roelofs *et al.*, 2001), mas este tipo de catalisador homogêneo tem algumas desvantagens, tais como grandes perdas de catalisador devido às dificuldades de separação, problemas de corrosão nos equipamentos e geração de resíduos. LIPs tem sido alvo de investigações em uma grande variedade de aplicações. Dentre elas, estes produtos têm sido empregados com sucesso em muitas outras reações de síntese orgânica, por exemplo, na condensação de Knoevenagel (Hangarge *et al.*, 2002), alquilação de Friedel-Crafts (Duan *et al.*, 2006) e reação de Mannich (Zhao *et al.*, 2004). Além disso, os LIPs estão sendo potencialmente utilizados como fase estacionária para separações cromatográficas (Waichigo *et al.*, 2005), como constituintes de matrizes iônicas na espectrometria de massas (Anderson *et al.*, 2002), em aplicações biológicas (Angell & Wang, 2003), eletroquímica (Rocheffort & Pont, 2006), lubrificantes (Qu *et al.*, 2006), entre outros.

## **2.7. Outras abordagens**

Durante a síntese enzimática de amoxicilina, conduzida pela estratégia de controle cinético, as reações laterais de hidrólise representam o principal obstáculo para alcançar bons

rendimentos sintéticos, conforme foi abordado com detalhes antecipadamente na seção 2.4.2. Estas reações hidrolíticas laterais indesejáveis são resultado da atividade hidrolase que a PGA exerce tanto sobre o antibiótico recém sintetizado quanto sobre o derivado ativado do doador acil (por exemplo, um éster). Durante o decorrer destas reações de hidrólise ocorre a geração de POHFG. Portanto, um processo de reaproveitamento deste subproduto precisa ser desenvolvido para que possa ser adequadamente recuperado e, em seguida, reutilizado para a produção de nova quantidade de éster, que poderia ser reciclado ao reator de síntese enzimática de amoxicilina.

A configuração industrial mais promissora para a síntese enzimática cineticamente controlada emprega um reator batelada alimentada, onde os reagentes são continuamente alimentados ao reator, enquanto ocorre a cristalização dos produtos durante o curso da reação (Ribeiro, 2007). Esta condição operacional resulta na remoção do antibiótico da fase líquida. Na forma de cristal, a amoxicilina torna-se inacessível para a enzima, impedindo sua hidrólise, o que aumenta a seletividade global do processo (Ferreira *et al.*, 2007). O equilíbrio termodinâmico sólido-líquido na síntese enzimática de ampicilina em meio aquoso foi estudado por Santana *et al.* (2010). Assim, os cristais do produto esperado (amoxicilina, no caso desta tese) e do subproduto indesejado (POHFG) devem ser separados, para que a POHFG possa ser reciclada ao reator, na forma do substrato ativado.

Uma variedade de procedimentos de separação pode ser utilizada nos sistemas biotecnológicos, incluindo filtração, centrifugação, cromatografia, precipitação, extração, adsorção, eletroforese e cristalização (Belter *et al.*, 1988). A escolha da técnica de separação adequada deve levar em conta que amoxicilina e POHFG apresentam características de aminoácidos, uma vez que possuem grupos amino e carboxílico em sua estrutura. Além disso, a natureza e distribuição de cargas elétricas ao longo das moléculas é função do pH do meio. Assim, uma variação seletiva no pH pode ser considerada uma estratégia conveniente para a separação de amoxicilina e POHFG a partir de uma mistura destes compostos.

Segundo Tsuji *et al.* (1978), a solubilidade de amoxicilina tem seu mínimo no pH próximo ao ponto isoelétrico (pI). Em contrapartida, Diender *et al.* (1998) reportaram que a solubilidade de POHFG não é tão dependente do pH, como pode ser visto por alguns dados de solubilidade obtidos por estes autores a 25 °C em água, mostrados na Tabela 2.3. O grupo carboxílico de todas as penicilinas parece ter valores das constantes de dissociação (pK)

similares (2,6-2,7), enquanto o pK dos grupos amino varia um pouco mais (7,15-7,65), provavelmente influenciado pelos grupos adjacentes da cadeia lateral. A Tabela 2.4 apresenta os valores de pK em água a 25 °C (Diender *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1999).

**Tabela 2.3.** Valores experimentais de solubilidade em água para a amoxicilina e *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) obtidos a 25 °C por Diender *et al.* (1998).

ESPÉCIES	pH 6,5	pH 7,5
	SOLUBILIDADE (mM)	SOLUBILIDADE (mM)
POHFG	116,7	116,7
AMOXICILINA	8,3	15,8

**Tabela 2.4.** Constantes de dissociação (pK) para a amoxicilina e *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) determinadas experimentalmente em água a 25 °C.

REFERÊNCIA	POHFG		AMOXICILINA	
	pk <sub>1</sub>	pk <sub>2</sub>	pk <sub>1</sub>	pk <sub>2</sub>
Diender <i>et al.</i> (1998)	2,20	9,20	2,90	7,40
Rudolph <i>et al.</i> (1999)	1,96	9,02	2,63	7,16

Essa metodologia de separação foi realizada por Boesten *et al.* (1999), que estudaram a recuperação de ampicilina a partir de uma mistura de cristais de ampicilina e fenilglicina (FG) obtida durante a síntese enzimática de ampicilina. Primeiramente, solubilizaram a ampicilina através da elevação do pH para um valor acima de 8,5, pois sua solubilidade aumenta em valores de pH mais elevados, enquanto a solubilidade da FG permanece praticamente constante com a variação do pH. Feito isso, realizaram uma filtração e obtiveram cristais de FG com elevada pureza e, em seguida, o filtrado foi acidificado para o pI da ampicilina, o que rendeu cristais de ampicilina com 98% de pureza (Boesten *et al.*, 1999). Posteriormente, este procedimento para a purificação de ampicilina a partir de uma

mistura de cristais composta por ampicilina e fenilglicina foi realizado com sucesso por Vieira (2003), cujos resultados corroboraram o estudo prévio de Boesten *et al.* (1999).

## CAPÍTULO 3

### SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMOXICILINA EM MEIO TOTALMENTE AQUOSO

Neste capítulo são apresentados todos os passos seguidos para o desenvolvimento de um processo integrado “verde” de recuperação, reutilização e reciclo do subproduto da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meio totalmente aquoso.

#### 3.1. Introdução

Éster metílico é o substrato ativado padrão empregado para a síntese enzimática cineticamente controlada de penicilinas semi-sintéticas. Contudo, o éster etílico é menos prejudicial, porque o éster metílico conduz à geração de metanol no transcorrer destas reações, o que, em escala industrial, representa um alto impacto sobre a saúde e segurança ambiental do processo enzimático de produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Até pouco tempo atrás, não era possível encontrar nos catálogos dos fornecedores mundialmente conhecidos o derivado ativado da *p*-hidroxifenilglicina na forma de éster, nem o metílico e tampouco o etílico, os quais são reagentes essenciais para o estudo da síntese enzimática cineticamente

controlada de amoxicilina. Com isso, restava aos laboratórios de pesquisa acadêmica desenvolver seus próprios protocolos para realizar a produção destes compostos. A partir do ano de 2010, somente o éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG) passou a ser comercializado. Entretanto, a utilização do EEPOHFG é mais apropriada, uma vez que este reagente contribui para diminuir o impacto ambiental da tecnologia enzimática.

Durante todo o decorrer da síntese cineticamente controlada de amoxicilina, POHFG é continuamente formada como subproduto, em decorrência da atividade hidrolítica da PGA. Por razões econômicas e ambientais, é fundamental o desenvolvimento de um procedimento para o reaproveitamento adequado deste subproduto e que possa ser aplicado eficientemente na síntese enzimática de amoxicilina. Em outras palavras, o subproduto (POHFG) deve ser recuperado para ser reutilizado na produção de quantidade adicional do substrato ativado (neste caso, EEPOHFG), o qual poderia ser subsequentemente reciclado ao reator enzimático para a realização de uma nova batelada de síntese de amoxicilina em meio aquoso.

Os processos que envolvem a utilização da catálise enzimática e o emprego de reagentes que contribuem para minimizar os impactos ambientais são classificados como tecnologias ambientalmente sustentáveis que estão intimamente ligadas à química verde. Neste contexto, este capítulo estuda um processo integrado “verde” de reaproveitamento do subproduto da síntese enzimática de amoxicilina em meio aquoso. A recuperação da POHFG a partir de uma mistura de cristais de POHFG e amoxicilina é feita por meio de variação seletiva no pH, de acordo com a solubilidade destes compostos. Em seguida, POHFG é esterificada com etanol gerando EEPOHFG, que é reciclado ao reator para outra síntese enzimática de amoxicilina em meio aquoso.

## **3.2. Materiais e Métodos**

### **3.2.1. Enzima, Reagentes e Outros Materiais de Consumo**

- ❖ Penicilina G acilase (PGA) de *Escherichia coli* imobilizada covalentemente em suporte Sepabeads<sup>®</sup> (Mitsubishi Chemical Corporation), gentilmente doada pelo Laboratório de

Engenharia Enzimática do Departamento de Biocatálise do Instituto de Catálise (CSIC) da Universidade Autônoma de Madri, Espanha;

- ❖ Os reagentes, *p*-hidroxifenilglicina (POHFG), éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG), ácido 6-amino penicilânico (6-APA), amoxicilina (AMOX) e *p*-dimetilaminobenzaldeído (PDAB), da Sigma-Aldrich Corporation;
- ❖ Penicilina G (PEN G), gentilmente doada pela Prodotti Laboratório Farmacêutico;
- ❖ Solventes variados (ácido acético, ácido fosfórico, acetato de etila, diclorometano, ácido clorídrico, metanol e etanol) da Qhemis;
- ❖ Reagentes diversos (fosfato de potássio anidro, fosfato de sódio monobásico, hidróxido de sódio, carvão ativado, brometo de potássio, sulfato de sódio anidro, fosfato de sódio dibásico e hidróxido de amônio) da Synth;
- ❖ Dodecil sulfato de sódio da J.T.Baker;
- ❖ Solventes grau HPLC (acetonitrila, isopropanol, etanol e metanol) da J.T.Baker;
- ❖ Solventes deuterados (metanol e água) da Cambridge Isotope Laboratories;
- ❖ Água com altíssimo grau de pureza (Milli-Q);
- ❖ Papel de filtro quantitativo n° 42 da Whatman;
- ❖ Membrana filtrante de celulose regenerada 0,45 µm da Sartorius Stedim Biotech;
- ❖ Sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM) da Merck Millipore.

### **3.2.2. Equipamentos e Afins**

- ❖ Agitador mecânico M110-VER-4K3 da Nova Ética;
- ❖ Banho termostaticado RTE-111 da Neslab;
- ❖ pHmetro 525A da Orion;
- ❖ Ultrassom 1450 da Maxiclean;
- ❖ Manta aquecedora 302 da Fisatom;

- ❖ Evaporador rotativo Laborota 4000 da Heidolph;
- ❖ Bombas de vácuo 131/132 da Primatec;
- ❖ Agitador magnético 752 da Fisatom;
- ❖ Balança analítica Q-500L210C da Quimis;
- ❖ Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, ou HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) 996 da Waters, equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD, ou PDA, do inglês Photodiode Array Detector);
- ❖ Coluna Gemini C18 da Phenomenex (150 x 4,6 mm, 5 µm);
- ❖ Espectrofotômetros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) ARX-200/ARX-400 da Bruker;
- ❖ Espectrofotômetro de infravermelho (IV) M102 da Bomem;
- ❖ Espectrofotômetro de massas (EM) Xevo TQ da Waters, equipado com um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo e uma fonte de ionização do tipo electrospray;
- ❖ Espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV-Vis da Pharmacia Biotech;
- ❖ Termômetro 5003 da Incoterm;
- ❖ Sistema para purificação de água Milli-Q RG da Millipore Corporation;
- ❖ Cronômetro SW2018 da Cronobio;
- ❖ Pipetas automáticas reguláveis de vários volumes da Eppendorf;
- ❖ Sistema de filtração a vácuo F250 da Nalgene.

### **3.2.3. Procedimento Experimental**

#### **3.2.3.1. Recuperação da *p*-Hidroxifenilglicina**

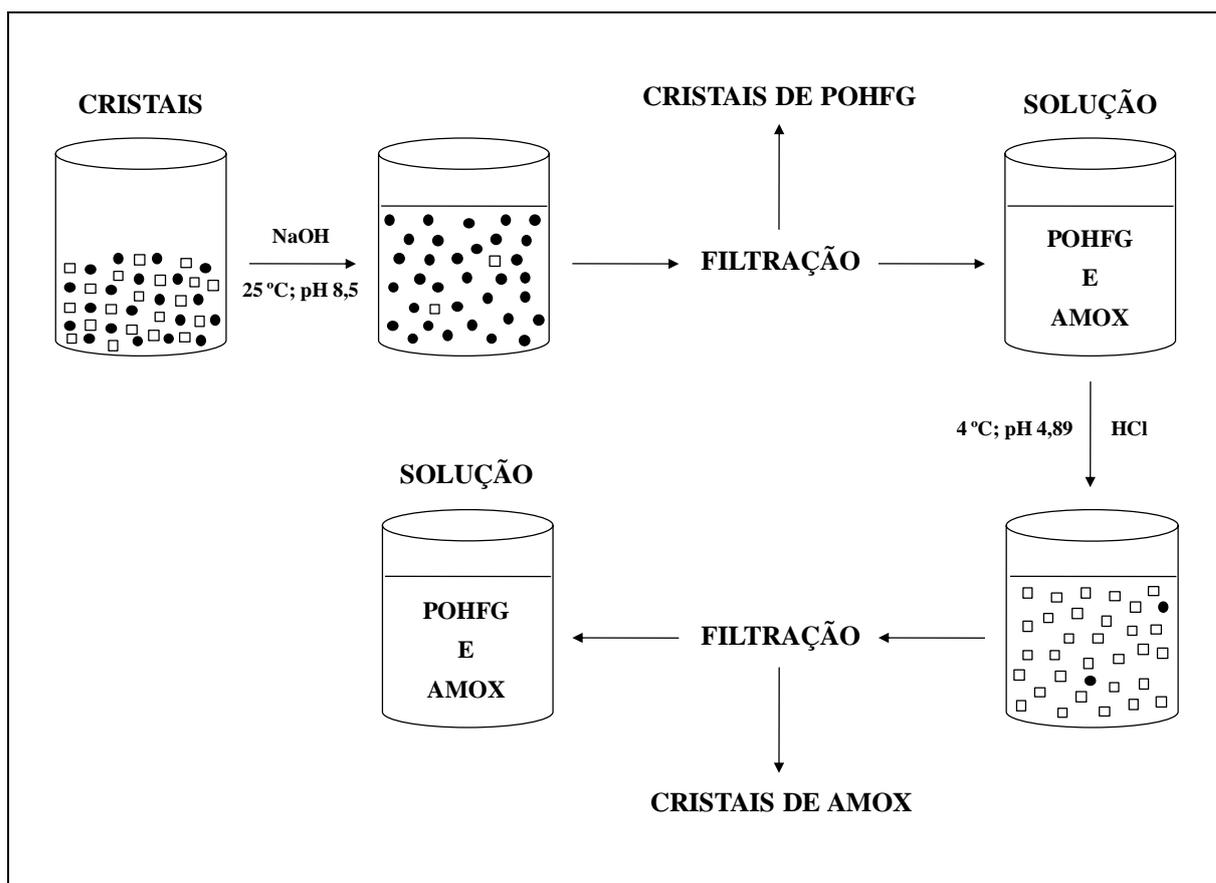
Baseada na metodologia desenvolvida por Vieira (2003), a recuperação da POHFG foi realizada com o objetivo de verificar a eficiência do processo de separação da POHFG a

partir de uma mistura de cristais constituída por amoxicilina e POHFG. Esta mistura foi preparada a partir dos compostos puros, visando simular a configuração industrialmente mais promissora para a realização da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina. Sendo assim, uma massa de amoxicilina e POHFG foi pesada de modo a ultrapassar o limite de solubilidade destes compostos. Posteriormente, esta mistura foi solubilizada a 25 °C com hidróxido de sódio (NaOH) concentrado, aumentando o pH para 8,5. Em seguida, esta solução foi filtrada usando papel de filtro Whatman n° 42, obtendo-se cristais de POHFG com pureza elevada, os quais foram empregados na produção do éster etílico, conforme o procedimento descrito detalhadamente na próxima seção. O filtrado resultante foi acidificado lentamente com ácido clorídrico (HCl) concentrado a 4 °C, diminuindo o pH para 4,89, o pI da amoxicilina, em outras palavras, o pH de sua menor solubilidade (Kurochkina & Nys, 2003). Os cristais de amoxicilina foram separados por filtração usando o mesmo tipo de papel de filtro quantitativo. A Figura 3.1 apresenta o esquema do procedimento que foi desenvolvido para a recuperação da POHFG a partir de uma mistura de cristais composta por amoxicilina e POHFG, incluindo a sequência de etapas aplicadas na recuperação da POHFG e subsequente recristalização da amoxicilina. A pureza final dos cristais obtidos foi validada através de análise por HPLC. É válido mencionar que o resíduo final deste método foi o sal cloreto de sódio (NaCl), que é inofensivo e inerte.

### **3.2.3.2. Síntese do Éster Etílico da *p*-Hidroxifenilglicina**

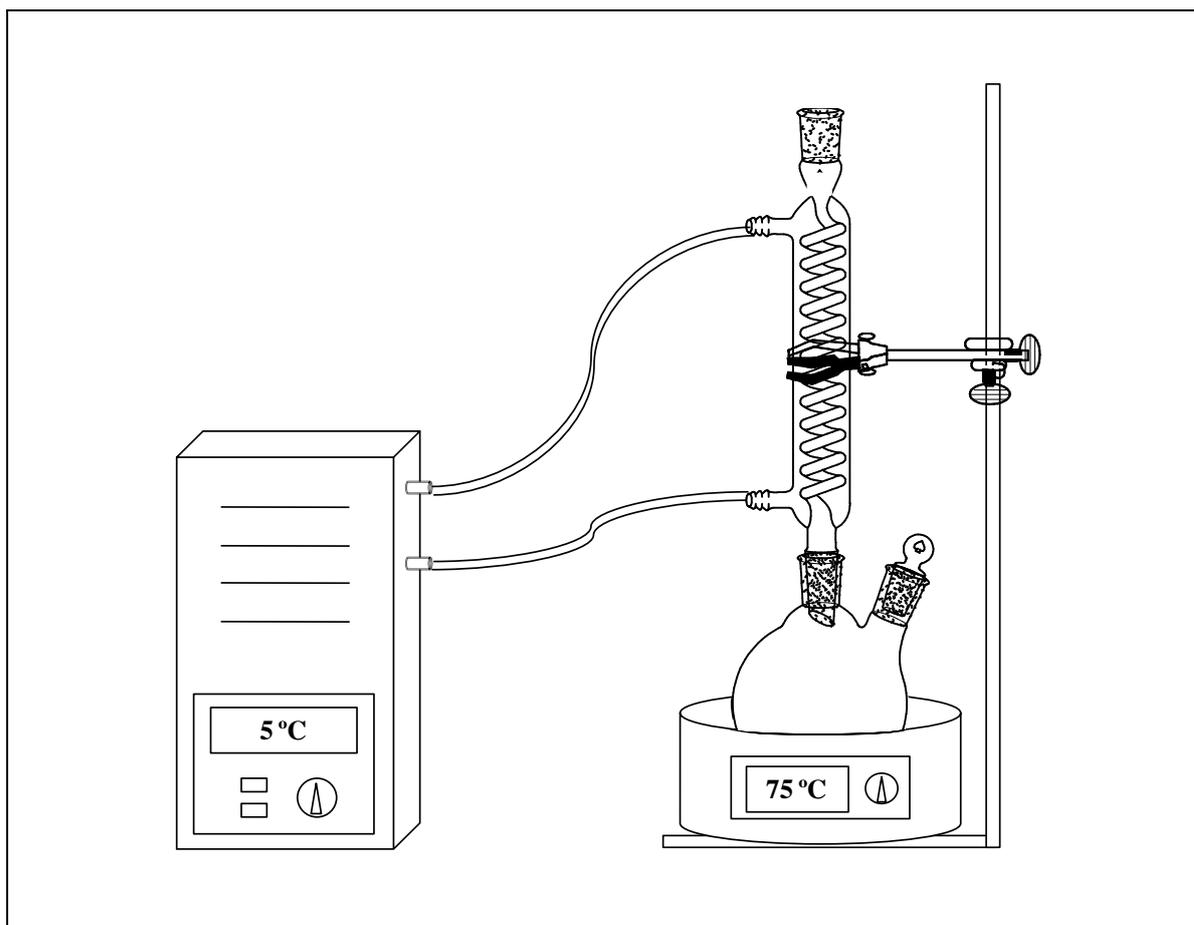
A reação de esterificação da POHFG para a produção do EEPOHFG foi baseada no procedimento primeiramente proposto por Batigalha (2008). Em um experimento típico de síntese orgânica, o volume de etanol (ETOH) necessário para a reação foi adicionado a um béquer em banho de gelo. Em seguida, o HCl foi adicionado lentamente com o auxílio de um bastão de vidro para a homogeneização da mistura, uma vez que é um processo exotérmico. Posteriormente, adicionou-se o sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para realizar a remoção de toda a água que pudesse estar presente nesta solução. Após a completa sedimentação do secante Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a mistura resultante foi filtrada a vácuo utilizando um papel de filtro quantitativo Whatman 42, próprio para a filtração de precipitados finos. Terminada a filtração, o filtrado foi cuidadosamente transferido com o auxílio de um funil de vidro para um balão de

fundo redondo contendo pequenos pedaços de porcelana e a POHFG. Subsequentemente, o balão contendo o meio reacional foi acomodado em uma manta aquecedora e conectado a um condensador. A água que estava circulando através do condensador foi equilibrada a 5 °C, enquanto a temperatura da manta aquecedora foi regulada para 75 °C. O sistema foi mantido sob refluxo durante 24 horas, conforme mostra a ilustração apresentada na Figura 3.2.

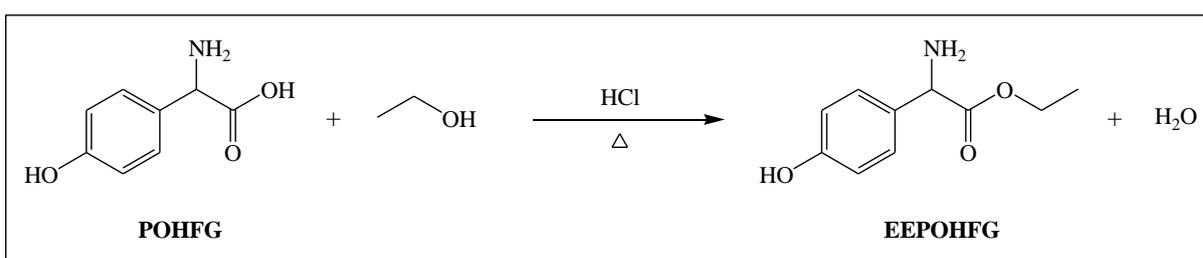


**Figura 3.1.** Etapas realizadas para a recuperação da *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) e subsequente recristalização da amoxicilina (AMOX), adaptado de Vieira (2003). Os cristais obtidos apresentaram pureza elevada. Nesta representação esquemática: AMOX (□) e POHFG (●).

A síntese do éster etílico foi constantemente monitorada através de análise por HPLC, realizando amostragens em tempos determinados. A reação geral de esterificação da POHFG para a produção do EEPOHFG pode ser visualizada na Figura 3.3. Adicionalmente, as concentrações iniciais empregadas para a realização da síntese do éster etílico estão sumarizadas na Tabela 3.1, perfazendo um volume reacional de 250 mL.



**Figura 3.2.** Ilustração dos componentes básicos que compõem o sistema de evaporação sob refluxo em escala de laboratório utilizado para a síntese do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina.



**Figura 3.3.** Visão geral da reação de esterificação da *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) com etanol (ETOH) para a produção do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG), empregando HCl como catalisador da reação sob aquecimento constante.

Transcorridas 24 horas de reação, o sistema permaneceu em repouso até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, a solução reacional resultante foi transferida para um

béquer em banho de gelo. O secante Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi adicionado novamente para retirar todas as moléculas de água que foram formadas durante a reação. Depois da completa decantação do secante, uma filtração foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Finalizada esta etapa, o filtrado foi transferido para um balão pera para efetuar a evaporação completa dos solventes e obter os cristais. Para tanto, um evaporador rotativo sob vácuo foi empregado, conforme mostra a ilustração apresentada na Figura 3.4. A temperatura do banho de aquecimento foi equilibrada a 40 °C, enquanto a temperatura da água que circula através do condensador foi regulada para 5 °C. Posteriormente, os cristais foram cuidadosamente recolhidos para uma placa de Petri, que foi armazenada no interior de um dessecador sob vácuo contendo pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), um potente agente de desidratação. Os cristais totalmente secos foram analisados por HPLC para determinar a conversão que foi obtida na reação de esterificação da POHFG.

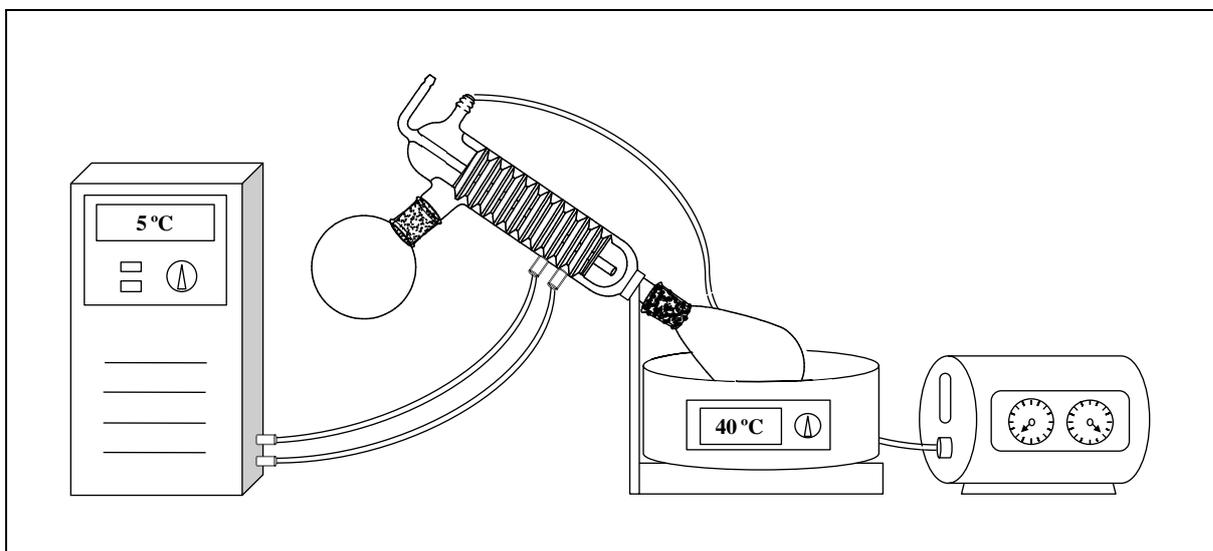
**Tabela 3.1.** Concentrações iniciais dos materiais que foram empregados na esterificação da *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) para a produção do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG).

MATERIAL EMPREGADO	CONCENTRAÇÃO (mol/L)
Álcool Etílico	16,4
Ácido Clorídrico	0,3
<i>p</i> -Hidroxifenilglicina	0,03

### 3.2.3.3. Caracterização do Éster Etílico da *p*-Hidroxifenilglicina

A caracterização do EEPOHFG previamente sintetizado foi realizada por meio de algumas técnicas espectrométricas. Nos experimentos de RMN 1H, uma amostra de 20 mg do EEPOHFG foi solubilizada em 1 mL de metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD). Adicionalmente, os espectros de RMN 1H foram também obtidos para o EMPOHFG comercial e para a POHFG, seguindo o mesmo procedimento descrito para o EEPOHFG, exceto que a solubilização da POHFG foi realizada em água deuterada (D<sub>2</sub>O). Na análise pela técnica de IV, uma amostra

de 1 mg do EEPOHFG foi moída com 100 mg de brometo de potássio (KBr), previamente pulverizado e completamente seco, em um gral de ágata liso. A mistura formada por KBr e EEPOHFG foi adequadamente prensada para a obtenção de discos transparentes. Os espectros de IV foram igualmente obtidos para a POHFG e para o EMPOHFG comercial. A finalidade da aquisição dos espectros de RMN 1H e IV tanto para o EMPOHFG comercial quanto para a POHFG foi simplesmente possibilitar a visualização das diferenças nos dados espectrais destes compostos e, ainda, comparar com os espectros do EEPOHFG que foi sintetizado.



**Figura 3.4.** Ilustração do sistema de rotaevaporação utilizado para a evaporação completa dos solventes, indicando os componentes básicos, por exemplo, o banho termostático e a bomba de vácuo.

Um pré-tratamento do EEPOHFG foi necessário para a realização das análises por EM. Esta metodologia de preparo compreendeu etapas sucessivas de lavagens do EEPOHFG com diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para arrastar as moléculas de solventes residuais, especialmente as moléculas de HCl. Entre as lavagens, o diclorometano foi sendo recolhido por meio do sistema de rotaevaporação, conforme mostra a ilustração apresentada na Figura 3.4. Finalizada esta etapa de pré-tratamento, uma amostra do EEPOHFG foi solubilizada em metanol, grau HPLC, formando uma solução  $1 \mu\text{g/mL}$  de concentração final. Uma infusão direta desta solução foi realizada com o auxílio de uma bomba seringa. A análise por EM empregou uma fonte do tipo electrospray no modo de ionização positivo bem como um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo.

### 3.2.3.3.1. Dados Espectrais do Éster Etilico da *p*-Hidroxifenilglicina

- ❖ RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7,28 ppm (d, *J* = 8,71 Hz, 2H); 6,86 ppm (d, *J* = 8,71 Hz, 2H); 5,03 ppm (s, 1H); 4,26 ppm (q, *J* = 7,11 Hz, 2H); 1,22 ppm (t, *J* = 7,11 Hz, 3H).
- ❖ IV (ν<sub>max</sub>, KBr): 3437 cm<sup>-1</sup>; 1736 cm<sup>-1</sup>; 1242 cm<sup>-1</sup>.
- ❖ EM (ESI<sup>+</sup>, TRIPLA QUADRUPOLO) *m/z*: 196,12 [M+H]<sup>+</sup>; 179,07 [M-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>; 107,02 [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N]<sup>+</sup>.

### 3.2.3.4. Atividade Enzimática

Baseada na metodologia do PDAB, a atividade catalítica da PGA covalentemente imobilizada em suporte Sepabeads<sup>®</sup> foi determinada. Neste método, ocorre a formação de uma base de Schiff entre o 6-APA e o PDAB gerando um composto que pode ser monitorado a 415 nm (Balasingham *et al.*, 1972). Esta reação foi apresentada com mais detalhes no Capítulo 4. O 6-APA é originado a partir da hidrólise enzimática de uma solução de penicilina G 5% (p/v), preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0. Os experimentos foram conduzidos em um reator batelada encamisado e com agitação mecânica constante, mantendo o pH 8,0 e a temperatura de 37 °C constantes, sendo que, 1 unidade internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de penicilina G por minuto em pH 8,0 a 37 °C.

### 3.2.3.5. Síntese Enzimática de Amoxicilina em Meio Aquoso

As reações de síntese enzimática de amoxicilina foram realizadas sob a estratégia de controle cinético. Nestes ensaios, ocorre uma reação entre o núcleo antibiótico (6-APA) e o substrato ativado (EEPOHFG), catalisada pela PGA covalentemente imobilizada em suporte Sepabeads<sup>®</sup>. Este derivado de enzima apresentou uma carga enzimática aparente de 260 UI/g

de biocatalisador. É importante lembrar que o EEPOHFG foi antecipadamente sintetizado neste trabalho.

Um reator batelada encamisado com agitação mecânica constante foi empregado em todos os experimentos de síntese enzimática de amoxicilina. A temperatura do meio de reação foi mantida constante durante o decorrer das reações, enquanto o pH foi continuamente monitorado por meio de um pHmetro. As concentrações iniciais dos substratos foram 50 mM tanto para o EEPOHFG quanto para o 6-APA. A relação de enzima para substrato (E/S) foi 52 UI/mmol de substrato, perfazendo um volume total de reação de 30 mL. Logo, a quantidade de biocatalisador utilizada foi 0,3 g. Todas as reações foram conduzidas a 25 °C em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. Ao longo do curso das reações, alíquotas foram constantemente retiradas para análise por HPLC.

### **3.2.3.6. Método Analítico**

As concentrações de todos os compostos que estão envolvidos na reação de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meio totalmente aquoso (POHFG, 6-APA, AMOX e EEPOHFG) foram determinadas através de análise por HPLC. Para tanto, foi empregada uma coluna de adsorção hidrofóbica Phenomenex Gemini C18, cujas dimensões eram 150 x 4,6 mm, com o tamanho da partícula igual a 5 µm. A separação cromatográfica foi conduzida utilizando o modo de eluição isocrática. A fase móvel foi preparada como se segue: 1,4 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,68 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 650 mL de água com altíssimo grau de pureza (Milli-Q), 350 mL de acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) e correção para pH 3,0 com o ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Este eluente foi filtrado através da utilização de uma membrana filtrante 0,45 µm e desgaseificado em ultrassom antes da sua utilização analítica.

Todas as análises foram realizadas a 25 ° C, enquanto a detecção foi registrada a 225 nm como  $\lambda_{\text{max}}$ . O volume de injeção utilizado foi de 10 µL a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Todas as amostras foram antecipadamente solubilizadas na própria fase móvel para proceder as análises. A ordem de eluição para os componentes da síntese enzimática de amoxicilina foi: POHFG, 6-APA, AMOX e EEPOHFG.

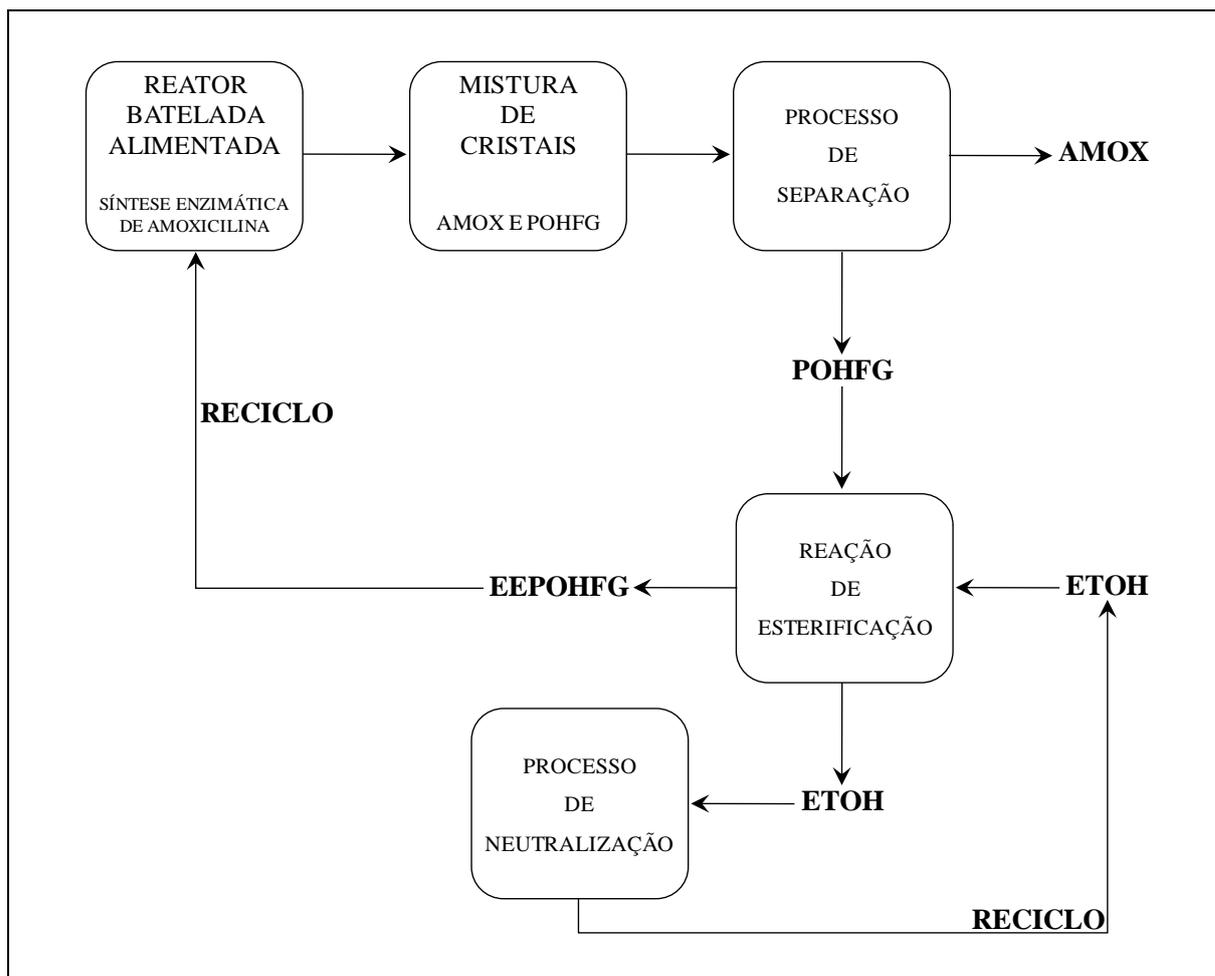
### 3.3. Resultados e Discussão

Esta seção apresenta os principais resultados que foram encontrados neste capítulo, bem como uma discussão dos aspectos envolvidos em cada etapa realizada, levando-se em conta as referências amplamente reportadas na literatura.

#### 3.3.1. Recuperação da *p*-Hidroxifenilglicina

O conceito global do processo integrado “verde”, que foi desenvolvido neste trabalho para o adequado reaproveitamento da POHFG está esquematizado na Figura 3.5. Em resumo, depois da síntese enzimática de amoxicilina, realizada em um reator batelada alimentada com cristalização simultânea dos produtos, o resultado é uma mistura de cristais composta por amoxicilina e POHFG, que são removidos separadamente das partículas do biocatalisador (Ferreira *et al.*, 2007). A metodologia utilizada para a separação destas duas espécies com a finalidade de recuperar a POHFG segue as etapas que foram apresentadas na Figura 3.1. A POHFG recuperada foi levada para o reator de esterificação para a síntese do EEPOHFG, juntamente com o etanol em excesso. Em seguida, o EEPOHFG sintetizado foi reciclado para o primeiro reator, de síntese enzimática de amoxicilina em meio totalmente aquoso, sem necessidade de nenhuma purificação adicional.

A eficiência da metodologia de recuperação da POHFG a partir de uma mistura de cristais constituída por amoxicilina e POHFG foi primeiramente avaliada. Neste contexto, Diender *et al.* (1998) afirmaram que a solubilidade da POHFG não é tão dependente do pH. Mais tarde, esta informação foi corroborada por Kurochkina *et al.* (2011). Em contrapartida, Tsuji *et al.* (1978) haviam reportado que a solubilidade da amoxicilina varia com o pH e tem o seu valor mínimo em pH próximo ao seu pI. Em adição, de acordo com Kurochkina *et al.* (2003), o pI da amoxicilina é 4,89. Com estas informações em mente, foi possível estabelecer um método para recuperar eficientemente a POHFG, solubilizando a amoxicilina em primeiro lugar, por meio de um aumento do pH para 8,5, obtendo, assim, os cristais de POHFG com elevada pureza, como pode ser visto pela Figura 3.1.



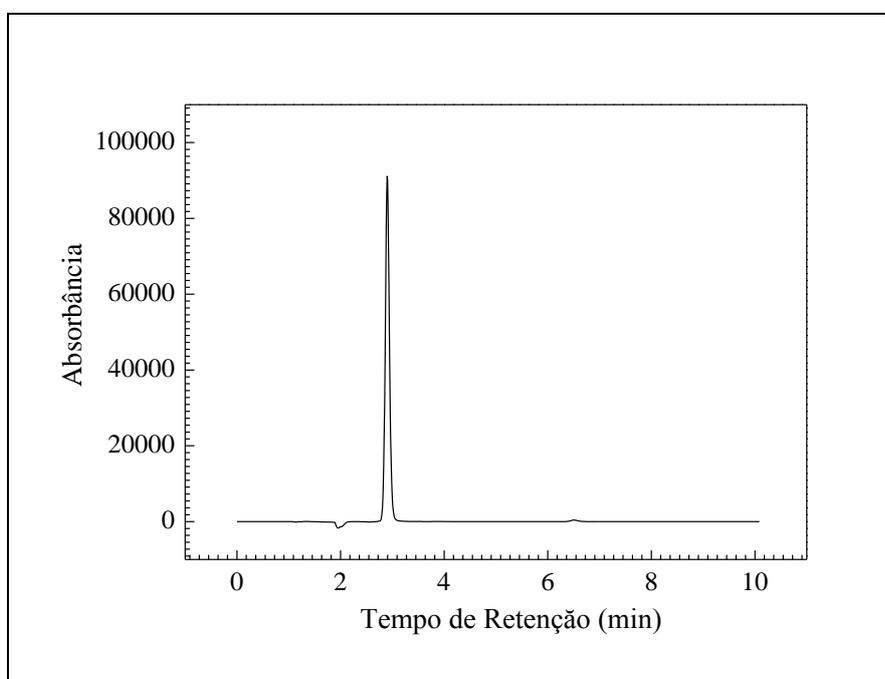
**Figura 3.5.** Conceito global do processo integrado “verde”, com recuperação da *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) a partir de uma mistura de cristais composta por amoxicilina e POHFG, seguida pela reutilização da POHFG para a produção de éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG) e reciclo do EEPOHFG ao reator de síntese enzimática de amoxicilina. Destaque para a utilização de etanol (ETOH) como reagente para a esterificação da POHFG, que pode ser facilmente neutralizado e reciclado para síntese adicional do EEPOHFG.

A solução resultante desta primeira etapa, contendo a amoxicilina que foi dissolvida, foi acidificada, diminuindo o pH para 4,89, recrystalizando o antibiótico, conforme mostra a Figura 3.1. A acidificação foi conduzida a 4 ° C, temperatura na qual a amoxicilina apresenta menor solubilidade e o crescimento dos cristais é mais lento, camada por camada, produzindo um produto mais puro. Com isso, as impurezas permanecem na solução. De outra maneira, trabalhando em temperaturas mais elevadas, poderia ocorrer um arraste das impurezas com o precipitado. A Tabela 3.2 apresenta o grau de pureza final que foi obtido para POHFG e amoxicilina ao término destes processos. As Figuras 3.6 e 3.7 apresentam os cromatogramas que foram obtidos para estas espécies, a partir de análises por HPLC, após os sucessivos

passos de separação. Além disso, a Figura 3.8 apresenta os cristais resultantes do processo de recristalização da amoxicilina conduzido a 4 °C.

**Tabela 3.2.** Pureza final obtida para *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) e amoxicilina, validada por HPLC-DAD, após as sucessivas etapas que foram realizadas para a separação destes compostos presentes em uma mistura.

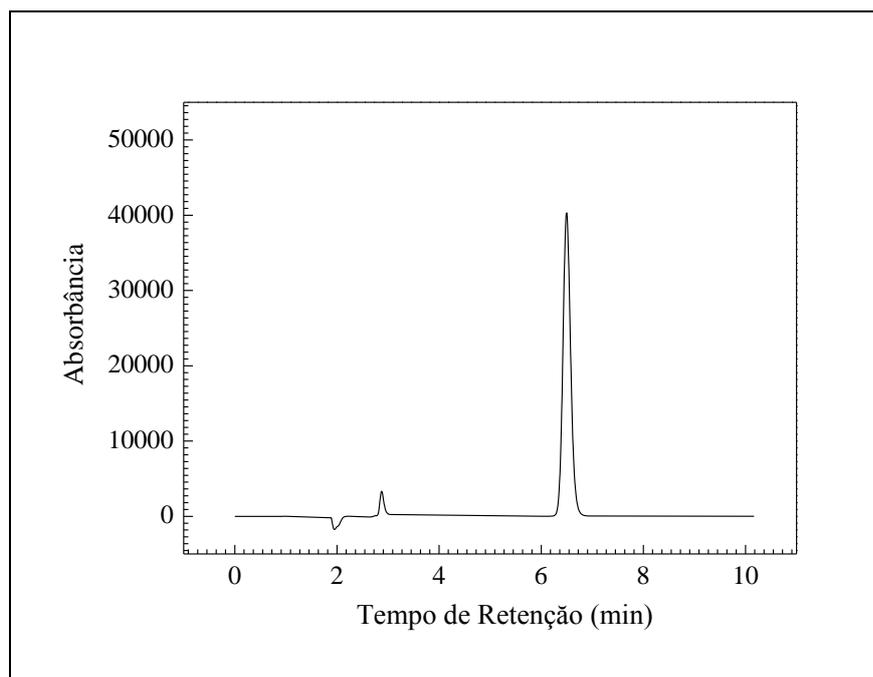
ESPÉCIE	PUREZA (%)
<i>p</i> -Hidroxifenilglicina	99
Amoxicilina	96



**Figura 3.6.** Cromatograma típico da POHFG (2,8 minutos), obtido após o procedimento de separação da POHFG a partir de uma mistura de cristais constituída por amoxicilina e POHFG. A fase móvel foi composta por 1,4 g de SDS, acrescido de 0,68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 650 mL de água Milli-Q e 350 mL de acetonitrila, com correção para pH 3,0. As análises foram realizadas em 25 °C e a detecção em 225 nm. Dados da coluna: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

Os graus de pureza mostrados na Tabela 3.2 e comprovados pelos respectivos cromatogramas das Figuras 3.6 e 3.7 indicam que o procedimento executado foi eficiente para a separação dos componentes de uma mistura de cristais composta por amoxicilina e POHFG,

rendendo cristais com pureza elevada. Os resultados foram coerentes com as informações anteriormente reportadas tanto por Boesten *et al.* (1999) quanto por Vieira (2003). Estes autores desenvolveram, similarmente, uma metodologia para efetuar a separação de uma mistura de cristais constituída por ampicilina, outra importante penicilina semi-sintética, e fenilglicina, subproduto da síntese enzimática cineticamente controlada de ampicilina.



**Figura 3.7.** Cromatograma típico da amoxicilina, incluindo as bandas cromatográficas da POHFG (2,8 minutos) e da amoxicilina (6,5 minutos), obtido após o procedimento de separação da amoxicilina a partir de uma mistura de cristais constituída por amoxicilina e POHFG. A fase móvel foi composta por 1,4 g de SDS, acrescido de 0,68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 650 mL de água Milli-Q e 350 mL de acetonitrila, com correção para pH 3,0. As análises foram realizadas em 25 °C e a detecção em 225 nm. Dados da coluna: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

É válido ressaltar que a pureza da banda cromatográfica foi determinada em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de diodos, conhecido pela sigla HPLC-DAD, realizando-se uma varredura do espectro eletromagnético nas regiões do ultravioleta ao visível (190 a 800 nm) tanto da amostra quanto de um padrão comercial. O detector de DAD é considerado uma precaução necessária para garantir a pureza da banda cromatográfica alvo, comparando-se o espectro do composto de interesse com o espectro de um padrão de alta pureza (superior a 96%), sendo que o resultado é uma indicação da

presença do composto puro na amostra analisada (Ruela *et al.*, 2009). Para o caso do EEPOHFG sintetizado neste trabalho e, ainda não encontrado comercialmente, a análise no espectrofotômetro de massas, mostrada adiante neste capítulo, corrobora a apreciação prévia realizada pelo HPLC-DAD.



**Figura 3.8.** Formação dos cristais de amoxicilina após a etapa de recristalização.

### 3.3.2. Síntese do Éster Etilico da *p*-Hidroxifenilglicina

A síntese enzimática cineticamente controlada de penicilinas semi-sintéticas requer o uso de um derivado ativado do doador acil, por exemplo, um éster ou uma amida (Fernández-Lafuente *et al.*, 1996). Na literatura, um éster metílico é o doador da cadeia lateral ativada padrão empregado nas reações de SCC, o que está em discordância não só com o conceito de um processo “ambientalmente-amigável” como também com o apelo da característica “verde” implícita na catálise enzimática. Nesse sentido, é mais apropriado usar um éster etílico ao invés de metílico, substituindo, no caso da SCC, o metanol por etanol como subproduto.

Adicionalmente, a produção do éster etílico utiliza etanol e, conseqüentemente, o risco operacional do reator de esterificação é reduzido. Assim, a POHFG previamente purificada foi reutilizada para a síntese do éster etílico (EEPOHFG).

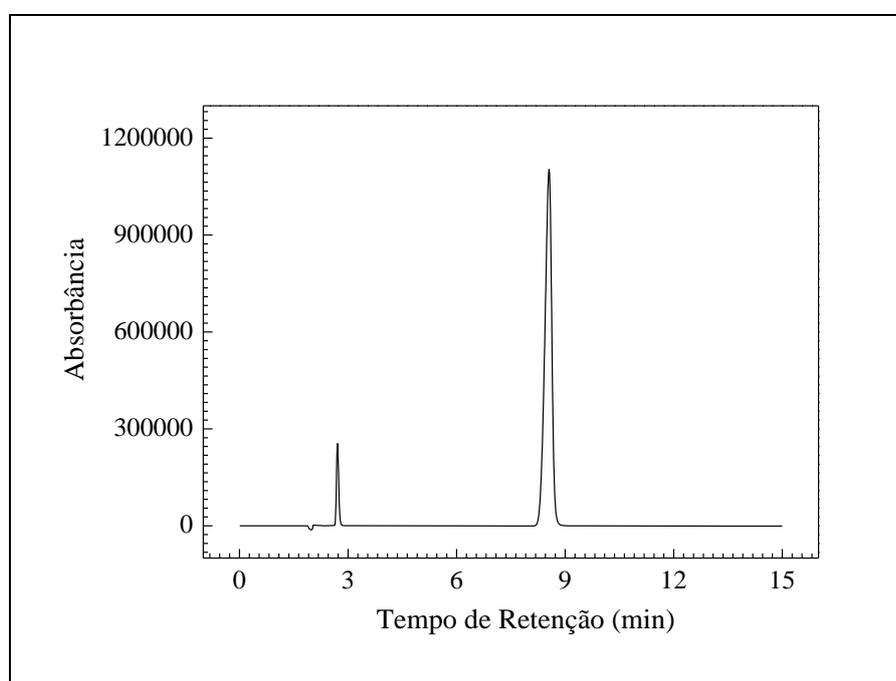
Ácidos carboxílicos reagem com alcoóis para formar ésteres por meio de uma reação de condensação conhecida como esterificação. Estas reações são extremamente lentas na ausência de ácidos fortes, mas alcançam o equilíbrio em algumas horas quando o álcool é submetido a refluxo com ácido concentrado. Esta observação explica a utilização de HCl como um catalisador. Como o ponto de equilíbrio controla a quantidade de éster formado, o emprego de um excesso do ácido carboxílico ou do álcool aumenta o rendimento baseado no reagente limitante. O componente exato que é escolhido para ser usado em excesso dependerá do custo. Neste caso, o etanol foi utilizado como o reagente em excesso.

No final da reação de esterificação, o etanol recolhido na rotaevaporação pode ser neutralizado e reciclado para ser reutilizado em uma produção adicional do EEPOHFG. Além disso, o rendimento também pode ser aumentado pela remoção das moléculas de água da mistura reacional. Esta estratégia foi empregada com a adição de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , que é amplamente usado como um poderoso agente de secagem, para a remoção de vestígios de água em soluções orgânicas (Vogel *et al.*, 1980). Em adição,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  é apenas eficaz em temperaturas inferiores a 30 °C, o que explica o fato de ter sido utilizado em banho de gelo, podendo ser empregado com uma variedade de materiais, uma vez que é quimicamente bastante inerte. Este agente secante é adicionado à solução até que não mais seja observada a agregação de seus cristais.

A reação de esterificação da POHFG para a produção do EEPOHFG foi apresentada na Figura 3.3 e as concentrações iniciais dos reagentes que foram utilizados neste processo estão resumidas na Tabela 3.1. Conduzida sob estas condições reacionais, a síntese química do EEPOHFG alcançou uma conversão de 93%. A conversão foi calculada com base na concentração de POHFG utilizada no ponto de partida da reação de esterificação. Para tanto, as análises por HPLC-DAD foram utilizadas para determinar as concentrações da POHFG e do EEPOHFG não só no início e término da reação de esterificação, como também no decorrer do processo sintético e após a obtenção dos cristais totalmente secos.

É relevante citar que todas as etapas relativas ao estudo sistemático do procedimento de síntese do EEPOHFG até a obtenção de um protocolo eficaz e reprodutível foram

realizadas em menor escala, evitando não só perdas excessivas de reagentes como também geração de grandes quantidades de resíduos do método analítico. A síntese do EEPOHFG em escala aumentada (10 vezes) resultou, ainda, em alta conversão da POHFG, porém, um pouco abaixo dos resultados em menor escala, numericamente, 91%. O tempo de reação foi outro ponto fundamental avaliado durante este estudo, verificando-se que após 24 horas de reação, o sistema estava próximo do equilíbrio químico, de modo que este tempo de reação foi escolhido para todos os ensaios de síntese do EEPOHFG. A Figura 3.9 apresenta um cromatograma dos cristais do EEPOHFG obtido através de análise por HPLC-DAD.

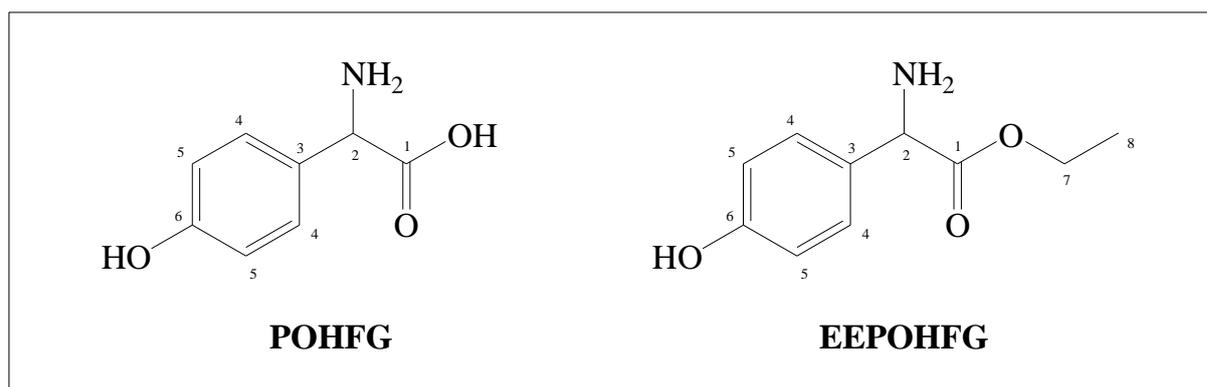


**Figura 3.9.** Cromatograma típico do EEPOHFG sintetizado neste trabalho, incluindo as bandas cromatográficas da POHFG (2,8 minutos) e do EEPOHFG (8,5 minutos), obtido após a secagem completa dos cristais resultantes da esterificação da POHFG. A fase móvel foi composta por 1,4 g de SDS, acrescido de 0,68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 650 mL de água Milli-Q e 350 mL de acetonitrila, com correção para pH 3,0. As análises foram realizadas em 25 °C e a detecção em 225 nm. Dados da coluna: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

### 3.3.3. Caracterização do Éster Etilico da *p*-Hidroxifenilglicina

A metodologia desenvolvida para a recuperação da POHFG, a partir de uma mistura de cristais constituída por amoxicilina e POHFG, rendeu cristais com pureza de 99%. Feito

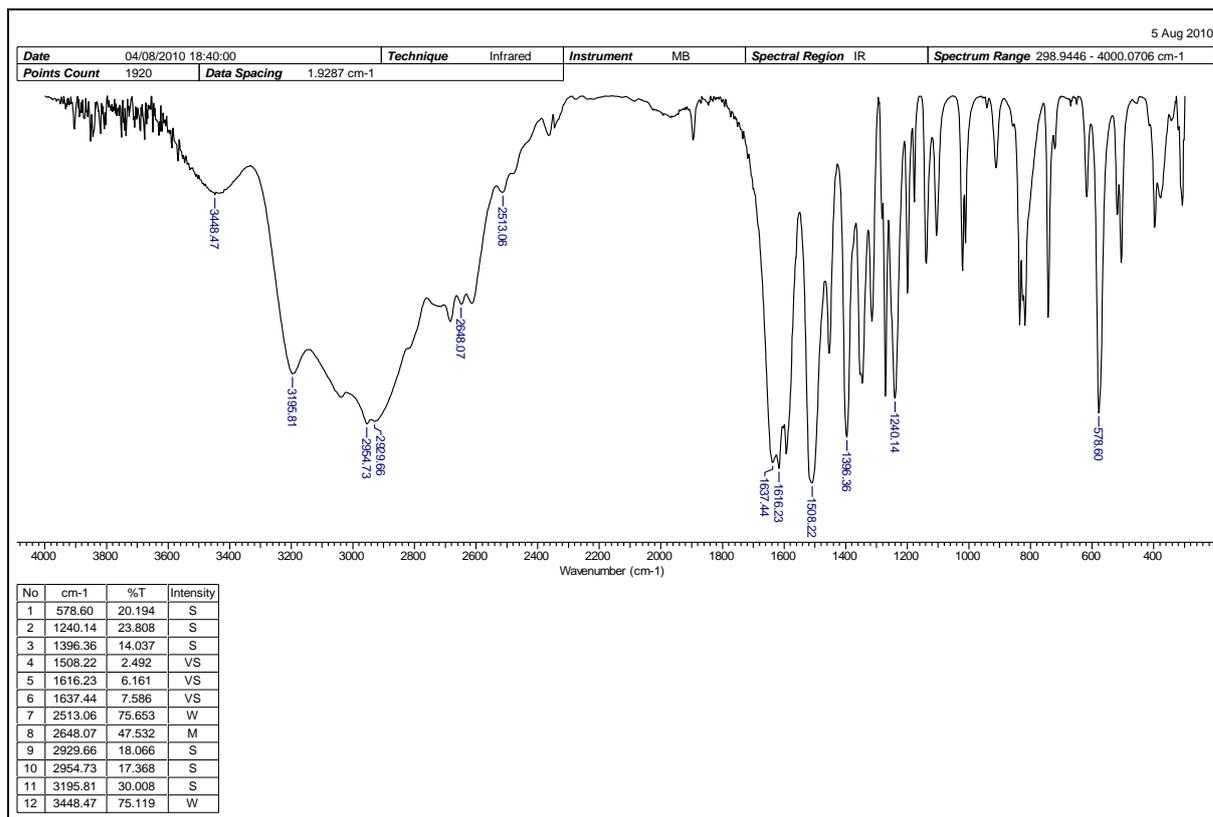
isso, a POHFG foi satisfatoriamente empregada na síntese do EEPOHFG, alcançando uma conversão de 93%. Em seguida, o EEPOHFG sintetizado foi identificado e caracterizado por algumas técnicas espectrométricas, incluindo RMN 1H, IV e EM, conforme procedimento descrito anteriormente. Os espectros de IV fornecem informações importantes a respeito dos grupos funcionais que estão presentes no composto analisado. Informações detalhadas sobre as características estruturais da amostra, incluindo as “vizinhanças” e números de átomos de hidrogênio presentes no composto, são fornecidas pelos espectros de RMN 1H. Um espectro de massa não só fornece informação estrutural, mas também confirma o peso molecular do composto. Assim, a combinação destas técnicas é capaz de indicar se a molécula sintetizada foi verdadeiramente o composto alvo, o EEPOHFG. As estruturas químicas dos compostos de interesse envolvidos no processo de produção do EEPOHFG são apresentadas na Figura 3.10, com o intuito de auxiliar na visualização da caracterização do EEPOHFG.



**Figura 3.10.** Estruturas químicas da *p*-hidroxifenilglicina (POHFG) e do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG). Os números indicados nas moléculas são representativos dos grupos metino, metileno e metila.

Inicialmente, realizou-se a caracterização da POHFG pelas técnicas de IV e RMN 1H, por se tratar do material de partida para a reação de esterificação. Portanto, a observação dos dados contidos nos espectros da POHFG poderia auxiliar no processo de identificação do EEPOHFG que foi sintetizado, uma vez que as diferenças estruturais entre estas moléculas, apesar de serem relativamente poucas, como confirmado na Figura 3.10, são suficientes para determinar informações espectrais muito características. No espectro de IV da POHFG, observa-se uma banda de absorção muito larga que se estende na região de 3400-2500  $\text{cm}^{-1}$ , sendo correspondente ao estiramento de ligação O-H dos ácidos carboxílicos, conforme

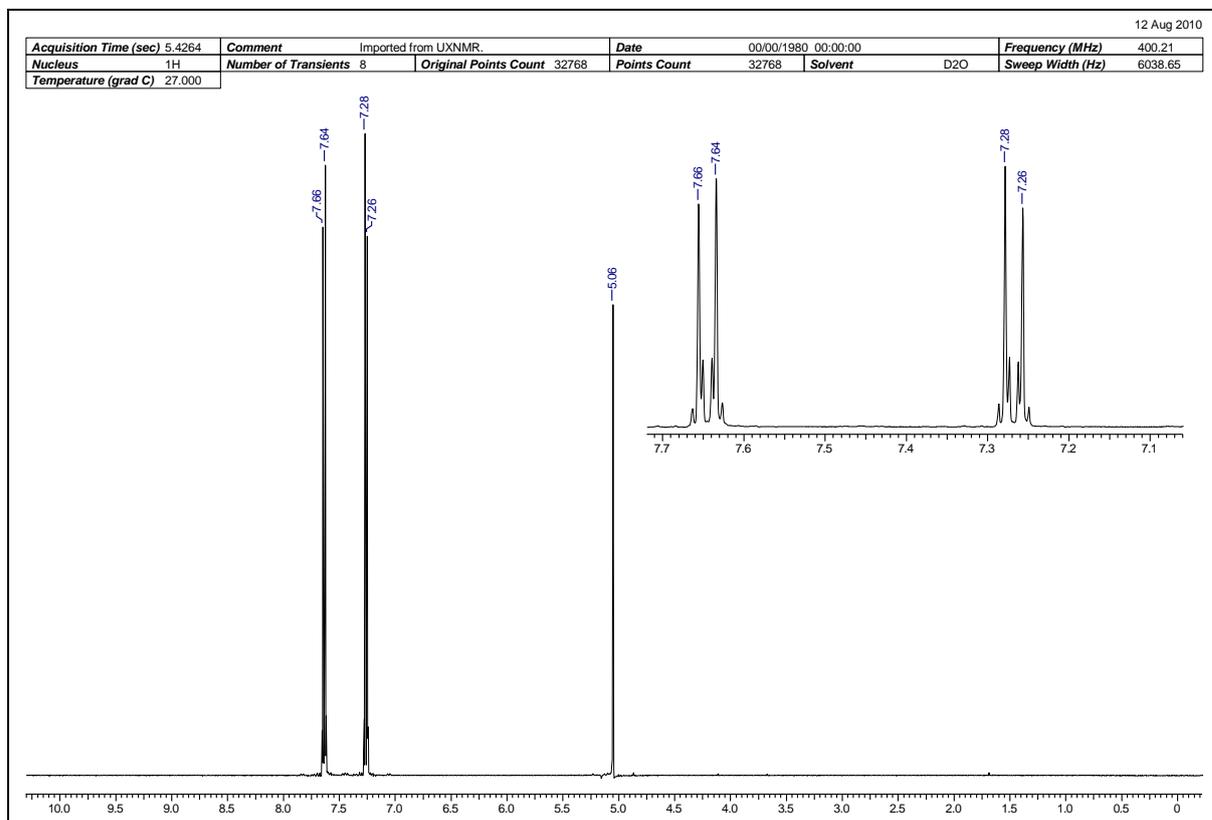
mostra a Figura 3.11. Esta banda bastante alargada aparece sobreposta às bandas relativas ao estiramento de ligação C-H (alcanos, alquenos ou compostos aromáticos), os quais abrangem a região de 3300-2800  $\text{cm}^{-1}$ . Adicionalmente, é importante destacar a presença de uma banda de absorção forte na região de 1637  $\text{cm}^{-1}$ , a qual é correspondente ao estiramento de ligação C=O dos ácidos carboxílicos, como pode ser observado na Figura 3.11.



**Figura 3.11.** Espectro de IV ( $\nu_{\text{max}}$ , KBr) da *p*-hidroxifenilglicina (POHFG).

Nos experimentos de RMN  $^1\text{H}$  realizados para a POHFG, observa-se um singlete no deslocamento químico de 5,06 ppm, referente ao hidrogênio pertencente ao grupo metino (número 2 da POHFG indicado na Figura 3.10), e dois dubletos característicos na região que compreende o intervalo de 7-8 ppm, correspondentes aos átomos de hidrogênio presentes em anéis aromáticos di-substituídos, mais precisamente em 7,27 ppm (número 5) e em 7,65 ppm (número 4), como pode ser visto na Figura 3.12. É válido explicar também que os hidrogênios ligados a átomos de oxigênio ou a átomos de nitrogênio podem ser trocados com deutério (D) e, por esta razão, podem não apresentar os respectivos sinais de absorção no espectro de RMN

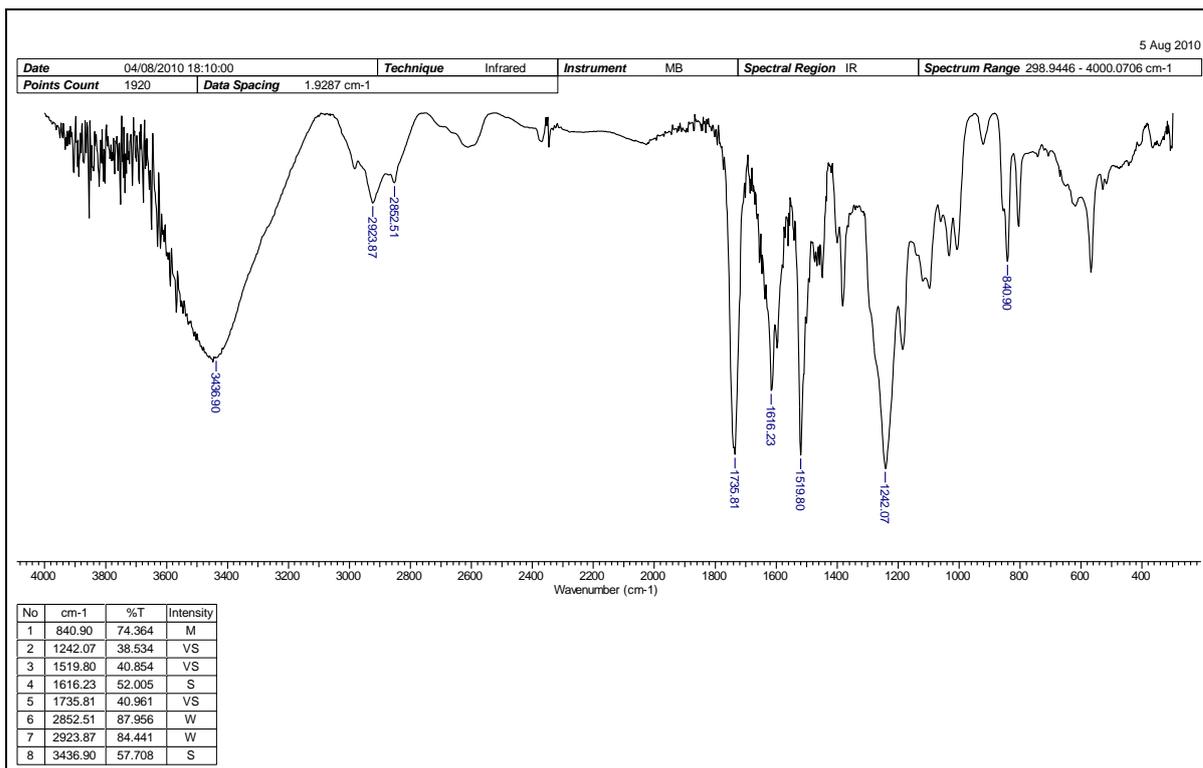
<sup>1</sup>H, o que de fato aconteceu para a análise por RMN <sup>1</sup>H da POHFG. Estes dados espectrais determinados a partir de análises por IV e RMN <sup>1</sup>H foram suficientes para caracterizar basicamente a estrutura química da POHFG.



**Figura 3.12.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) da *p*-hidroxifenilglicina (POHFG).

A identificação e caracterização do EEPOHFG que foi sintetizado são fundamentais para a confirmação do êxito na reação de esterificação. A Figura 3.13 apresenta o espectro de IV do EEPOHFG, ressaltando-se uma diferença marcante na região de 3400-2500 cm<sup>-1</sup> em relação ao espectro de IV da POHFG (Figura 3.11). Uma banda de absorção larga cobrindo a região de 3600-3200 cm<sup>-1</sup> está agora presente, com um formato de sino característico de ligação O-H dos compostos fenólicos que participam de ligações de hidrogênio, como pode ser observado pela Figura 3.13. Na maioria das situações, o grupo OH de uma molécula não se encontra livre ou isolado, ao contrário, ele quase sempre se apresenta na forma associada, realizando ligações de hidrogênio, que podem ser inter ou intramoleculares (Barbosa, 2007). Algumas das bandas relativas ao estiramento de ligação C-H podem ser agora observadas na

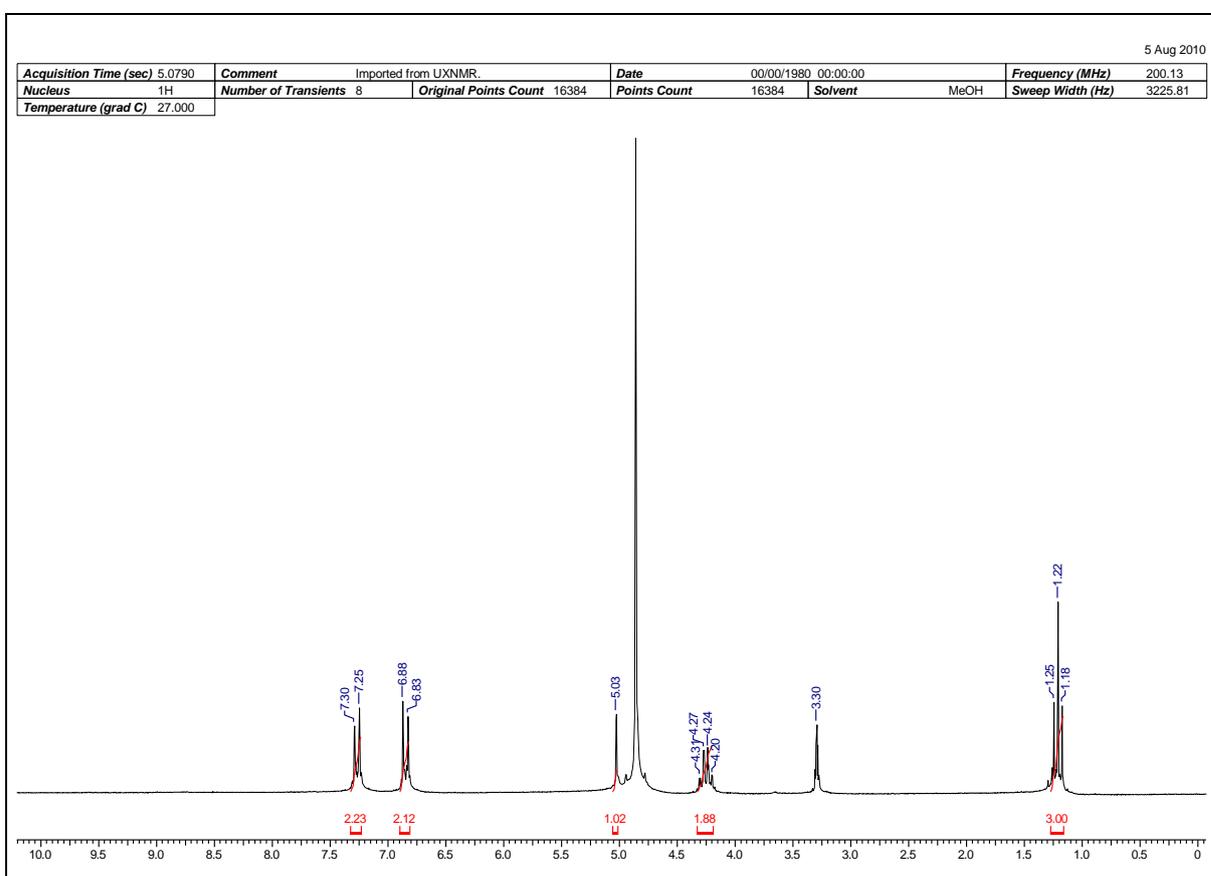
região de 3300-2800  $\text{cm}^{-1}$ , tanto as que envolvem carbono  $\text{sp}^3$  quanto as associadas aos carbonos  $\text{sp}^2$  (Figura 3.13). Uma banda de absorção forte pode ser notada na região de 1735  $\text{cm}^{-1}$ , relacionada ao estiramento de ligação C=O dos ésteres, e, uma banda de absorção mais larga e mais forte do que esta última, na região de 1242  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento de ligação C-CO-O dos ésteres pode ser vista na Figura 3.13.



**Figura 3.13.** Espectro de IV ( $\nu_{\text{max}}$ , KBr) do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do EEPOHFG está apresentado na Figura 3.14. Sua análise aponta a presença de alguns sinais adicionais em comparação ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  da POHFG, conforme pode ser visto pelas Figuras 3.12 e 3.14. Observam-se novamente os dois dubletos característicos dos átomos de hidrogênio pertencentes aos anéis aromáticos dissubstituídos no deslocamento químico de 6,86 ppm (número 5 do EEPOHFG indicado na Figura 3.10) e em 7,28 ppm (número 4). Vale mencionar que são gerados dois dubletos, tanto para a POHFG quanto para o EEPOHFG, pois os dois átomos de hidrogênios que estão localizados nas posições 4 (ou nas posições 5) são equivalentes. Além disso, observa-se um singlete referente ao hidrogênio do grupo metino (número 2) em 5,03 ppm (Figura 3.14).

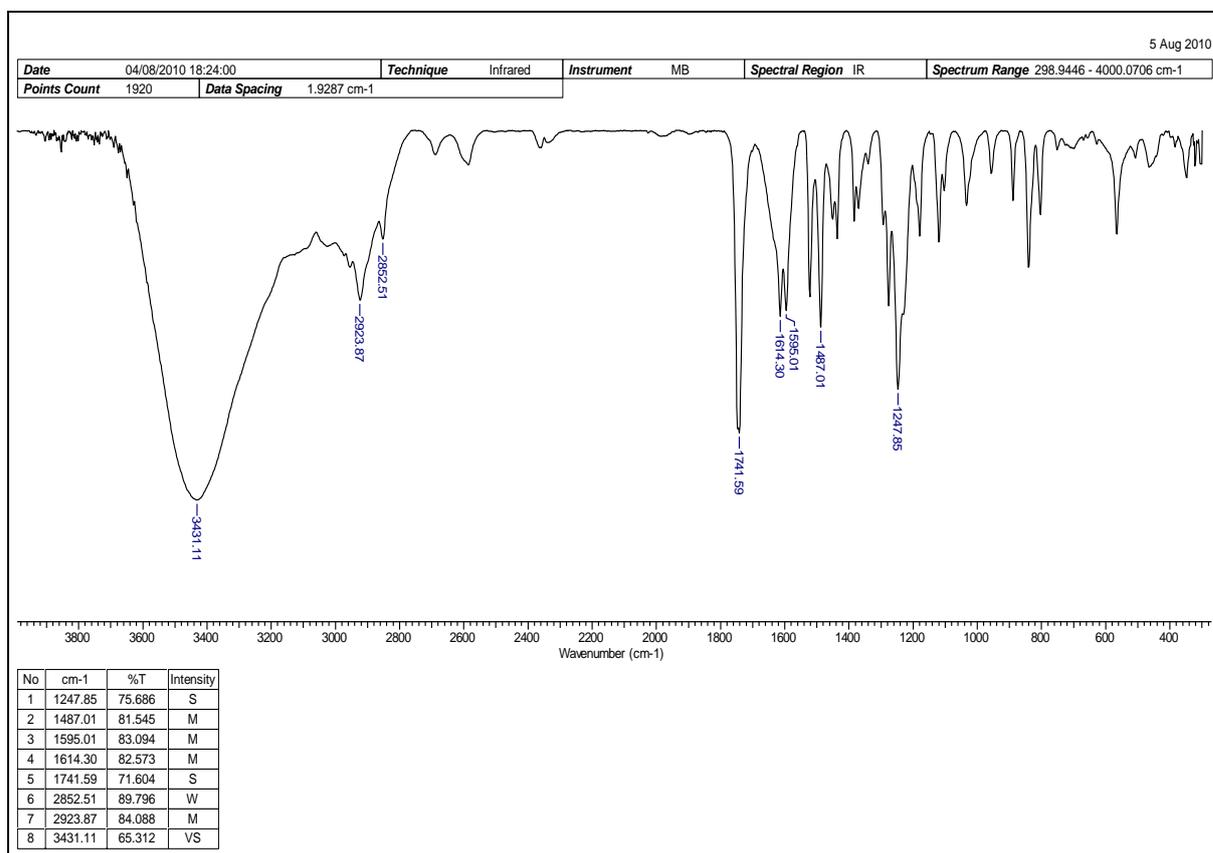
A diferença entre os espectros de RMN 1H da POHFG e do EEPOHFG é o aparecimento de um quarteto no deslocamento químico de 4,26 ppm, referente aos dois átomos de hidrogênio presentes no grupo metileno (número 7), e um triplete no deslocamento químico de 1,22 ppm, relativos aos três átomos de hidrogênio do grupo metila (número 8), como pode ser observado comparando-se os respectivos espectros de RMN 1H das Figuras 3.12 e 3.14. Os sinais em 4,78 e 3,30 ppm são oriundos do solvente que foi empregado no preparo da amostra para a análise por RMN 1H. Todas estas observações indicam que o EEPOHFG foi sintetizado com sucesso neste trabalho.



**Figura 3.14.** Espectro de RMN 1H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG).

Para fins de comparação, a caracterização do EMPOHFG comercial também foi realizada. Como era de se esperar, os experimentos de IV apontaram que o EMPOHFG comercial seguiu praticamente o mesmo padrão de absorção encontrado para o EEPOHFG que foi sintetizado, como pode ser visto pelas Figuras 3.13 e 3.15. . Da mesma maneira, uma

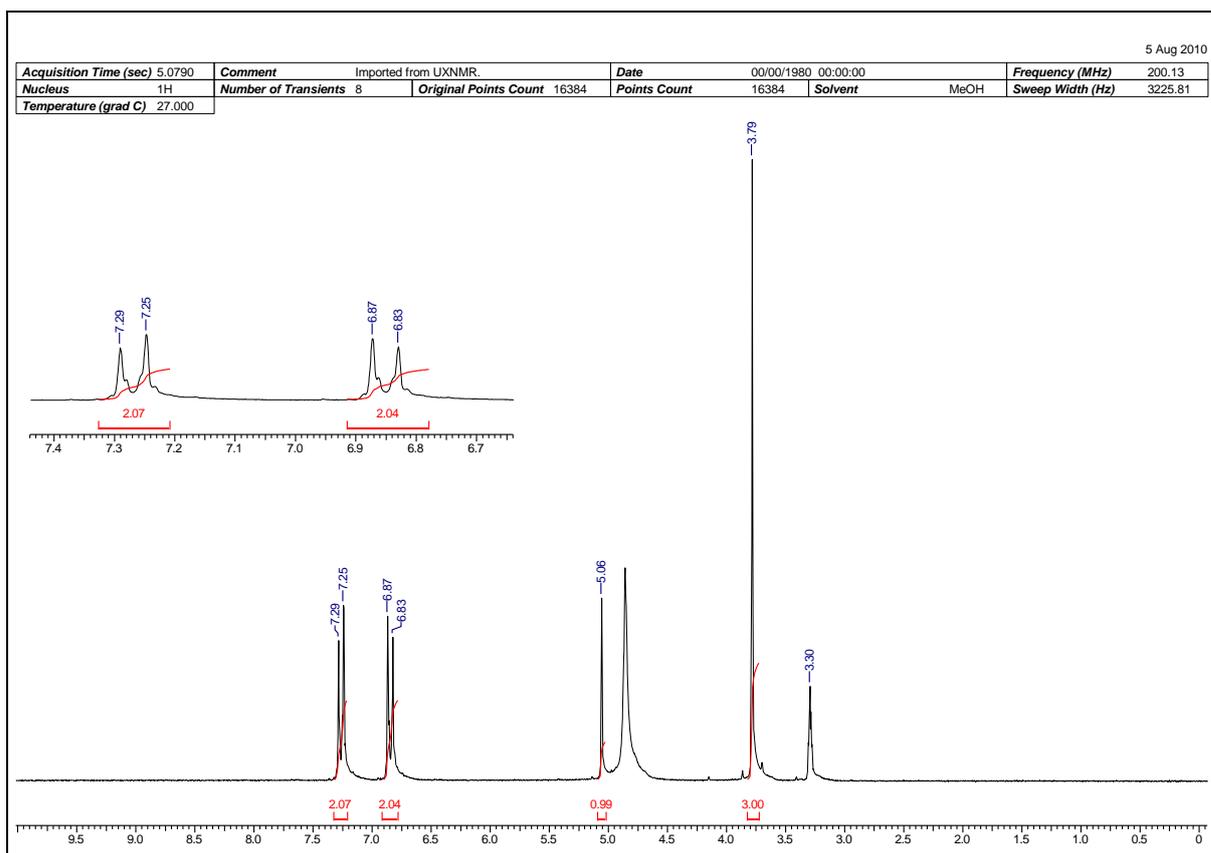
comparação entre o espectro de RMN 1H do EMPOHFG comercial, apresentado na Figura 3.16, com o do EEPOHFG sintetizado, mostrado na Figura 3.14, também indica um padrão de absorção similar. Em adição, como diferem estruturalmente pela presença de um grupamento metileno somente na molécula do EEPOHFG, observa-se a ausência deste sinal no espectro de RMN 1H do EMPOHFG comercial. Igualmente, observam-se os dois dubletos em 7,27 e 6,85 ppm, referentes aos hidrogênios do anel aromático, um singleto em 5,06 ppm, relativo ao hidrogênio do grupo metino, e, um singleto em 3,79 ppm, característico dos três átomos de hidrogênio presentes no grupo metila, conforme mostra a Figura 3.16. Pode-se enfatizar que os hidrogênios da metila do EMPOHFG aparecem como um singleto, porque não acoplam significativamente com outros átomos de hidrogênios.



**Figura 3.15.** Espectro de IV ( $\nu_{\max}$ , KBr) do éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG).

Uma vez que as amostras para as análises por RMN 1H tanto do EEPOHFG sintetizado quanto do EMPOHFG comercial foram preparadas com o mesmo solvente, os espectros apresentaram os mesmos sinais em 4,78 e 3,30 ppm. É apropriado acrescentar que

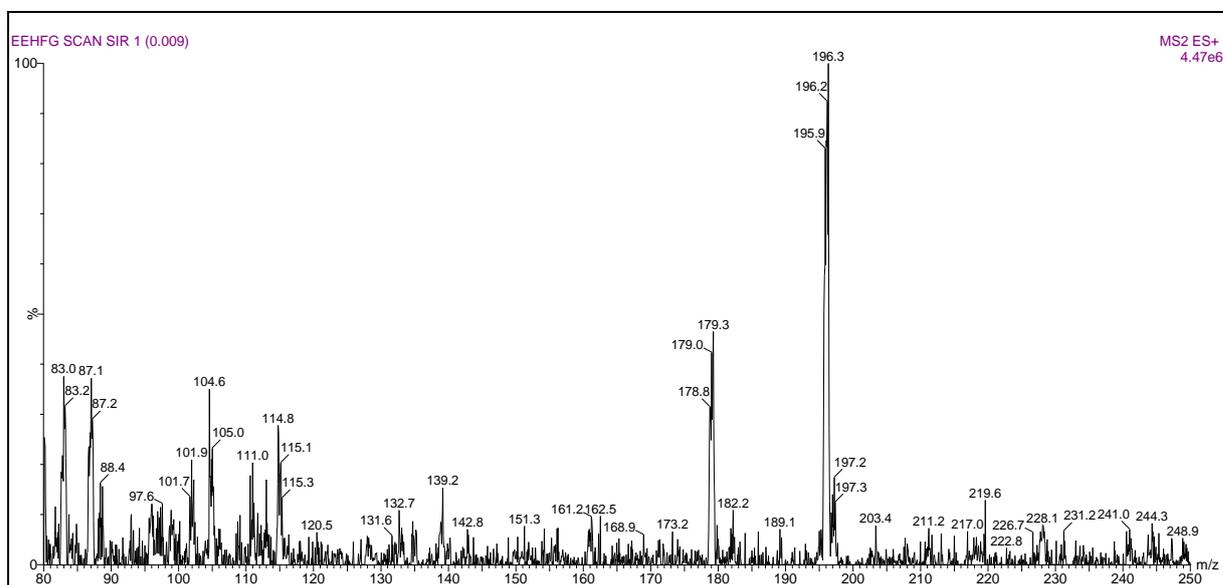
outras informações podem ser retiradas dos espectros de IV dos compostos analisados, as quais auxiliariam a indicar a presença de outros grupamentos que fazem parte da estrutura química de todas estas moléculas. É notável nos espectros de IV, por exemplo, a presença de algumas bandas de absorção de intensidade média a forte abrangendo a região de 1600-1450  $\text{cm}^{-1}$ , características de ligações C=C do anel aromático, como pode ser visto pelas Figuras 3.11, 3.13 e 3.15. Muitas outras bandas de absorção poderiam ser exaustivamente descritas. No entanto, uma inspeção detalhada destes espectros de IV é desnecessária, uma vez que as estruturas químicas dos compostos são conhecidas, e os espectros de IV são utilizados apenas para confirmar o sucesso da reação de esterificação, por meio da análise de regiões que são típicas de cada composto. Os espectros de IV foram usados para retirar dados sobre as absorções que fazem a diferença marcante entre os compostos.



**Figura 3.16.** Espectro de RMN 1H (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG).

É válido comentar que as integrações dos sinais no espectro de RMN 1H foram coerentes com os números de átomos de hidrogênios que compõem a molécula do

EEPOHFG, como pode ser visto pela Figura 3.14. Apesar da variedade de informações espectrais apresentadas até o presente momento já serem suficientes para indicar que a molécula sintetizada foi realmente o composto de interesse, uma análise espectrométrica adicional por EM foi realizada para confirmar não só o peso molecular da molécula em questão como também o seu padrão de fragmentação e, assim, adicionar mais alguns dados sobre a caracterização deste composto. Na análise por EM, o íon precursor  $m/z$  196,12,  $[M+H]^+$ , foi obtido utilizando-se uma energia do cone de 9 V, como pode ser visto pelo EM apresentado na Figura 3.17.

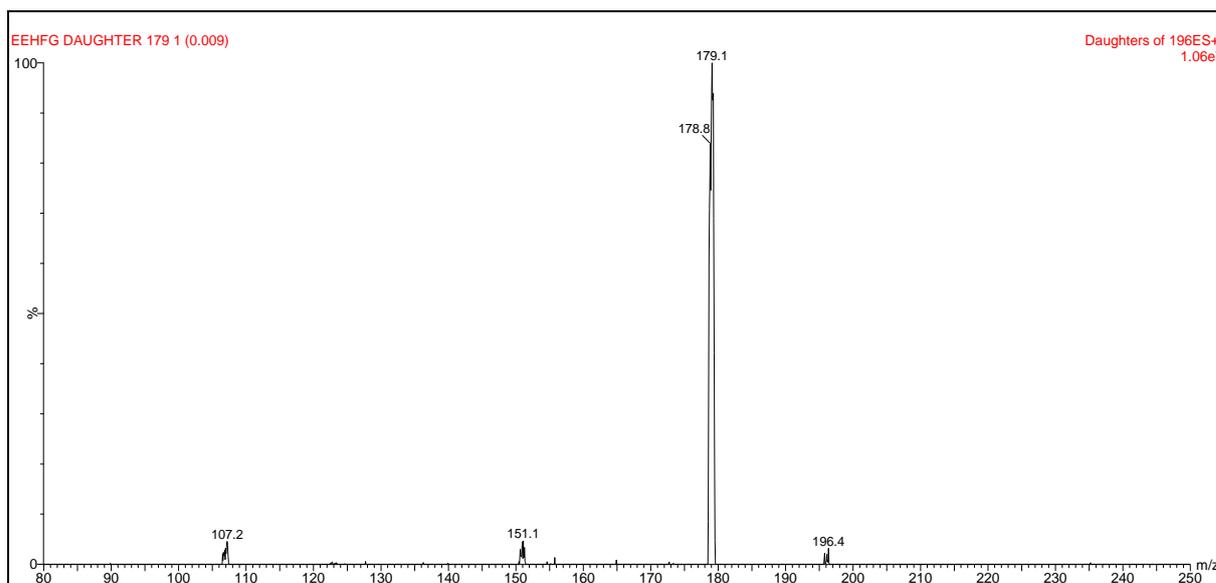


**Figura 3.17.** Íon precursor  $m/z$  196,12, representado por  $[M+H]^+$ , obtido através de análise por espectrometria de massas (ESI<sup>+</sup>, TRIPLO QUADRUPOLO) do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG) sintetizado neste trabalho. Energia do cone de 9V.

No experimento de íons produto, o íon  $m/z$  179,07 foi obtido empregando uma energia de colisão de 8 eV, como pode ser observado pela Figura 3.18. Este fragmento é correspondente à perda de uma molécula de amônia,  $[M-NH_3]^+$ . Ainda no experimento de íons produto, obteve-se o íon  $m/z$  107,02, o qual foi determinado com uma energia de colisão de 16 eV, como mostra a Figura 3.19. Este fragmento corresponde à perda da porção éster da molécula,  $[M-C_3H_7O_2N]^+$ . As informações obtidas a partir da análise por EM corroboram que a amostra analisada é verdadeiramente o EEPOHFG sintetizado neste trabalho. Com esses dados espectrais adicionais finaliza-se a caracterização do EEPOHFG.

### 3.3.4. Reciclo do Subproduto ao Reator de Síntese de Amoxicilina

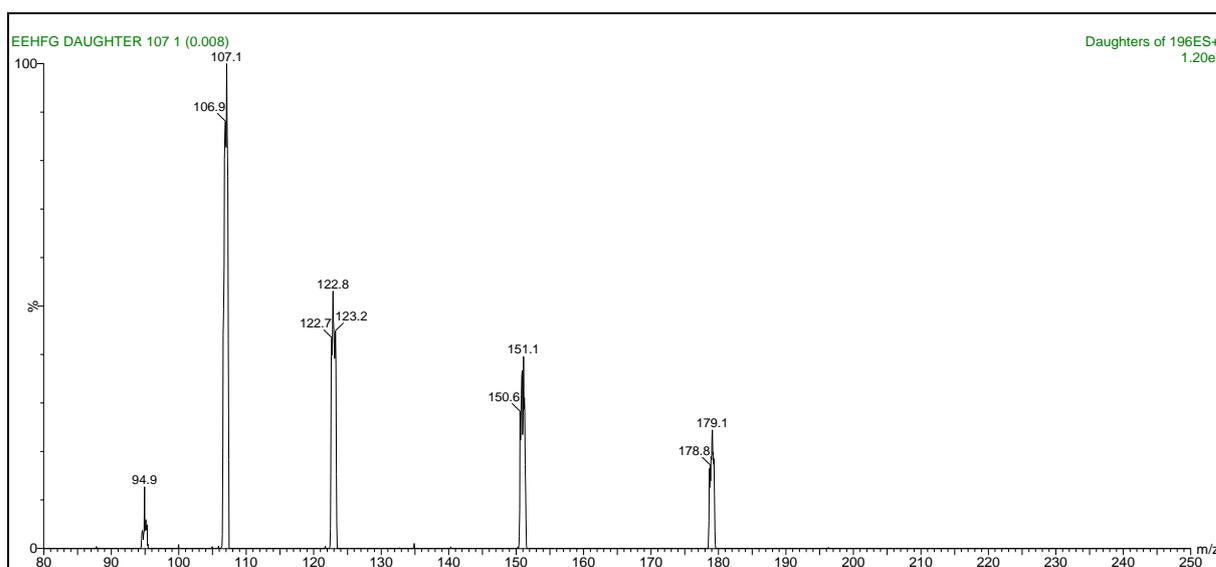
As etapas necessárias para o desenvolvimento do processo integrado “verde” em meio aquoso, que era o objetivo principal deste capítulo, foram sendo sucessivamente realizadas com sucesso, como pode ser observado por todas as informações descritas anteriormente. Em outras palavras, a POHFG foi eficientemente recuperada e reutilizada para a produção do EEPOHFG, o qual foi satisfatoriamente identificado e caracterizado pelas técnicas espectrométricas. Em seguida, a fim de comprovar a reatividade do EEPOHFG, uma reação padrão de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meio totalmente aquoso, catalisada pela PGA covalentemente imobilizada em suporte Sepabeads® foi realizada, empregando o EEPOHFG, que foi previamente sintetizado e identificado, como o substrato ativado.



**Figura 3.18.** Íon produto  $m/z$  179,07, representado por  $[M-NH_3]^+$ , obtido através de análise por espectrometria de massas (ESI<sup>+</sup>, TRIPLO QUADRUPOLO) do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG) sintetizado neste trabalho. Energia de colisão de 8 eV.

A Figura 3.20 apresenta os resultados encontrados. É importante comentar que esta reação não foi conduzida utilizando uma trajetória otimizada para o reator. O procedimento foi conduzido por meio de uma simples reação batelada, com os substratos e os produtos na

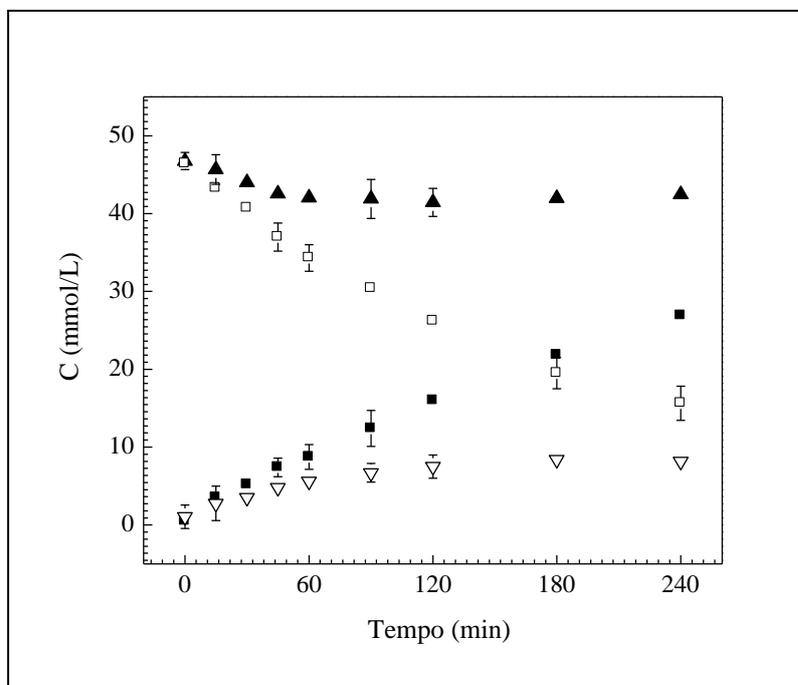
forma solúvel, o que explica a baixa seletividade encontrada para este processo. Apesar disso, a ideia aqui era somente verificar se a síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina seguiria seu percurso esperado, ou melhor, se o derivado ativado do doador acil, o EEPOHFG, seria um substrato efetivo. Estas observações possibilitariam comprovar se a metodologia integrada “verde” completa, incluindo a etapa final de reciclo do subproduto na forma de um éster, é tecnicamente viável.



**Figura 3.19.** Íon produto  $m/z$  107,02, representado por  $[M-C_3H_7O_2N]^+$ , obtido por análise de espectrometria de massas (ESI<sup>+</sup>, TRIPLO QUADRUPOLO) do éster etílico da *p*-hidroxifenilglicina (EEPOHFG) sintetizado neste trabalho. Energia de colisão de 16 eV.

A evolução da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina seguiu exatamente o padrão que é esperado para as reações que são efetuadas nestas condições operacionais, ou seja, em meio reacional aquoso, pH próximo da neutralidade, temperatura ambiente e substratos solúveis, conforme pode ser observado pela Figura 3.20, comprovando claramente a reatividade do EEPOHFG que foi previamente sintetizado e caracterizado neste trabalho. Esta afirmação está baseada em uma análise mais detalhada dos perfis encontrados na Figura 3.20, onde é possível observar que o EEPOHFG foi consumido durante todo o decorrer da reação, enquanto o núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA) foi consumido até o momento em que a hidrólise da amoxicilina recém produzida passou a ser predominante. Ao mesmo tempo, a POHFG foi continuamente produzida durante todo o curso do processo sintético, uma vez

que a POHFG é consequência não só da atividade esterase que a PGA exerce sobre o EEPOHFG como também da atividade amidase que a PGA desempenha sobre a amoxicilina recém sintetizada.



**Figura 3.20.** Etapa final completando a metodologia integrada “verde”, com o reciclo do EEPOHFG para o reator de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meio totalmente aquoso, a fim de verificar a reatividade deste substrato. Este procedimento sintético foi conduzido em pH 6,5 a 25 °C, catalisado pela PGA covalentemente imobilizada em suporte Sepabeads<sup>®</sup>. As condições operacionais foram: EEPOHFG 50 mM, 6-APA 50 mM e 0,3 g de 260 UI/g de biocatalisador, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. Neste gráfico, os símbolos representam: (□) EEPOHFG, (▲) 6-APA, (■) POHFG e (▽) amoxicilina. As barras de erros são referentes ao desvio padrão, o qual foi estimado a partir de triplicatas.

É importante mencionar que o EEPOHFG sintetizado neste trabalho foi obtido com uma pureza final elevada. Sendo assim, o EEPOHFG pôde ser empregado para a síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina sem qualquer processo de purificação, apesar de ser produzido sob a forma de um cloridrato (EEPOHFG.HCl). Este aspecto não compromete a reação enzimática para a produção de amoxicilina, uma vez que o pH do meio reacional é previamente ajustado pela adição de uma solução de NaOH concentrada. Esta estratégia gera somente o sal inofensivo e inerte NaCl. É importante recordar que o único tratamento adicional realizado sobre o EEPOHFG sintetizado, o qual envolveu sucessivas

lavagens com diclorometano, foi necessário exclusivamente para conduzir as análises por EM, uma vez que as moléculas de HCl podem afetar drasticamente o espectrofotômetro de massas, porque o HCl é um ácido forte, volátil e bastante corrosivo. Finalmente, é apropriado comentar que havendo a necessidade de conduzir uma purificação do EEPOHFG, seja exclusivamente para fins analíticos ou em decorrência de algum processo de degradação, que pode ser ocasionado por uma estocagem inadequada ou até mesmo por ter sido armazenado contendo traços de água, podendo resultar em hidrólise lenta e gradual, desenvolveu-se uma metodologia para esta finalidade. Assim sendo, o EEPOHFG pode ser eficientemente purificado empregando uma técnica de cromatografia líquida clássica, utilizando coluna de vidro previamente empacotada com sílica flash e fase móvel composta por 46% (v/v) de metanol, 46% (v/v) de acetato de etila e 8% (v/v) de hidróxido de amônio.

### **3.4. Conclusões**

O reaproveitamento da POHFG, um subproduto continuamente formado durante todo o decorrer das reações de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meio aquoso, catalisadas pela PGA, foi avaliado neste trabalho, incluindo as etapas de recuperação da POHFG a partir de uma mistura de cristais tipicamente constituída por POHFG e amoxicilina, reutilização da POHFG para a síntese subsequente do EEPOHFG e integração do processo com a reciclagem da POHFG, na forma do substrato ativado éster etílico, ao reator para produção enzimática adicional de amoxicilina.

Os resultados do procedimento de recuperação da POHFG demonstraram que uma variação seletiva no pH, levando em consideração dados de solubilidade tanto da amoxicilina quanto da POHFG, foi muito eficiente para alcançar a separação adequada destas espécies. Nas condições operacionais que foram empregadas, a pureza final encontrada para estes compostos após as sucessivas etapas de separação foi de 99% para a POHFG e 96% para a amoxicilina. Em adição, é válido ressaltar que neste procedimento de purificação apenas o sal inofensivo e inerte NaCl foi gerado como resíduo.

A POHFG previamente purificada foi reutilizada com sucesso para a produção do EEPOHFG, por meio de uma reação de esterificação, que empregou etanol como o reagente

em excesso, atingindo 93% de conversão. O etanol é um solvente menos tóxico do que o metanol, rotineiramente empregado para a síntese do EMPOHFG (substrato padrão na literatura) e, por este motivo, optou-se por realizar a síntese do EEPOHFG, para minimizar não só a exposição como também os riscos ambientais do processo. Além disso, o etanol residual pode ser reaproveitado para nova reação de esterificação, sendo simplesmente neutralizado antes de ser reciclado.

As informações espectrais originadas das análises do composto de interesse através das técnicas de IV, RMN <sup>1</sup>H e EM foram apropriadas para identificar e caracterizar o EEPOHFG sintetizado neste trabalho. A integração do processo “verde” com a etapa de reciclagem deste EEPOHFG para a síntese enzimática de amoxicilina provou ser factível, com a evolução da reação seguindo o mesmo perfil que é encontrado quando o EMPOHFG é utilizado como o substrato ativado, tendo ainda a importante vantagem de gerar etanol como subproduto ao invés de metanol.

Os resultados comprovaram que este processo integrado “verde” (de recuperação, reutilização e reciclo da POHFG, na forma de éster etílico) pode ser eficientemente aplicado para a síntese enzimática de antibióticos β-lactâmicos semi-sintéticos, uma vez que contribui para reduzir os impactos ambientais. A característica “verde” desta metodologia se deve à geração de resíduos inofensivos durante o processo global (sal NaCl), utilização do etanol para a produção do substrato ativado, formação de etanol como subproduto da síntese enzimática do antibiótico em meio aquoso, além, é claro, da peculiaridade “verde” inerente à catálise enzimática.

# CAPÍTULO 4

## SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMOXICILINA NA PRESENÇA DE LÍQUIDOS IÔNICOS

O presente capítulo descreve uma investigação da viabilidade de utilização dos líquidos iônicos como cossolventes nos meios reacionais para conduzir a síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina catalisada pela penicilina G acilase.

### 4.1. Introdução

Os rendimentos alcançados pela síntese química de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos são muito elevados, colaborando para os baixos preços de mercado destes fármacos, o que, naturalmente, é uma característica importante para a saúde pública, em especial, para os países subdesenvolvidos. No entanto, atualmente, existe uma disposição de se concentrar a produção mundial de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em poucos países, em decorrência da crescente conscientização em relação à necessidade de proteção do meio ambiente, traduzida em uma regulamentação ambiental cada vez mais rigorosa, o que, definitivamente, abre uma janela de oportunidades para outras tecnologias menos nocivas, por exemplo, a catálise enzimática.

Contudo, a síntese enzimática destes medicamentos ainda não é economicamente competitiva com os processos químicos convencionais (Giordano *et al.*, 2006).

Para reduzir os custos do processo enzimático, é necessário aumentar a seletividade. As reações hidrolíticas indesejáveis podem ser parcialmente prevenidas através da redução da atividade da água ( $a_w$ ) do sistema reacional. Com esta finalidade, alguns bons resultados têm sido encontrados com a utilização de cossolventes orgânicos. Entretanto, os solventes orgânicos comprometem a característica “verde” que é creditada à rota enzimática. Por este motivo, os líquidos iônicos (LIs) surgiram como uma opção para substituir os solventes orgânicos, uma vez que são altamente estáveis e apresentam pressão de vapor desprezível.

Neste contexto, este capítulo avalia a atividade catalítica da PGA nas reações de síntese cineticamente controlada de amoxicilina utilizando diferentes LIs como cossolventes. A reação em meio totalmente aquoso, conduzida em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5, foi escolhida como uma referência para realizar a comparação com as reações conduzidas na presença destes meios de reação contendo LIs, avaliando não só a influência destes solventes nos índices de desempenho das reações (seletividade e conversão de 6-APA) como também o nível de hidratação da enzima ( $a_w$ ) nestes sistemas.

## 4.2. Materiais e Métodos

### 4.2.1. Enzima, Reagentes e Outros Materiais de Consumo

- ❖ Enzima penicilina G acilase (PGA) de *Escherichia coli* na sua forma livre e imobilizada covalentemente em suporte Sepabeads<sup>®</sup> (Mitsubishi Chemical Corporation), gentilmente doadas pelo Laboratório de Engenharia Enzimática do Departamento de Biocatálise do Instituto de Catálise (CSIC) da Universidade Autônoma de Madri, Espanha;
- ❖ Líquidos iônicos apróticos, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF<sub>6</sub>), tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.BF<sub>4</sub>) e bis(trifluormetilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.NTf<sub>2</sub>), gentilmente doados pelo Laboratório de Catálise

Molecular do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

- ❖ Líquidos iônicos próticos, pentanoato de N-metil-2-hidroxi-etilamina (mM.Pe), butirato de N-metil-2-hidroxi-etilamina (mM.Bu), lactato de 2-hidroxi-etilamina (M.La), lactato de 2-hidroxi-dietilamina (D.La), propionato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Pr), acetato de 2-hidroxi-etilamina (M.Ac), succinato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Su), acetato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Ac), fumarato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Fu), citrato de 2-hidroxi-etilamina (M.Ci), citrato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Ci), maleato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Ma), adipato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Ad), ftalato de 2-hidroxi-etilamina (M.Ft), ftalato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Ft), oxalato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Ox), formato de 2-hidroxi-dietilamina (D.Fo), butirato de 2-hidroxi-etilamina (M.Bu), adipato de 2-hidroxi-etilamina (M.Ad), succinato de 2-hidroxi-etilamina (M.Su), oxalato de 2-hidroxi-etilamina (M.Ox), gentilmente doados pelo Laboratório de Termodinâmica Aplicada do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia;
- ❖ Os reagentes, *p*-hidroxifenilglicina (POHFG), éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG), ácido 6-amino penicilânico (6-APA), amoxicilina (AMOX), *p*-dimetilaminobenzaldeído (PDAB) e ácido 6-nitro-3-fenilacetamida benzóico (NIPAB), da Sigma-Aldrich Corporation;
- ❖ Penicilina G (PEN G), gentilmente doada pela Prodotti Laboratório Farmacêutico;
- ❖ Reagentes diversos (fosfato de potássio anidro, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e hidróxido de sódio) da Synth;
- ❖ Dodecil sulfato de sódio da J.T.Baker;
- ❖ Solventes variados (ácido acético, ácido fosfórico e metanol) da Qhemis;
- ❖ Solventes grau HPLC (acetonitrila, isopropanol, etanol e metanol) da J.T.Baker;
- ❖ Água com altíssimo grau de pureza (Milli-Q);
- ❖ Membrana filtrante de celulose regenerada 0,45 µm da Sartorius Stedim Biotech;
- ❖ Papel de filtro qualitativo 19070 da Satelit.

#### 4.2.2. Equipamentos e Afins

- ❖ pHmetro 525A da Orion;
- ❖ Banho termostatzado RTE-111 da Neslab;
- ❖ Agitador mecânico M110-VER-4K3 da Nova Ética;
- ❖ Agitador magnético 752 da Fisatom;
- ❖ Balança analítica Q-500L210C da Quimis;
- ❖ Medidor termostatzado de atividade da água ( $a_w$ ) AquaLab Series 4 TEV da Decagon Devices Incorporated, equipado com os sensores de ponto de orvalho e de capacitância;
- ❖ Reômetro programável DV-III Ultra da Brookfield Engineering Laboratories;
- ❖ Microcentrífuga CL-21R da Thermo Electron Corporation;
- ❖ Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Inspect S50 da FEI Company, equipado com um detector de difração de elétrons retroespalhados (EBSD);
- ❖ Cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-6AD da Shimadzu, equipado com um detector de UV-Vis SPD-10Avp, um injetor automático Sil-10AF e um controlador SCL-10Avp;
- ❖ Espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV-Vis da Pharmacia Biotech;
- ❖ Bomba de vácuo SL-60 da Solab;
- ❖ Ultrassom 1450 da Maxiclean;
- ❖ Shaker MA830 da Marconi;
- ❖ Sistema para purificação de água Milli-Q RG da Millipore Corporation;
- ❖ Termômetro 5003 da Incoterm;
- ❖ Cronômetro SW2018 da Cronobio;
- ❖ Sistema de filtração a vácuo F250 da Nalgene;
- ❖ Pipetas automáticas reguláveis de vários volumes da Eppendorf;
- ❖ Coluna Gemini C18 da Phenomenex (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m).

### **4.2.3. Procedimento Experimental**

#### **4.2.3.1. Atividade Enzimática**

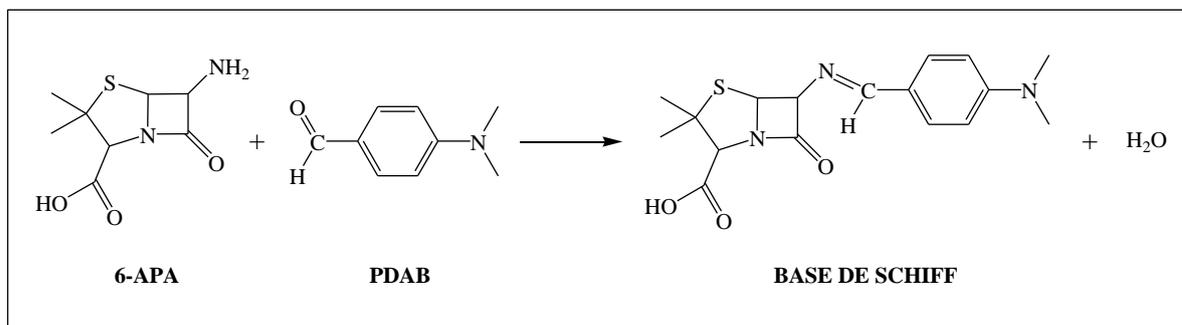
A atividade enzimática da PGA foi determinada por meio de dois procedimentos, utilizando o *p*-dimetilaminobenzaldeído (PDAB) e o ácido 6-nitro-3-fenilacetamida benzóico (NIPAB).

##### **4.2.3.1.1. Método do PDAB**

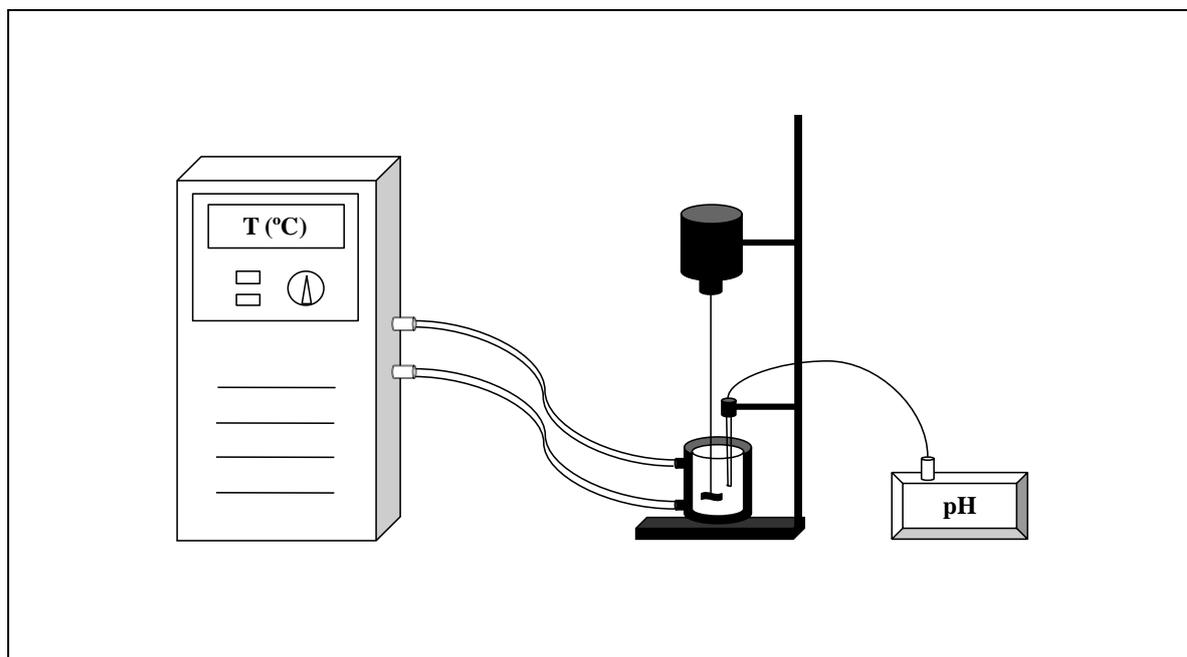
Uma das metodologias empregadas para a determinação da atividade amidase da PGA foi o método colorimétrico do PDAB, baseado na formação de uma base de Schiff após a reação entre o 6-APA e o PDAB (Balasingham *et al.*, 1972). O 6-APA produzido na reação de hidrólise enzimática da penicilina G (PEN G) reage com o PDAB gerando um composto que absorve luz na região do visível e pode ser monitorado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm, conforme mostra o esquema geral da reação apresentado na Figura 4.1. Em um experimento típico de hidrólise enzimática, conduzido em reator batelada encamisado com agitação mecânica constante, adicionava-se 20 mL de uma solução de PEN G 5% (p/v), que era previamente preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0. Logo após a solução atingir a temperatura de 37 °C era feita a adição da PGA. A temperatura e o pH do meio reacional eram mantidos constantes durante toda a reação de hidrólise enzimática. Periodicamente, retirava-se uma alíquota de 250 µL do meio de reação para, em seguida, ser transferida direto para uma cubeta contendo 1750 µL de uma solução de dosagem de PDAB. Transcorrido o tempo de 2,5 minutos, registrou-se a leitura da absorbância.

O preparo da solução de dosagem de PDAB era realizado de acordo com a seguinte proporção volumétrica: 1 parte de solução de PDAB 0,5% (p/v) em metanol, 4 partes de solução de ácido acético 20% (v/v) e 2 partes de solução de hidróxido de sódio 0,05 M. A montagem do sistema operacional característico de reações enzimáticas é mostrada na Figura 4.2. Em adição, a concentração de 6-APA foi medida a partir de uma curva de calibração

antecipadamente preparada. Para tanto, empregaram-se algumas soluções de concentrações conhecidas de 6-APA em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, sendo que, para cada ponto da curva de calibração, realizou-se o mesmo procedimento de dosagem que foi relatado anteriormente.



**Figura 4.1.** Formação de uma base de Schiff após a reação entre o 6-APA, gerado pela hidrólise enzimática da penicilina G, e o PDAB, que pode ser monitorada em espectrofotômetro a 415 nm.



**Figura 4.2.** Ilustração do sistema operacional utilizado para reações enzimáticas, incluindo o reator encamisado com agitação mecânica, acoplado a um banho termostatizado e monitoramento do pH por meio de um pHmetro.

A partir dos valores de concentração de 6-APA, obtidos através da curva de calibração, foi construído um gráfico de concentração de 6-APA *versus* tempo e a inclinação

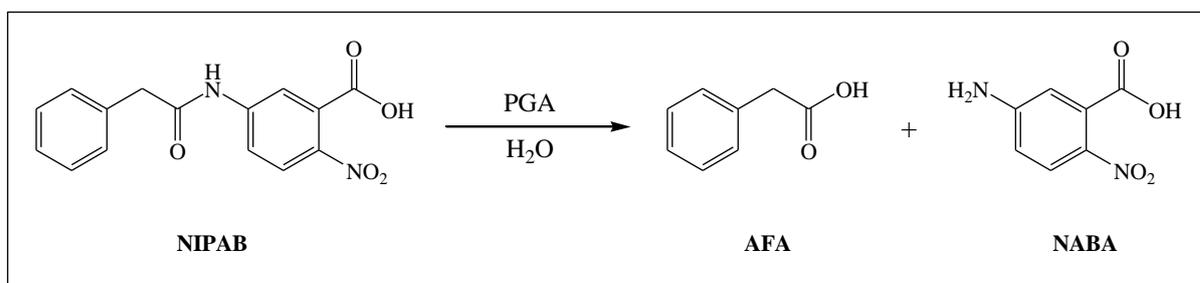
da reta, isto é, a velocidade da reação, foi empregada para determinar a atividade enzimática, como mostra o Quadro 4.1. Como resultado, a atividade enzimática é expressa em UI/g de derivado enzimático ou em UI/mL de enzima livre, onde, 1 unidade internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de PEN G por minuto em pH 8,0 a 37 °C.

**Quadro 4.1.** Cálculo da atividade enzimática da PGA pelo método do PDAB.

<p>ATIVIDADE <i>(UI/g de biocatalisador ou UI/mL de enzima livre)</i></p>	$At = \frac{\text{Velocidade da Reação } (\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}) * \text{Volume da Reação (L)}}{\text{Massa(g) ou Volume (mL) de Enzima}}$
---	---

#### 4.2.3.1.2. Método do NIPAB

Outra metodologia empregada para realizar a determinação da atividade amidase da enzima PGA foi através da análise colorimétrica de um dos produtos da hidrólise enzimática do NIPAB (Kutzbach & Rauenbusch, 1974). O NIPAB é enzimaticamente hidrolisado na temperatura de 25 °C gerando o ácido fenilacético (AFA) e o ácido 5-amino-2-nitro benzóico (NABA). O NABA pode ser quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. A Figura 4.3 apresenta o esquema geral desta reação. A hidrólise do NIPAB foi realizada na própria cubeta, diretamente no espectrofotômetro, com controle constante tanto da temperatura quanto da agitação durante os ensaios enzimáticos.



**Figura 4.3.** Reação de hidrólise do NIPAB, empregada para a determinação da atividade enzimática da PGA, gerando o NABA, composto que pode ser monitorado em espectrofotômetro a 405 nm.

Em cada experimento hidrolítico, utilizava-se um volume de 2 mL de uma solução de NIPAB 66 mg/L, a qual era antecipadamente preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. Em seguida, uma determinada massa (ou volume) da PGA era acrescentada ao substrato. Feito isso, registrou-se a absorvância periodicamente. Ao término de cada ensaio de hidrólise do NIPAB, construiu-se um gráfico de absorvância *versus* tempo e a inclinação da reta (velocidade da reação) foi utilizada para a estimativa da atividade enzimática, conforme apresenta o Quadro 4.2, onde,  $c$  é o caminho ótico da cubeta, numericamente, 1 cm, e,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar, numericamente  $9,09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . O resultado do cálculo é expresso em  $U_{\text{NIPAB}}/\text{g}$  de derivado enzimático ou em  $U_{\text{NIPAB}}/\text{mL}$  de enzima livre, onde, 1 unidade de NIPAB ( $U_{\text{NIPAB}}$ ) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de NIPAB por minuto em pH 7,5 a 25 °C.

**Quadro 4.2.** Cálculo da atividade enzimática da PGA pelo método do NIPAB, onde,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar ( $9,09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e,  $c$  é o caminho ótico da cubeta (1 cm).

<p>ATIVIDADE <small>(<math>U_{\text{NIPAB}}/\text{g}</math> de biocatalisador ou <math>U_{\text{NIPAB}}/\text{mL}</math> de enzima livre)</small></p>	$A_t = \frac{\text{Velocidade da Reação (ua.min}^{-1}) * \text{Volume da Reação (L)}}{\epsilon (\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) * \text{Massa (g) ou Volume (mL) de Enzima} * c (\text{cm})}$
---	--

#### 4.2.3.2. Estabilidade Enzimática

Inicialmente, procedeu-se uma investigação da estabilidade do biocatalisador, PGA imobilizada em Sepabeads<sup>®</sup> (PGA-SEPABEADS), tanto na presença de BMI.PF<sub>6</sub> quanto em meio aquoso. Posteriormente, avaliou-se a estabilidade da PGA na forma livre (PGA-LIVRE) em BMI.PF<sub>6</sub>. As metodologias aplicadas em cada caso são descritas a seguir.

##### 4.2.3.2.1. Estabilidade de PGA-SEPABEADS em BMI.PF<sub>6</sub>

Primeiramente, realizou-se uma correção do valor de  $a_w$  para cada meio de incubação em função da temperatura que se desejava ensaiar, para garantir que todos os experimentos de

estabilidade seriam conduzidos na mesma condição operacional, ou seja,  $a_w \sim 0,8$ . Para tanto, 5 mL de BMI.PF<sub>6</sub> foi adicionado a uma cela de leitura de  $a_w$ , acomodada em um sensor de ponto de orvalho, que foi previamente termostatizado a 25 °C. Uma vez que a medida de  $a_w$  foi inferior a 0,8, tornou-se necessário adicionar água ao BMI.PF<sub>6</sub> para alcançar a leitura desejada. Depois de cada adição de água, o sistema foi homogeneizado e equilibrado durante 24 horas antes de realizar uma nova leitura de  $a_w$ , até atingir o valor de 0,8. Concluída esta etapa, 5 mL foi transferido para um frasco de vidro com tampa de rosca contendo 500 mg de PGA-SEPABEADS. Feito isso, o frasco foi transferido para um shaker antecipadamente termostatizado a 25 °C.

Todos os ensaios de estabilidade foram conduzidos com uma agitação de 350 rpm. Periodicamente, alíquotas foram retiradas e centrifugadas a 12.000g e 4 °C por 5 minutos, com a finalidade de separar o meio de incubação contendo o BMI.PF<sub>6</sub> das partículas do biocatalisador. Posteriormente, PGA-SEPABEADS foi lavado com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. Uma amostra de 10 mg foi utilizada para a dosagem da atividade residual, determinada pelo método do NIPAB. Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicatas. Aqui, a atividade residual foi dada em porcentagem relativa à atividade da enzima no ponto inicial da incubação. Os ensaios de estabilidade de PGA-SEPABEADS a 37,5 e 50 °C foram realizados seguindo o mesmo procedimento que foi feito para o estudo de estabilidade a 25 °C.

#### **4.2.3.2.2. Estabilidade de PGA-SEPABEADS em Meio Aquoso**

Em um frasco de vidro com tampa de rosca, contendo uma massa de 500 mg de PGA-SEPABEADS, foi adicionado 5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. Logo após, este frasco foi acomodado em um shaker previamente termostatizado a 25 °C. No decorrer do experimento, a agitação do shaker foi de 350 rpm. Em tempos determinados, amostras do meio de incubação eram retiradas e lavadas com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. Em seguida, uma porção de 10 mg foi empregada para a quantificação da atividade residual, conforme descrito anteriormente. Para os experimentos seguintes, variou-se a temperatura para 37,5 e 50 °C, seguindo, precisamente, a mesma metodologia que foi realizada para o ensaio a 25 °C.

#### **4.2.3.2.3. Estabilidade de PGA-LIVRE em BMI.PF<sub>6</sub>**

Novamente, foi necessário realizar uma prévia correção do valor de  $a_w$  para cada meio de incubação em função da temperatura que seria conduzida cada ensaio de estabilidade, a fim de que todos fossem realizados na mesma condição de incubação, neste caso,  $a_w \sim 0,8$ . Este ajuste de  $a_w$  foi realizado seguindo a mesma metodologia anteriormente descrita para o estudo da estabilidade de PGA-SEPABEADS em BMI.PF<sub>6</sub>. Finalizado esse processo, um volume de 5 mL de BMI.PF<sub>6</sub>, apresentando uma medida de  $a_w$  próxima a 0,8, foi transferido para um frasco de vidro com tampa de rosca, o qual continha 500  $\mu$ L de PGA-LIVRE. Em seguida, depositou-se o frasco em um shaker previamente equilibrado na temperatura de interesse. A agitação do shaker foi de 350 rpm. Em tempos definidos, uma amostragem do meio de incubação era realizada e, em seguida, adequadamente diluída e adicionada ao ensaio para a dosagem da atividade residual, assim como relatado acima. Este método foi igualmente realizado para cada uma das diferentes temperaturas de incubação (25, 37,5 e 50 °C).

#### **4.2.3.3. Estabilidade dos Substratos**

A seleção prévia dos LIs foi imprescindível para avaliar a viabilidade de utilização destes solventes como possíveis meios de reação para a síntese enzimática de amoxicilina. Esta triagem foi dirigida por meio de testes de estabilidade dos substratos que são usualmente utilizados nestes processos enzimáticos, uma vez que estes meios têm que ser totalmente inertes em relação a estes compostos. Para tanto, algumas das condições reacionais foram simuladas. Em um ensaio de estabilidade típico, inicialmente, realizou-se a medida de  $a_w$  de cada um dos vários LIs que seriam avaliados, com a finalidade de garantir a mesma condição operacional para todos os experimentos que, neste caso, seria uma medida de  $a_w \sim 0,8$ . Igualmente, foi necessário realizar uma correção do valor de  $a_w$  para todos os LIs que foram testados. Este ajuste de  $a_w$  seguiu o mesmo procedimento que foi descrito anteriormente.

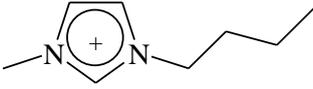
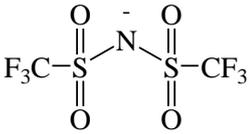
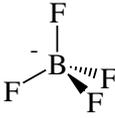
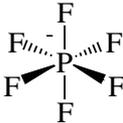
Tendo completado este passo, cada um dos diferentes LIs foi transferido para frascos individuais, contendo uma massa de um dos substratos, totalizando uma concentração de 50 mM. Todos estes frascos foram homogeneizados e levados para um shaker previamente

equilibrado a 25 °C e 350 rpm. A estabilidade dos substratos foi continuamente monitorada por meio das áreas referentes às bandas cromatográficas presentes nos cromatogramas. Uma varredura de diversos tipos de LIs foi realizada, incluindo as categorias de LIs apróticos (LIAs) e de LIs próticos (LIPs), conforme pode ser visto no Quadro 4.3.

**Quadro 4.3.** Relação de todos os líquidos iônicos, incluindo apróticos e próticos, que foram avaliados quanto à estabilidade dos substratos da reação de síntese enzimática de amoxicilina na presença destes meios.

LÍQUIDOS IÔNICOS APRÓTICOS	BMI.PF <sub>6</sub>		
	BMI.BF <sub>4</sub>		
	BMI.NTf <sub>2</sub>		
LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS	mM.Pe	M.Ci	M.Ft
	mM.Bu	D.Ci	D.Ft
	M.Bu	M.Su	M.Ad
	M.La	D.Su	D.Ad
	D.La	M.Ox	D.Fu
	M.Ac	D.Ox	D.Ma
	D.Ac	D.Pr	D.Fo

Adicionalmente, as Figuras 4.4 e 4.5 apresentam as estruturas químicas dos íons que fazem parte da constituição destes materiais que foram avaliados.

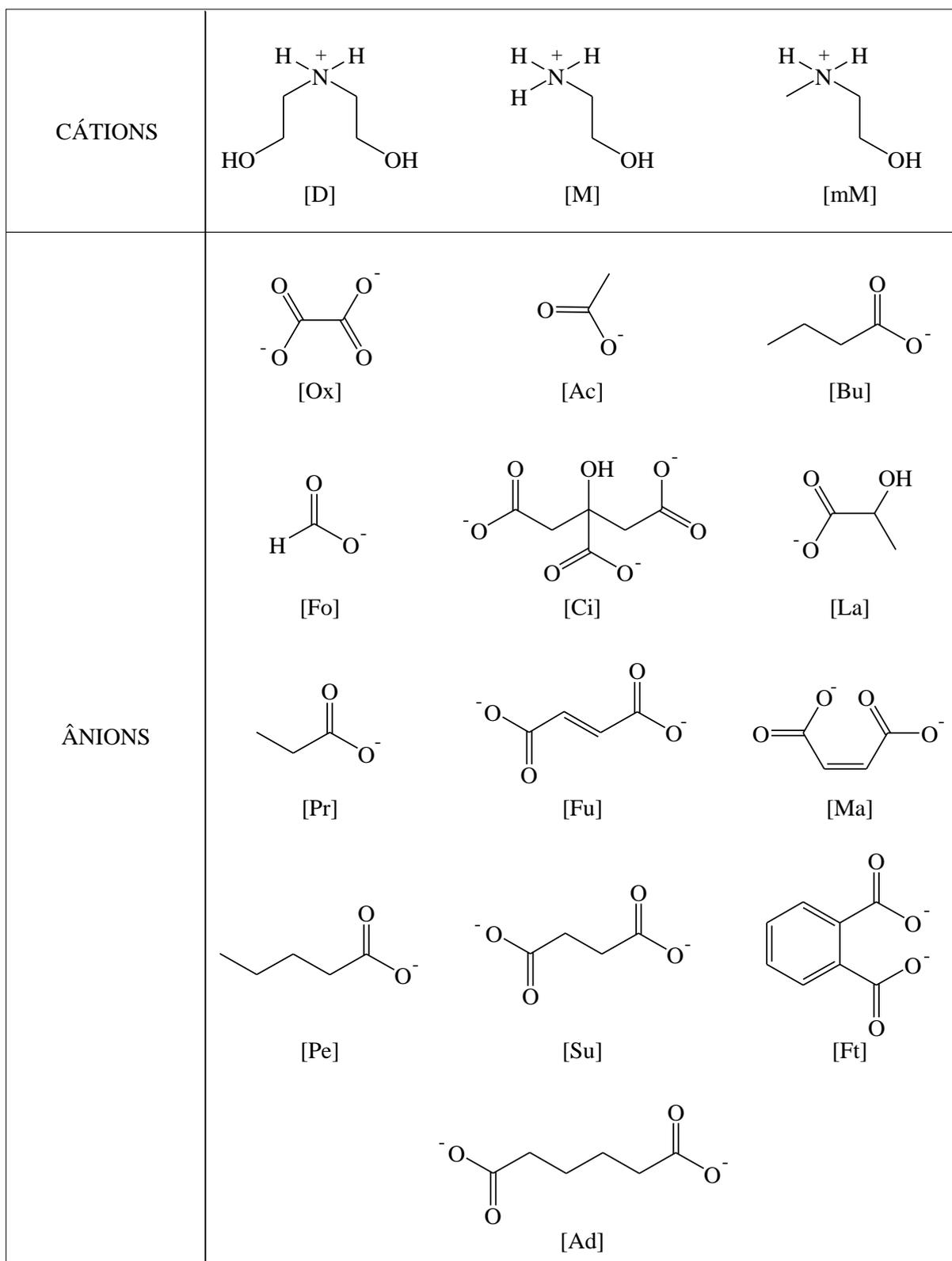
CÁTION	 [BMI]		
ÂNIONS	 [NTf <sub>2</sub> ]	 [BF <sub>4</sub> ]	 [PF <sub>6</sub> ]

**Figura 4.4.** Estrutura química dos íons que compõem os líquidos iônicos apróticos testados neste trabalho.

#### 4.2.3.4. Síntese de Amoxicilina

A síntese enzimática de amoxicilina foi conduzida sob a rota de controle cinético. Nestes experimentos, a reação entre o núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA) e o éster metílico da *p*-hidroxifenilglicina (EMPOHFG) foi catalisada pela PGA imobilizada covalentemente em suporte Sepabeads<sup>®</sup>. Este derivado enzimático proporcionou uma carga enzimática aparente de 260 UI/g de biocatalisador. Em todos os ensaios de síntese enzimática de amoxicilina, um reator batelada encamisado com agitação mecânica constante foi empregado. Em adição, o pH do meio reacional foi continuamente monitorado com o auxílio de um pHmetro, enquanto a temperatura foi conservada constante durante o decorrer de todo o ensaio enzimático por meio de um banho termostatizado. O sistema operacional é o mesmo que foi empregado para a hidrólise enzimática da PEN G, esquematizado antecipadamente na Figura 4.2.

As condições experimentais foram idênticas tanto para as reações realizadas em meio totalmente aquoso quanto para as reações que foram conduzidas na presença de cada um dos LIs como cossolvente. As concentrações dos substratos no ponto inicial das reações foram 50 mM tanto para o 6-APA quanto para o EMPOHFG. Além disso, a relação de enzima para substrato (E/S) foi 52 UI/mmol de substrato, totalizando um volume de reação de 20 mL. Desta forma, a quantidade de derivado enzimático empregada foi 0,2 g. Todas as reações de síntese de amoxicilina foram conduzidas a 25 °C.



**Figura 4.5.** Estrutura química dos íons, incluindo os cátions e os ânions, que fazem parte da constituição de todos os líquidos iônicos, da categoria dos próticos, que foram examinados neste trabalho. Para um melhor entendimento, as siglas completas referentes a cada um dos diferentes líquidos iônicos próticos avaliados foram anteriormente apresentadas no Quadro 4.3.

O padrão para comparação foi uma reação realizada em meio totalmente aquoso (tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5), sem a presença de nenhum LI. É importante mencionar que as reações que empregaram LIs como cossolventes foram preparadas como frações volumétricas, expressas pela relação de volume de LI para volume de água ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ). Ao longo do curso das reações, alíquotas foram retiradas e, em seguida, diluídas em fase móvel para proceder à análise por HPLC.

#### 4.2.3.5. Índices de Desempenho da Reação

O desempenho de todas as reações de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina, tanto daquelas que foram realizadas em meio totalmente aquoso quanto daquelas que foram conduzidas na presença de LIs, foi avaliado através da utilização dos índices de seletividade global (síntese/hidrólise, relação S/H) e conversão de 6-APA, conforme pode ser observado pelas definições apresentadas no Quadro 4.4. O cálculo destes índices foi efetuado depois de transcorridos 180 minutos de reação.

**Quadro 4.4.** Critérios empregados para avaliar o desempenho de todas as reações de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina, nos quais, t é referente a 180 minutos de reação.

<p>SELETIVIDADE <i>(concentração de amoxicilina/concentração de p-hidroxifenilglicina)</i></p>	$S(t) = \frac{C_{AMOX}^{(t)} - C_{AMOX}^{Inicial}}{C_{POHFG}^{(t)} - C_{POHFG}^{Inicial}}$
<p>CONVERSÃO DE 6-APA <i>(concentração de amoxicilina/concentração inicial de 6-APA)</i></p>	$X(t) = \frac{C_{6-APA}^{Inicial} - C_{6-APA}^{(t)}}{C_{6-APA}^{Inicial}}$

#### 4.2.3.6. Atividade Termodinâmica da Água

As medidas de  $a_w$  foram realizadas em um sensor de ponto de orvalho selado e antecipadamente termostatizado até a obtenção de medidas constantes. Todas as amostras

foram previamente equilibradas por 24 horas. O higrômetro foi continuamente calibrado com o auxílio de soluções padrão (Decagon Devices Incorporated).

#### **4.2.3.7. Viscosidade**

As medidas de viscosidades ( $\eta$ ) foram realizadas para todos os LIs empregados na síntese enzimática de amoxicilina. Deve ser sublinhado que estas medições foram conduzidas com os LIs sem nenhuma adição de água. O reômetro foi antecipadamente calibrado com um óleo padrão (Brookfield Engineering Laboratories).

#### **4.2.3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura**

As fotomicrografias do derivado enzimático, PGA immobilizada em Sepabeads<sup>®</sup>, foram obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estas imagens foram registradas antes e depois do biocatalisador ser empregado em uma síntese enzimática de amoxicilina. As amostras após a reação tiveram suas fotomicrografias geradas antes e depois de serem abundantemente lavadas, para retirar todo o material diferente das partículas do biocatalisador. As amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita de carbono e recobertas com ouro, sendo mantidas em dessecador até o momento da análise.

#### **4.2.3.9. Método Analítico**

Todos os compostos foram quantificados através de análises por HPLC. Para esta finalidade, empregou-se uma coluna Phenomenex Gemini C18, cujas dimensões eram 150 x 4,6 mm, com o tamanho da partícula igual a 5  $\mu\text{m}$ . O mecanismo de separação cromatográfica foi fundamentado em adsorção hidrofóbica, empregando o modo de eluição isocrática. O eluente foi previamente filtrado por meio de uma membrana filtrante 0,45  $\mu\text{M}$  e degaseificado em ultrassom para proceder à sua utilização. As análises foram conduzidas a

25 ° C. O sistema de detecção empregou o comprimento de onda de 225 nm como o  $\lambda_{\text{max}}$ . O volume de injeção empregado foi de 10  $\mu\text{L}$ , eluindo na vazão de 1 mL/min. Todas as amostras foram solubilizadas na fase móvel, apropriada em cada caso, para, em seguida, serem analisadas. Para cada uma das categorias de LIs foi empregada uma fase móvel diferente, cuja preparação é descrita a seguir.

#### **4.2.3.9.1. Líquidos Iônicos Apróticos**

A fase móvel utilizada para amostras contendo LIAs foi preparada como se segue: 1,4 g de SDS, 0,68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 650 mL de água Milli-Q, 350 mL de acetonitrila e correção para pH 3,0 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

#### **4.2.3.9.2. Líquidos Iônicos Próticos**

A preparação da fase móvel para alíquotas que continham LIPs foi conduzida da seguinte forma: 2,88 g de SDS, 0,34 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 300 mL de água Milli-Q, 700 mL de metanol e correção para pH 3,0 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

### **4.3. Resultados e Discussão**

Esta seção descreve os principais resultados obtidos durante o estudo da viabilidade de utilização de LIs para a síntese enzimática de amoxicilina.

#### **4.3.1. Estabilidade Enzimática**

A utilização de LIs nos mais diversos campos de pesquisa e desenvolvimento tem ganhado destaque na última década e, este panorama não é diferente no que diz respeito aos

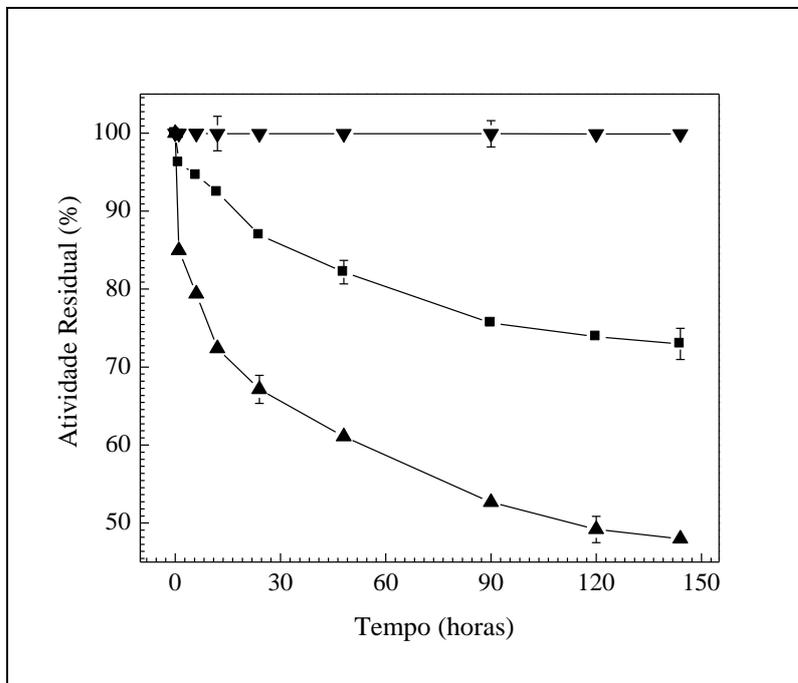
processos biotecnológicos, para os quais, tem sido amplamente reportado que os LIs oferecem possibilidades interessantes (Zhang *et al.*, 2011). Em catálise enzimática, a maior parte das reações conduzidas na presença de LIs é catalisada por lipases (Kobayashi, 2011). Estas enzimas, comumente, exibem melhor desempenho catalítico em LIs do que na presença dos solventes orgânicos que são convencionalmente aplicados (De Diego *et al.*, 2005). Por isso, há um interesse em usar não somente as lipases, mas, igualmente, outras enzimas.

Neste contexto, surgiu o interesse de explorar a utilização de LIs como possíveis cossolventes para as reações catalisadas pela PGA, que é uma enzima de grande importância industrialmente, em especial, na catálise da hidrólise de PEN G para a produção de 6-APA, uma molécula chave para a síntese de penicilinas semi-sintéticas (Arroyo *et al.*, 2003). Além disso, não existem muitos dados bibliográficos disponíveis sobre reações catalisadas pela PGA na presença de LIs. Entre as principais informações, alguns estudos citaram que a PGA se mostra estável nestes solventes, principalmente, em BMI.PF<sub>6</sub>, mas para ser cataliticamente ativa deve estar em um meio apresentando  $a_w \sim 0,8$  (Basso *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

Um critério extremamente importante para a seleção de um sistema solvente-enzima é a estabilidade do biocatalisador no meio de reação. Portanto, fundamentada nas informações reportadas na literatura, realizou-se uma investigação preliminar a respeito da influência de BMI.PF<sub>6</sub> na taxa de inativação da PGA em meio exibindo  $a_w \sim 0,8$ . Em adição, sabendo que a conservação da conformação cataliticamente ativa da enzima é dependente da temperatura, os ensaios foram conduzidos em três diferentes temperaturas, entretanto, realizados nas mesmas condições operacionais. Assim sendo, uma correção prévia de  $a_w$  para cada temperatura de incubação foi necessária, uma vez que, em nenhum dos casos, o valor de  $a_w$  alcançou o que foi padronizado para a realização deste estudo.

Inicialmente, os perfis de desativação da enzima imobilizada (PGA-SEPABEADS) foram analisados. A Figura 4.6 apresenta os resultados que foram encontrados neste estudo de estabilidade. Sabe-se que a temperatura é uma variável bastante importante em qualquer sistema biológico, especialmente, quando se trata de processos enzimáticos, nos quais a temperatura atua exercendo efeitos opostos na estabilidade e atividade enzimáticas. Um aumento na temperatura acarreta um acréscimo na taxa da reação química que está sendo catalisada, em contrapartida, também aumenta a taxa na qual a enzima está sendo inativada. Os resultados demonstraram que a temperatura foi, comprovadamente, um fator relevante

para o estudo da estabilidade de PGA-SEPABEADS em BMI.PF<sub>6</sub>, como pode ser claramente visualizado pela Figura 4.6.

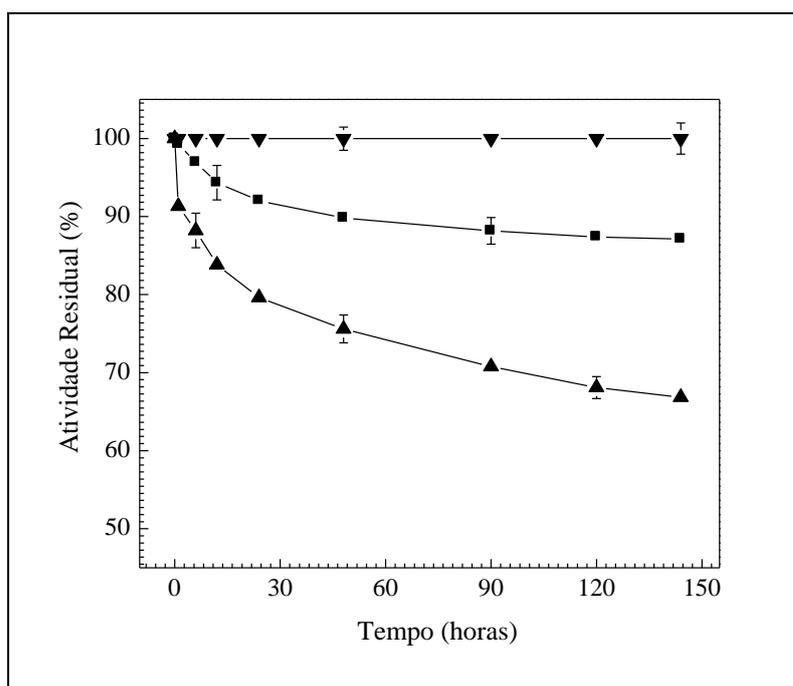


**Figura 4.6.** Perfis de desativação de PGA-SEPABEADS no decorrer da incubação em BMI.PF<sub>6</sub>, apresentando  $a_w \sim 0,8$ . Neste gráfico, os símbolos representam: (▼) 25 °C, (■) 37,5 °C e (▲) 50 °C. As barras de erros são referentes ao desvio padrão, o qual foi estimado a partir de triplicatas.

A observação dos perfis de desativação apresentados na Figura 4.6 mostra que PGA-SEPABEADS permaneceu totalmente ativa no decorrer das 144 horas de incubação a 25 °C. Este resultado corrobora uma pesquisa anterior reportada por Basso *et al.* (2005), ao estudar a estabilidade de uma PGA imobilizada, comercial, na presença de BMI.PF<sub>6</sub>, cujos detalhes de imobilização não foram fornecidos pelos autores. Os experimentos que foram conduzidos em temperaturas mais elevadas apresentaram perfis diferentes do que foi observado para 25 °C. Em outras palavras, PGA-SEPABEADS perdeu, gradativamente, a atividade no transcorrer das 144 horas de incubação, sendo esta perda mais brusca no experimento que foi realizado a 50 °C. Ao término do período de incubação estudado, a perda de atividade foi cerca de 30% a 37,5 °C e, aproximadamente, 50% no ensaio a 50 °C.

A influência da temperatura na estabilidade e atividade das enzimas é um aspecto inerente à catálise enzimática, independente do meio em que ocorre, seja aquoso, iônico ou

orgânico, embora essa dependência possa ser quantitativamente muito diferente. Tendo isso em mente e com a finalidade de comparação, optou-se por realizar, igualmente, ensaios de estabilidade de PGA-SEPABEADS em meio completamente aquoso, ou melhor, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. Deve ser ressaltado que este tampão é o rotineiramente utilizado para os ensaios de síntese enzimática de amoxicilina em meio aquoso. A Figura 4.7 apresenta os perfis de desativação de PGA-SEPABEADS em meio aquoso.

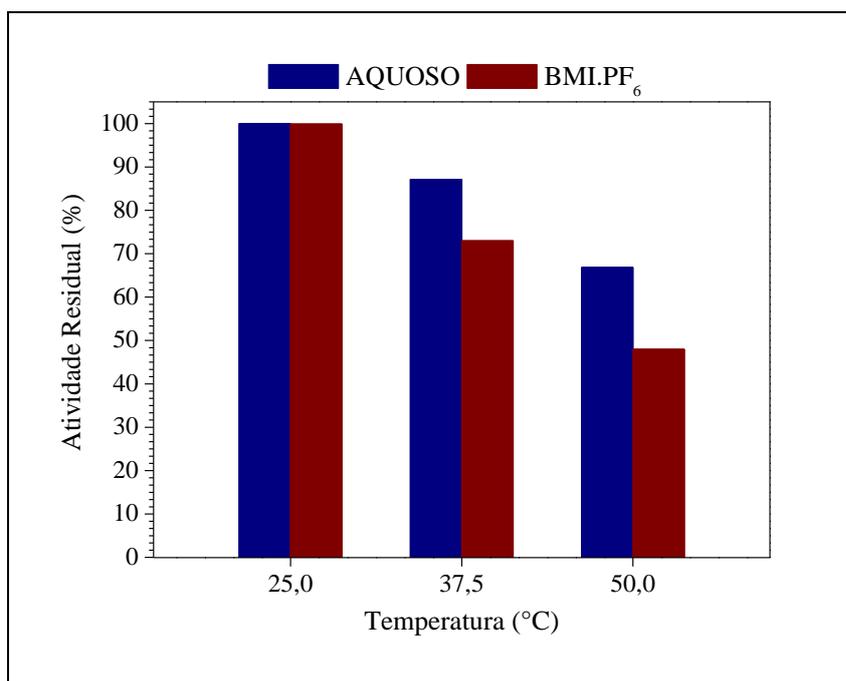


**Figura 4.7.** Perfis de desativação de PGA-SEPABEADS durante a incubação em meio totalmente aquoso (tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5). Neste gráfico, os símbolos representam: (▼) 25 °C, (■) 37,5 °C e (▲) 50 °C. As barras de erros são referentes ao desvio padrão, o qual foi estimado a partir de triplicatas.

O experimento conduzido a 25 °C mostrou que PGA-SEPABEADS foi capaz de conservar integralmente a atividade enzimática no decorrer das 144 horas que perfaziam o período de incubação, conforme pode ser visto pela Figura 4.7. Este resultado corrobora, outra vez, um estudo antecedente realizado por Basso *et al.* (2005), ao investigar a estabilidade de PGA imobilizada, incubando o biocatalisador em meio aquoso à temperatura ambiente, mesmo tendo empregado, em seu estudo, um derivado enzimático diferente do que foi utilizado neste presente trabalho. Estas observações indicam que PGA imobilizada é um biocatalisador altamente estável em meio aquoso a 25 °C. É conveniente mencionar que

Zhang *et al.* (2006) apresentaram uma pesquisa da estabilidade de PGA covalentemente imobilizada em polimetacrilimida, apresentando estabilidade mais elevada em BMI.PF<sub>6</sub> do que em vários outros LIs e, ainda, que este derivado enzimático mostrou-se mais estável em BMI.PF<sub>6</sub> do que em meio aquoso, durante uma incubação a 10 °C.

Os ensaios de estabilidade enzimática de PGA-SEPABEADS conduzidos em meio aquoso a temperaturas mais elevadas indicaram uma queda gradual de atividade, da mesma maneira que ocorreu com a incubação de PGA-SEPABEADS em BMI.PF<sub>6</sub>, como apresenta a Figura 4.7. Entretanto, observa-se que em meio aquoso essa queda de atividade enzimática foi menos acentuada, como pode ser constatado pelo comparativo entre os ensaios de estabilidade enzimática em BMI.PF<sub>6</sub> e em meio aquoso, após 144 horas de incubação, apresentado na Figura 4.8. No transcorrer da incubação de PGA-SEPABEADS em meio aquoso, a queda de atividade foi cerca de 10% no experimento realizado a 37,5 °C. Já no ensaio que foi realizado a 50 °C, essa queda foi de, aproximadamente, 30%.



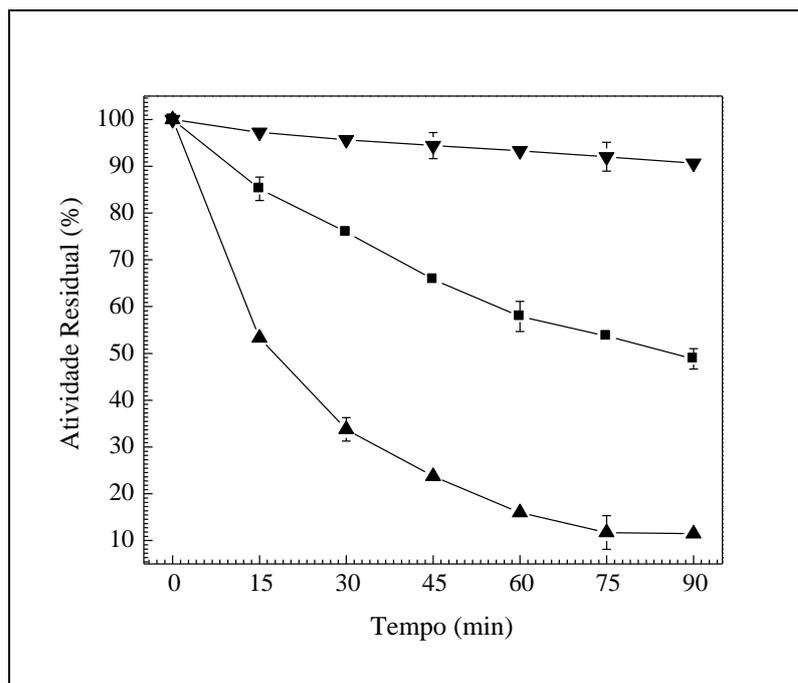
**Figura 4.8.** Comparativo entre os ensaios de estabilidade enzimática de PGA-SEPABEADS após um período de 144 horas de incubação na presença de BMI.PF<sub>6</sub> e em meio totalmente aquoso a 25, 37,5 e 50 °C.

As inúmeras técnicas de imobilização de enzimas, dentre outras finalidades, buscam a possibilidade de aumentar a estabilidade da enzima quando comparada à sua forma livre,

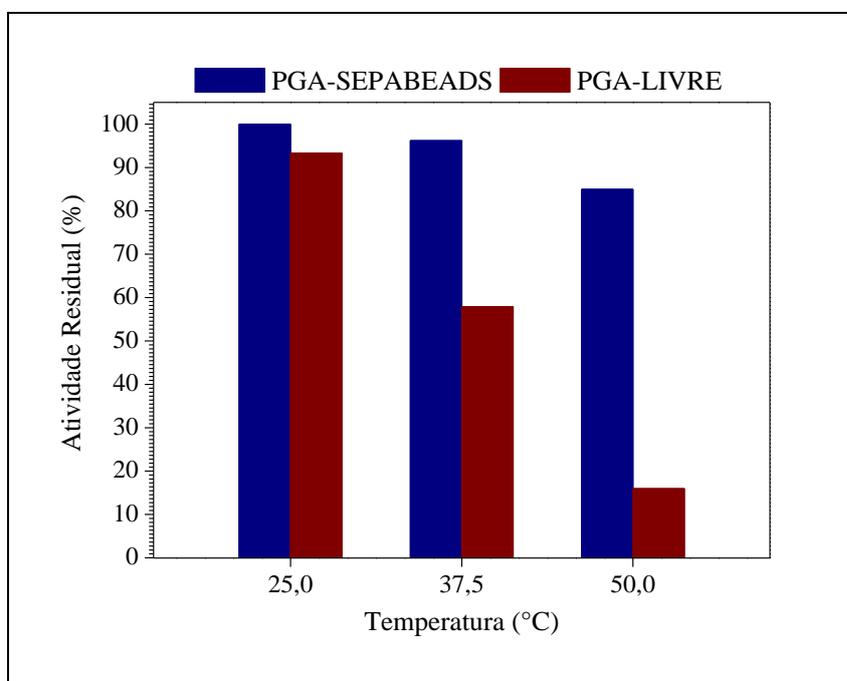
evitando sua rápida inativação frente às variações de temperatura (Phadtare *et al.*, 2002). Com o objetivo de investigar o quanto a técnica de imobilização covalente da PGA em suporte em Sepabeads<sup>®</sup> maximizava a estabilidade da enzima na presença de um meio iônico, foram conduzidos experimentos de estabilidade térmica da PGA na sua forma livre, incubando-se a enzima em BMI.PF<sub>6</sub>. Igualmente, foi necessário realizar uma correção prévia de  $a_w$  para cada temperatura de incubação, afim de que todos os experimentos fossem conduzidos na mesma condição, seguindo o procedimento que foi anteriormente realizado para a estabilidade de PGA-SEPABEADS em BMI.PF<sub>6</sub>. Em outras palavras, foi necessário fazer uma adição de água ao BMI.PF<sub>6</sub> para alcançar uma medida de  $a_w \sim 0,8$ .

Os ensaios realizados para o estudo da estabilidade de PGA-LIVRE na presença de BMI.PF<sub>6</sub> em 25 °C mostraram que a atividade enzimática sofreu uma ligeira queda ao longo dos 90 minutos do período de incubação, conforme mostra o perfil de desativação apresentado na Figura 4.9. Este resultado aponta certa vulnerabilidade da enzima livre, mesmo em uma temperatura ambiente. A perda de atividade enzimática foi mais acentuada nos experimentos conduzidos em temperaturas mais elevadas. No ensaio realizado a 37,5 °C, PGA-LIVRE perdeu cerca de 50% da atividade enzimática, enquanto no ensaio executado a 50 °C, essa perda alcançou, aproximadamente, 90%, depois de transcorridos 90 minutos da incubação na presença de BMI.PF<sub>6</sub>.

Os resultados encontrados neste trabalho, para o estudo da estabilidade de PGA-LIVRE na presença de BMI.PF<sub>6</sub>, corroboram trabalhos anteriormente reportados, nos quais foi encontrada uma perda de aproximadamente 50% de atividade enzimática de PGA-LIVRE após um período de 76 minutos de incubação em BMI.PF<sub>6</sub> a 40 °C (de los Ríos *et al.*, 2007; Hernández-Fernández *et al.*, 2009). Além disso, os perfis de desativação enzimática encontrados para PGA-LIVRE, resultantes da incubação em BMI.PF<sub>6</sub>, foram similares aos perfis encontrados para PGA-SEPABEADS incubada em BMI.PF<sub>6</sub>, como pode ser constatado pela comparação entre as Figuras 4.6 e 4.9. Contudo, a queda de atividade exibida por PGA-LIVRE foi significativamente mais acentuada do que a apresentada por PGA-SEPABEADS, como pode ser visto pelo comparativo entre os ensaios de estabilidade de PGA-SEPABEADS e de PGA-LIVRE na presença de BMI.PF<sub>6</sub> após 60 minutos de incubação (Figura 4.10). Estas observações confirmam que PGA-SEPABEADS é mais estável do que PGA-LIVRE, fazendo com que seja um biocatalisador valioso para pesquisas em meios não aquosos.



**Figura 4.9.** Perfis de desativação de PGA-LIVRE durante o período de incubação em BMI.PF<sub>6</sub>, apresentando  $a_w \sim 0,8$ . Neste gráfico, os símbolos representam: (▼) 25 °C, (■) 37,5 °C e (▲) 50 °C. As barras de erros são referentes ao desvio padrão, o qual foi estimado a partir de triplicatas.



**Figura 4.10.** Comparativo resultante dos ensaios de estabilidade de PGA-SEPABEADS e de PGA-LIVRE após 60 minutos de incubação na presença de BMI.PF<sub>6</sub>, em diferentes temperaturas: 25, 37,5 e 50 °C. Em ambos os casos, o meio de incubação apresentava  $a_w \sim 0,8$ .

Deve ser sublinhado que os gráficos contendo os perfis de desativação enzimática apresentados neste estudo de estabilidade da PGA não consistem de modelos matemáticos ajustados aos pontos experimentais e sim de pontos de originados de dados experimentais conectados por linhas de tendência. Em adição, são encontrados na literatura cálculos da constante de desativação e do tempo de meia-vida para os estudos de estabilidade da PGA através do método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987). Entretanto, este e outros modelos foram testados sem que fosse obtido ajuste satisfatório. Vale ressaltar que o ajuste de modelos matemáticos, neste caso, não se faz rigorosamente necessário, já que o objetivo deste estudo preliminar foi apenas verificar se PGA-SEPABEADS seria estável na presença de um LI que já é amplamente utilizado em biocatálise.

### **3.3.2. Estabilidade dos Substratos**

Como previamente mencionado, apesar da aplicação de LIs ganhar cada vez mais destaque em diferentes ramos da pesquisa e desenvolvimento, com crescente participação na área de biotecnologia, pouco se sabe sobre as implicações destes solventes no que diz respeito às reações catalisadas pela PGA, principalmente, para a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. Neste sentido, torna-se necessário realizar estudos preliminares sobre os principais elementos que compõem o sistema reacional, por exemplo, a estabilidade do biocatalisador no meio de reação que se deseja empregar. Este ponto foi anteriormente avaliado neste trabalho, constatando-se que PGA-SEPABEADS permaneceu estável durante seis dias de exposição ao BMI.PF<sub>6</sub> a 25 °C.

Além deste, outro critério muito importante para auxiliar na seleção de um solvente adequado para uma determinada aplicação, o que, neste caso, seria a síntese enzimática de amoxicilina, é a estabilidade dos substratos envolvidos na reação em relação ao meio que se espera utilizar. Em outras palavras, os substratos não podem ser degradados na presença do solvente que será aplicado como meio de reação. Baseado nestas observações, optou-se por conduzir um estudo da estabilidade do EMPOHFG e do 6-APA na presença de BMI.PF<sub>6</sub>. Os resultados mostraram que tanto o EMPOHFG quanto o 6-APA foram completamente estáveis em BMI.PF<sub>6</sub> durante os seis dias de incubação na temperatura de 25 °C. Estas informações

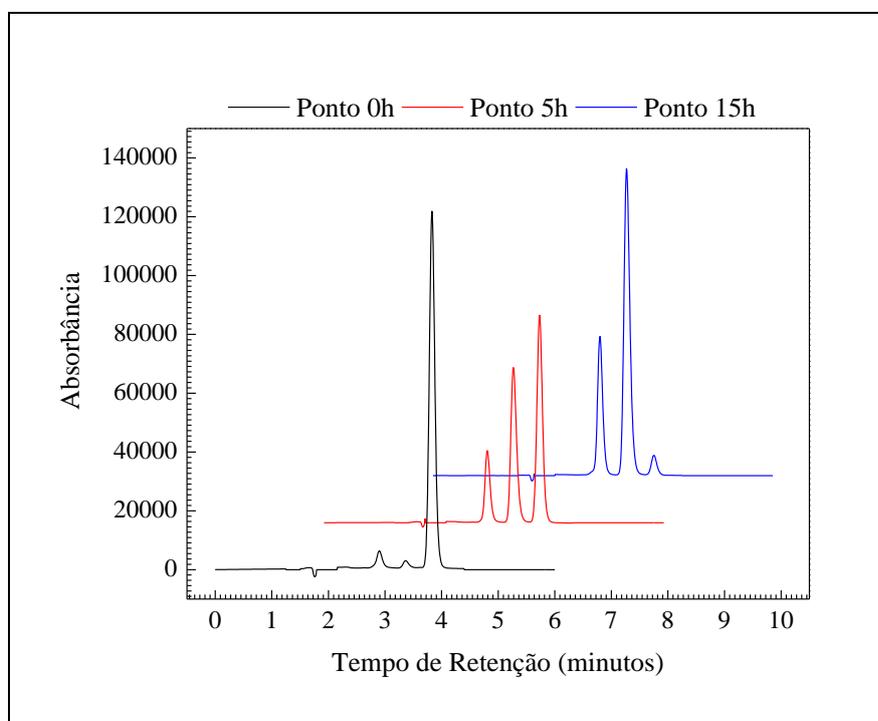
evidenciam a promissora viabilidade de utilização deste solvente para conduzir o processo de produção enzimática de amoxicilina.

Inicialmente, realizou-se uma investigação preliminar de apenas um dos diversos LIPs existentes e M.La foi o escolhido, aleatoriamente. Trata-se de um LI baseado na reação entre uma amina mono-substituída (2-hidroxietilamina) e um ácido láctico. Para este estudo prévio, reproduziram-se as mesmas condições que foram anteriormente empregadas no estudo da estabilidade dos substratos na presença de BMI.PF<sub>6</sub>, para fins comparativos. Os resultados mostraram que M.La interage tanto com o EMPOHFG quanto com o 6-APA, ou seja, este LIP não é inerte, como é de se esperar para um meio reacional e, assim, não poderia ser diretamente aplicado para a reação de síntese enzimática de amoxicilina.

Apesar disso, extrapolou-se a investigação nesta classe de LIPs com a finalidade de ampliar a base de informações para permitir a formação de uma afirmativa conclusiva. Para tanto, utilizaram-se uma série de LIPs que são formados não apenas pela mesma amina mono-substituída como também por outras aminas di-substituídas, a N-metil-2-hidroxietilamina (mM) e a 2-hidroxi-dietilamina (D). Além disso, empregaram-se LIPs baseados não somente no íon lactato como também em vários outros ânions, incluindo pentanoato (Pe), butirato (Bu), acetato (Ac), propionato (Pr), succinato (Su), ftalato (Ft), fumarato (Fu), citrato (Ci), maleato (Ma), adipato (Ad), oxalato (Ox) e formato (Fo), perfazendo um total de 21 LIPs que foram avaliados nesta etapa.

Como a degradação de apenas um destes substratos, seja o EMPOHFG ou o 6-APA, implica a inviabilidade de utilização do meio para a síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina, utilizando estes substratos, optou-se por realizar este estudo de estabilidade com somente um deles, o EMPOHFG. Esta opção foi motivada, principalmente, pela ideia de evitar perdas excessivas de reagentes, o que, neste caso, seria desnecessário, já que se pretende, simplesmente, realizar uma pré-seleção dos solventes em questão. Além disso, os resultados preliminares com o M.La apontaram que ambos os substratos foram degradados. Portanto, o estudo de estabilidade do EMPOHFG na presença destes LIPs foi utilizado como um teste para investigar e selecionar possíveis meios de reação. Vale lembrar que este estudo foi conduzido seguindo a mesma metodologia empregada para o estudo de estabilidade dos substratos em BMI.PF<sub>6</sub>. Os resultados mostraram que todos os 21 LIPs que foram testados interagiram com o EMPOHFG, resultando não só na degradação do mesmo

durante o período de incubação como também na formação de um composto desconhecido, apresentando tempo de retenção próximo a 3,4 minutos, como pode ser nitidamente visualizado através dos cromatogramas apresentados na Figura 4.11. É válido sublinhar que o perfil de estabilidade do EMPOHFG foi praticamente idêntico em todos os LIPs que foram avaliados, ou seja, ocorreu uma degradação contínua do EMPOHFG, observada pela redução de área da banda cromatográfica relativa a este substrato, resultando no aparecimento de uma banda cromatográfica, cuja identidade não foi caracterizada neste presente trabalho. Por se tratar de um grande número de LIPs, sendo que todos apresentaram uma evolução similar, escolheu-se apenas um deles, o D.Ac, para representar os resultados que foram encontrados.



**Figura 4.11.** Cromatogramas típicos resultantes do estudo de estabilidade do EMPOHFG na presença do LIP acetato de 2-hidrodietilamina (D.Ac), incluindo as bandas cromatográficas da POHFG (2,9 minutos), do composto desconhecido (3,4 minutos) e do EMPOHFG (3,9 minutos).

O fato do EMPOHFG não ser estável na presença dos LIPs testados inviabiliza a utilização destes meios para os propósitos deste presente trabalho, tornando-se desnecessário prosseguir com a pesquisa da estabilidade do 6-APA ou mesmo investigar a estabilidade do biocatalisador. Como o número de distintos ânions é bem maior do que a variedade de cátions

que compõem os LIPs avaliados pode-se inferir que talvez tenha ocorrido uma interação entre o EMPOHFG e a parte catiônica do LI. Além disso, vale lembrar que os LIPs apresentam um próton disponível para realizar ligação de hidrogênio (Greaves & Drummond, 2008). Esse fato pode ter sido preponderante para a interação de toda esta série de LIPs com o EMPOHFG. É válido comentar que talvez impurezas presentes nestes meios também possam ter contribuído para estes resultados de degradação do EMPOHFG.

### 3.3.3. Síntese de Amoxicilina

A síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas ainda não é economicamente competitiva com a síntese química em escala industrial, muito em razão da existência de reações laterais de hidrólise que limitam o rendimento do processo enzimático (Gabor *et al.*, 2005). Assim, maximizar a seletividade (síntese/hidrólise, relação S/H) é essencial para tornar a rota enzimática economicamente viável. As reações hidrolíticas podem ser parcialmente evitadas utilizando um sistema reacional que apresente menor valor de  $a_w$  para minimizar estas reações de hidrólise, mas que mantenha a enzima na sua conformação cataliticamente ativa. Neste cenário, LIs surgiram como possíveis solventes para a produção de amoxicilina.

Para desenvolver um processo enzimático em um meio não aquoso, é importante garantir que o biocatalisador seja estável neste meio, e que não exista qualquer interação com os substratos da reação. Estas etapas preliminares são fundamentais para viabilizar a síntese enzimática de amoxicilina e foram realizadas neste trabalho, resultando na seleção do BMI.PF<sub>6</sub> como um potencial solvente. É válido acrescentar que na presença de BMI.PF<sub>6</sub> não ocorre degradação do produto, ou seja, o composto alvo deste trabalho é estável na presença deste solvente. Vale destacar que os experimentos de estabilidade enzimática e dos substratos foram, igualmente, realizados na presença de BMI.BF<sub>4</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub>, apresentando os mesmos resultados antes encontrados para o BMI.PF<sub>6</sub>.

O comportamento de enzimas em solventes não aquosos ainda não é completamente compreendido. Desde os primeiros estudos de catálise enzimática em solventes orgânicos, tem sido questionado se um microambiente totalmente aquoso é essencial para a manutenção da conformação cataliticamente ativa de enzimas (Zaks & Klivanov, 1984). Em sistemas não

completamente aquosos, as moléculas de água são distribuídas entre as proximidades da macromolécula enzima, o próprio solvente, quando não há imiscibilidade total, e o suporte para a imobilização, quando utilizado. Deste modo, um aspecto importante, mais do que a concentração de água no meio, é a sua disponibilidade para a molécula de enzima, a fim de sustentar suas propriedades catalíticas. A quantidade de água disponível para a enzima no meio reacional, ou seja, a hidratação da enzima, particularmente, para a interação com o sítio ativo, é intimamente relacionada com a atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) no meio (Bell *et al.*, 1995). Assim, previamente aos ensaios de síntese enzimática de amoxicilina, medidas de  $a_w$  foram efetuadas. A Tabela 4.1 apresenta os valores de  $a_w$  para os três sistemas LI-ÁGUA utilizados nos ensaios cinéticos, para diferentes composições em volume de cada sistema, medidas a 25 °C, após serem equilibrados por 24 horas. É interessante observar que as “composições” em volume da mistura LI-ÁGUA estão expressas como frações volumétricas.

**Tabela 4.1.** Valores de  $a_w$  para diferentes sistemas LI-ÁGUA, os quais foram medidos a 25 °C depois de terem sido equilibrados durante 24 horas, incluindo o desvio padrão estimado a partir de triplicatas.

LI-ÁGUA ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ )	$a_w$ (25 °C)		
	BMI.BF <sub>4</sub>	BMI.PF <sub>6</sub>	BMI.NTf <sub>2</sub>
12,5%	0,7950 ± 0,0003	0,9001 ± 0,0006	0,9988 ± 0,0002
25%	0,6487 ± 0,0005	0,8979 ± 0,0011	0,9945 ± 0,0003
37,5%	0,5765 ± 0,0006	0,8902 ± 0,0002	0,9902 ± 0,0004
50%	0,5321 ± 0,0011	0,8765 ± 0,0014	0,9862 ± 0,0002
62,5%	0,4703 ± 0,0007	0,8434 ± 0,0003	0,9521 ± 0,0003
75%	0,3987 ± 0,0010	0,7777 ± 0,0008	0,8904 ± 0,0002
87,5%	0,3467 ± 0,0006	0,6244 ± 0,0012	0,7586 ± 0,0004
100%	0,1705 ± 0,0005	0,3710 ± 0,0009	0,5719 ± 0,0008

Baseado nos dados apresentados pela Tabela 4.1, pode-se sugerir que os ânions têm uma grande influência sobre a interação LI-ÁGUA. Para todas as frações volumétricas, os menores valores de  $a_w$  são encontrados para BMI.BF<sub>4</sub>, enquanto os valores mais elevados são exibidos por BMI.NTf<sub>2</sub>. As medidas de  $a_w$  para os LIs sem adição de água, nomeadamente, 100% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ), são corroboradas por um estudo prévio, no qual foram encontrados valores de 0,17 e 0,30 para BMI.BF<sub>4</sub> e BMI.PF<sub>6</sub>, respectivamente (Basso *et al.*, 2005). Como esperado, a redução da fração volumétrica de LI implica em valores mais elevados de  $a_w$ . Sabe-se que  $a_w$  depende de interações específicas entre o solvente e as moléculas de água, ou seja,  $a_w$  é maior para um solvente que contém um grupo mais hidrofóbico (Ebert *et al.*, 1996; 1998). Em outras palavras, estas interações são favorecidas em solventes hidrofílicos, resultando em menores valores de  $a_w$ .

A miscibilidade de LIs em água varia amplamente e de forma não sistemática, uma vez que BMI.BF<sub>4</sub> é miscível em água, mas BMI.PF<sub>6</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub>, os quais têm polaridade semelhante à do BMI.BF<sub>4</sub>, são apenas parcialmente miscíveis em água (van Rantwijk *et al.*, 2003). Solventes com polaridades semelhantes podem ter valores muito diferentes de miscibilidade em água. Buscando um melhor entendimento a respeito destas informações, a Tabela 4.2 apresenta alguns valores de polaridade destes LIs que foram obtidos com o corante de Reichardt ( $E_T^N$ ) a 25 °C e, em adição, o conteúdo de água destes LIs equilibrados a 25 °C em água, ambos reportados na literatura (Huddleston *et al.*, 2001; Reichardt, 2005).

**Tabela 4.2.** Valores de polaridade dos LIs obtidos com o corante de Reichardt ( $E_T^N$ ) a 25 °C (Reichardt, 2005) e conteúdo de água dos LIs equilibrados a 25 °C em água (Huddleston *et al.*, 2001).

LÍQUIDO IÔNICO	$E_T^N$ [*]	ÁGUA EQUILIBRADA [**]
BMI.BF <sub>4</sub>	0,673	Miscível
BMI.PF <sub>6</sub>	0,667	11700 ppm
BMI.NTf <sub>2</sub>	0,642	3280 ppm

Fontes: [\*] Reichardt, 2005; [\*\*] Huddleston *et al.*, 2001.

Embora LIs sejam considerados como materiais “nano-estruturados”, apresentando regiões polares e não polares, a sua polaridade pode ser considerada como semelhante à de alcoóis de cadeia curta, por exemplo, metanol (Schröder *et al.*, 2000; Muldoon *et al.*, 2001). Entretanto, é muito importante fazer uma distinção entre os conceitos de hidrofobicidade e polaridade, porque o primeiro é relacionado à miscibilidade em água, isto é, hidrofobicidade pode ser considerada como um conceito mais limitado de polaridade (Zhao, 2010). As informações bibliográficas e as que foram experimentalmente obtidas neste trabalho, além de todas as observações descritas anteriormente, endossam que a identidade do ânion que compõe o LI exerce uma grande influência sobre as interações que ocorrem entre a água e as moléculas de LI.

Segundo Reichardt (2005), a escala de polaridade de solvente pode ser facilmente interpretada pela seguinte relação: valores mais elevados de  $E_T^N$  correspondem a um solvente com polaridade mais elevada. Além do mais, os parâmetros solvatocrômicos fornecem um procedimento simples para a determinação da polaridade de um solvente (Kaar *et al.*, 2003). É interessante citar que ao realizar uma comparação entre os valores de  $a_w$ , apresentados na Tabela 4.1, com as informações que foram expostas na Tabela 4.2, pode se observar que a ordem de miscibilidade em água, ou seja, a ordem de hidrofiliicidade,  $BMI.BF_4 > BMI.PF_6 > BMI.NTf_2$ , seguiu a mesma ordem de polaridade destes LIs. Estas observações explicam os valores de  $a_w$  que foram encontrados no presente trabalho.

A escala de polaridade empírica ( $E_T^N$ ) é fundamentada no deslocamento da banda de absorção de transferência de carga de uma sonda solvatocrômica na presença de um solvente. Modificações na posição da banda de absorção de transferência de carga dentro do espectro visível são devidas às ligações de hidrogênio entre o solvente e o átomo de oxigênio fenóxido presente no corante de Reichardt (Reichardt, 2005). Um valor de  $E_T^N$  é, então, determinado como uma função da posição da banda de absorção de transferência de carga (Muldoon *et al.*, 2001; Kaar *et al.*, 2003; Reichardt, 2005). Valores de  $E_T^N$  para LIs são dependentes da força de ligação de hidrogênio entre o cátion que faz parte da composição do LI e o grupo fenóxido presente no corante de Reichardt (Muldoon *et al.*, 2001). Além disso, valores de  $E_T^N$  mais elevados indicam que LIs exibem fortes forças de ligação de hidrogênio e, os solventes que demonstram a habilidade para ligações de hidrogênio apresentam o potencial de interferir com a estrutura enzimática (Kaar *et al.*, 2003; Lopes & Pádua, 2006).

A Tabela 4.3 apresenta os dados experimentais de viscosidade para estes LIs, obtidos a 25 °C, juntamente com os dados relatados na literatura (Huddleston *et al.*, 2001). Pode ser observado que a ordem de viscosidade encontrada no presente trabalho é coincidente com a ordem de viscosidade descrita na literatura, BMI.PF<sub>6</sub> > BMI.BF<sub>4</sub> > BMI.NTf<sub>2</sub>. A diferença de magnitude pode ser devida ao fato de as medidas aqui realizadas não terem sido conduzidas com os LIs completamente secos, como é o caso do estudo reportado. Adicionalmente, a simetria mais elevada dos ânions inorgânicos (PF<sub>6</sub> e BF<sub>4</sub>) em comparação ao ânion orgânico (NTf<sub>2</sub>) pode desempenhar um papel importante, ou seja, a geometria e a massa molar dos ânions exibem uma forte influência sobre a viscosidade desta classe de LIs, uma vez que o cátion BMI combinado com um dos ânions, PF<sub>6</sub> ou NTf<sub>2</sub>, produz LIs com viscosidades significativamente diferentes (Huddleston *et al.*, 2001). As diferenças de viscosidade são uma das explicações para o recente desenvolvimento de LIs baseados em NTf<sub>2</sub>, os quais são menos viscosos em comparação com LIs contendo outros ânions (Jacquemin *et al.*, 2006).

**Tabela 4.3.** Viscosidades experimentais ( $\eta$ ) dos LIs obtidas a 25 °C e dados reportados na literatura para os LIs completamente secos na mesma temperatura (Huddleston *et al.*, 2001).

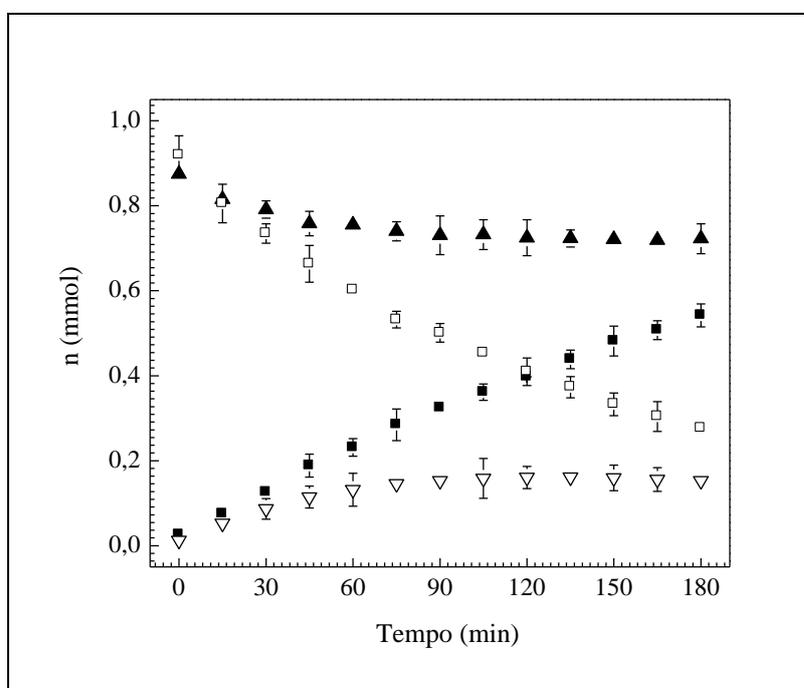
LÍQUIDO IÔNICO	$\eta$ (cP)	$\eta$ (cP) <sup>[*]</sup>
BMI.BF <sub>4</sub>	91	219
BMI.PF <sub>6</sub>	234	450
BMI.NTf <sub>2</sub>	44	69

Fonte: <sup>[\*]</sup> Huddleston *et al.*, 2001.

LIs são fluidos mais viscosos do que os solventes orgânicos convencionalmente aplicados em bioprocessos (Wasserscheid & Welton, 2002). Apesar disso, a viscosidade mais elevada dos LIs pode ser vantajosa ao desacelerar as mudanças conformacionais das proteínas, permitindo que as enzimas mantenham suas estruturas nativas e, portanto, sua atividade (van Rantwijk & Sheldon, 2007). Em adição, nos processos de produção industrial,

a maioria das enzimas são imobilizadas/estabilizadas não só para facilitar o manuseio como também para melhorar a sua estabilidade operacional. Desta forma, estas partículas de catalisador heterogêneas estão sujeitas a limitações de transferência de massa, as quais são fortemente influenciadas pela viscosidade do meio de reação (Kragl *et al.*, 2002).

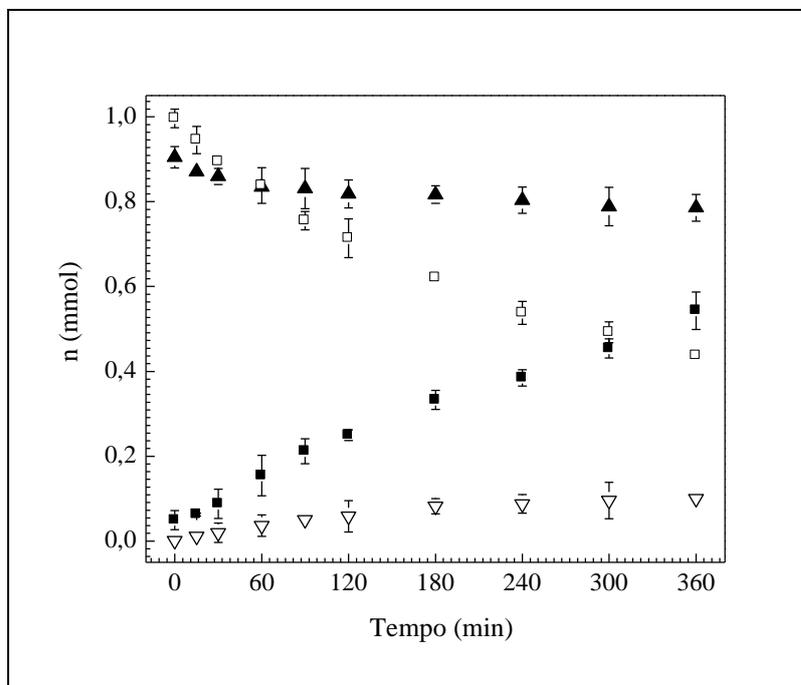
Uma questão importante que deve ser considerada em uma pesquisa que envolve solventes inovadores, como é o caso da utilização de LIs para a síntese enzimática de amoxicilina, é a reprodutibilidade experimental que pode ser alcançada. Para ilustrar a reprodutibilidade, a Figura 4.12 apresenta a evolução da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em meio totalmente aquoso, catalisada por PGA-SEPABEADS.



**Figura 4.12.** Síntese de amoxicilina em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. Neste gráfico, os símbolos representam: (□) EMPOHFG, (▲) 6-APA, (■) POHFG e (▽) amoxicilina.

Do mesmo modo, as Figuras 4.13, 4.14 e 4.15 mostram algumas das reações conduzidas na presença de LIs como cossolventes. Estes ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5 e em diferentes concentrações de cada um dos LIs. De acordo com os gráficos, pode-se notar que o desvio padrão (representado pelas barras de erros e estimado a partir de triplicatas) foi pequeno e, em todos os casos, menor do que 5%. É

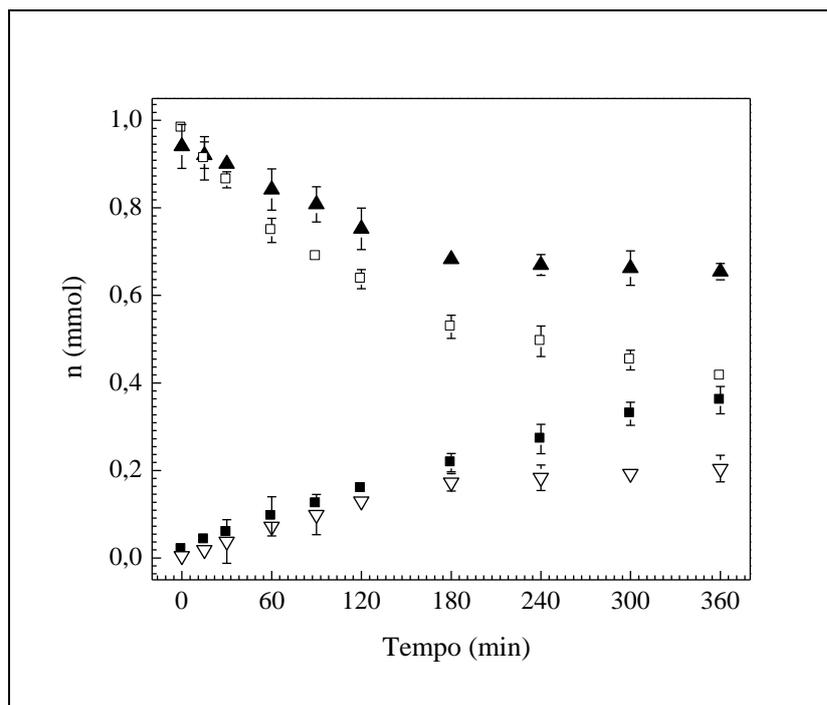
importante citar que cálculos de balanço de massa foram efetuados para todas as reações executadas no presente estudo, apresentando desvios menores do que 5%.



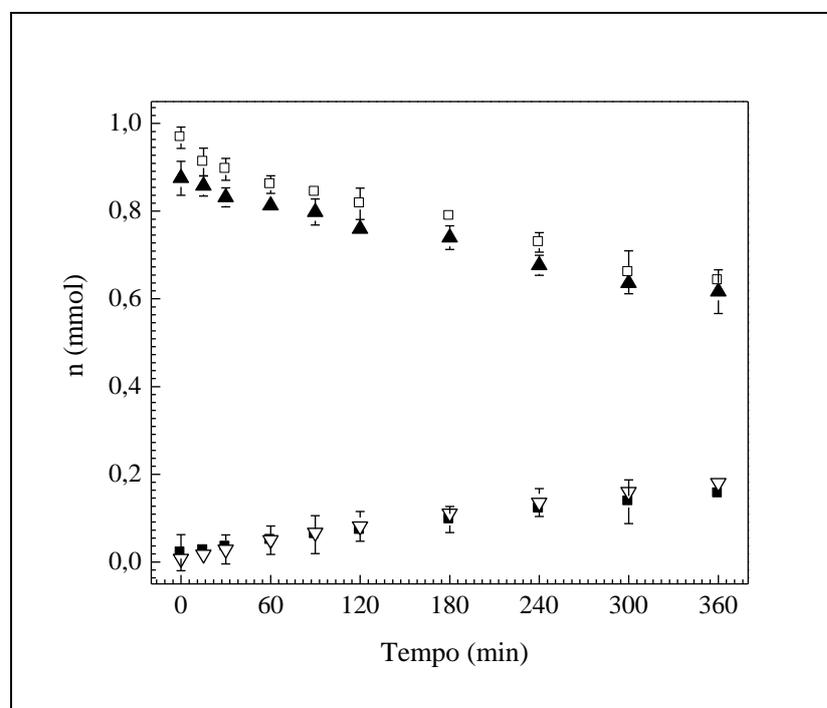
**Figura 4.13.** Síntese de amoxicilina em 25% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.BF<sub>4</sub>. Neste gráfico, os símbolos representam: (□) EMPOHFG, (▲) 6-APA, (■) POHFG e (▽) amoxicilina.

A estequiometria do conjunto de reações mostradas na Figura 4.1 fornece dois graus de liberdade para o sistema, de modo que, a conversão de 6-APA e a seletividade foram os índices escolhidos para avaliar o desempenho da síntese enzimática de amoxicilina. Deve ser lembrado que as condições experimentais foram iguais tanto para as reações realizadas em tampão fosfato sem a presença de nenhum LI, especificamente, 0% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ), quanto para as reações que usam LIs como cossolventes. As relações volumétricas de LI/ÁGUA variaram de 12,5 a 87,5% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ). Além destes, também foram conduzidos ensaios na presença de LI não misturado com água, designadamente, 100% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ).

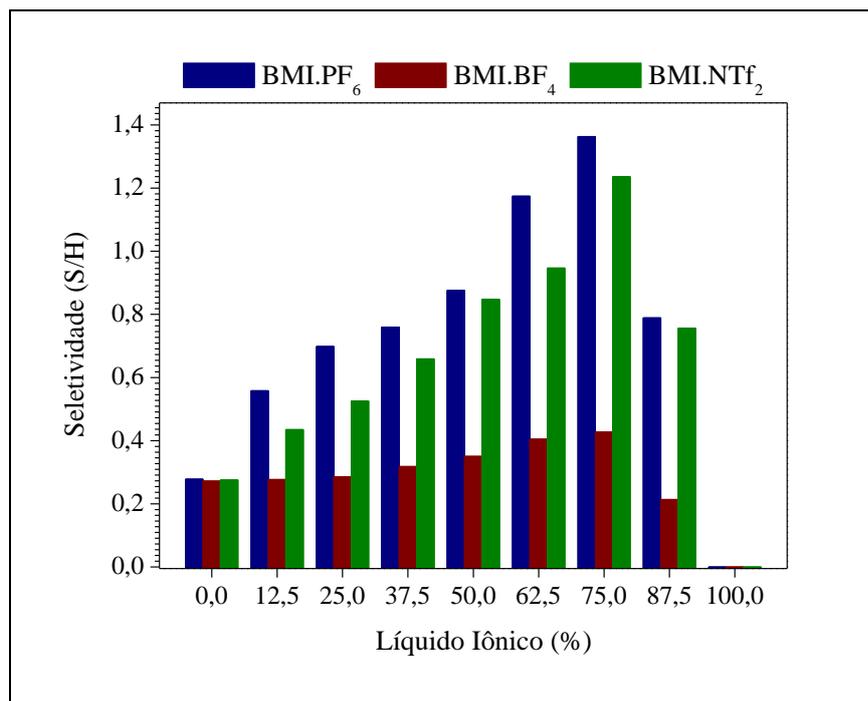
A Figura 4.16 apresenta uma comparação, em termos de seletividade, de todos os experimentos que foram realizados no presente estudo. Observa-se que as reações realizadas com BMI.BF<sub>4</sub> como cossolvente mostraram apenas um ligeiro aumento da seletividade em relação à reação padrão, 0% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ). Em contrapartida, as reações que foram conduzidas com BMI.PF<sub>6</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub> apresentaram um aumento significativo de seletividade.



**Figura 4.14.** Síntese de amoxicilina em 50% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.NTf<sub>2</sub>. Neste gráfico, os símbolos representam: (□) EMPOHFG, (▲) 6-APA, (■) POHFG e (▼) amoxicilina.



**Figura 4.15.** Síntese de amoxicilina em 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.PF<sub>6</sub>. Neste gráfico, os símbolos representam: (□) EMPOHFG, (▲) 6-APA, (■) POHFG e (▼) amoxicilina.



**Figura 4.16.** Seletividade após 180 minutos de reação. Síntese de amoxicilina em pH 6,5 a 25 °C. Concentrações iniciais: EMPOHFG 50 mM, 6-APA 50 mM e 0,2 g de 260 UI/g de biocatalisador.

É interessante notar que os perfis de seletividade foram similares para todos os LIs, diferindo apenas em magnitude. Em outras palavras, a seletividade aumentou com o aumento da concentração de LI até alcançar um valor de máximo, precisamente em 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de LI, como pode ser nitidamente constatado na Figura 4.16. Em concentrações mais elevadas de qualquer um dos LIs, ocorreu uma diminuição da seletividade.

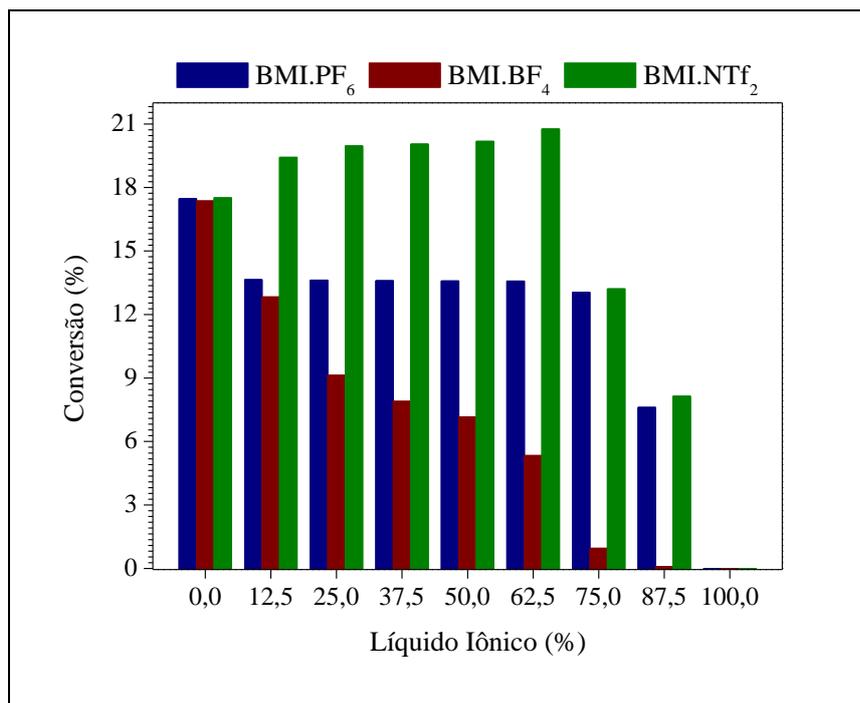
Deve ser sublinhado que reatores operando no modo batelada alimentada seriam, certamente, a melhor solução operacional para o processo industrial de síntese enzimática de amoxicilina, no qual o antibiótico seria precipitado durante a operação, o que impediria a ação amidase da PGA sobre o mesmo, enquanto os substratos poderiam ser continuamente alimentados ao reator à medida que fossem sendo consumidos para a síntese do antibiótico (Ferreira *et al.* 2007). Conseqüentemente, uma seletividade mais elevada do que as que foram encontradas neste trabalho pode ser alcançada. Todas as reações apresentadas neste estudo foram executadas em um reator batelada, exclusivamente para padronizar o procedimento, a fim de comparar os diferentes sistemas utilizando a mesma base. Como mencionado anteriormente, as reações hidrolíticas laterais representam o principal obstáculo à prática

industrial da síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas (Gabor *et al.*, 2005). Deste modo, a maximização da seletividade seria um ponto importante para a viabilidade econômica do processo enzimático (Ribeiro *et al.*, 2005). A Figura 4.16 sugere que com o aumento da concentração do LI e, portanto, com a redução de  $a_w$  no meio de reação, é possível reduzir parcialmente estas reações laterais de hidrólise indesejáveis. Neste contexto, os resultados de seletividade encontrados neste trabalho para as reações realizadas na presença de BMI.PF<sub>6</sub> e de BMI.NTf<sub>2</sub> são promissores.

Um aspecto interessante que merece ser destacado é a comparação das seletividades que foram obtidas a partir das reações conduzidas na presença de BMI.PF<sub>6</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub> com as medidas de  $a_w$  para estes sistemas. A análise dos dados da Tabela 4.1 mostra que todos os valores de  $a_w$  foram maiores para as misturas compostas por BMI.NTf<sub>2</sub>. Adicionalmente, BMI.NTf<sub>2</sub> é mais hidrofóbico do que BMI.PF<sub>6</sub>, como pode ser observado pela Tabela 4.2. Isto significa que as reações que foram realizadas com BMI.NTf<sub>2</sub> como cossolvente tinham mais água no meio reacional disponível para a enzima, o que resultou em maior taxa de hidrólise, ou seja, menores seletividades, como podem ser claramente constatadas pela Figura 4.16.

Por outro lado, BMI.BF<sub>4</sub>, o LI mais hidrofílico dentre os empregados para a síntese enzimática de amoxicilina, apresenta os valores mais baixos para a seletividade, como mostra a Figura 4.16. A elevada quantidade de água miscível neste LI, neste caso, não inviabilizaram as reações hidrolíticas, tal como foi observado para o BMI.PF<sub>6</sub>, mostrando mais uma vez que os fenômenos envolvidos nas interações enzima-LI-substratos (incluindo a água) são muito complexos e interconectados (Schröder *et al.*, 2000; Lopes & Pádua, 2006). Assim, a seleção do solvente ideal não pode ser fundamentada apenas nas suas propriedades físico-químicas, isto é, ensaios cinéticos são essenciais para esta avaliação.

A conversão é outra variável importante na avaliação do desempenho do processo enzimático. A Figura 4.17 apresenta uma comparação, em termos da conversão de 6-APA, de todos os ensaios que foram realizados neste trabalho. Segundo o gráfico, a conversão diminuiu acentuadamente nas reações com BMI.BF<sub>4</sub> como cossolvente, em comparação com a reação padrão. As reações em BMI.PF<sub>6</sub> também mostraram uma diminuição da conversão com o aumento da concentração do LI, porém, de uma forma muito menos pronunciada. Os ensaios realizados na presença de BMI.NTf<sub>2</sub> apresentaram um aumento gradativo da conversão até atingir um máximo na concentração de 62,5% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de LI e, para frações volumétricas superiores, houve uma diminuição na conversão de 6-APA.



**Figura 4.17.** Conversão de 6-APA após 180 minutos de reação. Síntese de amoxicilina em pH 6,5 a 25 °C. Concentrações iniciais: EMPOHFG 50 mM, 6-APA 50 mM e 0,2 g de 260 UI/g de biocatalisador.

É relevante ressaltar que para LIs puros, 100% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ), não ocorreram reações em níveis que pudessem ser detectados. Na Figura 4.17, pode ser observado o aparecimento de um “inesperado” patamar na faixa de concentrações que vai de 12,5 a 62,5% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) para os LIs mais hidrofóbicos, BMI.PF<sub>6</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub>. Uma comparação entre os perfis de conversão, apresentados na Figura 4.17, e os valores de  $a_w$  mostrados na Tabela 4.1, contudo, indicam que os valores  $a_w$  não mudaram significativamente no intervalo de 12,5 a 62,5% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ), isto é, a hidratação da enzima nesta região de composições foi suficiente para preservar quase inalterada a atividade enzimática, para BMI.PF<sub>6</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub>.

PGA-SEPABEADS, o biocatalisador empregado neste trabalho, é um derivado de enzima altamente estável, capaz de suportar condições de reações adversas (Mateo *et al.*, 2002). Estes suportes são robustos e adequados para fins industriais, com uma densidade de superfície muito elevada de grupos epóxi, permitindo uma intensa interação enzima-suporte (Mateo *et al.*, 2007). Adicionalmente, neste trabalho, a atividade enzimática da PGA foi medida antes e depois de cada reação de síntese enzimática de amoxicilina e, em todos os casos, nenhuma desativação foi observada. Mesmo quando nenhuma atividade catalítica de

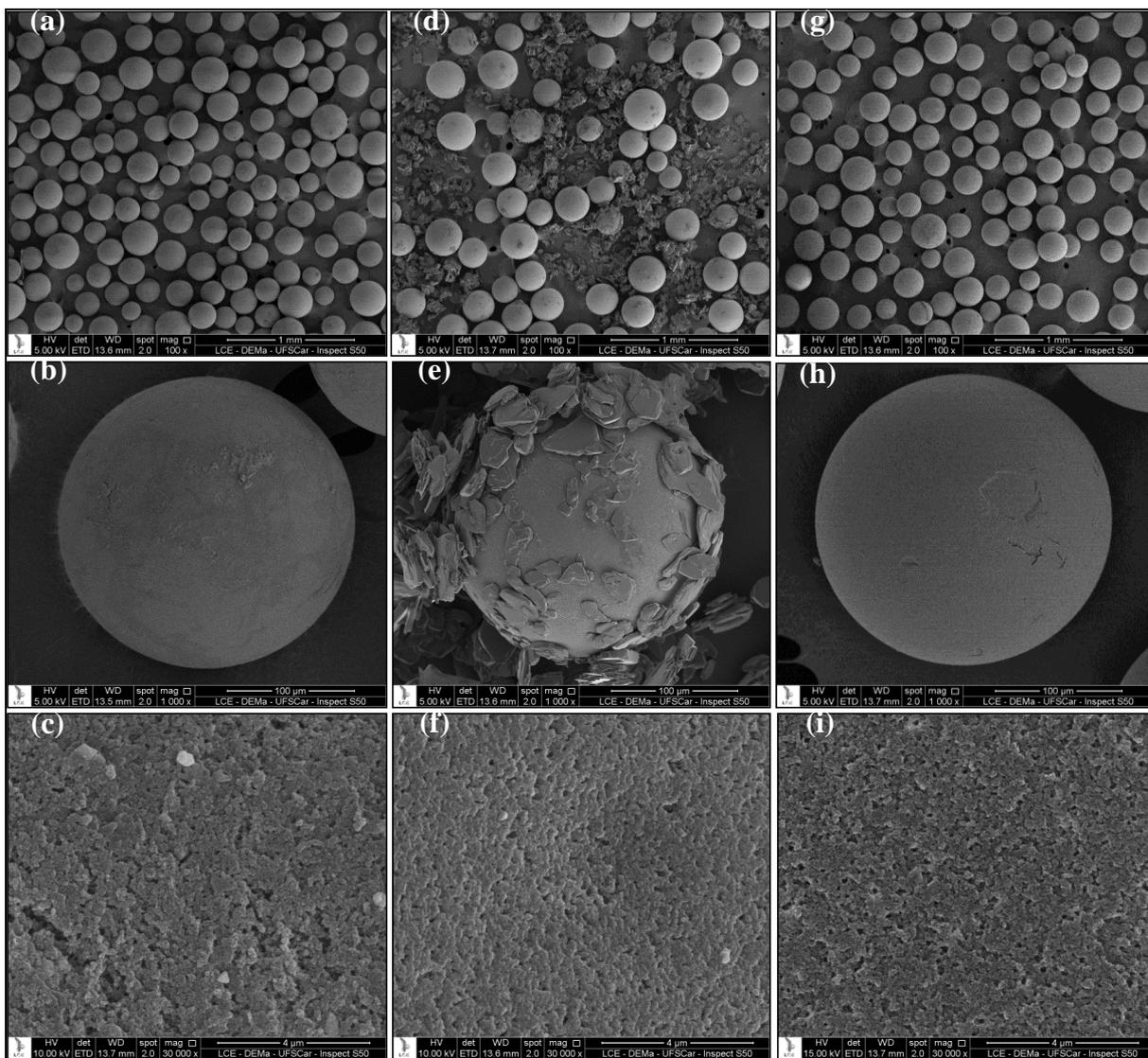
PGA-SEPABEADS foi notada durante o ensaio cinético, após uma lavagem cuidadosa do biocatalisador esta atividade foi totalmente restaurada.

A fim de garantir que as partículas de PGA-SEPABEADS não foram estruturalmente afetadas pela presença de LIs no meio reacional, análise de imagens foram realizadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para esta finalidade, as partículas do biocatalisador foram igualmente lavadas e secas a vácuo para realizar a posterior fixação e recobrimento com ouro. A Figura 4.18 mostra as fotomicrografias do derivado enzimático antes de ser utilizado nas reações (Figura 4.18 a, b, c) e depois de ter sido empregado na síntese enzimática de amoxicilina com a presença de LI como cossolvente, sem ter sido previamente lavado (Figura 4.18 d, e, f) e após ter sido cuidadosamente lavado (Figura 4.18 g, h, i). Este conjunto de fotomicrografias demonstra que a integridade das partículas de PGA-SEPABEADS foi perfeitamente preservada.

A viscosidade dos LIs também é um fator que interfere na atividade observada da enzima, principalmente porque enzimas imobilizadas foram utilizadas, ou seja, o processo está sujeito a resistências de transferência de massa, tanto no filme externo quanto nos poros das partículas (Moniruzzaman *et al.*, 2010). A Tabela 4.3 mostrou que a ordem de viscosidades foi  $BMI.PF_6 > BMI.BF_4 > BMI.NTf_2$ . Esta mesma ordem de viscosidades foi anteriormente reportada na literatura, contudo, as viscosidades para os LIs completamente secos foram maiores do que os valores aqui encontrados, demonstrando que a presença de água tem um efeito importante sobre a viscosidade destes meios iônicos (Huddleston *et al.*, 2001). Portanto, a menor resistência de transferência de massa pode ter contribuído para uma conversão mais elevada em  $BMI.NTf_2$  do que em  $BMI.PF_6$ . Por outro lado, até 62,5% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de  $BMI.NTf_2$ , a conversão foi maior do que em meio totalmente aquoso, como pode ser visto pela Figura 4.17. Este é um exemplo da complexidade destes fenômenos.

Ao contrário dos outros LIs, ocorre uma redução sistemática da conversão de 6-APA com o aumento da fração volumétrica de  $BMI.BF_4$  (Figura 4.17). Neste caso, mais do que a viscosidade de  $BMI.BF_4$ , é sua miscibilidade em água e polaridade que contribuem de forma decisiva para estes resultados, porque estes últimos afetam diretamente  $a_w$ . Sabe-se que certos solventes têm uma tendência para remover água das proximidades da enzima, levando a uma hidratação insuficiente e, portanto, a uma diminuição na atividade enzimática (Zaks & Klivanov, 1988; Halling, 1994). A extensão deste fenômeno é mais elevada para os solventes

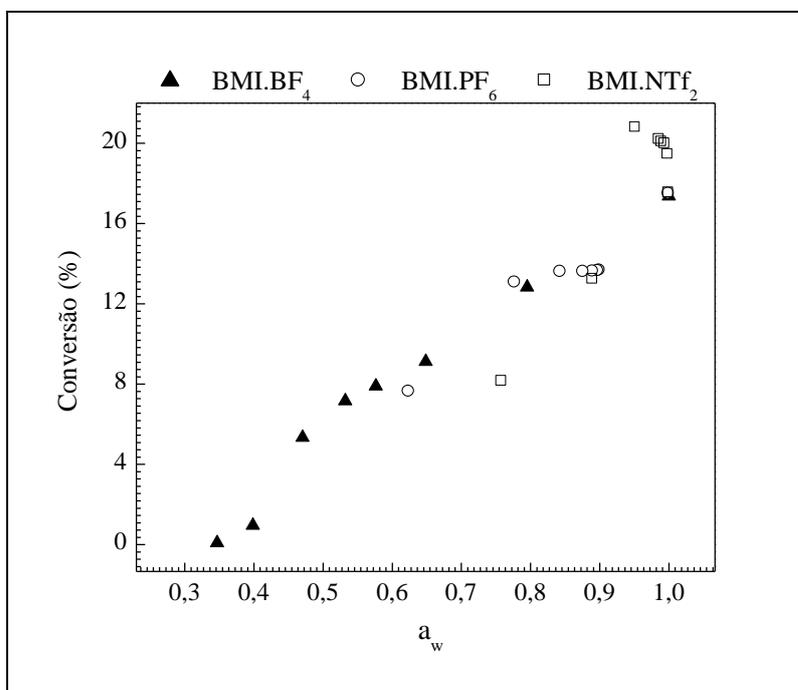
hidrofílicos e, por esta razão, solventes hidrofóbicos geralmente apresentam um melhor desempenho nas reações enzimáticas (Bell *et al.*, 1995).



**Figura 4.18.** Fotomicrografias do derivado enzimático utilizado neste trabalho, PGA-SEPABEADS: (a), (b) e (c) MEV das partículas do biocatalisador antes de ser empregado para a reação na presença de líquido iônico, (d), (e) e (f) MEV após a reação em líquido iônico sem lavar as partículas do biocatalisador, (g), (h) e (i) MEV após a reação em líquido iônico com lavagem prévia das partículas do biocatalisador.

A grande maioria dos processos enzimáticos utilizando LIs reportados na literatura envolvem reações catalisadas por lipases (Lau *et al.*, 2000; Gamba *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2009; Hernández-Fernández *et al.*, 2010). Poucas informações são encontradas sobre as

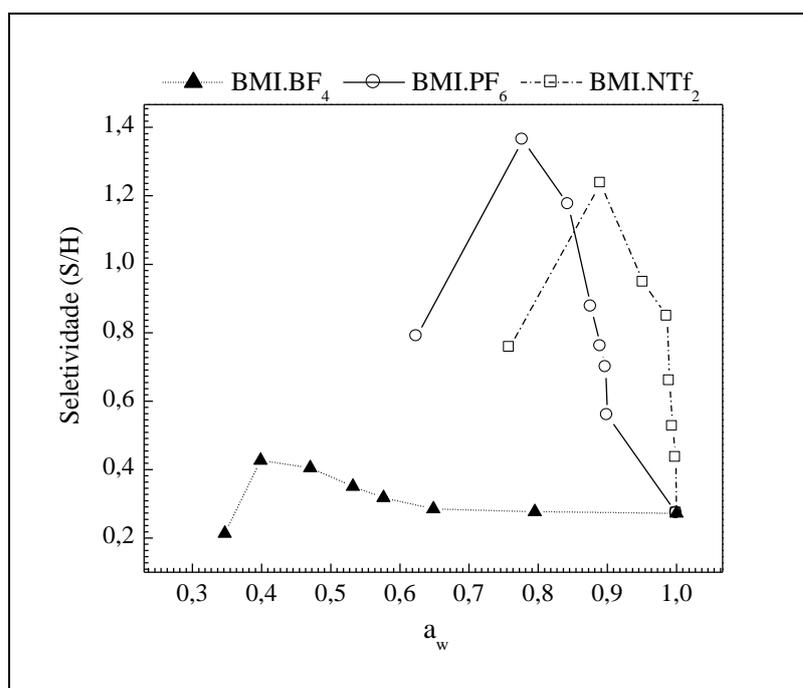
reações que são catalisadas pela PGA. Entre elas, um estudo reportou que  $a_w$  deve ser próximo de 0,8 para garantir a atividade enzimática da PGA em BMI.PF<sub>6</sub> e em BMI.BF<sub>4</sub> (Basso *et. al.*, 2005). As Figuras 4.19 e 4.20 fazem um entrecruzamento das informações que foram fornecidas pela Tabela 4.1 com as observadas nas Figuras 4.16 e 4.17. A Figura 4.19 mostra que há um aumento moderado de atividade enzimática com BMI.NTf<sub>2</sub> para o intervalo  $0,95 < a_w < 1,00$ . Os outros LIs exibiram um comportamento monotônico, com a conversão diminuindo sistematicamente com  $a_w$ , e os três LIs apresentaram uma sensível redução de atividade enzimática para  $a_w < 0,8$ . A Figura 4.20, por sua vez, indica que a seletividade em direção à síntese passa por um máximo quando  $a_w$  é reduzida, para todos os três sistemas que foram avaliados neste trabalho.



**Figura 4.19.** Conversão de 6-APA (%) após 180 minutos de reação para diferentes valores de  $a_w$ . Síntese de amoxicilina em pH 6,5 a 25 °C. Concentrações iniciais: EMPOHFG 50 mM, 6-APA 50 mM e 0,2 g de 260 UI/g de biocatalisador. Nos gráficos: (▲) BMI.BF<sub>4</sub>, (○) BMI.PF<sub>6</sub> e (□) BMI.NTf<sub>2</sub>.

Em outros estudos anteriormente reportados, a estabilidade de PGA de *E. coli* na sua forma nativa na presença de LIs a 40 °C foi avaliada, reportando-se que o tempo de meia-vida nestes LIs seguiu a ordem: BMI.NTf<sub>2</sub> > BMI.PF<sub>6</sub> > BMI.BF<sub>4</sub> (de los Ríos *et. al.*, 2007). Estes resultados foram corroborados mais tarde por Hernández-Fernández *et. al.* (2009). Além

disso, não foi observada qualquer atividade para PGA na presença de várias concentrações de BMI.BF<sub>4</sub> (v/v) na hidrólise de penicilina G, enquanto que os resultados foram bastante promissores em BMI.PF<sub>6</sub>, com PGA mostrando uma estabilidade maior do que em meio aquoso na temperatura de 10 °C (Zhang *et. al.*, 2006).



**Figura 4.20.** Seletividade (síntese/hidrólise, relação S/H) após 180 minutos de reação para diferentes valores de  $a_w$ . Síntese de amoxicilina em pH 6,5 a 25 °C. Concentrações iniciais: EMPOHFG 50 mM, 6-APA 50 mM e 0,2 g de 260 UI/g de biocatalisador. Nos gráficos: (▲) BMI.BF<sub>4</sub>, (○) BMI.PF<sub>6</sub> e (□) BMI.NTf<sub>2</sub>.

Os resultados encontrados para seletividade e conversão de 6-APA indicam que BMI.BF<sub>4</sub> não parece ser um solvente adequado para se realizar a síntese enzimática de amoxicilina, uma vez que não resulta em um aumento significativo na seletividade e, ainda, promove uma queda muito acentuada na conversão, em relação ao sistema aquoso. Os solventes mais promissores foram BMI.PF<sub>6</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub>, os quais apresentaram um acréscimo muito significativo na seletividade, atingindo um valor 400% maior em 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.PF<sub>6</sub> do que no meio totalmente aquoso, enquanto BMI.NTf<sub>2</sub> proporcionou um aumento de mais de 350% na seletividade para esta mesma fração volumétrica. Além disso, BMI.NTf<sub>2</sub> apresentou os melhores resultados em termos de conversão do que BMI.PF<sub>6</sub> na faixa de concentrações de 12,5 a 62,5% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ). Um aumento da seletividade reflete uma

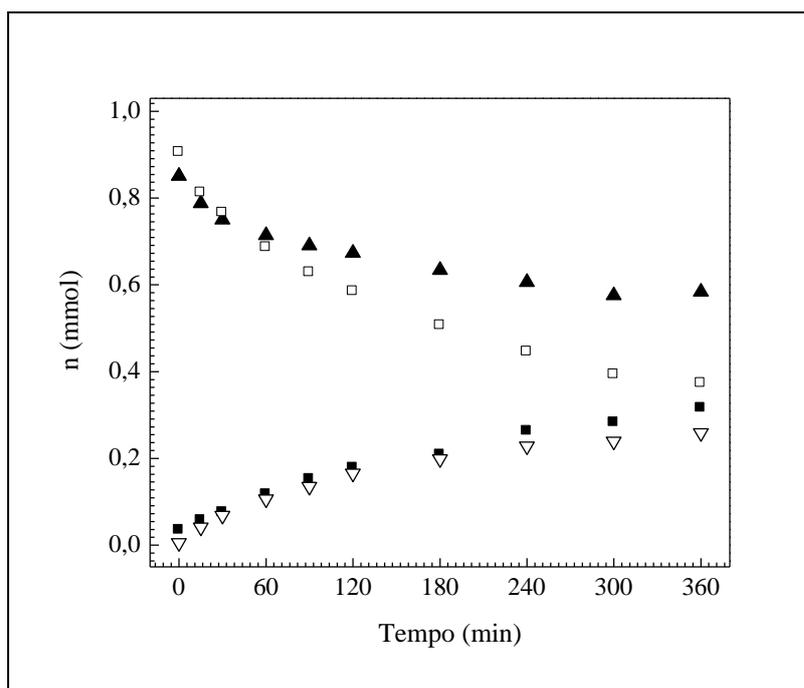
diminuição das reações hidrolíticas laterais indesejáveis. Assim, uma quantidade menor de subproduto será formada, isto é, o custo para recuperar POHFG e realizar a subsequente síntese do substrato EMPOHFG será menor. Do mesmo modo, uma maior conversão do núcleo  $\beta$ -lactâmico (6-APA) representa um custo mais baixo para reciclá-lo. Neste ponto, a comparação entre as concentrações de 62,5 e 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.NTf<sub>2</sub> mostra um decréscimo de 36% na conversão e um aumento de 30% na seletividade. A escolha entre 62,5 ou 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.NTf<sub>2</sub> dependerá de uma análise mais detalhada a respeito do custo deste processo enzimático.

O LI que apresentou as melhores características para utilização na síntese enzimática de amoxicilina foi BMI.NTf<sub>2</sub>, o qual é o menos viscoso dentre os LIs que foram empregados nestas reações, e não possui a tendência de remover água das proximidades da enzima, uma vez que é o mais hidrofóbico deles, sem, contudo, ser responsável por qualquer deformação notável da estrutura da enzima, preservando a integridade do sítio ativo. Portanto, um estudo no intervalo de 62,5 a 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.NTf<sub>2</sub> foi conduzido para determinar o limite de concentração que não reduziria a conversão de 6-APA e ainda preservaria a seletividade do processo. A Figura 4.21 mostra a evolução da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina na presença de 71% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.NTf<sub>2</sub>, resultando em um aumento de 36% na conversão em relação à reação padrão, 0% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ), e um acréscimo de mais de 300 % na seletividade.

As reações realizadas em BMI.PF<sub>6</sub> apresentaram os maiores valores de seletividade, mas este aumento foi obtido em detrimento da conversão. Uma explicação provável para a redução da conversão em reações realizadas na presença de BMI.PF<sub>6</sub> poderia ser a elevada viscosidade deste solvente, o que acarretou uma diminuição das taxas aparentes de reação. A viscosidade de BMI.PF<sub>6</sub> poderia ser reduzida pelo aumento da temperatura reacional ou por adição de algum solvente orgânico que não prejudique a estabilidade de PGA, porém, estas estratégias estão além do propósito deste estudo. É importante ressaltar que em determinadas condições, o contato de BMI.PF<sub>6</sub> com uma fase aquosa pode acarretar em uma hidrólise do ânion PF<sub>6</sub> gerando HF (Peletier *et. al.*, 1990; Dupont *et. al.*, 2001; Carda-Broch *et al.*, 2003).

Por fim, pode-se acrescentar que EEPOHFG também poderia ter sido empregado nesta investigação da viabilidade de utilização de LIs como meios de reação para a síntese enzimática de amoxicilina, o que reduziria ainda mais o impacto ambiental deste processo

enzimático. Este substrato foi empregado com sucesso na produção de amoxicilina em meio totalmente aquoso, entretanto, uma vez que o éster metílico é o substrato padrão encontrado na literatura, empregado para a síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas sob a rota de controle cinético, ele foi escolhido e utilizado neste trabalho, simplesmente, para finalidade de comparação.



**Figura 4.21.** Síntese de amoxicilina em pH 6,5 a 25 °C. Concentrações iniciais: EMPOHFG 50 mM, 6-APA 50 mM e 0,2 g de 260 UI/g de biocatalisador, em 71% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) de BMI.NTf<sub>2</sub>. Neste gráfico, os símbolos representam: (□) EMPOHFG, (▲) 6-APA, (■) POHFG e (▼) amoxicilina.

#### 4.4. Conclusões

A viabilidade de aplicação de LIs como potenciais meios de reação para realizar a síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina foi avaliada por meio dos índices de seletividade e conversão. Inicialmente, investigou-se a estabilidade de PGA-SEPABEADS na presença de BMI.PF<sub>6</sub>. Os resultados mostraram que este derivado enzimático manteve-se totalmente estável durante os 6 dias de incubação a 25 °C, seguindo o mesmo comportamento apresentado em meio aquoso.

Em seguida, realizou-se uma pesquisa da estabilidade dos substratos envolvidos na reação de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina a 25 °C na presença de uma variedade de LIs, incluindo os apróticos e próticos. Os resultados apontaram que tanto o EMPOHFG quanto o 6-APA foram completamente estáveis na presença de LIs apróticos (BMI.PF<sub>6</sub>, BMI.BF<sub>4</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub>). Contrariamente, nenhum dos LIs próticos avaliados se apresentaram inertes em relação a estes substratos, inviabilizando sua utilização para este processo enzimático.

A investigação da produção de amoxicilina avançou com os LIs apróticos. Observou-se que a natureza do ânion que faz parte da constituição de cada LI teve grande influência sobre a interação LI-ÁGUA. Os menores valores de  $a_w$  foram encontrados para os sistemas compostos por BMI.BF<sub>4</sub>, enquanto os mais altos foram observados para as misturas formadas por BMI.NTf<sub>2</sub>, seguido por BMI.PF<sub>6</sub>. Esta propriedade termodinâmica exerce uma influência direta sobre a seletividade destas reações. De acordo com os resultados, a seletividade foi expressivamente maior na presença de LIs.

Outra propriedade que afetou significativamente o desempenho das reações foi a viscosidade. As reações de síntese enzimática de amoxicilina conduzidas na presença dos LIs mais viscosos, BMI.PF<sub>6</sub> ou BMI.BF<sub>4</sub>, apresentaram valores de conversões de 6-APA menores do que aqueles encontrados nas reações em meio totalmente aquoso (tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5). Em contrapartida, as conversões de 6-APA foram expressivamente maiores para as reações realizadas na presença do LI menos viscoso dentre os que foram estudados, BMI.NTf<sub>2</sub>, do que para a reação padrão aquosa.

O biocatalisador que foi empregado para a realização destas reações enzimáticas, PGA-SEPABEADS, não sofreu qualquer desativação detectável durante o processo de síntese de amoxicilina. Além disso, a análise de imagens por MEV demonstrou que a integridade das partículas foi inteiramente conservada. Estes dados indicaram a viabilidade de reutilização do biocatalisador, o que leva a uma redução de custo do procedimento.

Os resultados encontrados neste trabalho abriram possibilidades promissoras para prosseguir na tentativa de fazer com que a síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas se torne industrialmente praticável. No entanto, mais pesquisas são claramente necessárias para explorar outras implicações que a utilização de LIs pode ocasionar para o processo.

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSÕES FINAIS

Considerando-se que atualmente há uma vertente cada vez mais direcionada para evitar ao máximo os impactos ambientais, esta tese de doutorado buscou contribuir para o avanço no estudo da síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos propondo a utilização de reagentes e solventes mais “verdes” para a realização destes processos com a finalidade de torná-los viáveis para a prática industrial.

Primeiramente, avaliou-se o uso de LIs como cossolventes para a síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina. Para tanto, realizou-se um estudo da estabilidade de PGA-SEPABEADS na presença de BMI.PF<sub>6</sub>, um dos LIs mais aplicados para bioprocessos. Os resultados demonstraram que PGA-SEPABEADS conservou integralmente sua atividade enzimática no decorrer das 144 horas do período de incubação conduzido a 25 °C.

Posteriormente, investigou-se a estabilidade dos substratos típicos para a reação de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina, observando-se que na presença de LIs apróticos, tanto o 6-APA quanto o EMPOHFG foram totalmente estáveis durante as 144 horas de exposição a 25 °C, ao contrário do que foi observado para todos os LIs próticos. Assim sendo, os LIs apróticos (BMI.PF<sub>6</sub>, BMI.BF<sub>4</sub> e BMI.NTf<sub>2</sub>) foram utilizados para avaliar a reação de produção enzimática de amoxicilina.

A utilização de LIs tem a função principal de maximizar a seletividade do processo, reduzindo as reações laterais de hidrólise indesejáveis. A propriedade termodinâmica  $a_w$  afeta diretamente esta relação. Por isso, determinaram-se os valores de  $a_w$  para todos os sistemas LI-ÁGUA. As maiores medidas de  $a_w$  foram obtidas para BMI.NTf<sub>2</sub>, seguido por BMI.PF<sub>6</sub>. Os menores valores de  $a_w$  foram encontrados para os sistemas formados por BMI.BF<sub>4</sub>.

Como a série de LIs apróticos investigada era baseada no mesmo cátion BMI, pode ser sugerido que a natureza do ânion exerce grande influência sobre a interação LI-ÁGUA. De acordo com os resultados obtidos, a seletividade foi significativamente maior para as reações conduzidas na presença de LIs apróticos do que para a reação padrão aquosa (tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5).

Um acréscimo de 400% na seletividade foi observado para as reações realizadas na presença de BMI.PF<sub>6</sub> como cossolvente na concentração de 75% ( $V_{LI}/V_{ÁGUA}$ ) em relação à reação efetuada em meio totalmente aquoso. Este número alcançou mais do que 350% para as reações conduzidas em BMI.NTf<sub>2</sub> na mesma fração volumétrica, enquanto para BMI.BF<sub>4</sub> houve apenas um ligeiro aumento na seletividade.

Segundo a ordem de viscosidade experimentalmente encontrada para a série de LIs apróticos pesquisada, BMI.PF<sub>6</sub> > BMI.BF<sub>4</sub> > BMI.NTf<sub>2</sub>, pode ser notado que a viscosidade desempenha um importante papel sobre o desempenho das reações, já que ao serem realizadas na presença do LI menos viscoso, BMI.NTf<sub>2</sub>, as conversões de 6-APA foram expressivamente mais elevadas do que na reação conduzida em meio completamente aquoso.

Para avaliar a estabilidade do biocatalisador durante a operação de síntese enzimática de amoxicilina, a atividade enzimática de PGA-SEPABEADS foi determinada antes e após cada reação. Os resultados mostraram que PGA-SEPABEADS manteve-se totalmente estável. Adicionalmente, analisou-se a integridade física das partículas do biocatalisador através da técnica de MEV, a qual foi inteiramente conservada.

Outra linha considerada nesta tese de doutorado foi o desenvolvimento de uma metodologia integrada “verde” para permitir o adequado reaproveitamento da POHFG, que é um subproduto da síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina conduzida em meio aquoso. Para tanto, utilizou-se o etanol como reagente para a esterificação da POHFG gerando o éster etílico, que é um insumo mais “verde”, uma vez que gera etanol como subproduto desta produção enzimática de amoxicilina.

A recuperação da POHFG a partir de uma mistura típica de cristais composta por POHFG e amoxicilina foi realizada com sucesso através de uma variação seletiva no pH com base na solubilidade de cada um destes compostos. Após as etapas de separação, obteve-se uma pureza final de 99% para a POHFG e 96% para a amoxicilina. O resíduo gerado ao final deste processo de purificação é o sal inofensivo e inerte NaCl.

A POHFG foi eficientemente reutilizada para a produção do EEPOHFG, alcançando uma conversão de 93%, que pôde ser apropriadamente identificado e caracterizado por meio das técnicas espectrométricas de IV, RMN 1H e EM. A integração do processo com a etapa de reciclagem da POHFG, na forma do substrato ativado EEPOHFG, para o reator de síntese enzimática de amoxicilina demonstrou ser absolutamente factível.

# CAPÍTULO 6

## PROPOSTAS FUTURAS

Os resultados encontrados nesta tese de doutorado deram origem a uma variedade de caminhos promissores vislumbrando possibilitar a efetivação da prática industrial da síntese enzimática de penicilinas semi-sintéticas. Para estudos futuros, resumidamente, propõe-se o aprofundamento deste trabalho, como especificado a seguir:

**i.** Investigar o efeito da variação nas condições reacionais, tais como: temperatura, pH, relação molar entre os substratos e relação de enzima para substrato, sobre os índices de desempenho da reação;

**ii.** Avaliar a influência da utilização de um éster etílico (EEPOHFG) ao invés de um éster metílico (EMPOHFG) para o processo de síntese enzimática de amoxicilina na presença de solventes iônicos;

**iii.** Pesquisar a utilização de uma baixa concentração de etanol no meio de reação a fim de reduzir a viscosidade do sistema e possibilitar um aumento na velocidade da reação, traduzida, entre outros, no índice de produtividade;

**iv.** Empregar uma classe de LIs apróticos que seja baseada em um cátion contendo uma cadeia alquílica menor, por exemplo, o 1-etil-3-metilimidazólio (EMI), por se tratarem de meios iônicos menos viscosos;

v. Utilizar um derivado enzimático diferente, por exemplo, a PGA covalentemente imobilizada em glioxil-agarose, visando verificar aspectos que estão diretamente envolvidos na difusividade dos componentes da reação;

vi. Estudar a solubilidade multicomponente na presença de meio iônico, na tentativa de poder executar a reação sintética com alta carga de reagentes, ou seja, em níveis acima do limite de solubilidade, atendendo a interesses industriais;

vii. Executar a reação de síntese enzimática cineticamente controlada de amoxicilina em reator batelada alimentada com cristalização simultânea dos produtos, visando obter uma maximização na seletividade do processo;

viii. Caracterizar e ajustar modelos matemáticos que sejam apropriados para estes processos enzimáticos, com a finalidade de otimização destas reações de síntese enzimática de amoxicilina conduzidas em LIs;

ix. Desenvolver uma metodologia adequada para realizar a recuperação e purificação subsequente da amoxicilina resultante do processo de produção enzimática na presença de meios iônicos;

x. Pesquisar a possibilidade de realizar a síntese do éster etílico (EEPOHFG) através da rota enzimática, empregando a enzima lipase, e avaliar todas as condições reacionais para a otimização deste processo, incluindo a caracterização e o ajuste de modelos;

xi. Realizar um estudo da estabilidade operacional do biocatalisador que for mais adequado para estes processos, com o intuito de encontrar o número de ciclos em que pode ser efetivamente aplicado;

xii. Estabelecer um processo eficiente para a recuperação e purificação dos solventes iônicos que forem empregados nos procedimentos de síntese enzimática tanto de amoxicilina quanto de EEPOHFG;

xiii. Ampliar toda esta investigação para as reações de síntese enzimática de outro importante antibiótico  $\beta$ -lactâmico semi-sintético, a ampicilina, incluindo a síntese do éster etílico da fenilglicina (EEFG);

xiv. Analisar a implementação de um procedimento de síntese do substrato ativado (éster etílico) com subsequente síntese de antibiótico, ambos realizados no mesmo reator enzimático, na presença de lipase e PGA;

xv. Preparar uma análise detalhada de todos os custos que estão envolvidos nestes processos enzimáticos visando avaliar a viabilidade econômica e competitividade em relação aos processos tradicionalmente praticados na indústria.

# CAPÍTULO 7

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAN, O. et al. Improving the industrial production of 6-APA: enzymatic hydrolysis of penicillin G in the presence of organic solvents. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1639-1642, 2003.

ABIAN, O. et al. Stabilization of immobilized enzymes against water-soluble organic cosolvents and generation of hyper-hydrophilic micro-environments surrounding enzyme molecules. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 19, p. 489-503, 2001.

AGUIRRE, C. et al. Effect of cosolvent and pH on the kinetically controlled synthesis of cephalexin with immobilized penicillin acylase. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 351-360, 2002.

AGUIRRE, C. et al. Low temperature effect on production of ampicillin and cephalexin in ethylene glycol medium with immobilized penicillin acylase. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1924-1931, 2006.

ALKEMA, W. B. L. et al. Characterization of the  $\beta$ -lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. *Protein Engineering*, v. 13, p. 857-863, 2000.

ÁLVAREZ, V. H. et al. Brønsted ionic liquids for sustainable processes: synthesis and physical properties. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 55, p. 625-632, 2010.

ÁLVAREZ, V. H. et al. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid Phase Equilibria*, v. 299, p. 42-50, 2010.

ALVARO, G. Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 26, p. 181-195, 1990.

ANDERSON, J. L. et al. Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, p. 14247-14254, 2002.

ANGELL, C. A.; WANG, L. M. Hyper quenching and cold equilibration strategies for the study of liquid-liquid and protein folding transitions. *Biophysical Chemistry*, v. 105, p. 621-637, 2003.

ARROYO, M. et al. Biotechnological applications of penicillin acylases: state of the art. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p. 507-514, 2003.

ARROYO, M. et al. Examination of penicillin acylase stability in water-organic solvent systems at different temperatures. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 20, p. 53-56, 2002.

ARROYO, M. et al. Kinetic mechanism of penicillin V acylase activation by short-chain alcohols. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 312-318, 2001.

BALASINGHAM, K. et al. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 276, p. 250-256, 1972.

BASSO, A. et al. Activity of covalently immobilized PGA in water miscible solvents at controlled  $a_w$ . *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 851-855, 2001.

BASSO, A. et al. Stability and activity of immobilized penicillin G amidase in ionic liquids at controlled  $a_w$ . *Green Chemistry*, v. 7, p. 671-676, 2005.

BATIGALHIA, F. *Síntese, caracterização e determinação da pureza dos ésteres empregados como cadeias laterais na produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos*. Relatório Interno. UFSCar, São Carlos, 2003.

BELL, G. et al. Biocatalyst behavior in low-water systems. *Trends in Biotechnology*, v. 13, p. 468-473, 1995.

BELTER, P. A.; CUSLLER, E. L.; WEI-SHOU, H. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, Wiley-Interscience, 1988.

BERNARDINO S. M.; FERNANDES P.; FONSECA L. P. Improved specific productivity in cephalixin synthesis by immobilized PGA in silica magnetic micro-particles. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 107, p. 753-762, 2010.

BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 877-882, 2006.

BICAK, N. A new ionic liquid: 2-hydroxy ethylammonium formate. *Journal of Molecular Liquids*, v. 116, p. 15-18, 2005.

BLANCO, R. M.; CALVETE, J. J.; GUISTIN, J. M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 353-359, 1989.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 360-366, 1989.

BÖCK, A. W. et al. The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105 consists of two dissimilar subunits. *FEMS Microbiology Letters*, v. 20, p. 135-139, 1983.

BOESTEN, W. H. J.; MOODY, H. M.; ROOS, E. C. *Process for recovering of ampicillin*. USPTO 5.916.762, 1999.

BRAUTIGAM, S. et al. Whole-cell biocatalysis: evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 310-316, 2009.

BRÜNS, W. et al. Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, v. 3, p. 36-44, 1985.

BRUGGINK, A.; ROOS, E. C.; de VROOM, E. Penicillin acylase in the industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Organic Process Research & Development*, v. 2, p. 128-133, 1998.

BRUGGINK, A.; ROY, P. D. *Synthesis of  $\beta$ -Lactam antibiotics*. Kluwer Academic Publishers, 1<sup>a</sup> ed., Netherlands, 2001.

BRYJAK J.; TROCHIMCZUK A. W. Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 573-578, 2006.

CALLERI, E. et al. Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, p.243-258, 2004.

CAO, L. et al. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 665-670, 2001.

CARDA-BROCH, S.; BERTHOD, A.; ARMSTRONG, D. W. Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 375, p. 191-199, 2003.

CASSOL, C. C. et al. A simple and practical method for the preparation and purity determination of halide-free imidazolium ionic liquids. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 348, p. 243-248, 2006.

CECCHINI D. A. et al. New active site oriented glyoxyl-agarose derivatives of *Escherichia coli* penicillin G acylase. *BMC Biotechnology*, v. 7, p. 54-65, 2007.

CHANDEL, A. K. et al. The realm of penicillin G acylase in  $\beta$ -lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 199-207, 2008.

CHEN, C. H. et al. Anhydrous tert-pentanol as a novel media for the efficient enzymatic synthesis of amoxicillin. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 601-607, 2008.

CHOW, Y. et al. Modeling and optimization of methanol as a cosolvent in amoxicillin synthesis and its advantage over ethylene glycol. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 12, p. 390-398, 2007.

CLAUSEN K.; DEKKERS, R. M. *Process for preparation of  $\beta$ -lactams at constantly high concentration of reactants*. USPTO 6048708, 2000.

COLE, M. Penicillins and other acylamino compounds synthesized by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, v. 115, p.747-756, 1969.

COTA, I. et al. New short aliphatic chain ionic liquids: synthesis, physical properties, and catalytic activity in aldol condensations. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, p. 12468-12477, 2007.

CULL, S. G. et al. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 69, p. 227-233, 2000.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

DE DIEGO, T. et al. Understanding structure-stability relationships of *Candida antarctica* Lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 1457-1464, 2005.

DE LOS RÍOS, A. et al. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, p. 190-195, 2007.

DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 75, p. 5-19, 1999.

DIAGO, J.; LUDESCHER, J. Processes for the production of alpha-aminoacylpenicillin and 7-alpha. *Patente Americana*, nº 5.840.885, 1998.

DIENDER, M. B. et al. Feasibility of the thermodynamically controlled synthesis of amoxicillin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, p. 249-253, 1998.

DONE, S. H. et al. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase. *Journal of Molecular Biology*, v. 284, p. 463-475, 1998.

DU, L. L. et al. A two-step, one-pot enzymatic synthesis of ampicillin from penicillin G potassium salt. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 58, p. 208-211, 2009.

- DUAN, Z. Y. Protic pyridinium ionic liquids: synthesis, acidity determination and their performances for acid catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 250, p. 163-168, 2006.
- DUGGLEBY, H. J. et al. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center. *Nature*, v. 373, p. 264-268, 1995.
- DUPONT, J. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. *Energy & Environmental Science*, v. 2, p. 1258-1265, 2009.
- DUPONT, J. et al. Organo-zincate molten salts as immobilising agents for organometallic catalysis. *Catalysis Letters*, v. 73, p. 2-4, 2001.
- DUPONT, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *Chemical Society Reviews*, v. 15, p. 341-350, 2004.
- DUPONT, J.; SPENCER, J. On the noninnocent nature of 1,3-dialkylimidazolium ionic liquids. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 43, p. 5296 -5297, 2004.
- EBERT, C.; GARDOSI, L.; LINDA, P. Activity of immobilized penicillin amidase in toluene at controlled water activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, p. 241-244, 1998.
- EBERT, C.; GARDOSI, L.; LINDA, P. Control of enzyme hydration in penicillin amidase catalysed synthesis of amide bond. *Tetrahedron Letters*, v. 37, p. 9377-9380, 1996.
- EGOROV, A. M. et al. Enzymatic transformation of betalactam antibiotics. Trends of development and approaches to practical implementation. *Vestnik Moskovskogo Khimiya*, v. 41, p. 43-46, 2000.
- EL SEOUD, O. et al. Applications of ionic liquids in carbohydrate chemistry: a window of opportunities. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2629-2647, 2007.
- ELANDER R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 385-392, 2003.
- ERARSLAN, A. The effect of polyol compounds on the thermostability of penicillin G acylase from a mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. *Process Biochemistry*, v. 30, p. 133-139, 1995.
- ERBELDINGER, M.; MESIANO, A. J.; RUSSELL, A. J. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in IL-an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnology Progress*, v. 16, p. 1129-1131, 2000.
- ESTRUCH, I. et al. Immobilization of the acylase from *Escherichia coli* on glyoxyl-agarose gives efficient catalyst for the synthesis of cephalosporins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 121-129, 2008.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 96-103, 1999.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. et al. Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: Evaluation and optimization of different synthetic approaches. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 9-14, 1996.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISÁN, J. M. Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, p. 898-905, 1991.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISÁN, J. M. The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized Penicillin G acylase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 305-310, 1998.

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, p. 7695-7702, 2007.

FILICE, M.; GUISÁN, J. M.; PALOMO, J. M. Effect of ionic liquids as additives in the catalytic properties of different immobilized preparations of *Rhizomucor miehei* Lipase in the hydrolysis of peracetylated lactal. *Green Chemistry*, v. 12, p. 1365-1369, 2010.

FLORES, G.; SOBERÓN, X.; OSUNA, J. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. *Protein Science*, v. 13, p. 1677-1683, 2004.

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, p. 182-190, 2005.

GAMBA, M.; LAPIS, A. A. M.; DUPONT, J. Supported Ionic Liquid Enzymatic Catalysis for the Production of Biodiesel. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 350, p. 160-164, 2008.

GANSKE, F.; BORNSCHEUER, U. T. Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the presence of the ionic liquids [BMIM][BF<sub>4</sub>] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] and organic solvents. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 465-469, 2006.

GARCIA, M. T.; GATHERGOOD, N.; SCAMMELLS, P. J. Biodegradable ionic liquids Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chemistry*, v. 7, p. 9-14, 2005.

GHOSH, A. C.; BORA, M. M.; DUTTA, N. N. Developments in liquid membrane separation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Bioseparations*, v. 6, p. 91-105, 1996.

GIORDANO, R. C.; RIBEIRO, M. P. A.; GIORDANO, R. L. C. Kinetics of  $\beta$ -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 27-41, 2006.

GONÇALVES, L. R. B. *Estudo cinético da síntese enzimática de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em agarose*. Tese. UFSCar, São Carlos, 2001.

GONCALVES, L. R. B. et al. Inhibitory effects in the side reactions occurring during the enzymic synthesis of amoxicillin: *p*-hydroxyphenylglycine methyl ester and amoxicillin hydrolysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 38, p. 77-85, 2003.

GREAVES, T. L. et al. Protic ionic liquids: solvents with tunable phase behavior and physicochemical properties. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, p. 22479-22487, 2006.

GREAVES, T. L.; Drummond, C. J. Protic ionic liquids: properties and applications. *Chemical Reviews*, v. 108, p. 206-237, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, p. 667-679, 2010.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2<sup>a</sup> ed., Madrid, Spain, 2006.

GUPTA, M. N. Enzyme function in organic solvents. *European Journal Biochemistry*, v. 203 p. 25-32, 1992.

GUPTA, M. N. Thermo stabilization of proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 14, p. 1-11, 1991.

HALLING, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, p. 178-206, 1994.

HANGARGE, R. V.; JARIKOTE, D. V.; SHINGARE, M. S. Knoevenagel condensation reactions in an ionic liquid. *Green Chemistry*, v. 4, p. 266-268, 2002.

HARING, D.; SCHREIER, P. Cross-linked enzyme crystals. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 3, p. 35-38, 1999.

HEILMANN S. M. et al. Cartridge filter systems containing immobilized enzymes: Part I. Concept and features. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 45, p. 1-9, 2007.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J. et al. Biocatalytic ester synthesis in ionic liquid media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p. 1423-1435, 2010.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J. et al. Stability of hydrolase enzymes in ionic liquids. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 87, p. 910-914, 2009.

HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O. et al. Evaluation of different enzymes as catalysts for the production of  $\beta$ -lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 336-343, 1999.

HODGSON, E. *A Textbook of Modern Toxicology*. Wiley-Interscience, 2004.

HUDDLESTON, J. G. et al. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chemistry*, v. 3, p. 156-164, 2001.

HURLEY, F. H.; WIER, T. P. The electrodeposition of aluminium from nonaqueous solutions at room temperature. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 98, p. 207-212, 1951.

IGLESIAS, M. et al. Effect of temperature on mixing thermodynamics of a new ionic liquid: {2-Hydroxyethylammonium formate (2-HEAF) + short hydroxylic solvents}. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 40, p. 119-133, 2008.

ILLANES, A. *Biotecnología de Enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.

ILLANES, A. et al. Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of  $\beta$ -Lactam antibiotics in organic medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 133, p. 189-202, 2006.

ILLANES, A. et al. Optimization of cephalexin synthesis with immobilized penicillin acylase in ethylene glycol medium at low temperatures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 95-103, 2004.

ILLANES, A. et al. Production of cephalexin in organic medium at high substrate concentrations with CLEA of penicillin acylase and PGA-450. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 195-203, 2007.

ILLANES, A. et al. Synthesis of cephalexin in ethylene glycol with glyoxyl-agarose immobilized penicillin acylase: temperature and pH optimization. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 111-117, 2003.

ILLANES, A. et al. Synthesis of cephalexin in organic medium at high substrate concentrations and low enzyme to substrate ratio. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 35, p. 45-51, 2005.

ILLANES, A.; FAJARDO, A. Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 587-595, 2001.

ITOH, T. et al. Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: reaction of enzyme anchored to the solvent. *Chemistry Letters*, v. 30, p. 262-263, 2001.

JACQUEMIN, J. et al. Density and viscosity of several pure and water-saturated ionic liquids. *Green Chemistry*, v. 8, p. 172-180, 2006.

JAIN, N. et al. Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron Letters*, v. 61, p. 1015-1060, 2005.

JIANG, Y. et al. Enzymatic hydrolysis of penicillin in mixed ionic liquids/water two-phase system. *Biotechnology Progress*, v. 23, p. 829-835, 2007.

KAAR, J. et al. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, p. 4125-4131, 2003.

KAFTZIK, N. Mandelate racemase activity in ionic liquids: scopes and limitations. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 214, p. 107-112, 2004.

KAFTZIK, N.; WASSERSCHIED, P.; KRAGL, U. Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the  $\beta$ -Galactosidase catalysed synthesis of *N*-Acetyllactosamine. *Organic Process Research & Development*, v. 6, p. 553-557, 2002.

KENNEDY, D. F.; DRUMMOND C. J. Large Aggregated Ions Found in Some Protic Ionic Liquids. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, p. 5690-5693, 2009.

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, p. 181-190, 1996.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than water? *Trends in Biotechnology*, v. 15, p. 97-101, 1997.

KOBAYASHI, T. Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media. *Biotechnology Letters*, v. 33, p. 1911-1919, 2011.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 118, p. 1-36, 2010.

KOROLKOVAS A.; DE FRANÇA F. F. A. C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2000.

KOSMIDIS, J.; WILLIAMS, J. D.; ANDREWS, J. Amoxicillin-pharmacology, bacteriology and clinical studies. *The British Journal of Clinical Practice*, v. 26, p. 341-346, 1972.

KRAGL, U.; ECKSTEIN, M.; KAFTZIK, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 565-571, 2002.

KUROCHKINA, V. B. et al. Ionization constants and solubility of compounds involved in enzymatic synthesis of aminopenicillins and aminocephalosporins. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 1103-1117, 2011.

KUROCHKINA, V. B.; NYS, P. S. Physicochemical principles of separation of the reaction mixture components enzymatic synthesis of aminobetalactams. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 37, p. 655-662, 2003.

KUTZBACH, C.; RAUENBUSCH, E. Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR*, v. 354, p. 45-53, 1974.

LATAŁA, A. et al. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Acute effects on the Baltic algae *Oocystis submarina* and *Cyclotella meneghiniana*. *Aquatic Toxicology*, v. 73, p. 91-98, 2005.

LAU, R. M. et al. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters*, v. 2, p. 4189-4191, 2000.

LEE, S. H. et al. Adverse effect of chloride impurities on lipase-catalyzed transesterifications in ionic liquids. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 1335-, 2006.

LEE, S. M. et al. Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 22, p. 687-690, 2005.

LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. 2<sup>a</sup> ed. Sarvier, São Paulo, 1984.

LENOURRY, A.; GARDINER, J. M.; STEPHENS, G. Hydrogenation of C–C double bonds in an ionic liquid reaction system using the obligate anaerobe, *Sporomusa termitida*. *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 161-165, 2005.

LOPES, J. N. A. C.; PÁDUA, A. A. H. Nanostructural organization in ionic liquids. *Journal of Physical Chemistry B*, v.110, p. 3330-3335, 2006.

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, p. 143-149, 1997.

LOZANO, P. et al. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chemical Communications*, v. 7, p. 692-693, 2002.

LOZANO, P. et al. Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 21, p. 9-13, 2003.

LOZANO, P. et al. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 214, p. 113-119, 2004.

MARGOLIN, A. L.; SVEDAS, V. K.; BEREZIN, I. V. Substrate-specificity of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 616, p. 283-289, 1980.

- MARÍA, P. D. “Nonsolvent” applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 47 , p. 6960-6968, 2008.
- MARSH, K. N.; BOXALL, J. A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review. *Fluid Phase Equilibria*, v. 219, p. 93-98, 2004.
- MARTINEK, K. et al. The principles of enzyme stabilization. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 485, p. 1-12, 1977.
- MARZO, A.; DAL BO, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *Journal of Chromatography A*, v. 812, p. 17-34, 1998.
- MATEO, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p. 1593-1601, 2007.
- MATEO, C. et al. Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, v. 18, p. 629-634, 2002.
- MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 509-515, 2000.
- MATEO, C. et al. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, v. 1, p. 739-745, 2000.
- MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 456-462, 2005.
- MATSUDA, T. et al. An effective method to use ionic liquids as reaction media for asymmetric reduction by *Geotrichum candidum*. *Tetrahedron Letters*, v. 47, p. 4619-4622, 2006.
- MCVEY, C. E. et al. Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, v. 313, p.139-150, 2001.
- MENEZES, J. C.; ALVES, T. P.; CARDOSO, J. P. Biotecnologia microbiana: a produção de penicilina. Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações. N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL, 2000.
- MONIRUZZAMAN, M. et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 295-314, 2010.

MONIRUZZAMAN, M.; KAMIYA, N; GOTO, M. Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 8, p. 2887-2899, 2010.

MOON, Y. et al. Enzyme-catalyzed reactions in ionic liquids. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 23, p. 247-263, 2006.

MULDOON, M. J.; GORDON, C. M; DUNKIN, L. R. Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, v. 2, p. 433-435, 2001.

MUÑIZ, C. C. et al. Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 49, p. 88-98, 2007.

NARA, S. J.; HARJANI, J. R.; SALUNKHE, M. M. Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study. *Tetrahedron Letters*, v. 43, p. 2979-2982, 2002.

NATHWANI, D.; WOOD, M. J. Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, v. 45, p. 866-894, 1993.

NETO, B. A. S. et al. Organoindate Room Temperature Ionic Liquid: Synthesis, Physicochemical Properties and Application. *Synthesis*, v. 8, p. 1155-1158, 2004.

NIELSON, J. et al. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of penicillium chrysogenum and relation to penicillin production. *Biotechnology Progress*, v. 11, p. 93-98, 1995.

NOËL, M. et al. Kinetic resolution of rac-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium [bis (trifluoromethyl) sulfonyl amide]. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 301-306, 2004.

OLIVIER-BOURBIGOU, H.; MAGNA, L.; MORVAN, D. Ionic liquids and catalysis: recent progress from knowledge to applications. *Applied Catalysis A: General*, v. 373, p. 1-56, 2010.

OSPINA, S. et al. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 462-469, 1996.

PAN, S. B. et al. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, p. 13-18, 2008.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, p. 432-437, 2003.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 66, p. 8395-8401, 2001.

- PARMAR A. et al. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 289-301, 2000.
- PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2ª ed. Makron Books, São Paulo, 1996.
- PELETIER, P.; DURAND, J.; COT, L. Z. Etude de la Réaction d'Hydrolyse de l'Anion PO<sub>3</sub>F<sub>2</sub><sup>-</sup> en Solution Aqueuse. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, v. 581, p. 190-198, 1990.
- PERIC, B. et al. Terrestrial ecotoxicity of short aliphatic protic ionic liquids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, p. 1-8, 2011.
- PERNAK, J.; CZEPUKOWICZ, A. New ionic liquids and their antielectrostatic properties. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 40, p. 2379-2383, 2001.
- PFRUENDER, H.; JONES, R.; WEUSTER-BOTZ, D. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, v. 124, p. 182-190, 2006.
- PHADTARE, S. et al. Penicillin G acylase-fatty lipid biocomposite films show excellent catalytic activity and long term stability/reusability. *Biotechnology Progress*, v. 18, p. 483-488, 2002.
- PHAM, T. P. T.; CHO, C. W.; YUN, Y. S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. *Water Research*, v. 44, p. 352-372, 2010.
- POLDERMAN-TIJMES, J. J. *Biochemical characterization of  $\alpha$ -amino acid ester hydrolases*. Tese. University of Groningen, The Netherlands, 2004.
- POLIAKOFF, M.; LICENCE, P. Green chemistry, *Nature*, v. 450, p. 810-812, 2007.
- POOLE, C. F. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. *Journal of Chromatography A*, v. 1037, p. 49-82, 2004.
- QU, J. et al. Ionic liquids with ammonium cations as lubricants or additives. *Tribology Letters*, v. 22, p. 207-214, 2006.
- QUIJANO, G.; COUVERT, A.; AMRANE, A. Ionic liquids: applications and future trends in bioreactor technology. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8923-8930, 2010.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 97, p. 1-13, 2004.
- RANKE, J. et al. Design of sustainable chemical products the example of ionic liquids. *Chemical Reviews*, v. 107, p. 2183-2206, 2007.

- REICHARDT, C. Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. *Green Chemistry*, v. 7, p. 339-351, 2005.
- RIBEIRO, M. P. A. et al. Solid–Liquid equilibrium of substrates and products of the enzymatic synthesis of ampicillin. *AIChE Journal*, v. 56, p.1578-1583, 2010.
- RIBEIRO, M. P. A. *Operação ótima de reator para síntese enzimática de ampicilina com cristalização simultânea dos produtos*. Tese. UFSCar, São Carlos, 2007.
- ROCHEFORT, D.; PONT, A. L. Pseudocapacitive behavior of RuO<sub>2</sub> in a proton exchange ionic liquid. *Electrochemistry Communications*, v. 8, p. 1539-1543, 2006.
- ROELOFS, J. C. A. A.; VAN DILLEN, A. J.; DE JONG, K. P. Condensation of citral and ketones using activated hydrotalcite catalysts. *Catalysis Letters*, v. 74, p. 91-94, 2001.
- ROLINSON, G. N.; GEDDES, A. M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, p. 3-8, 2007.
- ROMERO, O. et al. Simple strategy of reactivation of a partially inactivated penicillin G acylase biocatalyst in organic solvent and its impact on the synthesis of  $\beta$ -Lactam antibiotics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, p. 472-479, 2009.
- ROOSEN, C.; MÜLLER, P; GREINER, L. Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 607-614, 2008.
- ROPEL, L. et al. Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids. *Green Chemistry*, v. 7, p. 83-90, 2005.
- ROSELL, C. M. et al. A criterion for the selection of monophasic solvents for enzymatic synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 64-69, 1998.
- RUDOLPH, E. S. J. et al. Correlating the phase behavior of semi-synthetic antibiotics and their precursors in water + 1-butanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, v. 158, p. 903-912, 1999.
- RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro. *Química Nova*, v. 32, p. 165-168, 2009.
- SANTANA, V. C. O Papel dos Antibióticos na Resistência Bacteriana. *Revista Cesumar*, v. 11, p. 129-138, 2006.
- SCHÖFER, S. H. et al. Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chemical Communications*, v. 5, p. 425-426, 2001.

SCHRÖDER, U. et al. Water-induced accelerated ion diffusion: voltammetric studies in 1-methyl-3- [2,6-( S)-dimethylocten-2-yl] imidazolium tetrafluoroborate, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and hexafluorophosphate ionic liquids. *New Journal of Chemistry*, v. 24, p. 1009-1015, 2000.

SCHROËN, C. G. P. H. et al. Thermodynamically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 498-506, 1999.

SHELDON, R. A. Catalytic reactions in ionic liquids. *Chemical Communications*, v. 23, p. 2399-2407, 2001.

SHELDON, R. A. et al. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*, v. 4, p. 147-151, 2002.

SHELDON, R. A. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chemistry*, v. 7, p. 267-278, 2005.

Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em abril de 2012.

SUAREZ, P. A. Z. et al. The use of new ionic liquids in two-phase catalytic hydrogenation reaction by rhodium complexes. *Polyhedron*, v. 15, p. 1217-1219, 1996.

SURESHKUMAR, M; LEE, C.K. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, p.1-12, 2009.

TRAVASCIO, P. et al. Enzyme reaction engineering: effect of methanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions. *Biotechnology Progress*, v.18, p. 975-985, 2002.

TSUJI, A. et al. 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, p. 1059-1066, 1978.

ULBERT, O. et al. Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 31, p. 39-45, 2004.

VAN RANTWIJK, F.; LAU, R. M.; SHELDON, R. A. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology*, v. 21, p. 131-138, 2003.

VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, v. 107, p. 2757-2785, 2007.

VIEIRA, M. F. *Separação de ampicilina produzida enzimaticamente por reação entre éster metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico*. Tese. UFSCar, São Carlos, 2003.

VOGEL, A. I.; SMITH, B. V.; WALDRON, N. M. *Vogel's Elementary Practical Organic Chemistry I Preparations*. Longman Scientific & Technical, 1980.

WAICHIGO, M. M.; RIECHEL, T. L.; DANIELSON, N. D. Ethylammonium acetate as a mobile phase modifier for reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 61, p. 17-, 2005.

WANG, W.; ZONG, M. H.; LOU, W. Y. Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2.2241 cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 70-76, 2009.

WANG, Z. et al. Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 3, p. 614-622, 1999.

WARD, N.  *$\beta$ -Lactam antibiotics*. EPO 0.244.113.A1, 1987.

WASSERSCHIED, P.; WELTON, T. *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

Web of Science. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com>. Acesso em abril de 2012.

WEGMAN, M. A. et al. Towards biocatalytic synthesis of beta-lactam antibiotics. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 343, p. 559-576, 2001.

WEI, D. Z.; YANG, L. Effects of ethylene glycol on the synthesis of ampicillin using immobilized penicillin G acylase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 78, p. 431-436, 2003.

WILSON, L. et al. Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: an easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 852-857, 2004.

XIE, T. et al. Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 4724-4733, 2009.

YOUSHKO, M. I. et al. Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: a new approach to optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 78, p. 589-593, 2002.

YOUSHKO, M. I. et al. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in "aqueous solution-precipitate" systems. High substrate concentration and supersaturating effect. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 509-515, 2000.

YOUSHKO, M. I. et al. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in "aqueous solution-precipitate" systems. High substrate concentration and supersaturating effect. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 509-515, 2000.

YOUSHKO, M. I. et al. Quantitative characterization of the nucleophile reactivity in penicillin acylase-catalyzed acyl transfer reactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1599, p. 134-140, 2002.

YOUSHKO, M. I.; VEDAS, V. K. S. 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*, v. 65, 2000, p. 1367-1375, 2000.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 3194-3201, 1988.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, v. 224, p. 1249-1251, 1984.

ZHANG, Q.; ZHANG, S.; DENG, Y. Recent advances in ionic liquid catalysis. *Green Chemistry*, v. 13, p. 2619-2637, 2011.

ZHANG, W. et al. Penicillin acylase catalysis in the presence of ionic liquids. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 29, p. 379-383, 2006.

ZHANG, Y. W. et al. kinetically controlled synthesis of cefaclor with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 22, p. 349-354, 2008.

ZHAO, D.; LIAO, Y.; ZHANG, Z. Toxicity of ionic liquids. *Clean*, v. 35, p. 42-48, 2007.

ZHAO, G. Y. et al. Mannich reaction using acidic ionic liquids as catalysts and solvents. *Green Chemistry*, v. 6, p. 75-77, 2004.

ZHAO, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids – a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p. 891-907, 2010.

ZHU, S. et al. A mini-review on greenness of ionic liquids. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 23, p. 207-211, 2009.

ŽUŽA, M.; MILOSAVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Immobilization of modified penicillin G acylase on Sepabead carriers. *Chemical Papers*, v. 63, p. 117-124, 2009.