

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

ESTUDO CINÉTICO DA SÍNTESE DE AMOXICILINA
CATALISADA POR PENICILINA G ACILASE
IMOBILIZADA EM AGAROSE

LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES

SÃO CARLOS – SP

2001

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

ESTUDO CINÉTICO DA SÍNTESE DE AMOXICILINA
CATALISADA POR PENICILINA G ACILASE
IMOBILIZADA EM AGAROSE

LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES

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

Orientadora: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

SÃO CARLOS – SP

2001

*Dedico este trabalho aos meus pais e meu irmão por
todo o apoio e incentivo durante todos esses anos*

AGRADECIMENTOS

A Professora Raquel de Lima Camargo Giordano, pela amizade, pela atenção e pela orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Jose Manuel Guisán pelas importantes contribuições e críticas à elaboração deste trabalho.

Ao Professor Roberto de Campos Giordano pela orientação preciosa no trabalho com os modelos mecanístico e híbridos.

Ao Dr. Roberto Fernandez-Lafuente pelos conselhos, críticas, importantes contribuições, pelo apoio e auxílio durante toda a elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos Emma, Marieta, Jorge, Sylvia, David e Fernando por terem me “adotado” na Espanha e por todos os inesquecíveis momentos de lazer e a Nuno Jorge Remédio Ornelas pelo incentivo e pela paciência, principalmente nos últimos meses de elaboração deste trabalho.

Aos colegas Andrea Lopez de Oliveira Ferreira, Antonio José Gonçalves da Cruz e Ruy de Souza pela ajuda, sugestões e críticas que muito contribuíram para este trabalho e, sobretudo por sua amizade sincera.

Ao Amadeus pela ajuda preciosa no decorrer deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP) em Madrid, do DEQ/UFSCar pela ajuda desinteressada e pelos momentos de descontração e a todos os professores e funcionários do DEQ/UFC pelo incentivo e pela oportunidade de concluir este trabalho.

Aos órgãos de Fomento (Fapesp, CNPq, PICD/Capes) pelo apoio financeiro sem o qual a execução deste trabalho não seria possível.

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	xix
Nomenclatura	xxi
Capítulo 1 – Introdução	1
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	7
2.1 - Antibióticos β -Lactâmicos.....	7
2.1.1 Penicilinas Naturais	8
2.1.2 Penicilinas Semi-Sintéticas	9
2.1.2.1 - Amoxicilina	10
2.1.2.2 A natureza amino ácida da ampicilina, amoxicilina e de outras penicilinas	10
2.1.3 Cefalosporinas	13
2.2 – Rotas de Produção de Antibióticos Semi-Sintéticos.....	13
2.3 - Rota Enzimática : Estratégias de Síntese de Antibióticos β -Lactâmicos.....	18
2.3.1 – Síntese Termodinamicamente Controlada (STC).....	18
2.3.2 Síntese Cineticamente Controlada.....	19

2.3.3 - Síntese de antibióticos β -lactâmicos: rota cineticamente controlada versus rota termodinamicamente controlada.....	22
2.4 – Enzimas: catalisadores biológicos.....	25
2.4.1 - O descobrimento das enzimas e o desenvolvimento da enzimologia.....	25
2.4.2 – Atividade e inativação de enzimas.....	26
2.4.3 – O Sítio Ativo.....	26
2.4.4 – A Hipótese "Chave-Fechadura" de Fischer.....	28
2.4.5 – A Hipótese do "Encaixe Induzido" de Koshland.....	29
2.4.6 – Hipóteses Envolvendo Distorção ou Estabilização por Estado de Transição	30
2.4.7 – Formação do complexo acil-enzima: mecanismo catalítico da quimotripsina.....	31
2.4.8 – Cinética Enzimática.....	34
2.4.8.1 – Inibição Enzimática.....	36
2.4.8.2 – Métodos de Representação de Dados.....	41
2.4.8.3 – Enzimas com Substratos Múltiplos.....	45
2.4.9 – Enzimas Imobilizadas	46
2.4.9.1 – Aplicações.....	48
2.4.9.2 – Métodos de Imobilização.....	50
2.4.9.3 Suportes para imobilização.....	50
2.4.9.4 - Géis glioxil-agarose.....	51
2.4.9.5 Efeitos de Transporte de Massa	52
2.5 – Penicilina G Acilase	54
2.5.1 – Aplicações	55

2.5.2 – Estrutura, Especificidade e Mecanismo Catalítico da Penicilina G Acilase	58
2.6 – Efeito de Condições Operacionais na Síntese Enzimática de Antibióticos β -Lactâmicos	65
2.6.1 - Efeito do pH.....	65
2.6.2 – Efeito da Temperatura	68
2.6.3 – Efeito da Força Iônica	69
2.6.4 – Influência da Concentração de Substratos e Produtos nas Reações de Síntese e Hidrólise de Antibiótico β -Lactâmicos	70
2.6.5 – Solubilidade dos Substratos e Produtos de Síntese.....	72
2.6.6 – Efeito de solventes orgânicos.....	75
2.7 Estudo Cinético da Síntese e hidrólise de Antibióticos β -Lactâmicos.....	79
2.8 – Modelos Matemáticos para a síntese e hidrólise enzimática de antibióticos β -lactâmicos	87
2.9 Sistemas Bifásicos aplicados á síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos.....	106
2.10 Redes Neurais.....	108
2.10.1 - Arquitetura e Topologia de Redes Neurais	109
2.10.2 – Número Ótimo de Neurônios na Camada Escondida.....	110
2.10.3 – O Algoritmo de Retropropagação.....	111
2.10.4 – Funções de transferência	112
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	113

3.1 - Materiais.....	113
3.2 - Equipamentos.....	114
3.3 - Métodos.....	114
3.3.1 - Caracterização do gel de agarose.....	114
3.3.2 - Imobilização da PGA.....	115
3.3.2.1 - Ativação e Oxidação do Suporte.....	115
3.3.2.2 - Imobilização da PGA.....	116
3.3.3 - Determinação da atividade enzimática: Método colorimétrico do PDAB.....	117
3.3.4 - Análises de concentração de substratos e produtos de hidrólise e síntese.....	118
3.4 - Condições Experimentais.....	119
3.4.1 - Experimentos de Síntese e Hidrólise para Estimativa de Parâmetros do Modelo Empírico: Ensaio Preliminares.....	119
3.4.2 Estudos Cinéticos.....	120
3.4.2.1 – Ensaio de Hidrólise de Éster Metílico de p-hidroxifenilglicina na Ausência ou na Presença de Inibidores.....	122
3.4.2.2 – Ensaio de Hidrólise de Amoxicilina na Ausência ou na Presença de Inibidores.....	122
3.4.2.3 – Ensaio de Síntese de Amoxicilina: Velocidades Iniciais.....	122
3.4.2.4 – Síntese de Amoxicilina com Saturação Prévia de Enzima com 6-APA.....	123
3.4.2.5 – Ensaio de Síntese de Amoxicilina.....	123
3.4.3 - Ensaio com enzima livre.....	123

3.4.4 - Ensaios em meio bifásico.....	124
3.4.5 - Ensaios de Velocidade Inicial.....	124
3.5 Métodos Numéricos.....	125
3.5.1 Método de Colocação Ortogonal.....	125
3.5.2 Ddassl.....	125
 Capítulo 4 – Modelos Cinéticos	127
4.1 - Introdução.....	127
4.2- Modelo Semi-Empírico	128
4.3- Modelo Reativo-Difusivo.....	130
4.4- Modelo Cinético Mecanístico.....	131
4.4.1 – 1ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: sem inibição por 6-APA nas Reações de Síntese de Amoxicilina e Hidrólise de Éster.....	133
4.4.2 – 2ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: 6-APA se Liga Apenas ao Complexo Enzima-Éster.....	135
4.5- Modelo Híbrido.....	136
4.5.1 – Rede Neural.....	136
4.5.2 - Modelo Híbrido 1.....	139
4.5.3 – Modelo Híbrido 2	140
 Capítulo 5 – Resultados e Discussões	143
5.1 - Influência do pH e da temperatura na síntese de amoxicilina.....	143
5.2 - Modelo Semi-Empírico: Resultados Preliminares	144

5.2.1 - Estimativa de parâmetros do modelo semi-empírico.....	144
5.2.2 - Validação do modelo semi-empírico.....	148
5.2.3 - Simulação de condições ótimas para a síntese de amoxicilina.....	151
5.3 - Escolha das condições experimentais para o estudo cinético das reações envolvidas na síntese enzimática de amoxicilina	154
5.3.1 - Caracterização do gel de agarose utilizado para imobilização.....	155
5.3.2 - Efeitos de Transporte de massa.....	156
5.3.2.1 - Efeitos de Transferência de Massa Externa	156
5.3.2.2 - Efeitos de Transferência de Massa Interna.....	156
5.4 - Estudos Difusivos na Síntese de Amoxicilina em Gel de Agarose: Estimativa dos Coeficientes de Difusão Efetiva de substratos e produtos	158
5.5 - Efeito de Inibidores nas Reações Laterais da Síntese Enzimática de Amoxicilina.....	164
5.5.1 - Efeito do 6-APA na hidrólise de amoxicilina.....	164
5.5.2 - Efeito do Metanol na Hidrólise Éster Metílico de p-hidroxifenilglicina e de Amoxicilina.....	167
5.5.3 - Efeito de p-hidroxifenilglicina na Hidrólise Éster Metílico de p-hidroxifenilglicina e de Amoxicilina.....	170
5.5.4 - Estimativa de Parâmetros Cinéticos.....	171
5.6 – Adequação do Modelo Empírico e Estimativa de Novos Parâmetros Cinéticos.....	180

5.7 - Efeito da concentração de ácido 6-aminopenicilânico na síntese de amoxicilina.....	186
5.7.1 - Efeito da concentração de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima, durante síntese de amoxicilina.	186
5.7.2 – Dependência da Razão das Constantes de Deacilação (k_3/k'_3) _{app} com a concentração de 6-APA.....	189
5.7.3 – Síntese de Amoxicilina: Comparação entre Resultados Experimentais e Simulados para Diferentes Condições Experimentais.....	190
5.8 - Síntese de Amoxicilina: Ensaio com Saturação da Enzima por 6-APA....	192
5.8.1 Ensaio com enzima livre.....	192
5.8.2 Ensaio com enzima imobilizada.....	193
5.9 – Busca de modelo Cinético Mecanístico para síntese de amoxicilina.....	196
5.9.1 – 1ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: sem inibição por 6-APA nas Reações de Síntese de Amoxicilina e Hidrólise de Éster.....	196
5.9.2 – 2ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: 6-APA se Liga Apenas ao Complexo Enzima-Éster.....	199
5.10 - Rede Neural: Treinamento com Dados de Velocidades Iniciais – Modelo Híbrido 1.....	202
5.10.1 – Treinamento da Rede.....	202
5.10.2 – Validação com Dados de Velocidade Inicial.....	206
5.10.3 - Validação do Modelo Híbrido 1 com Dados de Síntese de Amoxicilina em Batelada.....	209
5.11 - Rede Neural: Treinamento usando Dados em Batelada – Modelo Híbrido 2.....	213

5.11.1 – Escolha dos Conjuntos de Dados de Síntese de Amoxicilina em Batelada utilizados no Treinamento da Rede Neural.....	213
5.11.2 –Conjuntos de Dados de Síntese de Amoxicilina em Batelada utilizados na Validação da Rede Neural: Modelo Híbrido 2.....	215
5.11.3 – Treinamento da Rede – Modelo Híbrido 2.....	217
5.11.4 – Influência do número de neurônios entre a camada de entrada e a camada escondida na capacidade preditiva da rede.....	218
4.11.5 – Influência do número de apresentações na capacidade preditiva da rede.....	220
5.11.6 – Validação da Rede: Resposta do Modelo Híbrido 2 para Reator em Batelada.....	223
5.12 – Otimização das Condições Iniciais de Síntese de Amoxicilina em Reator Batelada: Concentração de Substratos e pH do Meio Reacional.....	235
Capítulo 6 – Conclusões e Sugestões	245
6.1 Conclusões	245
6.2 Sugestões	249
Referências Bibliográficas	251

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de modelo cinético para a síntese de amoxicilina a partir de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico catalisada por penicilina G acilase imobilizada em gel de agarose. O uso do reagente doador da cadeia lateral ativado (éster) para acilação do núcleo β -lactâmico resulta num sistema reativo série-paralelo, onde as reações laterais de hidrólise do éster e do antibiótico ocorrem simultaneamente à de formação do antibiótico. A máxima concentração atingida de antibiótico depende, assim, das velocidades relativas das três reações. O primeiro modelo testado, denominado empírico, resultou numa representação razoável do sistema para algumas condições operacionais, mas falhou para outras. Decidiu-se por isso elaborar modelo mecanístico onde fosse possível a inclusão do efeito de diferentes inibidores nas três reações. Estudos de efeitos difusivos permitiram a escolha de condições operacionais que garantissem ausência de problemas de transferência de massa, interna ou externa no sistema. A seguir, realizaram-se inúmeros experimentos para obtenção de velocidades iniciais sob diferentes condições. Hidrólise de éster na ausência e na presença de inibidores mostraram que p-hidroxifenilglicina inibe esta reação e que o metanol só o faz quando presente em altas concentrações, acima de 0,5M. Hidrólise de amoxicilina na presença e ausência de inibidores mostraram que a p-hidroxifenilglicina também inibe esta reação e que o 6-APA é um inibidor competitivo, mas só quando presente em altas concentrações (acima de 100mM). Síntese de amoxicilina com ou sem saturação prévia da enzima (livre ou imobilizada) com o 6-APA confirmaram o efeito inibitório de altas concentrações deste substrato na hidrólise do antibiótico e comprovaram que a água pode atacar o complexo acil-enzima que contenha ou não o 6-APA adsorvido. Síntese de amoxicilina para diferentes concentrações de 6-APA mostraram que este substrato atua tanto como inibidor quanto ativador da síntese e da hidrólise, dependendo da relação entre a concentração inicial dos substratos. O grande número de complexos enzimáticos diferentes considerados no modelo mecanístico implicou um sistema de equações de difícil manipulação. Os modelos resultantes de simplificações efetuadas para diminuição do número de parâmetros não conseguiram representar os dados experimentais em toda a faixa operacional estudada. O uso de redes neurais para obtenção de modelo matemático é uma solução comumente indicada nesses casos. Assim, modelo híbrido foi elaborado onde balanços de massa para um reator em batelada eram acoplados a velocidades de reação fornecidas por uma rede treinada com dados experimentais. Testaram-se dois tipos de treinamento para uma rede direta treinada por retropropagação. No primeiro, alimentava-se a rede com dados de velocidades iniciais de síntese de amoxicilina, hidrólise de éster e hidrólise de amoxicilina. Essa abordagem só foi capaz de representar os tempos iniciais das bateladas. Passou-se então a alimentar a rede velocidades obtidas durante síntese de amoxicilina em batelada. Essa abordagem permitiu uma boa representação da síntese em toda a faixa operacional estudada. Resultados obtidos com o modelo híbrido indicaram que o pH 6,5 é mais favorável que 7,5 e que há dois pontos diferentes para obtenção de máxima produtividade e seletividade em antibiótico, cuja seleção depende de análise econômica.

Abstract

The objective of this work was to obtain a kinetic model for the amoxicillin synthesis starting from p-hydroxyphenylglycine methyl ester and acid 6-aminopenicilanic catalyzed by penicillin G acilase immobilized in agarose gel. The use of an activated lateral chain donor (ester) for acilation of the β -lactamic nucleus results in a series-parallel system, where the lateral reactions of ester and of antibiotic hydrolysis occur simultaneously toward the one of formation of the antibiotic. The maximum antibiotic concentration reached depends on the relative rates of the three reactions. The first tested model, denominated empiric, resulted in a reasonable representation of the system for some operational conditions, but it failed for others. The elaboration of a mechanistic model, where the inclusion of different inhibitor effects in the three reactions was possible, seemed to be an alternative to represent the synthetic reaction. Diffusional studies allowed the choice of operational conditions that guaranteed the absence of mass transfer limitations, internal or external. Countless experiments took place in order to obtain initial rates of synthesis and hydrolysis under different conditions. Ester Hydrolysis in the absence and in the presence of inhibitors showed us that p-hydroxyphenylglycine inhibits this reaction and that methanol is an inhibitor when present in high concentrations, above 0,5M. Amoxicillin Hydrolysis in the absence and in the presence of inhibitors showed that p-hydroxyphenylglycine also inhibits this reaction and that 6-APA is a competitive inhibitor, but only when present in high concentrations (above 100mM). Amoxicillin synthesis with or without previous saturation of the enzyme (free or immobilized) with 6-APA confirmed the inhibitory effect of high concentrations of this nucleus in the antibiotic hydrolysis. Furthermore, those experiments showed water could attack the complex acil-enzyme with or without adsorved 6-APA. Amoxicillin synthesis for different 6-APA concentrations APA showed that this substrate acts as an inhibitor or as an activator of the synthesis and hydrolysis of ester, depending on the relationship among the initial concentration of substrates. The great number of different enzymatic complexes considered in the mechanistic model implied in equations of difficult manipulation. The simplifications performed in the model decreased the number of parameters, but it was not able to represent the experimental data. The use of neural networks is a common solution indicated in those cases. Thus, a hybrid model, which was elaborated using where mass balances for a batch reactor and reaction rates supplied by a neural network, was examined. Two training types were tested for a direct network by backpropagation. In the first, the network input was initial rates of amoxicillin synthesis, ester hydrolysis and amoxicillin hydrolysis. That model was only capable to represent the experimental data at the beginning of the assays. The neural networks trained with rates of amoxicillin production/consumption and rates of p-hydroxyphenylglycine formation obtained during amoxicillin synthesis allowed a good representation of the reaction in the whole operational conditions studied. Results obtained with the hybrid model indicated that the pH 6.5 is more favorable than 7.5 and that there are two different points to operate a batch reactor: maximum productivity and maximum selectivity of the antibiotic. The final operational conditions depends on economic analysis.

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA): estrutura principal da penicilina G e comum a todas as penicilinas [Pelczar Jr. et al. (1996)].7	7
Figura 2.2 - Antibióticos β -lactâmicos importantes comercialmente.8	8
Figura 2.3 - Estrutura molecular da Penicilina G.....9	9
Figura 2.4 - Etapas envolvidas na síntese industrial de amoxicilina [Louwrier e Knoelest (1997)]11	11
Figura 2.5 - Esquema de reação para a síntese termodinamicamente controlada ..18	18
Figura 2.6 - Esquema de síntese cineticamente controlada.....21	21
Figura 2.7 - Síntese cineticamente controlada de ampicilina, catalisada por penicilina G acilase.23	23
Figura 2.8 - Síntese cineticamente controlada de amoxicilina.....23	23
Figura 2.9 – Representação esquemática da interação entre o sítio ativo da enzima e o substrato, segundo Ogston (1948) apud Palmer (1995).27	27
Figura 2.10 – Mecanismo de ligação enzima-substrato segundo a hipótese da chave e fechadura de Fischer, onde GL = grupo de Ligação, GR = Grupo de Reação, SC = Sítio Catalítico e SL = Sítio de Ligação [Palmer (1995)].28	28
Figura 2.11 – Mecanismo de ligação enzima-substrato segundo a hipótese do "encaixe-induzido" de Koshland, onde GL = grupo de Ligação, GR = Grupo de	

Reação, SC = Sítio Catalítico e SL = Sítio de Ligação [Palmer (1995)].

.....30

Figura 2.12 - Mecanismo de ligação enzima-substrato segundo a hipótese do "encaixe-induzido" de Koshland: ligação não produtiva, onde GL = grupo de Ligação, GR = Grupo de Reação, SC = Sítio Catalítico e SL = Sítio de Ligação [Palmer (1995)].30

Figura 2.13 – Estrutura tridimensional da quimotripsina, determinada por cromatografia de raio-X [Abeles et al. (1992)].....	32
Figura 2.14 – Etapas envolvidas na quebra de um peptídeo por quimotripsina. O substrato (polipeptídeo ou proteína) se liga ao sítio ativo. A ligação peptídica a ser quebrada se posiciona pela ligação da cadeia lateral hidrofóbica (um resíduo fenil, por exemplo) em uma bolsa hidrofóbica especial da enzima. A reação consiste de duas etapas: (a) a (c) formação de um intermediário acil-enzima covalente com a quebra da ligação peptídica (fase de acilação) e (d) a (g), deacilação para regenerar a enzima livre (etapa de deacilação). Em ambas as fases, o oxigênio carbonil do substrato adquire carga negativa no estado de transição. A carga é estabilizada por ponte de hidrogênio com os nitrogênios amida do Gly-193 e Ser-195; a ponte de hidrogênio com o Gly-193 se forma apenas no estado de transição. A deacilação é essencialmente o inverso da acilação, com uma molécula de água tomando o lugar do componente amino do substrato. Os resíduos His e Asp cooperam com a trilogia catalítica fornecendo elementos para a catálise básica dos passos (b) e (e) e catálise ácida dos passos (c) e (f).....	35
Figura 2.15 – Modelos de inibição competitiva: S (substrato) e I (inibidor) se excluem mutuamente . (1) Modelo clássico: S e I competem pelo mesmo sítio de ligação, sendo que I deve ser parecer estruturalmente com S. (2) I e S se excluem mutuamente devido a impedimento estérico. (3) I e S compartilham um grupo de ligação comum na enzima. (4) Os sítios de ligação são distintos para I e S mas se sobrepõe. (5) A união de um inibidor I a um sítio de ligação diferente provoca uma mudança conformacional na enzima que distorce e mascara o sítio de ligação do substrato, e vice-versa [Segel (1982)].....	37
Figura 2.16 – Esquema de reação que descreve a inibição competitiva [Segel (1982)].	38
Figura 2.17 – Inibição não competitiva. (a) S e I não são mutuamente exclusivos mas ESI é cataliticamente inativo e (b) I não pode se ligar a ES, mas as propriedades do sistemas são idênticas às do caso <u>a</u> [Segel (1975)].....	39
Figura 2.18 – Modelo para inibição não competitiva; I "esconde" o sítio de ligação de S [Segel (1975)].....	40

Figura 2.19 – Equilíbrio das reações catalisadas por enzima na presença do substrato S e do inibidor não competitivo I [Segel (1975)].	40
Figura 2.20 – Esquema de reações mais simples para inibição do tipo misto [Segel (1975)].	41
Figura 2.21 – Representação de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor competitivo [Segel (1982)].	42
Figura 2.22 - Representação de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor não competitivo [Segel (1982)].	43
Figura 2.23 - Representação de Dixon para diferentes concentrações de inibidor não competitivo [Segel (1982)].	44
Figura 2.24 - Representação de Dixon para diferentes concentrações de inibidor não competitivo [Segel (1982)].	44
Figura 2.25 – Representação esquemática mecanismo randômico bi bi - dois substratos, dois produtos [Segel (1982)].	45
Figura 2.26 – Representação esquemática mecanismo ordenado bi bi - dois substratos, dois produtos [Segel (1982)].	46
Figura 2.27 – Representação esquemática mecanismo ping pong bi bi - dois substratos, dois produtos [Segel (1982)].	46
Figura 2.28 - As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pelas interações enzima-suporte. O rendimento de imobilização, a eficiência catalítica (resultante de interações físico-químicas, efeitos de transporte de massa) e a estabilidade operacional (em um reator CSTR, o número de ciclos) caracterizam a produtividade da enzima (produto produzido por unidade de enzima) [Tischer e Kasche (1999)].	47

Figura 2.29 - Parâmetros característicos de enzimas imobilizadas (Tischer e Kasche, 1999).	49
Figura 2.30 – Classificação dos métodos de imobilização de enzimas [Kennedy et al. (1988)].	50
Figura 2.31 - Hidrólise da penicilina G.	55
Figura 2.32 - Estrutura Tridimensional da Penicilina acilase: representação do heterodímero. A cadeia α é mostrada em vermelho e a β , em preto [Duggleby et al. (1995)]......	61
Figura 2.33 - Estrutura do sítio ativo do complexo penicilina acilase-ácido fenilacético [Duggleby et al. (1995)].	61
Figura 2.34 - Vista do ácido fenilacético na bolsa de ligação da enzima. A molécula de ácido é desenhada como uma linha e os resíduos como bolas e palitos. MetA142, PheA146, TrpB154 e IleB177 cobrem a bolsa, com a Ser B67 no final. A entrada desta bolsa é formada pela cadeia lateral da Ser B11 Asn B241 e pela cadeia principal de nitrogênios de B23 e B69 [Duggleby et al. (1995)]......	62
Figura 2.35 - A vizinhança da Ser B1 na enzima nativa, mostrando os arranjos tetraédricos dos ligantes do $O\gamma$ (marcado por OG) e o grupo α -amino (chamado de N), incluindo a molécula ponte de água [Duggleby et al. (1995)].	62
Figura 2.36 - Ação catalítica da penicilina acilase (hidrólise de penicilina G): passos do processo catalítico mostrando o papel da molécula ponte (água), que atua como uma base virtual, e do grupo α -amino para aumentar a nucleofilicidade da serina B1 e mostrando as interações para formar o buraco oxiânico para os intermediários tetraédricos. A deacilação acontece por ataque nucleofílico de uma	

molécula de água, que pode ser indireto, como mostrado aqui, com a molécula de água atuando como uma base virtual, ou a deacilação pode ser o resultado de um ataque nucleofílico direto pela água que está interagindo com o grupo α -amino. A interação do seril O γ e a cadeia principal de nitrogênio do B23 não é mostrada e assumimos que se mantém constante ao longo da reação [Duggleby et al. (1995)].....63

Figura 2.37 – Solubilidade de aminopenicilinas em função do pH a 37°C [Tsuji et al. (1978)]: (O) ampicilina anidra; (●) ampicilina trihidratada; (□) amoxicilina trihidratada e (x) epicilina trihidratada.....73

Figura 2.38 – Solubilidade em água de p-hidroxifenilglicina (◆), 6-APA (●) e de amoxicilina (▲) em função do pH a 25°C (Diender et al., 1998): C_{APA} = concentração de 6-APA, C_{HPG} = concentração de p-hidroxifenilglicina e C_{AMOX} = concentração de amoxicilina [Youshko et al. (2000)].74

Figura 2.39 – Mecanismo da reação de transferência de acil para um nucleófilo, água ou núcleo β -lactâmico. Neste caso: EH = enzima; HB = metanol; AOH= produto de hidrólise; AB = doador de acil ativado; E-A = acil-enzima; NH = nucleófilo; AN = produto de síntese [Kasche et al. (1984)].83

Figura 2.40 - Equilíbrio envolvendo penicilina amidase-doador de acil (E-A) , 6-APA e um álcool (R-OH) (Kasche, 1985).84

Figura 2.41 – Seqüência de reação proposto por Konecny et al. (1983). EH = enzima, EAc = intermediário, RNH₂ = doador de acil, Ac = radical acil (neste caso Ac = CNCH₂CO).....92

Figura 2.42 –Reação proposta por Konecny et al. (1983) quando na presença de altas concentrações do receptor de acil.93

Figura 2.43 - Modelo cinético com intermediário acil-enzima proposto por Nam et al., 1985.....	95
Figura 2.44 – Mecanismo de síntese de produtos de condensação (AN) catalisada por hidrolases a partir de substrato ativado (AB) e Nucleófilo (NH). O mecanismo se aplica a hidrolases com intermediário covalente acil-enzima (E-A) [Kasche (1987)]	99
Figura 2.45 - Esquema cinético que descreve as reações laterais envolvidas na síntese de cefalexina.....	103
Figura 2.46 – Síntese cineticamente controlada de antibióticos em um sistema bifásico aquoso [Hernández-Jústiz et al. (1998)].	107
Figura 2.47 - Representação esquemática da arquitetura de uma rede direta com uma camada intermediária treinada por algoritmos de retropropagação [Linko et al. (1997)].	110
Figura 3.1 - Imobilização de PGA em agarose.....	117
Figura 3.2 – Cromatograma típico de uma amostra de síntese enzimática de amoxicilina, onde: POHPG = p-hidroxifenilglicina, AMOX = amoxicilina e POHPGME = éster metílico de p-hidroxifenilglicina.	119
Figura 3.3 - Equipamento utilizado para realização das reações de síntese e hidrólise.	120
Figura 3.4 – Equipamento experimental utilizado para as reações de síntese e hidrólise.....	121
Figura 3.5 - Equipamento utilizado para realização das reações de síntese e hidrólise: detalhe do reator.	121

Figura 3.6 – Determinação da velocidade inicial de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina.....	125
Figura 4.1 – Reações envolvidas na síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos, Kasche (1986).	127
Figura 4.2 - Mecanismo cinético para a síntese de amoxicilina a partir de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA, usando PGA imobilizada em agarose, baseado em informações de literatura e dados experimentais.	131
Figura 4.3 - Mecanismo cinético sem inibição do tipo misto por 6-APA para a síntese de amoxicilina catalisada por PGA.	134
Figura 4.4 – Topologia de rede neural multicamadas utilizada neste trabalho....	137
Figura 4.5 – Modelo de elemento processante da rede neural: neurônio artificial. (Cruz, 1996).	138
Figura 4.6 - Síntese cineticamente controlada de amoxicilina, onde AB = éster metílico de p-hidroxifenilglicina, AOH = p-hidroxifenilglicina e AN = amoxicilina.	139
Figura 5.1 – Velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e de amoxicilina em função da concentração de substrato, a diferentes pHs e temperaturas.	144
Figura 5.2 - Hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina na presença e na ausência de amoxicilina: dados experimentais e modelo cinético.	145
Figura 5.3 - Hidrólise de amoxicilina na presença e na ausência de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA: dados experimentais e modelo cinético.....	146
Figura 5.4 - Dados de síntese de amoxicilina para diferentes valores de concentração inicial de núcleo.	146

Figura 5.5 - Hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina a 4°C e pH = 7,5 e 6,5.....	148
Figura 5.6 - Hidrólise de amoxicilina a 4°C e pH = 7,5 e 6,5	148
Figura 5.7 - Síntese de amoxicilina: pH=7,5, T= 25°C e 5ml de derivado 10UI/ml.....	149
Figura 5.8 - Síntese de amoxicilina: pH=6,5, T= 25°C e 3ml de derivado 30UI/ml.....	149
Figura 5.9 - Síntese de amoxicilina: pH=6,5, T= 25°C e 3ml de derivado 30UI/ml, alta concentração inicial de éster.	150
Figura 5.10 - Síntese de amoxicilina: pH=6,5, T= 25°C e 4ml de derivado 400UI/ml.	150
Figura 5.11 – Rendimento de síntese de amoxicilina para diferentes condições de reação – resposta do modelo matemático.	152
Figura 5.12 – Representação esquemática de um meio bifásico aquoso.....	153
Figura 5. 13 – Rendimento de síntese de amoxicilina em meio bifásico aquoso.	154
Figura 5.14– Gel de agarose 6BCL partícula pequena.	155
Figura 5.15 – Concentração adimensional de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA em função do tempo para diferentes velocidade de agitação.	156
Figura 5.16 – Concentração adimensional de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA em função do tempo para diferentes diâmetros de partículas e concentração de enzima na matriz e tamanho de poro.....	157

Figura 5.17 – Síntese de Amoxicilina: 25°C pH 6,5 e 3ml de derivado 200UI/ml _{gel}	160
Figura 5.18 – Síntese de Amoxicilina: 25°C pH 6,5 e 4ml de derivado 200UI/ml _{gel}	160
Figura 5.19 – Síntese de Amoxicilina: 25°C, pH 7,5 e 3ml de derivado 200UI/ml _{gel}	161
Figura 5.20 – Teste de consistência do modelo reativo-difusivo.	163
Figura 5.21 – Síntese de amoxicilina: 25°C, pH = 7,5 e 5ml de derivado 10UI/ml _{gel}	163
Figura 5.22 – Fator de efetividade (η) para derivados com diferentes cargas de enzima imobilizada.	164
Figura 5.23 – Gráfico de Lineweaver-Burk para velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina na presença de 6-APA a 25°C e pH = 7,5, catalisada por penicilina G acilase imobilizada.	166
Figura 5.24 – Gráfico de Dixon para hidrólise de amoxicilina na presença de 6-APA a 25°C e pH = 7,5, catalisada por penicilina G acilase imobilizada.....	166
Figura 5.25– Gráfico de Dixon para a hidrólise de PHPGME na presença de metanol a pH 7,5 e 25°C.	167
Figura 5.26 – Gráfico de Dixon para a hidrólise de amoxicilina (Amox) na presença de metanol a pH 7,5 e 25°C.	168
Figura 5.27 – Gráficos de Dixon para hidrólise de POHPGME na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.	170

Figura 5.28 – Gráficos de Dixon para hidrólise de amoxicilina (Amox) na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.	170
Figura 5.29 – Hidrólise de POHPGME na ausência e na presença de metanol (I) a 25°C e pH 7,5.	173
Figura 5.30 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de metanol (I) a pH 6,5 e 25°C.	174
Figura 5.31 - Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de metanol a pH 6,5 e 25°C.	174
Figura 5.32 – Hidrólise de POHPGME na ausência e na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.	175
Figura 5.33 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.	175
Figura 5.34 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 6,5 e 25°C.	176
Figura 5.35 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de 6-APA a pH 7,5 e 25°C.	177
Figura 5.36 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de 6-APA a pH 6,5 e 25°C.	178
Figura 5.37 - Hidrólise enzimática de amoxicilina na presença de éster (inibidor competitivo: K_{iAB}) a pH 6,5 e 25°C.....	179

Figura 5.38 - Hidrólise enzimática de amoxicilina (AN) na presença de éster (inibidor competitivo: K_{iAB}) a pH 6,5 e 25°C.	179
Figura 5.39 – Hidrólise enzimática de éster metílico de p-hidroxifenilglicina na presença de amoxicilina (inibidor competitivo: K_{iAN}) a 25°C e pH 6,5.....	180
Figura 5.40 – Fração da velocidade de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações de 6-APA a pH =7,5 e 25°C: estimativa de K_{EN} e T_{max}	181
Figura 5.41 – Fração da velocidade de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações de 6-APA a pH =6,5 e 25°C: estimativa de K_{EN} e T_{max}	182
Figura 5.42 – Síntese de amoxicilina a pH 7,5 e 25°C: 1g de derivado 30IU/ml, $C_{AB} = 10\text{mM}$ e $C_{NH} = 5\text{mM}$	183
Figura 5.43 - Síntese de amoxicilina a pH 7,5 e 25°C: 1g de 30IU/ml derivative $C_{AB} = 5\text{mM}$ e $C_{NH} = 5\text{mM}$	183
Figura 5.44 - Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g de derivado 30IU/ml, $C_{AB} = 80\text{mM}$ e $C_{NH} = 100\text{mM}$	184
Figura 5.45 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g de derivado 30IU/ml, $C_{AB} = 20\text{mM}$ e $C_{NH} = 60\text{mM}$	184
Figura 5.46 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g de derivado 30IU/ml, $C_{AB} = 30\text{mM}$ e $C_{NH} = 30\text{mM}$	185
Figura 5.47 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g de derivado 30IU/ml, $C_{AB} = 80\text{mM}$ e $C_{NH} = 5\text{mM}$	185
Figura 5.48 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g de derivado 30IU/ml, $C_{AB} = 80\text{mM}$ e $C_{NH} = 20\text{mM}$	186

Figura 5.49 – Efeito de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima durante síntese de amoxicilina a 25°C e pH =7,5.	187
Figura 5.50 – Efeito de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima durante síntese de amoxicilina a 25°C e pH =6,5.....	187
Figura 5.51 – Efeito de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima durante síntese de amoxicilina a 25°C e pH =6,5.....	188
Figura 5.52 – Influencia da concentração de 6-APA nas velocidades iniciais de formação de amoxicilina e p-hidroxifenilglicina na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase a 25°C, em tampão fosfato (pH =6,5) e $C_{AB} = 80\text{mM}$	191
Figura 5.53 – Síntese de amoxicilina com enzima livre: $C_{N0} = 10\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C.....	192
Figura 5.54 – Síntese de amoxicilina com enzima livre: $C_{N0} = 25\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C.....	193
Figura 5.55 - Síntese de amoxicilina com enzima livre: $C_{N0} = 100\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C.....	193
Figura 5.56 - Síntese de amoxicilina com enzima imobilizada: $C_{N0} = 100\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C.....	194
Figura 5.57 - Síntese de amoxicilina com enzima imobilizada: $C_{N0} = 30\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C.....	194
Figura 5.58 - Síntese de amoxicilina com enzima imobilizada: $C_{N0} = 5\text{mM}$195	
Figura 5.59 - Produção de ácido durante síntese de amoxicilina com enzima imobilizada e diferentes concentrações iniciais de núcleo.....	195

Figura 5.60 - Ajuste do modelo cinético mecanístico a dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C.....	198
Figura 5.61 - Comparação do modelo cinético mecanístico com dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C, com NH constante.....	199
Figura 5.62 - Ajuste do modelo cinético mecanístico (equação **) a dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C..	200
Figura 5.63 - Comparação do modelo cinético mecanístico com dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C, com NH constante.	201
Figura 5.64 – Treinamento da rede com velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (na presença e na ausência de 6-APA, amoxicilina e p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,046 \text{ mM/min}$).....	203
Figura 5.65 – Velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (na presença e na ausência de 6-APA, amoxicilina e p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: Treinamento da rede.....	203
Figura 5.66 – Treinamento da rede com velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina (na presença e na ausência de 6-APA e p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,039 \text{ mM/min}$).	204

Figura 5.67 – Velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina (na presença e na ausência de 6-APA, p-hidroxifenilglicina e éster metílico de p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: treinamento da rede.	204
Figura 5.68 – Treinamento da rede com velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,05 \text{ mM/min}$).....	205
Figura 5.69 – Velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: treinamento da rede.	205
Figura 5.70 – Gráfico de dispersão para validação da rede com velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina a pH 6,5 e 25°C: as linhas pontilhadas representam o desvio padrão ($\sigma = 0,046 \text{ mM/min}$) da medida.....	206
Figura 5.71 – Velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina a pH 6,5 e 25°C: validação da rede.	206
Figura 5.72 –Validação da rede com velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,039 \text{ mM/min}$).	207
Figura 5.73 – Velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: validação da rede.	207
Figura 5.74 –Validação da rede com velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e	

a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,05 \text{ mM/min}$).	208
Figura 5.75 – Velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: validação da rede.	208
Figura 5.76 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 100 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 80 \text{ mM}$: validação da rede.	209
Figura 5.77 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 20 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 80 \text{ mM}$: validação da rede.	210
Figura 5.78 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 30 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 30 \text{ mM}$: validação da rede.	210
Figura 5.79 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 5 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 80 \text{ mM}$: validação da rede.	211
Figura 5.80 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 12 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 40 \text{ mM}$: validação da rede.	211
Figura 5.81 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 5 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 30 \text{ mM}$: validação da rede.	212
Figura 5.82 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 60 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 20 \text{ mM}$: validação da rede.	212
Figura 5.83 – Região delimitada para o treinamento da rede para a síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C.....	214
Figura 5.84 – Região delimitada para o treinamento da rede para a síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C.....	215

Figura 5.85 – Localização dos Dados usados na validação da rede dentro da região delimitada no treinamento: síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C: ● dados usados no treinamento das redes e ▲ dados usados na validação.....	216
Figura 5.86 – Localização dos Dados usados na validação da rede dentro da região delimitada no treinamento: síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C: ● dados usados no treinamento das redes e ▲ dados usados na validação.....	217
Figura 5.87 – Erro de predição da rede ($\text{Erro} = \Sigma(y^{\text{calculado}} - y^{\text{experimental}})^2$) em função do número de neurônios para os n conjuntos de dados utilizados para a validação a pH 7,5 e 25°C.	219
Figura 5.88 – Erro de predição da rede ($\text{Erro} = \Sigma(y^{\text{calculado}} - y^{\text{experimental}})^2$) em função do número de neurônios para os n conjuntos de dados utilizados para a validação a pH 6,5 e 25°C.....	219
Figura 5.89 – Erro de predição da rede (com 25 neurônios na camada escondida) em função do número de apresentações para síntese de amoxicilina a 25°C e a pH 7,5.	221
Figura 5.90 – Erro de predição da rede (com 20 neurônios na camada escondida) em função do número de neurônios para velocidade de formação/ consumo de amoxicilina a 25°C e a pH 6,5.	222
Figura 5.91 – Erro de predição da rede (com 20 neurônios na camada escondida) em função do número de neurônios para velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina durante síntese de amoxicilina a 25°C e a pH 6,5.	222
Figura 5.92 – Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, para o treinamento da rede a pH 7,5.	223

Figura 5.93 – Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, para o treinamento da rede a pH 6,5.....	223
Figura 5.94 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 4 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 35 \text{ mM}$, 25°C e pH 7,5.....	224
Figura 5.95 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 4,47 \text{ mM}$, 25°C e pH 7,5.....	224
Figura 5.96 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 66 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 35 \text{ mM}$, 25°C e pH 7,5.....	225
Figura 5.97 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 66 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 5 \text{ mM}$, 25°C e pH 7,5.....	225
Figura 5.98 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 30 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 26,7 \text{ mM}$, 25°C e pH 7,5.....	226
Figura 5.99 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 30 \text{ mM}$, 25°C e pH 6,5.....	226
Figura 5.100 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 40 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 80 \text{ mM}$, 25°C e pH 6,5.....	227

Figura 5.101 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 80 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	227
Figura 5.102 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 20 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 40 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	288
Figura 5.103 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 40 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 30 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	228
Figura 5.104 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 30 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 30 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	229
Figura 5.105 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 100 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 80 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	229
Figura 5.106 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 100 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 40 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	230
Figura 5.107 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 55 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 55 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	230
Figura 5.108 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 12 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 40 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$	231

Figura 5.109 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6-APA0} = 5$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 55$ mM, 25°C e pH 6,5.....	232
Figura 5.110 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6-APA0} = 10$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 55$ mM, 25°C e pH 6,5.	232
Figura 5.111 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6-APA0} = 20$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 80$ mM, 25°C e pH 6,5.	233
Figura 5.112 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6-APA0} = 78$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 35$ mM, 25°C e pH 6,5.	233
Figura 5.113 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6-APA0} = 5$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 15$ mM, 25°C e pH 7,5.	234
Figura 5.114 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6-APA0} = 5$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 30$ mM, 25°C e pH 7,5.....	234
Figura 5.115 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6-APA0} = 66$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 20$ mM, 25°C e pH 7,5.	235
Figura 5.116 - Seletividade da reação de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.....	237

Figura 5.117 - Seletividade da reação de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5, em função da concentração inicial de núcleo.	237
Figura 5.118 - Seletividade (S_{AN}) em função da concentração inicial de éster, síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.	238
Figura 5.119 - Concentração de máxima de amoxicilina formada na síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.	238
Figura 5.120 - Concentração de éster consumido no ponto de máxima concentração de amoxicilina durante síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.	239
Figura 5.121 - Concentração de ácido formado no ponto de máxima concentração de amoxicilina durante síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.....	239
Figura 122 - Concentração máxima de amoxicilina durante síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.	240
Figura 5.123 - Rendimento de síntese de amoxicilina (R_{NH}) a 25°C e pH 6,5....	241
Figura 5.124 - Produtividade de amoxicilina (P_{AN}) durante síntese a 25°C e pH 6,5.	242
Figura 5.125 - Produtividade de amoxicilina (P_{AN}) em função da concentração de 6-APA, durante síntese a 25°C e pH 6,5.	243
Figura 5.126 - Produtividade de amoxicilina (P_{AN}) em função da concentração de enzima no reator para concentração de éster e 6-APA fixas a 25°C e pH 6,5.....	244

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Valores de pK em água para ampicilina, Hou e Poole (1969).....	12
Tabela 2.2 – Valores a aparentes de pk em diferentes misturas de solventes.	12
Tabela 2.3 – Mecanismos de reação enzimática com múltiplos substratos.....	45
Tabela 2.4 – Exemplos de aplicações industriais de enzimas imobilizadas [Messing, (1975), Chibata (1978) e Trevan (1980)].....	48
Tabela 2.5 - Coeficientes de difusão molecular e efetiva para Penicilina G em diferentes suportes.....	53
Tabela 2.6 – Antibióticos semi-sintéticos que podem ser produzidos pela acilação de 6-APA, 7-ADCA, 7-ACA por PGA [Shewale et al. (1990)].....	56
Tabela 2.7 - Solubilidade em água de p-hidroxifenilglicina, 6-APA e de amoxicilina a 25°C.....	75
Tabela 2.8 – Parâmetros cinéticos da pencilina amidase [Balasingham et al. (1972)].....	79
Tabela 2.9 - Rendimento de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações iniciais de substrato a pH 7 e 25°C [Marconi et al. (1975)].	80
Tabela 2.10 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise de Penicilina G (PG) a pH 7,8 e 37°C [Ospina et al. (1996a)]	87
Tabela 2.11 - Valores de parâmetros obtidos por Rhee et al. (1980).....	88
Tabela 2.12 - Parâmetros cinéticos ótimos para a síntese de benzilpencilina [Svedas et. Al (1980b)].	89

Tabela 2.13 - Comparação de constantes cinéticas entre enzimas solúveis e imobilizadas [Choi et al. (1981)].	90
Tabela 2. 14 - Parâmetros cinéticos envolvidos na síntese enzimática de cefalexina [Nam et al. (1985)]	98
Tabela 2.15 - Parâmetros cinéticos para a Síntese de Cefalexina [Blinkovsky e Markaryan (1993)].	104
Tabela 2.16 – Resumo das Informações Encontradas em Literatura para a Síntese de Antibióticos Semi-sintéticos....	106
Tabela 5.1– Parâmetros estimados, com 95% de intervalo de confiança, 25°C..	147
Tabela 5.2 – Parâmetros estimados, com 95% de intervalo de confiança, 4°C...	147
Tabela 5.3 – Coeficientes de partição para o sistema bifásico aquoso.....	153
Tabela 5.4 - Agarose 6 BCL (partículas pequenas)...	155
Tabela 5.5 - Agarose 10 BCL (partículas pequenas).....	155
Tabela 5.6 – Condições experimentais escolhidas para o estudo cinético da síntese enzimática de amoxicilina... ..	158
Tabela 5.7 – Difusividades efetivas estimadas nos poros de gel de agarose e difusividade molecular em água calculada pelo método de Wilke-Chang [Reid et al. (1987)]... ..	159
Tabela 5.8 – Difusividades Efetivas estimadas por diferentes autores.....	161
Tabela 5.9 – Efeito inibitório do 6-APA, relatos na literatura.....	165
Tabela 5.10 – Parâmetros cinéticos para equação de Michaelis-Menten a 25°C.....	172
Tabela 5.11 – Constantes de inibição por Metanol (K_{iMeOH}) para diferentes reações enzimáticas a 25°C.....	173

Tabela 5.12 – Constantes de inibição competitiva (K_{iAOH}) para hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (POHPGME), amoxicilina, éster metílico de fenilglicina (PGME) e cefalexina.....	176
Tabela 5.13 – Constantes de inibição não competitiva (K_{i6-APA}) para hidrólise de amoxicilina a pH 6,5 e 7,5 e 25°C.....	177
Tabela 5.14 – Constantes de inibição competitiva a 25°C, estimadas com 95% de intervalo de confiança... ..	178
Tabela 5.15 – Parâmetros cinéticos para a síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em agarose (modelo empírico), estimados com 95% de intervalo de confiança.....	182
Tabela 5.16 – Constantes da equação 4.22 estimadas para velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.....	197
Tabela 5.17 – Constantes da equação 4.21 para velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.....	197
Tabela 5.18 – Constantes da equação 4.23 para velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.....	198
Tabela 5.19 – Constantes da equação 4.25: velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.....	200
Tabela 5.20 – Constantes da equação 4.24 para a síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.. ..	201
Tabela 5.22 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C; concentrações iniciais para ensaio em batelada usados no treinamento das redes do modelo híbrido 2.....	213

Tabela 5.23 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C; concentrações iniciais para ensaio em batelada usados no treinamento das redes do modelo híbrido 2.....	214
Tabela 5.24 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C usados na validação das redes neurais (modelo híbrido 2); concentrações iniciais de substrato em ensaios em batelada.....	215
Tabela 5.25 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C usados na validação das redes neurais (modelo híbrido 2); concentrações iniciais de substrato em ensaios em batelada.....	216
Tabela 5.26 – Número de neurônios na camada escondida e número de apresentações adotadas para o treinamento das redes para velocidade de formação/consumo de amoxicilina e velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina durante síntese do antibiótico a 25°C – Modelo Híbrido 2...	221
Tabela 5.27 - Otimização da concentração inicial de substrato na síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.....	236
Tabela 5.28 - Otimização da concentração inicial de substrato na síntese de amoxicilina a 25°C e pH 7,5.....	236

Nomenclatura

AMOX	Amoxicilina;
AB	Doador de acil (Éster metílico de p-hidroxifenilglicina);
AN	Antibiótico (amoxicilina);
AOH	p-hidroxifenilglicina;
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico;
BH	Metanol;
C_i	Concentração de i (mM);
D_{ei}	Difusividade Efetiva (cm^2/s).
\underline{d}_i	Vetor de saída desejada para a rede neural;
EH	Atividade enzimática (IU);
HPLC	Cromatografia Líquida de alta precisão;
I_{AOH}	Concentração de inibidor competitivo (mM);
I_{MeOH}	Concentração de inibidor não competitivo (mM);
k_{cat}	Constante de primeira ordem ou “turnover”(mM/min IU);
K_m	Constante de Michaelis Menten (mM);
k_{AB}	Constante de inibição por éster;
k_{AN}	Constante de inibição por amoxicilina;
k_{AOH}	Constante de inibição por AOH (mM);
k_{MeOH}	Constante de inibição por MeOH (mM);
k_{IN}	Constante de inibição por núcleo
MeOH	Metanol

NH	Núcleo β -lactâmico (6-APA);
$\Delta P/\Delta t$	Velocidade de formação de produto (mM/min)
$\Delta S/\Delta t$	Velocidade de consumo de substrato (mM/min)
PG	Fenilglicina;
PGA	Penicilina G acilase;
PGME	Éster Metílico de fenilglicina;
POHPG	p-hidroxifenilglicina
POHPGME	Éster Metílico de p-hidroxifenilglicina
R_p	Raio da partícula;
S	Concentração de substrato (mM);
SDS	Lauril Sulfato de Sódio;
T_{max}	Taxa de conversão máxima do complexo acil-enzima-núcleo em produto;
V	Velocidade de reação (mM/min);
V_{AN}	Velocidade de formação/consumo de amoxicilina: $V_{AN} = V_s - v_{h2}$;
V_{AOH}	Velocidade de formação de POHPG: $V_{AOH} = v_{h1} + v_{h2}$
V_{max}	Velocidade máxima (mM/minIU) = $k_{cat} \cdot EH$
v_{h1}	Velocidade de hidrólise de doador de acil (mM/min)
v_{h2}	Velocidade de hidrólise de antibiótico (mM/min)
v_s	Velocidade de síntese de antibiótico (mM/min)
\underline{W}_1 e \underline{W}_2	Vetores peso para a rede neural;
X	Fração de enzima saturada com o núcleo;
\underline{x}_i	Vetor de entrada da rede neural;
\underline{Y}	Vetor de saída da rede neural;

Letras Gregas

ε	Diferença entre o valor desejado e o valor previsto pela rede neural;
ε_r	Porosidade do leito;
ε_g	Porosidade do gel;
Φ	Função SQE (Soma dos Quadrados dos Erros);
ζ	Raio adimensional: $\zeta = r/R_p$;
v	Velocidade de reação;

Capítulo 1 – Introdução

Este trabalho é parte de uma linha de pesquisa que objetiva estudar a produção de antibióticos semi-sintéticos por rotas enzimáticas, atualmente em andamento no Departamento de Engenharia Química da universidade Federal de São Carlos em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Catálise e Petroquímica (ICP-CSIC), Madri, Espanha. O escopo deste trabalho de pesquisa é contribuir para esse objetivo, levantando o mecanismo das reações envolvidas, desenvolvendo e implementando em computador modelo matemático do sistema reativo-difusivo em estudo.

Antibióticos β -lactâmicos constituem um grupo de substâncias caracterizadas pela presença de um grupamento químico denominado anel β -lactâmico. Este anel é o responsável pela atividade antimicrobiana desses antibióticos e seu rompimento, em qualquer ponto, resulta em perda da ação antibacteriana da droga. Duas das mais importantes famílias de antibióticos - as penicilinas e as cefalosporinas - fazem parte deste grupo. Após a descoberta do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), em um curto espaço de tempo, pesquisas em diversos laboratórios resultaram na descoberta de penicilinas semi-sintéticas com propriedades diferentes da penicilina G. No mundo atual, a pesquisa em torno deste tema se revela crescente e necessária, considerando que , além do seu emprego como agentes terapêuticos em medicina humana e veterinária, os antibióticos são também utilizados para evitar infecções e, conseqüentemente, promover ganho ponderal e rápido crescimento de animais criados para a

alimentação humana, bem como para proteção contra deterioração de alimentos congelados, resfriados ou em conservas, no combate a ervas daninha e na preservação de plantas e na esterilização de meios laboratoriais [Tavares (1994)].

Atualmente, a produção industrial de antibióticos semi-sintéticos é feita por síntese química, um processo complexo que requer a utilização de grupos de proteção facilmente removíveis para evitar reações laterais, o que implica condições anidras (solventes orgânicos), temperaturas muito baixas (-30°C), derivados altamente reativos de fenilglicina e o uso de reagentes tóxicos como piridina, dimetilnilina e diclorometano [Ospina et al. (1996a); Croci et al. (1980a); Grossman et al. (1976)].

A via enzimática, no entanto, vem despertando um grande interesse nas últimas décadas devido a boas propriedades catalíticas. As enzimas são proteínas especializadas na catálise de uma reação metabólica, em condições suaves de temperatura e pressão (condições biológicas) e, portanto, são indicadas para processos cujos substratos sejam lábeis. Além disso, garantem condições meio-ambientais muito limpas. O alto peso molecular destas proteínas permite que elas atinjam conformações espaciais específicas, de tal forma que apenas os seus substratos atinjam o centro ativo, onde se encontram com os grupos reacionais da enzima no posicionamento requerido para a reação. Esta característica confere às enzimas grande eficiência catalítica, alta seletividade e elevada especificidade frente ao substrato. Assim, estes biocatalisadores apresentam as seguintes vantagens em relação aos catalisadores químicos:

- Operam em condições amenas de reação (meio aquoso, pH neutro e temperaturas moderadas);
- Não há necessidade de proteção de grupos funcionais, pois a enzima é altamente específica,

- Não há necessidade de utilização de solventes altamente tóxicos, ao contrário da rota química que requer a proteção dos demais grupos reativos dos substratos envolvidos, o que diminui a sua solubilidade e força o uso de solventes orgânicos.

No entanto, apesar das boas perspectivas mencionadas, sua aplicação industrial não é imediata pois as enzimas apresentam algumas peculiaridades que limitam a sua utilização:

- São solúveis em meio de reação e, portanto, torna-se difícil sua separação dos produtos e sua reutilização;
- Costumam ser catalisadores instáveis (frente a pH, temperatura, solventes orgânicos, etc.);
- Algumas enzimas podem apresentar inibição ou alterações alostéricas por interação com substratos, produtos ou outras moléculas;
- Algumas enzimas têm cinética de ordem zero, portanto, as transformações de altas concentrações de substrato são muito lentas;
- Algumas enzimas podem catalisar “in vitro” reações que não realizavam “in vivo” e para as quais não estavam otimizadas.

A imobilização de enzimas a suportes pré-existentes mediante união covalente multipontual consegue resolver, em muitas ocasiões, os problemas aqui mencionados e se relatam excelentes resultados com um grande número de enzimas: tripsina, quimiotripsina, penicilina G acilase, β -galactosidase e termolisina [Hernández-Jústiz (1996)].

A enzima utilizada neste trabalho é penicilina G acilase de *E. coli*. Esta enzima é normalmente utilizada industrialmente na hidrólise de penicilina G ou V para a produção do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), precursor de uma ampla gama de penicilinas semi-sintéticas, entre elas amoxicilina e ampicilina. Estas penicilinas são muito utilizadas pois apresentam melhores propriedades que as

penicilinas naturais e são mais efetivas para o uso oral do que as obtidas unicamente por fermentação porque possuem melhor estabilidade, melhor absorção e originam menos reações laterais. Desde que Cole (1969a) descobriu que esta enzima era também capaz de catalisar a reação de transferência do grupo acil para o núcleo antibiótico, ela vem sendo largamente empregada no estudo da síntese de antibióticos semi-sintéticos.

Existem dois mecanismos para a síntese de produtos de condensação [Kasche (1986)] catalisada por enzimas: a síntese termodinamicamente controlada (STC) e a síntese cineticamente controlada (SCC). A síntese termodinamicamente controlada consiste na reação inversa da hidrólise do antibiótico, ou seja, a condensação direta do doador de acil livre com o núcleo antibiótico. No caso da amoxicilina, por exemplo, seria a condensação direta da p-hidroxifenilglicina com o núcleo antibiótico, 6-APA. Neste processo, a enzima atua acelerando a velocidade da reação até que se alcance o equilíbrio termodinâmico. Esta rota é a mais simples para se obter produtos de condensação pois: a) é uma reação direta entre carboxila e amida, tornando desnecessária a ativação do doador de acil (requerida na síntese cineticamente controlada); b) os rendimentos obtidos são estáveis e constantes; c) pode-se conseguir rendimentos de 100% em relação ao substrato mais caro ou instável, utilizando um excesso do outro substrato; e) simplifica-se o processo de purificação pois só é necessário separar o produto do substrato em excesso. No entanto, esta rota não pode ser utilizada para a síntese de muitos antibióticos β -lactâmicos. Estudos termodinâmicos demonstraram que o equilíbrio na direção da síntese é muito desfavorável para antibióticos semi-sintéticos que possuam um aminoácido como

cadeia lateral. Conseqüentemente, a condensação de fenilglicina e um núcleo β -lactâmico, por exemplo, não pode ser feita de forma eficiente [Youshko et al. (2000)]. Além disso, a penicilina G acilase requer que tanto o grupo carboxílico da p-hidroxifenilglicina quanto o grupo amino estejam descarregados (ela não reconhece substratos com grupos carregados). Por razões termodinâmicas, a síntese é desfavorável em valores altos de pH ($\text{pH} > 7$), pois a concentração da forma desprotonada do ácido é alta. Portanto, sob condições termodinâmicas ótimas, a síntese tem velocidades extremamente baixas [Margolin et al. (1980), Svedas et al. (1980a)].

Desta forma, a síntese cineticamente controlada é a única alternativa para produção enzimática de amoxicilina e, portanto, será a rota utilizada neste trabalho. Na síntese cineticamente controlada catalisada pela PGA, utiliza-se um doador de acil ativado na forma de éster ou amida. Os substratos aqui empregados para a produção de amoxicilina são: éster metílico de p-hidroxifenilglicina (doador de acil) e 6-APA (núcleo β -lactâmico). A reação de síntese cineticamente controlada de antibióticos β -lactâmicos tem ainda alguns problemas a serem superados. Penicilina G acilase (PGA) pode atuar tanto como hidrolase quanto transferase, ou seja, a mesma enzima responsável pela síntese, também catalisa a hidrólise do antibiótico recém-formado e a hidrólise do substrato (éster), resultando em baixo rendimento da reação desejada. Com o propósito de estudar esse sistema complexo e buscar condições otimizadas de rendimento da reação enzimática, pretende-se levantar e implementar em computador modelo cinético para a síntese de amoxicilina a partir de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA usando PGA imobilizada multipontualmente em agarose. Cabe ressaltar que

a existência de diferentes modelos matemáticos contraditórios na literatura e a falta de convergência para um mecanismo comum justificam este trabalho de pesquisa.

O estudo cinético da SCC é uma tarefa difícil pois envolve três reações simultâneas: a desejada (síntese do antibiótico) e duas indesejáveis (hidrólises do substrato éster e do antibiótico recém-formado). Segundo Schultz (1994), desvendar a seqüência de uma reação enzimática é análogo a resolver um crime, em um romance policial. O estudo do comportamento cinético de uma enzima pode ser considerado, portanto, um trabalho de detetive, cheio de desafios e intrigas. Cabe ao cientista fazer as perguntas certas, no momento exato e interpretar as respostas obtidas com sagacidade.

Apesar de todas as dificuldades mencionadas, a busca de um modelo matemático é de grande importância para o estudo deste sistema complexo: faz-se necessário encontrar soluções aos problemas existentes de maneira a viabilizar a implementação da rota enzimática em escala industrial. O conhecimento de um modelo matemático, permitirá a otimização das condições de operação com o intuito de se atingir melhores rendimentos de síntese, seja simulando diferentes propriedades do catalisador (engenharia do catalisador), diferentes propriedades das condições de reação (engenharia da reação) ou diferentes tipos de reatores enzimáticos (engenharia do reator), sem que se façam necessários exaustivos e dispendiosos testes em laboratório.

Com o progresso incessante que tem ocorrido na área computacional, tanto do ponto de vista de velocidade de processamento quanto no de desenvolvimento de softwares para resolução de problemas matemáticos específicos, há uma

tendência crescente na modelagem matemática de se tentar contemplar todos os fenômenos que parecem ocorrer no sistema. Na prática, deve-se ter em mente que quanto maior a sofisticação do modelo maior o número de parâmetros envolvidos. Assim, muitas vezes um modelo mais simplificado de um dado processo, onde se consideram apenas os fenômenos mais influentes e cujos parâmetros podem ser preditos com precisão aceitável, pode ser muito mais realístico e trazer mais esclarecimento acerca do sistema em análise.

Por outro lado, sistemas inerentemente complexos onde não se consegue uma boa representação com modelos simplificados são casos clássicos para uso de redes neurais. Nessa abordagem, cuja estrutura de modelagem busca em algum nível refletir o que se conhece sobre o modo de funcionamento do cérebro humano, é possível obter boas representações matemáticas de situações complexas.

Na modelagem matemática das reações de síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em agarose, trabalho aqui realizado, seguiu-se exatamente o caminho acima traçado. Iniciamos a tarefa com um modelo simplificado, aqui denominado empírico, cujo desempenho, embora razoável para algumas condições operacionais, não se mostrou válido para toda a faixa estudada. Tentou-se então elaborar modelo mecanístico mais completo incorporando todas as informações disponíveis sobre as reações em estudo, o que resultou em um sistema matemático excessivamente complexo. Novas tentativas de simplificações, agora sobre o modelo mecanístico, também não conseguiram representar o sistema reacional em toda faixa de operação experimental. Utilizou-se então a modelagem com redes neurais, com que se obteve afinal a

representação do sistema em todas as condições testadas. Finalmente, um modelo híbrido foi elaborado através da combinação do modelo cinético fornecido por redes neurais com equações de balanço de massa. Realizando simulações com o modelo híbrido foi possível, assim, encerrar este trabalho com uma análise preliminar do processo de síntese enzimática de amoxicilina em batelada.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2.1 - Antibióticos β -Lactâmicos

Antibióticos são agentes quimioterápicos naturais produzidos por um microrganismo, que em quantidade muito pequena inibem o desenvolvimento de outros microrganismos. Os antibióticos β -lactâmicos incluem penicilinas, monobactâmicos, cefalosporinas e carbapenems. Todos contêm um núcleo básico comum, o *anel β -lactâmico*, que é composto de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. Estes antibióticos afetam a síntese dos componentes do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Sem a proteção da parede celular, a célula provavelmente morrerá por absorção de água, aumento de volume e conseqüente rompimento.

Existem muitas penicilinas diferentes, mas todas têm uma estrutura central denominada *ácido 6-amino penicilânico* (ver figura 2.1). As diferenças entre as várias penicilinas devem-se às diferenças nas cadeias laterais (parte da molécula além daquela da estrutura central).

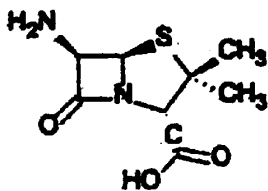


Figura 2.1 - Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA): estrutura principal da penicilina G e comum a todas as penicilinas [Pelczar Jr. et al. (1996)].

Os antibióticos β -lactâmicos importantes comercialmente (figura 2.2) são responsáveis por um faturamento da ordem de bilhões de dólares e detêm a maior

fatia do mercado mundial de antibióticos. De uma produção mundial de 5×10^7 kg/ano, 3×10^7 kg/ano são do grupo de β -lactâmicos [Ghosh et al. (1996)].

Os antibióticos são utilizados principalmente no tratamento de infecções no homem e nos animais. Entretanto, existem alguns antibióticos que são efetivos contra patógenos de plantas e algumas vezes utilizados para o tratamento de doenças de plantas, embora esta prática seja limitada devido ao custo dos antibióticos. Além disso, os antibióticos são utilizados em um número de propósitos não médicos: suplementação de ração animal, inibição de bactérias em culturas de tecidos e em ovos embrionados de galinha que estão sendo utilizados para o cultivo de vírus e preparação de meios de cultura seletivos.

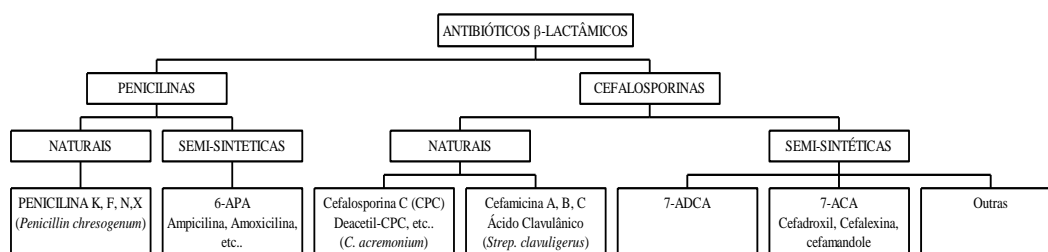


Figura 2.2 - Antibióticos β -lactâmicos importantes comercialmente.

2.1.1 Penicilinas Naturais

Em 1929, Alexander Fleming, um microbiologista que trabalhava no hospital St. Mary em Londres, observou que um fungo pertencente ao gênero *Penicillium* que estava contaminando uma de suas culturas de *Staphylococcus* causou a morte das bactérias que estavam em sua vizinhança. O caldo no qual o fungo cresceu inibiu significativamente o desenvolvimento de diversos microrganismos. Fleming deu o nome de penicilina a este agente antibacteriano. Uma variedade de problemas foi resolvida na década seguinte permitindo a produção em escala de laboratório em quantidade suficiente para atender a testes em pacientes muito doentes que não apresentavam melhora significativa quando

da utilização de outros agentes terapêuticos. A maioria dos problemas de produção em escala industrial foi resolvida durante a segunda guerra mundial. O custo da penicilina quando ela foi colocada no mercado pela primeira vez era 10 a 20 vezes mais do que o seu custo hoje em dia [Marzo e Dal Bo (1998)]. Nos últimos 50 anos, muitas penicilinas foram descobertas e este grupo é hoje uma das classes mais importantes de antibióticos [Nathwani e Wood (1993)].

As penicilinas que são produzidas por microrganismos são denominadas **penicilinas naturais**. Estes antibióticos são produzidos por certas espécies de fungos do gênero *Penicillium*. As duas mais importantes deste grupo são a penicilina G e a Penicilina V. A estrutura básica da penicilina G é um anel tiazolidina (I) conectado a um anel β -lactâmico (II), ao qual uma cadeia lateral (R) está fixa, ver figura 2.3. Alterações químicas ou metabólicas nestes núcleos causa inativação. A única penicilina natural hoje no mercado é a benzilpenicilina [Marzo e Dal Bo (1998)]. Este antibiótico é ainda muito utilizado quando se deseja um rápido efeito ou quando há necessidade de altas concentrações no plasma sanguíneo. A maioria das penicilinas, no entanto, são destruídas no estômago pelo ácido gástrico e não são, portanto, adequadas para administração oral [Nathwani e Wood (1993)].

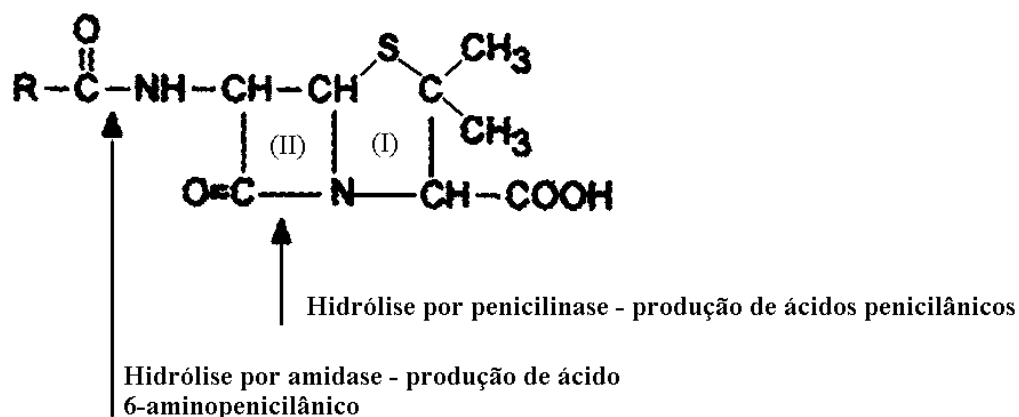


Figura 2.3 - Estrutura molecular da Penicilina G

As penicilinas naturais podem ser destruídas por enzimas denominadas penicilinases. Estas enzimas destroem o anel β -lactâmico do núcleo básico da molécula e por esta razão são também denominadas β -lactamases.

2.1.2 Penicilinas Semi-Sintéticas

Em 1959, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) foi descoberto e sintetizado em quantidades apreciáveis, o que serviu como ponto de partida para a síntese química de diversos derivados da penicilina [Nathwani e Wood (1993)]. O anel central ácido 6-aminopenicilânico pode ser produzido em grande quantidade por fungos por fermentação ou por hidrólise enzimática de penicilina G ou penicilina V. É possível adicionar a este anel central diferentes cadeias laterais, criando novos tipos de penicilinas que não são encontradas na natureza. Estas penicilinas são denominadas *penicilinas semi-sintéticas*, e algumas apresentam vantagens sobre as penicilinas naturais. Por exemplo, a feneticiclina, umas das primeiras penicilinas semi-sintéticas produzidas para uso clínico, é mais facilmente absorvida que a penicilina V.

2.1.2.1 - Amoxicilina

O Ácido 6-[D(-)- α -Amino-p-hidroxifenilacetamido] penicilânico, mais conhecido como amoxicilina, é um importante antibiótico β -lactâmico, que foi primeiramente descrito pela patente Britânica nº 1.382.409 [appud Ward (1987)].

Segundo Louwrier e Knoelest (1997), amoxicilina é um dos antibióticos β -lactâmicos mais usados, devido ao fato da resistência bacteriana a esta substância ser limitada. Além disso, como é um antibiótico de amplo espectro, esta penicilina semi-sintética é aplicável contra uma grande variedade de infecções bacteriológicas. Outra vantagem é que sendo muito estável a pH ácido, pode ser usada por via oral [Tsuji et al. (1978)]. Em torno de 90% do antibiótico é absorvido após administração oral e essa absorção não é significativamente influenciada por alimentação [Nathwani e Wood (1993)].

Amoxicilina consiste de duas partes fundamentais: uma parte que contém o anel β -lactâmico (ácido 6-aminopenicilânico gerado por hidrólise de penicilinas naturais, tais como benzilpenicilina) e a outra metade é a cadeia lateral D-hidroxifenilglicina, ver figura 2.4. Apesar de ser o anel β -lactâmico o responsável pela atividade antibacteriana (por se ligar seletivamente ao resíduo serina da enzima transpeptidase bacteriana), é a cadeia lateral que determina a efetividade da resistência bacteriológica ao antibiótico.

2.1.2.2 A natureza amino ácida da ampicilina, amoxicilina e de outras penicilinas

Hou e Poole (1969) estudaram a natureza de ampicilina e de algumas penicilinas. Observaram que para valores de pH iguais ao do ponto isoelétrico, a ampicilina existe como zwitterions (íons dipolares) e que está é a forma mais

estável e menos solúvel em água. A solubilidade muda pouco com a força iônica a não ser que um solvente não polar seja adicionado. A 25°C em água, o grupo carboxila de todas as penicilinas parece ter o mesmo pK (2,6 – 2,7) enquanto o pH dos grupos amino varia entre 7,24 e 7,65, provavelmente sendo influenciados pelos grupos adjacentes da cadeia lateral. A solubilidade mínima em água da ampicilina ($3,98 \times 10^{-2}$ M) ocorre em pH 4,9 (ponto isoelétrico). Ela é insolúvel na maioria dos solventes e sua solubilidade não é significativamente afetada pelo pH. A tabela 2.1 apresenta valores de pK em água para ampicilina em diferentes temperaturas.

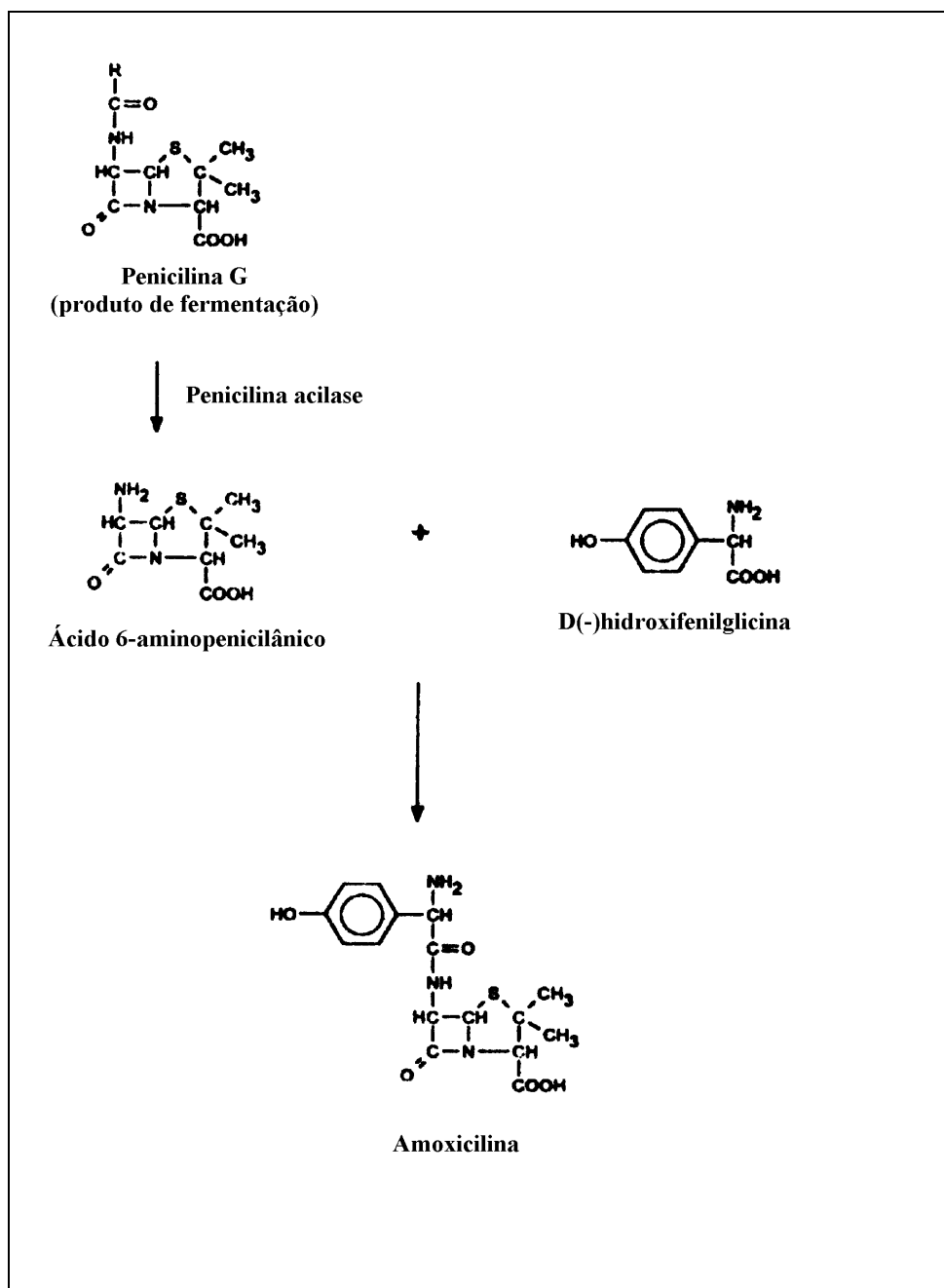


Figura 2.4 - Etapas envolvidas na síntese industrial de amoxicilina [Louwrier e Knoelest (1997)]

Diender et al. (1998a) determinaram os valores de pK em água e solventes orgânicos (ver tabela 2.2). Sendo que PhAc = ácido fenilacético, PenG= penicilina G, p-HPG = p-hidroxifenilglicina e amox = amoxicilina.

Tabela 2.7 – Valores de pK em água para ampicilina, Hou e Poole (1969)

T (°C)	pK1	pK2
5	2,62	-
10	-	7,67
15	2,63	-
20	-	7,39
25	2,66	7,24
	2,64	7,25
30	2,67	-
35	2,68	6,96
	2,69	
45	2,73	6,72

Tabela 2.8 – Valores a aparentes de pK em diferentes misturas de solventes.

Solvente	6-APA		PhAc	PenG	p-HPG		Amox	
	pKa1	pKa2	pKa	pKa	pKa1	pKa2	pKa1	pKa2
Água Pura*	2,5	4,9	4,3	2,5	2,2	9,2	2,9	7,4
Água Pura**	2,6	5,4	-	-	1,96	9,02	2,63	7,16
50% (m/m) glicerol*	2,5	4,8	4,5	2,5	2,2	8,8	-	7,3
50% (m/m) 1-4-butanoldiol*	3,3	4,8	5,2	3,3	2,8	9,2	-	7,2
50% (m/m) N,N-dimetilformamida*	3,9	4,8	6,0	3,9	3,6	9,2	4,5	7,5

* Diender et al. (1998a)

** Rudolph et al. (1999)

2.1.3 Cefalosporinas

As cefalosporinas diferem das penicilinas na estrutura do seu núcleo básico composto pelo *ácido 7-aminocefalosporânico* (7-ADCA). São produzidas por certas espécies de fungos marinhos pertencentes ao gênero *Cephalosporium* (agora reclassificado como *Acremonium*). As cefalosporinas são agrupadas como

produtos de “primeira geração”, “segunda geração” e “terceira geração”. As cefalosporinas de segunda e terceira gerações têm maior atividade antimicrobiana, incluindo atividade de largo espectro, e são muito mais resistentes à inativação enzimática do que os produtos de primeira geração.

2.2 – Rotas de Produção de Antibióticos Semi-Sintéticos

Atualmente, a produção industrial de amoxicilina e outros antibióticos semi-sintéticos é feita por rota química, processo caro e complexo pois envolve temperaturas abaixo de zero (-25°C), a proteção/desproteção de grupos reativos e o uso de solventes orgânicos tóxicos, tal como cloreto de metileno [Ospina et al. (1996a)]. Apesar do alto rendimento, esses processos químicos têm sido criticados pois esses solventes organoclorados podem ser cancerígenos, sendo indesejáveis tanto como resíduo, quanto como impureza presente no produto, mesmo como traços [Diago et al. (1998)].

Estão disponíveis na literatura diversas patentes sobre a produção de antibióticos β -lactâmicos, tais como ampicilina, amoxicilina, cefradroxil, cefalexina entre outros. Duas rotas são normalmente descritas: a síntese química e a síntese enzimática. Hoje em dia, a síntese química é a que vem sendo utilizada industrialmente e possui um alto rendimento, em torno de 80 %. Cada fabricante utiliza um método próprio mas, em geral, estes métodos envolvem a reação do 6-APA, ou um derivado deste ácido (como por exemplo um sal ou um derivado silanizado), com um agente acilante. Este agente acilante é um derivado reativo apropriado do α -aminoácido. O grupo α -amino deste derivado deve ser protegido contra reações laterais fazendo, por exemplo, a substituição de um grupo protetor facilmente removível. Posteriormente, faz-se a remoção deste grupo protetor do

produto para a obtenção da α -aminopenicilina desejada. As patentes que tratam da rota química se concentram nas décadas de 70 e 80, enquanto as que tratam da rota enzimática, na década de 90. Essa maior concentração de patentes sobre a síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos na última década vem a refletir o crescente interesse no processo enzimático, visando a substituição da rota química. Este interesse se deve ao fato das enzimas, como, por exemplo, a penicilina G acilase (PGA), possuírem alta seletividade, especificidade e atividade em condições amenas de reação (meio aquoso, pH neutro e temperaturas moderadas).

Cowley e Martin (1976) descrevem um processo químico para a produção de antibióticos aminopenicilânicos, tais como ampicilina e amoxicilina, que consiste na preparação de uma solução de 6-APA em um meio contendo água e solvente orgânico imiscível, o que é feito a 25°C sob agitação por 1 a 3h. Trata-se, então, esta solução com uma base amina terciária e neutraliza-se o excesso de base com uma solução água-solvente imiscível de um agente acilante, que é uma mistura anidra de um ácido alcoxifórmico e um derivado de um α -aminoácido com os grupos N protegidos, em um intervalo de temperatura de -50°C a +30°C. A temperatura da etapa de neutralização não é crítica e pode ser igual à temperatura ambiente. Recomenda-se o uso de 4-metilfenan metil isobutil cetona para a preparação da solução contendo a mistura anidra de ácido alcoxifórmico. Nessa etapa a temperatura deve estar no intervalo de -10°C a 0°C. Neste momento, já se tem o derivado α -aminoacilpenicilina. A solução resultante é tratada com ácido forte para a remoção dos grupos protetores (que são suscetíveis a ataque ácido) sob resfriamento (0°C). Ácidos fortes que são úteis nesta etapa

são, por exemplo, ácido hidrocloreídrico e ácido toluênico-p-sulfônico. Finalmente, obtém-se a α -aminoacilpenicilina em solução. A seleção de derivado α -aminoácido a ser utilizado é feita de acordo com o produto final desejado. Por exemplo, para a síntese de amoxicilina, deve-se usar um derivado reativo de ácido D-2-amino-2-p-hidroxifenilacético.

Variações desses processos podem ser encontradas na literatura:

- Grossman e Hardcastle, Jr. (1976);
- Stojanovic et al. (1978);
- Bharucha et al. (1981);
- Centellas et al. (1999);

Segundo Diago et al. (1998) os processos usados para a produção de penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas devem necessariamente satisfazer alguns critérios para sua aplicação em escala comercial, tais como: alto rendimento, baixo custo e facilidade de operação. Para satisfazer esses critérios, utilizam-se solventes que contém halogêneos, como por exemplo cloreto de metileno, apesar do fato deles serem difíceis de reciclar ou descartar (por ser agressivo ao meio ambiente). Cloreto de metileno é normalmente utilizado devido à suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, baixo ponto de ebulição (fácil remoção). Seu uso, porém, tem sido largamente criticado ao longo dos anos, por ele não ser biodegradável. Os autores propõem uma rota alternativa, industrialmente viável, para a produção de penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas (tais como ampicilina, amoxicilina, cefalexina e cefadroxil) sem a adição de cloreto de metileno com rendimento superior a 85% e pureza de 98%. No entanto, o processo proposto envolve baixíssimas temperaturas (-55°C).

A rota enzimática de produção de amoxicilina, ampicilina e cefalexina, por exemplo, a partir de 6-APA puro e um derivado de D-fenilglicina (como por exemplo, um alquil éster) é conhecida desde a patente germânica nº 2.163.792. No entanto, até o presente momento, nenhum dos processos descritos na literatura foi implantado em escala industrial. Os principais problemas desses métodos são: concentração de partida (inicial) de 6-APA muito baixa (normalmente menor que 25mM), o que torna a separação do produto formado muito difícil e cara, baixo rendimento de síntese (inferior a 85%) e necessidade de um processo para reutilização do 6-APA não consumido na reação, o que aumenta o custo pois requer um maior número de operações unitárias. Um dos problemas encontrados quando se deseja aumentar a concentração dos substratos é a baixa solubilidade dessas espécies. Para contornar essa situação Kaasgaard et al. (1992) utilizaram concentrações de substrato acima de sua solubilidade de maneira que durante todo o curso da reação eles estivessem presentes na forma sólida (cristalina, amorfa ou outra) e na forma solúvel. Além disso, estes autores utilizaram enzima imobilizada para permitir sua reutilização. Para facilitar a separação da enzima das outras espécies sólidas presentes no meio reacional, os autores utilizaram um biocatalisador com densidade menor que a densidade do líquido. Para conferir esta característica ao catalisador, os autores utilizaram gel de agarose (6%) contendo partículas de vidro (50-75µm). Para a preparação de amoxicilina, por exemplo, Kaasgaard et al. (1992), prepararam uma solução contendo 2,247g de amida de p-hidroxifenilglicina (HPGA) e 0,715g de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) em tampão fosfato 50mM e 25°C. A esta solução, adicionaram-se 2g de catalisador e o pH foi mantido constante por adição de solução de H₂SO₄ 2M.

Após 10 h, a concentração de amoxicilina alcançou um máximo e o meio reacional continha cristais de amoxicilina e HPGA não consumido. A agitação foi desligada, o que permitiu que o catalisador se concentrasse na superfície do líquido e os cristais, no fundo do reator. Os cristais de amoxicilina e o líquido contido no reator foram retirados pelo fundo. O catalisador foi reutilizado após lavagem com água ou tampão fosfato.

Clausen (1995) descreve um processo enzimático para a produção de cefalexina e cefadroxil, a partir de ácido 7-desacetoxicefalosporânico (7-ADCA) e amida de D-fenilglicina e amida de D-p-hidroxifenilglicina, respectivamente. O catalisador utilizado foi enzima imobilizada Eupergit PCA, 100U/g (seca) da Rhom-Pharma ou Penicilina G acilase imobilizada de acordo com o método descrito por Wumpelmann, M. et al. na patente americana nº 4,892,825. A reação foi realizada a 25°C e em diferentes valores de pH (entre 6,4 e 7). Para melhorar a taxa de síntese/hidrólise, que representa a relação entre a quantidade do substrato amida que foi consumido para formar o antibiótico ou D-fenilglicina (produto indesejável de hidrólise do substrato), o autor adicionou 2-naftol ao meio reacional. O rendimento obtido nos experimentos descritos por Clausen foi da ordem de 90%.

Kaasgaard et al. (1996) descreve um processo enzimático de produção de antibióticos β -lactâmicos, como ampicilina, amoxicilina, cefalexina e cefadroxil, a partir de altas concentrações iniciais de substrato (em torno de 450mM). A enzima utilizada pode ser penicilina amidase ou penicilina acilase, classificada como E.C. 3.5.1.11, de preferência em uma forma reutilizável (encapsulada ou imobilizada). Os autores obtiveram um rendimento de 98% para a síntese de

ampicilina e 92% para a síntese de cefalexina a pH 6,4 e 20°C. Para a síntese de amoxicilina utilizando PGA de *E. coli* a pH 6,4 e 30°C, os autores obtiveram 95% de rendimento.

Clausen et al. (1998) descrevem um método enzimático de produção de antibióticos semi-sintéticos (amoxicilina, ampicilina, cefalexina, cefadroxil, entre outros) pela acilação de um núcleo β -lactâmico com um derivado ativado da cadeia lateral ácida do antibiótico e um modulador. Este modulador é uma substância, diferente dos produtos e substratos, que diminui a taxa de hidrólise do derivado ativado da cadeia lateral ácida e do antibiótico. Os autores utilizaram penicilina G acilase imobilizada (Enzygel da Boehringer Mannheim) como catalisador, pH 6 e temperatura de 25°C. As substâncias moduladoras usadas foram: ácido fenoxiacético e ácido fenilacético.

Segundo Clausen et al. (2000) há uma melhora significativa no rendimento de síntese se a reação for realizada a altas e constantes concentrações de substratos. Os valores de concentração destes substratos devem ser maiores que 85% de sua concentração de saturação. A enzima utilizada foi Penicilina G acilase, imobilizada em matriz composta de um polícarboidrato e um polímero contendo grupos amino livres. O pH deve estar entre 5,5 e 6,4 e a temperatura de trabalho deve ser em torno de 20°C, para amoxicilina. O tempo de reação deve ser superior a 5 h e pode chegar a dias ou semanas. Em um exemplo de síntese de amoxicilina, os autores utilizaram 200mmol de 6-APA, 200mmol de éster metílico de D-p-hidroxifenilglicina e 26250U de PGA. O pH foi fixado em 6,1 (mantido constante por adição de ácido sulfúrico 4M). Os substratos foram sendo alimentados ao

reator ao longo do tempo. O rendimento de síntese foi 88% e a razão síntese/hidrólise foi 1,4.

De Vroom (2000) apresenta um processo de produção de derivados β -lactâmicos (amoxicilina, ampicilina, cefadroxil, cefalexina) usando penicilina G acilase imobilizada. A temperatura do processo pode variar de 0 a 35°C e a temperatura ótima depende do substrato utilizado. O valor apropriado de pH depende da natureza e da concentração dos substratos, tipicamente está entre 5 e 9. O autor descreve como exemplo a síntese de amoxicilina: A uma solução aquosa (50ml) contendo 10mM de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 30mM de 6-APA se adiciona 50 unidades de penicilina G acilase a 21°C e pH 6. A reação acontece sob atmosfera de nitrogênio com controle de pH pela adição de uma solução 0,05M de H₂SO₄.

2.3 - Rota Enzimática : Estratégias de Síntese de Antibióticos

β -Lactâmicos

A síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos teoricamente pode ser feita por duas vias: a termodinamicamente controlada, onde temos simplesmente a reação reversa da hidrólise, e a cineticamente controlada, onde usamos um reagente previamente ativado para promover a acilação do núcleo β -lactâmico.

2.3.1 – Síntese Termodinamicamente Controlada (STC)

A síntese termodinamicamente controlada é a reação inversa à reação de hidrólise. Nestes processos, a enzima atua acelerando a velocidade da reação alcançando o equilíbrio termodinâmico. Como se pode observar no esquema da reação (ver figura 2.5), somente as formas não iônicas participam no processo de síntese. A constante termodinâmica do processo é definida pela equação 2.1.

$$K_i = \frac{[Amoxicilina][H_2O]}{[p-OH-fenilglicina][6-APA]}$$

Equação 2.1

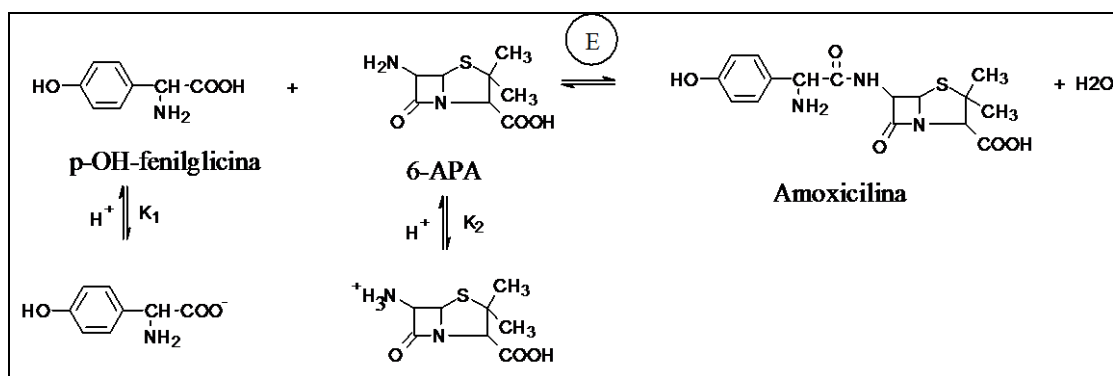


Figura 2.5 - Esquema de reação para a síntese termodinamicamente controlada

Da equação 2.1 se pode deduzir que existem duas opções para melhorar os rendimentos: diminuir a concentração de água (a reação será deslocada no sentido da síntese) ou favorecer a presença de substrato na forma não iônica, atuando sobre as constantes de ionização, de maneira que a constante termodinâmica se aproxime da constante aparente da reação.

Esta rota é a mais simples para se obter produtos de condensação pois:

- É uma reação direta entre carboxila e amida, tornando desnecessária a ativação do doador de acil (requerida na síntese cineticamente controlada);
- Os rendimentos obtidos são estáveis e constantes;
- Pode-se conseguir rendimentos de 100% em relação ao substrato mais caro ou instável, utilizando um excesso do outro substrato;
- Simplifica-se o processo de purificação pois só é necessário separar o produto do substrato em excesso.

Apesar de todas as vantagens mencionadas, esta estratégia requer o uso de solventes orgânicos, que provocam efeitos negativos sobre as propriedades das

enzimas [Sadvige (1984); Mc Dougall et al. (1982); Svedas et al. (1980a)]. A presença destes solventes orgânicos é imprescindível em sistemas monofásicos já que diminuem a concentração de água e favorecem a presença de substrato na forma não iônica (aumento do pK dos grupos carboxílicos).

Apesar das vantagens mencionadas anteriormente, esta rota não pode ser utilizada para a síntese de muitos antibióticos β -lactâmicos. Estudos termodinâmicos demonstraram que o equilíbrio na direção da síntese é muito desfavorável para antibióticos semi-sintéticos que possuam um aminoácido como cadeia lateral. Conseqüentemente, a condensação de fenilglicina e um núcleo β -lactâmico, por exemplo, não pode ser feita de forma eficiente [Youshko et al. (2000)].

2.3.2 Síntese Cineticamente Controlada

Esta rota é uma das mais populares na literatura científica [Fernandez-Lafuente et al. (1991)], pois as suaves condições de reação em que ela é feita permitem a utilização de derivados enzimáticos sem estabilizar ou com estabilidade reduzida. Suas características são [Fernandez-Lafuente et al. (1991) e Kasche (1986)]:

- A enzima atua como hidrolase ou transferase;
- As condições de reação são suaves;
- Requer substratos ativados (AB) na forma de ésteres ou amidas, que normalmente são substratos melhores que os não ativados (AOH);
- As velocidades de reação são elevadas;
- Os rendimentos obtidos são superiores aos do equilíbrio termodinâmico e normalmente são mais rapidamente alcançados mas são transitórios;
- Os rendimentos dependem das propriedades das enzimas (taxa de deacilação, constante de ligação do nucleófilo (K_N), “turnover” (k_{cat}),

constante de Michaelis-Menten (K_m)), dos substratos e das variáveis experimentais (pH, força iônica, presença de solventes orgânicos).

Na síntese cineticamente controlada, o rendimento está condicionado às propriedades da enzima, pois ele é um balanço entre três atividades da mesma enzima: a) síntese do produto (atividade de síntese), b) hidrólise do doador de acil (atividade esterase) e c) hidrólise do produto recém formado (atividade amidase). Assim, mudando a fonte da enzima, o tipo de imobilização, as condições de reação, entre outras variáveis, pode-se esperar uma variação no rendimento. Essa estratégia é uma das mais descritas na literatura para a síntese de amoxicilina, ampicilina entre outros antibióticos. Uma pequena mudança conformacional na estrutura da enzima, sem que haja influência na atividade da enzima em reações simples (como a hidrólise de substratos simples), pode provocar mudanças importantes no comportamento da enzima como catalisadores destes processos. Essas mudanças podem ocorrer tanto na velocidade de reação quanto nos rendimentos máximos de síntese [Fernandez-Lafuente (1995)].

Em contraste com a condensação direta do ácido com o núcleo (rota termodinamicamente controlada), quando o produto vai se acumulando gradualmente até que se atinja o equilíbrio, a transferência do acil do doador para o receptor é governada tanto pela cinética quanto pela termodinâmica, e a curva de acúmulo do produto mostra claramente um ponto de máximo. Na reação de transferência de acil, a água atua também como um nucleófilo e compete pelo doador de acil, que é parcialmente hidrolisado durante o curso de reação. Esta reação de hidrólise é termodinamicamente favorável e supera a reação de transferência do acil para o ácido 6-aminopenicilânico (no caso da ampicilina). Esta perda do doador de acil é uma das desvantagens desta rota e é um dos

motivos pelos quais esta técnica não é empregada industrialmente [Youshko et al. (2000)].

Em consequência da diversidade de variáveis que influenciam esta rota de síntese, é necessário realizar um projeto cuidadoso analisando as propriedades do sistema (pH, temperatura, força iônica, presença de solventes orgânicos), da enzima e do substrato ativado. Ela terá um interesse especial nos casos em que a síntese termodinamicamente controlada pareça muito complicada ou não possa ser utilizada.

Na síntese cineticamente controlada de antibióticos catalisada por penicilina G acilase, utiliza-se um doador de acil ativado (na forma de amida, ou mais comum, de éster) para alcançar um rendimento máximo transitório de produto, normalmente afastado das concentrações de equilíbrio. Na figura 2.6, representa-se o mecanismo pelo qual acontece esta reação. De acordo com dados disponíveis [Fernandez-Lafuente (1991)] parece ser necessário que o nucleófilo se encontre adsorvido no centro ativo da enzima antes da formação do acil-enzima.

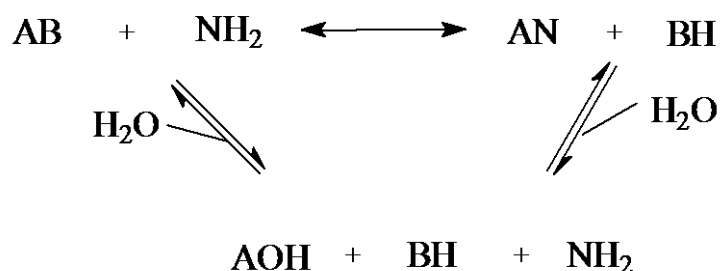


Figura 2.6 - Esquema de síntese cineticamente controlada

Neste caso, o rendimento de síntese será dado por três fatores [Fernandez-Lafuente et al. (1995)]:

1. Porcentagem de moléculas de enzima que tenham adsorvido o anel antibiótico no centro ativo (constante de saturação) pois a reação de transferase só é possível quando o nucleófilo está adsorvido no sítio ativo da enzima;

2. Probabilidade de que o nucleófilo seja capaz de deslocar a água em sua competição pelo acil-enzima. Quando a enzima está saturada de nucleófilo, denomina-se taxa máxima de síntese/hidrólise (T_{\max}) à porcentagem de moléculas de éster que vai para antibiótico.

3. Velocidade de hidrólise do antibiótico formado, que depende das concentrações relativas de produtos e substratos (o nucleófilo e o éster, por exemplo, podem ser um inibidor desta reação).

O resultado obtido com esta rota depende fundamentalmente das propriedades da enzima, também influenciadas pelo meio. Não se deve esquecer que ao mudar as condições do meio pode haver uma alteração nas propriedades da enzima. Esta possível interação enzima-meio costuma ser um fator bastante esquecido mas que pode complicar na interpretação dos resultados.

Por isso, a interpretação de um único resultado pontual é impossível. Deve-se realizar estudos integrados que abranjam os três fatores que delimitam o rendimento para que se consiga uma interpretação adequada de cada nova situação.

Em escala industrial, a síntese cineticamente controlada poderá apresentar alguns problemas derivados da relativa complexidade do processo: ativação prévia do doador de acil, rendimento termodinamicamente instável e dependente do estado do catalisador.

2.3.3 - Síntese de antibióticos β -lactâmicos: rota cineticamente controlada versus rota termodinamicamente controlada

Embora as duas rotas, cinética e termodinamicamente controladas, sejam possíveis para a benzilpenicilina, no caso da amoxicilina, ampicilina e cefalexina, entre outros antibióticos, apenas a cineticamente controlada é possível, pois a enzima requer que tanto o grupo carboxílico da fenilglicina (ou p-hidroxifenilglicina, no caso da amoxicilina) quanto o grupo amino estejam descarregados (ela não reconhece substratos com grupos carregados) e não há nenhum valor de pH que permita a existência das formas apropriadas dos reagentes em concentrações suficientes para que a reação ocorra de forma perceptível. Assim, a síntese enzimática terá que ser feita com um doador de acil ativado - por exemplo, o éster metílico de fenilglicina (para ampicilina e cefalexina) ou o éster metílico de p-hidroxifenilglicina (para amoxicilina) - que reage com o núcleo para gerar o antibiótico. A presença do éster, contudo, gera um complicador adicional, pois este também pode sofrer hidrólise. A figura 2.7 ilustra essa situação para a síntese de ampicilina a partir da união do 6-APA com éster metílico de fenilglicina, catalisada por penicilina G acilase e a figura 2.8, para a síntese de amoxicilina.

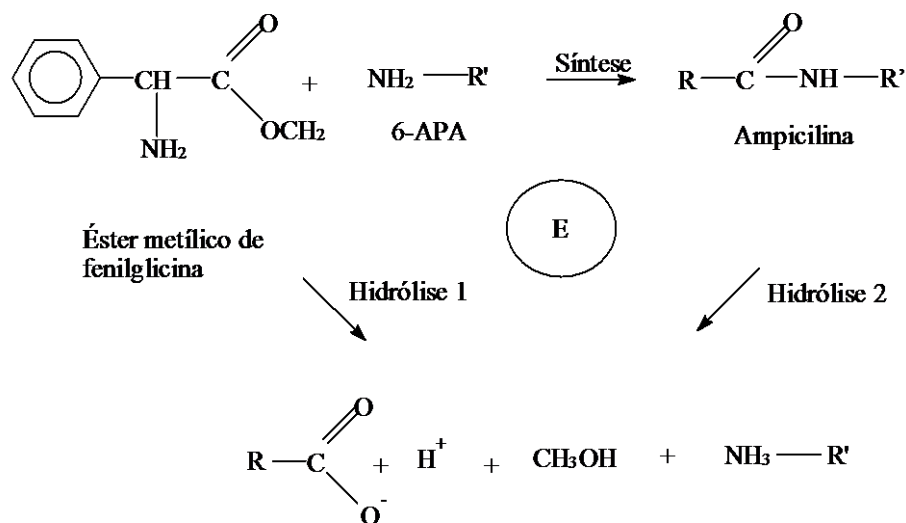


Figura 2.7 - Síntese cineticamente controlada de ampicilina, catalisada por penicilina G acilase.

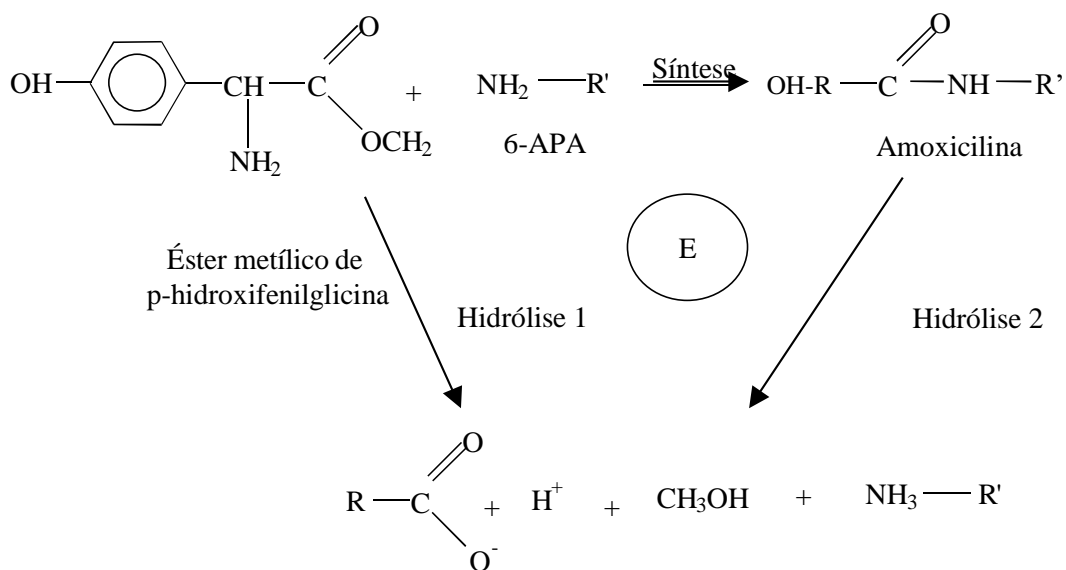


Figura 2.8 - Síntese cineticamente controlada de amoxicilina

Até hoje, numerosas tentativas de sintetizar ampicilina diretamente do ácido livre usando penicilina amidase de *Escherichia coli* falharam. Isto pode ser explicado da seguinte forma: o valor do pK do ácido D-(-)α-aminofenilacético é 9,1. A velocidade máxima da reação não depende da forma do substrato que se liga à enzima, mas Km depende da concentração da forma desprotonada. Isto significa que em pH 6,0, a solução sempre irá conter menos de 0,1% da forma descarregada do substrato, isto é, a forma que torna a reação possível. Além disso,

a síntese é impossível em valores altos de pH ($\text{pH} > 7$) por razões termodinâmicas, quando a concentração da forma desprotonada do ácido é alta. Portanto, sob condições termodinâmicas ótimas, a síntese tem velocidades extremamente baixas [Margolin, et al. (1980), Svedas et al. (1980a)].

Blinkovsky & Markaryan (1993) estudaram aspectos termodinâmicos da síntese enzimática de cefalexina e ampicilina. Observaram que peculiaridades termodinâmicas das ligações amina desses antibióticos tornavam impossível a síntese enzimática diretamente a partir do ácido correspondente e do núcleo mesmo na faixa ácida de pH. Eles comentam que a inabilidade da PGA de *Escherichia coli* de se ligar a substratos carregados não é o maior obstáculo para a síntese de cefalexina diretamente de fenilglicina e 7-ADCA. O maior problema é a ausência de condições termodinâmicas favoráveis e a baixa solubilidade do núcleo para valores ácidos de pH.

Ospina et al. (1996b) comentam que a síntese termodinamicamente controlada de ampicilina é difícil devido à baixa solubilidade do substrato (fenilglicina) e ao baixo valor do pK. No pH onde a enzima é mais estável, a fração não dissociada de fenilglicina é muito baixa, condição requerida para a ligação entre a serina no sítio ativo da enzima e a fenilglicina. Por essa razão, a síntese de ampicilina vem sendo feita a partir de derivados ativados de fenilglicina (síntese cineticamente controlada), em particular éster metílico de fenilglicina.

Fernandez-Lafuente et al. (1996) compararam as duas rotas de síntese para a produção de cefaloglicina e observaram que não houve síntese de antibiótico quando a rota termodinamicamente controlada foi utilizada (em duas condições de pH: 7,5 e 4,5). Os autores concluíram que há uma correlação entre a ionização do

grupo amino da fenilglicina e a queda na atividade enzimática. A incapacidade da enzima em reconhecer derivados de fenilglicina em valores ácidos de pH está relacionada com a ionização da porção acil da molécula: penicilina G acilase parece ser incapaz de utilizar compostos com grupos carregados perto da porção carboxílica. Portanto, do ponto de vista da especificidade da enzima, a síntese de cefaloglicina dever ser realizada em um valor de pH uma ou duas unidades menor que o valor do pK do grupo amino da fenilglicina, isto é, pH entre 7 e 8. Se a constante termodinâmica deste processo for similar a da penicilina G, a síntese termodinâmica seria favorável a pH entre 4,5 e 5. Consequentemente, parece bastante difícil sintetizar cefaloglicina e outros antibióticos, tais como ampicilina e amoxicilina, com boa atividade e altos rendimentos usando a estratégia termodinamicamente controlada.

Diender et al. (1998b) estudaram a possibilidade de se utiliza a síntese termodinamicamente controlada para produção de amoxicilina. Os autores comentam que em água as condições termodinâmicas são mais favoráveis para a hidrólise do que para a síntese do antibiótico. De fato, eles obtiveram concentrações de equilíbrio de amoxicilina muito baixas.

Schroën et ali (1999) estudaram a síntese termodinamicamente controlada de cefalexina acoplada com remoção simultânea do produto e observaram que a baixa concentração de equilíbrio obtida para cefalexina impede este tipo de abordagem. Os autores mediram a concentração de equilíbrio para amoxicilina, cefalexina e cefadroxil e obtiveram valores similares aos obtidos para a cefalexina. Estes resultados mostram que a síntese direta destes antibióticos a

partir de 6-APA ou 7-ADCA e fenilglicina ou p-hidroxifenilglicina é possível, mas as condições termodinâmicas não são favoráveis.

2.4 – Enzimas: catalisadores biológicos

2.4.1 - O descobrimento das enzimas e o desenvolvimento da enzimologia

É difícil fixar o ponto exato em que as enzimas foram descobertas, mas em 1783 observou-se atividade celular quando Spallazani notou que carne era liqüefeita por suco gástrico de gaviões. A partir daí, diversas observações similares foram mencionadas. É atribuída a Payen e Persoz a primeira descoberta de uma enzima. Em 1833, tratando um extrato aquoso de malte com etanol, eles precipitaram uma substância sensível à temperatura, chamada de “diastase”, e que era responsável pela hidrólise de amido. Hoje em dia, esta enzima é conhecida como amilase. Em 1860, Berthelot macerou leveduras e, por precipitação com álcool, obteve um precipitado que convertia sacarose em glicose e frutose, o qual denominou “invertase”. Em 1878, Kühne sugeriu o nome enzima (do grego *ενζυμη*, que significa “na levedura”) e em 1883, Duclaux propôs o sufixo “ase” para designar as enzimas.

2.4.2 – Atividade e inativação de enzimas

A atividade de uma enzima depende de vários fatores, tais como: sua estrutura molecular, pH, força iônica, temperatura, agentes químicos, irradiação entre outros parâmetros. A variação da atividade pode ser reversível ou irreversível, dependendo das condições às quais a enzima foi exposta. A estabilidade operacional de uma enzima em um processo industrial é muito importante, pois afeta o custo do biocatalisador e o custo do bioprocessamento. Portanto, a determinação das condições de inativação de uma enzima é de grande

valia para a engenharia de processos biotecnológicos, especialmente para a otimização de reações enzimáticas. A cinética de desativação é fortemente dependente do pH e da força iônica. A inativação causada pelo pH se deve à incapacidade da enzima em manter sua função biológica em intervalo de pH específico. Portanto, a desnaturação de uma enzima pode se dar em diferentes valores de pH. A atividade de uma enzima pode variar devido a efeitos ativadores ou inibidores de alguns íons e a diferentes forças iônicas. O efeito da força iônica na atividade enzimática é muitas vezes ignorado mas tem ligação direta com o pH. Portanto, a força iônica de uma solução tampão deve ser ajustada utilizando sais neutros e não inibitórios, tais como KCl ou NaCl. Geralmente, sais que aumentam a solubilidade de amino ácidos facilitam a desativação da enzima. Portanto, o ajuste do pH e da força iônica de uma solução contendo enzimas deve ser feito de forma a não afetar a sua estabilidade [Kheirloom et al. (1998)].

2.4.3 – O Sítio Ativo

Para explicar a estereoespecificidade das enzimas, Ogston, em 1948, assinalou que deve haver pelo menos três pontos de interação entre o substrato e a enzima. Estas interações podem ter função de ligação ou catalítica: sítios de ligação se unem a grupos específicos no substrato, assegurando que a enzima e as moléculas de substrato se mantenham numa orientação fixa (uma em relação à outra), com o grupo reacional nas vizinhanças do sítio catalítico. Por exemplo, no esquema mostrado na figura 2.9, os sítios A" e A''' representam sítios de ligação para R" e R''', respectivamente, e A', o sítio catalítico para a reação envolvendo R'. Geralmente, considerações semelhantes se aplicam a enzimas envolvidas em reações com substratos múltiplos. Nesses casos, os grupos reativos de cada substrato são posicionados juntos nas vizinhanças de um ou mais sítios catalíticos da enzima.

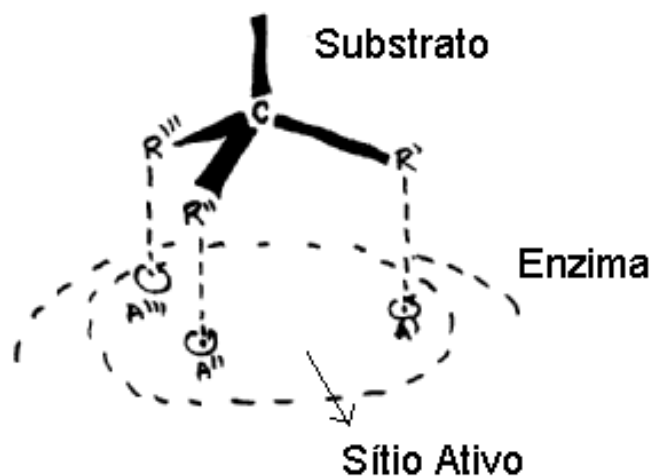


Figura 2.9 – Representação esquemática da interação entre o sítio ativo da enzima e o substrato, segundo Ogston (1948) apud Palmer (1995).

A região que contém os sítios de ligação e catalítico é chamada de sítio ativo ou centro ativo da enzima. Este sítio é apenas uma pequena fração do volume total da enzima e, geralmente, localiza-se perto ou na superfície do catalisador, de maneira a ser mais acessível a todas as moléculas de substrato. Em alguns casos, estudos de difração com raios-X mostraram que há uma bolsa na enzima onde o substrato (ou parte dele) consegue se encaixar.

Apesar do sítio ativo ser normalmente representado no plano, não se pode esquecer que ele é, de fato, uma estrutura tridimensional, uma vez que é formado por porções de uma cadeia polipeptídica. Os resíduos de aminoácidos envolvidos podem estar bem separados na estrutura primária, sendo aproximados no espaço devido aos desdobramentos que a molécula sofre. Os sítios de ligação e catalítico podem ser aminoácidos ou cofatores (ligados a cadeias de aminoácidos). A união enzima-substrato pode envolver uma variedade de ligações (pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, etc.), mas essas ligações são normalmente fracas (isto é,

não covalentes). Os resíduos de aminoácidos que não têm função catalítica ou de ligação podem contribuir para a especificidade da enzima. Sua cadeia lateral deve ter forma e tamanho apropriado para não interferir na ligação do substrato, mas eles podem impedir a ligação de outra molécula, quimicamente similar. O sítio ativo, muitas vezes, tem resíduos polares e não polares de aminoácidos, criando um arranjo de microambientes hidrofóbicos e hidrofílicos, não encontrados em nenhuma outra parte da enzima. Portanto, a função de uma enzima não depende apenas do arranjo espacial dos sítios catalíticos e de ligação mas também do ambiente nos quais estes sítios acontecem.

2.4.4 – A Hipótese "Chave-Fechadura" de Fischer

Por volta do ano de 1890, Fischer sugeriu que a especificidade da enzima implicava na presença de estruturas complementares entre enzima e substrato: o substrato entre em um sítio complementar na enzima assim como uma chave entra na sua fechadura. De acordo com esta teoria, denominada de "*chave e fechadura*", todas as estruturas permanecem fixas durante o processo de ligação, ver figura 2.10.

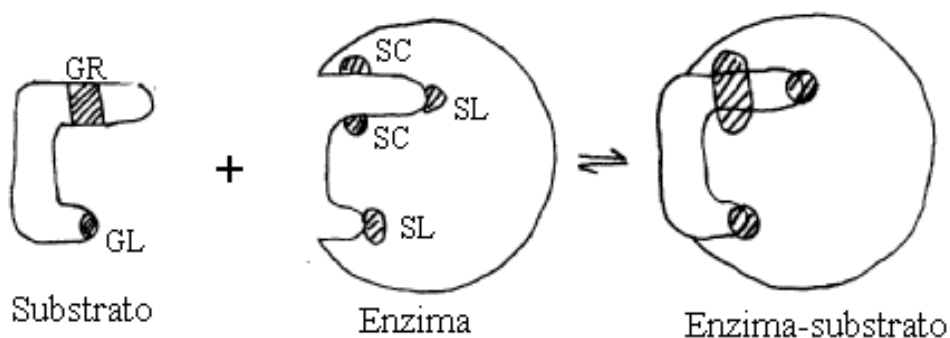


Figura 2.10 – Mecanismo de ligação enzima-substrato segundo a hipótese da chave e fechadura de Fischer, onde GL = grupo de Ligação, GR = Grupo de Reação, SC = Sítio Catalítico e SL = Sítio de Ligação [Palmer (1995)].

2.4.5 – A Hipótese do "Encaixe Induzido" de Koshland

A hipótese "chave-fechadura" explica muitas das características da especificidade enzimática, mas não leva em consideração a conhecida flexibilidade das proteínas. Análises de difração com raios-X e dados de várias formas de espectroscopia (nmr) revelaram diferenças na estrutura de enzimas livres e enzimas ligadas ao substrato. Portanto, a ligação de um substrato à enzima pode causar mudanças conformacionais, ou seja, mudança na estrutura tridimensional, mas não na estrutura primária da proteína. Isto não é surpreendente, uma vez que a união entre o substrato e o sítio de ligação substitui as ligações que existiam entre esse sítio e grupos vizinhos na enzima. Além disso, a presença do substrato no sítio ativo pode excluir moléculas de água e fazer com que a região adquira um caráter mais apolar. Estes fatores podem ser responsáveis pelo grau de mudança que acontece na estrutura terciária.

Koshland, no seu modelo de "encaixe-induzido" de 1958, sugeriu que a estrutura do substrato é complementar à estrutura do sítio ativo do complexo enzima-substrato, mas não é complementar à estrutura do sítio ativo da enzima livre. Uma mudança conformacional acontece na enzima durante a ligação do substrato. A hipótese do "encaixe-induzido" requer que o sítio ativo da enzima seja flexível e que o substrato seja rígido, permitindo que a enzima envolva o substrato, o que aproxima o sítio catalítico dos grupos reativos. No mecanismo chave-fechadura, o sítio catalítico está sempre intacto (sob o ponto de vista estrutural) com o sítio catalítico alinhado e facilmente acessível. Assim, um grupo reativo, que faz parte ou não de um substrato apropriado, pode se aproximar da região catalítica e algum grau de reação pode ocorrer. No mecanismo do encaixe-induzido, por outro lado, grupos catalíticos podem estar separados na enzima, minimizando o risco de uma colisão ao acaso de um grupo reativo com ambos os sítios. Neste mecanismo, quando o grupo de ligação do substrato é reconhecido pelo sítio específico da enzima acontece o processo de ligação. Posteriormente, a enzima (com o substrato

já ligado) passa por mudança conformacional, o que faz com que os grupos importantes para a catálise (presentes na enzima e no substrato) se aproximem, ver figura 2.11.

Um grupo de ligação similar ao existente no substrato pode "enganar" a enzima e causar uma mudança conformacional, mas, em geral, não acontece reação. Isto porque os grupos catalíticos não se posicionam da maneira adequada a favorecer a reação. Este processo é chamado de ligação não produtiva e está representado na figura 2.12.

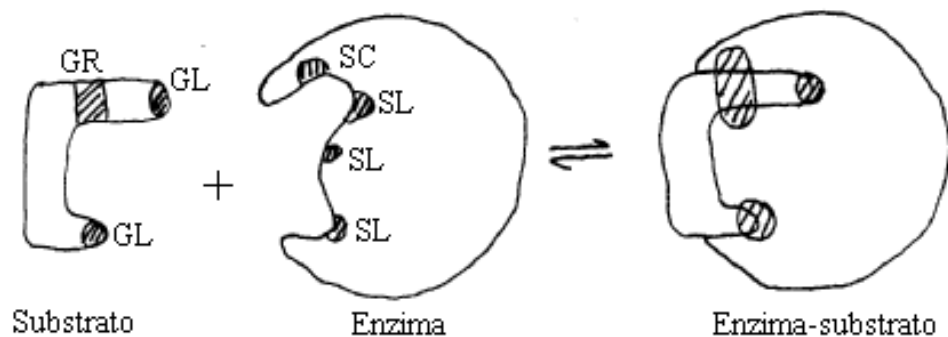


Figura 2.11 – Mecanismo de ligação enzima-substrato segundo a hipótese do "encaixe-induzido" de Koshland, onde GL = grupo de Ligação, GR = Grupo de Reação, SC = Sítio Catalítico e SL = Sítio de Ligação [Palmer (1995)].

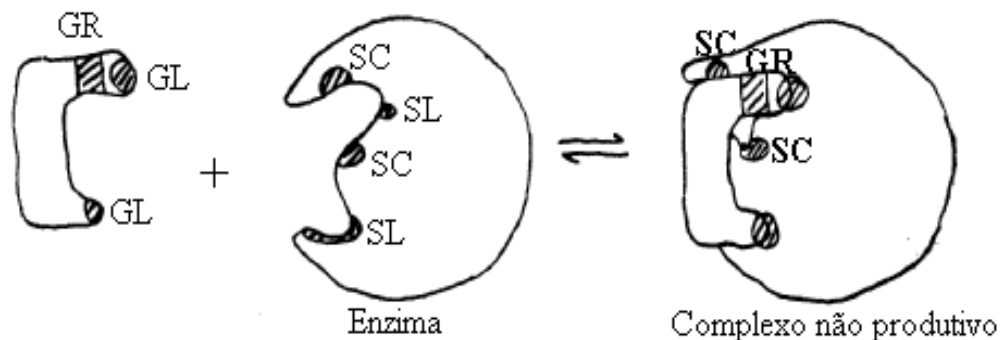


Figura 2.12 - Mecanismo de ligação enzima-substrato segundo a hipótese do "encaixe-induzido" de Koshland: ligação não produtiva, onde GL = grupo de Ligação, GR = Grupo de Reação, SC = Sítio Catalítico e SL = Sítio de Ligação [Palmer (1995)].

2.4.6 – Hipóteses Envolvendo Distorção ou Estabilização por Estado de Transição

Apesar das teorias "chave-fechadura" e "encaixe-induzido" explicarem a especificidade da enzima, nenhuma das duas hipóteses sugere um mecanismo direto para promover a reação. A ligação do substrato envolve o consumo de energia e, a pesar de servir a um importante propósito (que é juntar os grupos catalíticos), mais energia deve ser fornecida para que a reação prossiga. Haldane, em 1930, propôs que se a energia de ligação fosse usada para distorcer o substrato de maneira a facilitar a reação subsequente, então, menos energia seria necessária para que a reação acontecesse. Este conceito foi desenvolvido posteriormente por Pauling (1948). Por exemplo, se assumirmos que a estrutura do sítio ativo é rígida e quase complementar ao substrato (mas não igual), o substrato deve sofrer uma pequena distorção de maneira a se ligar à enzima. Esta distorção vai resultar no estiramento e, portanto, no enfraquecimento da ligação que será quebrada, dando assim continuidade à reação.

De fato, há poucas evidências sobre a ocorrência da ligação distorcida. Uma alternativa mais plausível é um mecanismo de estabilização por estado de transição. Esse mecanismo assume que o substrato se liga de forma não distorcida à enzima. O complexo formado possui uma série de ligações desfavoráveis, o que causa a distorção do substrato de maneira a favorecer a sequência de reações: complexo enzima-substrato → estado de transição → produtos. A medida que a reação acontece, as interações desfavoráveis diminuem e estão ausentes a partir do

estado de transição. A quimotripsina é um exemplo de enzima governada por este mecanismo.

Cabe ressaltar que os mecanismos de ligação induzida e distorção/estado de transição não são mutuamente excludentes. O mecanismo catalítico da papaína, por exemplo, parece envolver uma mudança conformacional na enzima somado a um estado de transição.

2.4.7 – Formação do complexo acil-enzima: mecanismo catalítico da quimotripsina

As proteases são enzimas muito conhecidas e incluem enzimas digestivas (como a quimotripsina) que quebram as proteínas ingeridas em amino ácidos que podem ser absorvidos no intestino. A especificidade das proteases exemplifica um fenômeno geral: a atividade catalítica da maioria das enzimas depende do reconhecimento de grupos específicos do substrato. As serinas proteases, como a quimotripsina, são endopeptidases que atacam a ligação peptídica de certos amino ácidos em uma cadeia protéica, o que causa a quebra desta cadeia em porções menores por hidrólise. A quimotripsina é ativa frente a peptídeos que contenham fenilalanina e tirosina, que são muito parecidos aos substratos da penicilina G acilase.

O modelo estrutural para a quimotripsina, ver figura 2.13, mostra que a enzima é uma proteína globular composta de 3 cadeias polipeptídicas (A, B e C). O sítio catalítico contém uma bolsa hidrofóbica que é forrada por amino ácidos não polares e hidrofóbicos. O anel fenil de fenilalanina e tirosina encaixam muito bem nesta bolsa.

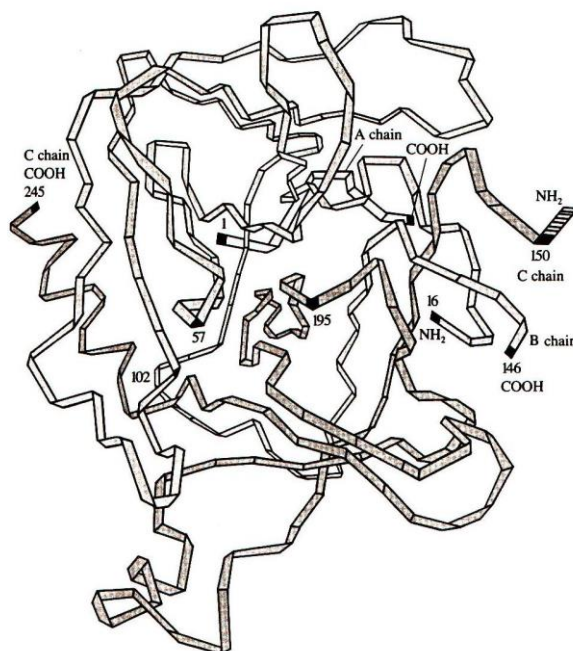


Figura 2.13 – Estrutura tridimensional da quimotripsina, determinada por cromatografia de raio-X [Abeles et al. (1992)].

Em 1953, Hartley e Kilby mostraram que a reação de hidrólise de p-nitrofenil acetato (PNPA) acontece com uma produção rápida inicial de p-nitrofenol, que requer a presença da enzima, seguida de uma liberação linear, de ordem zero, deste produto. Esta produção inicial correspondia a 1 mol de p-nitrofenol por cada mol de enzima. Este resultado sugere que esta produção inicial representa uma reação química do PNPA com a enzima e que a reação global acontece em duas etapas: uma velocidade inicial rápida do substrato com a enzima, que leva a uma liberação estequiométrica de p-nitrofenol, seguida de uma reação mais lenta em estado estacionário que é responsável pela liberação subsequente de p-nitrofenol. A partir destes resultados pode-se concluir que o mecanismo de hidrólise catalisado por quimotripsina é um exemplo de catálise covalente, um mecanismo catalítico no qual um grupo na enzima forma uma ligação covalente com uma parte do substrato para dar uma espécie química

intermediária. Num segundo passo, o intermediário sofre uma transformação para formar produto e regenerar a forma original da enzima.

A reação enzimática da quimotripsina tem duas fases importantes: acilação, onde uma ligação peptídica é quebrada e um éster é formado pela ligação entre o carbono carbonil do peptídeo e a enzima; e deacilação, onde o éster é hidrolisado e a enzima, regenerada. O nucleófilo na etapa de acilação é o oxigênio da serina Ser-195. O hidroxil de uma serina está normalmente protonado a pH neutro, mas no caso da enzima, a Ser-195 está fazendo ponte de hidrogênio com a His-57, que também faz pontes de hidrogênio com o Asp-102. Este três amino ácidos são referenciados como triade catalítica das serinas proteases. Quando o oxigênio da serina ataca o carbono carbonil de uma ligação peptídica, o hidrogênio ligado a His-57 funciona como uma base para abstrair o próton da serina, e o Asp-102 que está negativamente carregado estabiliza a carga positiva que se forma no resíduo histidina. Isto previne o desenvolvimento de uma carga positiva instável na serina e aumenta a sua nucleoficidade. A His-57 pode também atuar como doador de próton para o grupo amino protonado na porção deslocada da molécula de substrato (primeiro produto liberado). Conforme o oxigênio da serina ataca o grupo carbonil do substrato, atingi-se um estado de transição no qual o oxigênio carbonil adquire carga negativa. Esta carga é formada em uma bolsa da enzima chamada de buraco oxiânico, e é estabilizada por pontes de hidrogênio com moléculas de nitrogênio do esqueleto da proteína. A figura 2.14 mostra os passos envolvidos na quebra de um peptídeo por quimotripsina. O substrato (polipeptídeo ou proteína) se liga ao sítio ativo. A ligação peptídica a ser quebrada se posiciona pela ligação da cadeia lateral hidrofóbica (um resíduo fenil,

por exemplo) em uma bolsa hidrofóbica especial da enzima. A reação consiste de duas etapas: (a) a (c) formação de um intermediário acil-enzima covalente com a quebra da ligação peptídica (fase de acilação) e (d) a (g), deacilação para regenerar a enzima livre (etapa de deacilação). Em ambas as fases, o oxigênio carbonil do substrato adquire carga negativa no estado de transição. A carga é estabilizada por ponte de hidrogênio com os nitrogênios amida do Gly-193 e Ser-195; a ponte de hidrogênio com o Gly-193 se forma apenas no estado de transição. A deacilação é essencialmente o inverso da acilação, com uma molécula de água tomando o lugar do componente amino do substrato. Os resíduos His e Asp cooperam com a trilogia catalítica fornecendo elementos para a catálise básica dos passos (b) e (e) e catálise ácida dos passos (c) e (f).

2.4.8 – Cinética Enzimática

A cinética enzimática é o ramo da enzimologia que estuda os fatores que influenciam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Os fatores mais importantes são: concentração de enzima, concentração de ligantes (substratos, produtos, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura. Quando esses fatores são analisados adequadamente, é possível averiguar muitos dados a respeito da natureza da reação enzimática.

Durante a primeira parte do século vinte, muitos esforços foram feitos para se purificar enzimas e descrever sua atividade catalítica em linguagem matemática. Em 1902, Henri e Brown, de forma independente, sugeriram que um complexo enzima- substrato seria necessariamente um intermediário na reação catalítica. Esta sugestão se baseou no tipo de curva obtida quando se fez um gráfico da velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato e está de acordo com o conceito **chave-fechadura** proposto por Emil Fischer em

1984. Henri derivou uma equação matemática para representar o efeito da concentração do substrato na velocidade de reação. Em 1913, Michaelis e Menten redescobriram a equação de Henri, que era baseada em princípios de equilíbrio químico. Em 1925, Briggs e Haldane introduziram o conceito de estado estacionário na cinética enzimática. Atualmente, ambas as abordagens são utilizadas para explicar as propriedades das enzimas. A existência do complexo enzima-substrato foi demonstrada experimentalmente pela primeira vez em 1936 por espectroscopia (catalase e peroxidase).

Até a década de 50, a maioria dos estudos cinéticos se baseavam na equação de Henri-Michelis-Menten ou Briggs-Haldane (ver equação 2.2) para sistemas enzimáticos com apenas um substrato. No início dos anos 60, iniciaram-se os estudos de sistemas com dois ou três reagentes. Equações baseadas no equilíbrio rápido (Henri-Michelis-Menten) eram facilmente obtidas, porém, muitas enzimas não tinham este tipo de cinética. Equações baseadas em estado estacionário foram obtidas por diversos autores, mas elas eram complexas e pouco familiares. Em 1963, Cleland apresentou um procedimento claro e uniforme, com nomenclatura conveniente, para descrever mecanismos cinéticos. Em 1965, Monod, Wyman e Changeux apresentaram um modelo cinético para enzimas alostéricas (enzimas que apresentam curva sigmoideal de v em função de S ao invés de curva hiperbólica).

$$v = \frac{v_{\max} S}{K_m + S}$$

Equação 2.2

onde :

v = velocidade de reação;

v_{\max} = velocidade máxima de reação quando toda enzima esta na forma ES (complexo enzima-substrato);

K_m = constante de Michelis-Menten;

S = concentração de substrato.

2.4.8.1 – Inibição Enzimática

Qualquer substância que reduza a velocidade de uma reação enzimática pode ser considerada um inibidor. A inibição da atividade enzimática é um dos

mecanismos de regulação mais importantes das células vivas e um dos mais importantes procedimentos de diagnóstico do enzimólogo: os estudos de inibição muitas vezes nos dizem muito a respeito da especificidade da enzima, de estrutura física e química do sítio ativo e do mecanismo cinético da reação.

Inibição Competitiva

Um inibidor competitivo é uma substância que se combina com a enzima livre de forma que impede a união do substrato. Em outras palavras, o inibidor e o substrato se excluem mutuamente, freqüentemente pela competição pelo mesmo sítio. Um inibidor competitivo pode ser: a) um análogo não metabolizável do substrato, b) um derivado do verdadeiro substrato, c) outro substrato, e d) um produto da reação. A figura 2.15 mostra modelos de inibição competitiva.

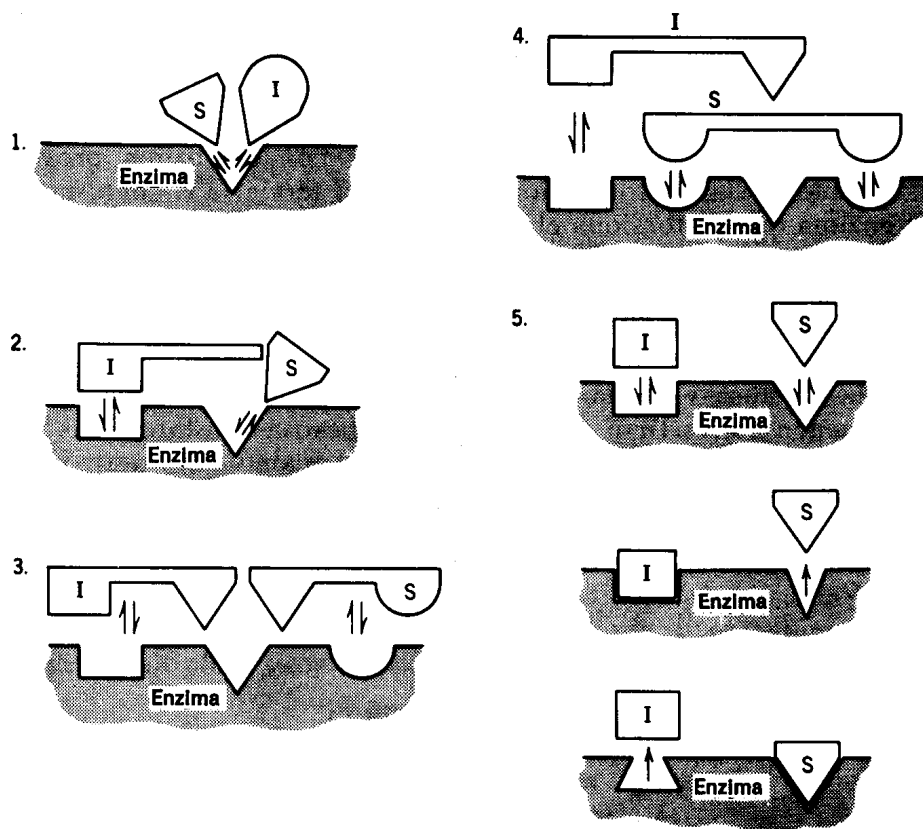


Figura 2.15 – Modelos de inibição competitiva: S (substrato) e I (inibidor) se excluem mutuamente. (1) Modelo clássico: S e I competem pelo mesmo sítio de ligação, sendo que I deve ser parecer estruturalmente com S. (2) I e S se excluem mutuamente devido a impedimento estérico. (3) I e S compartilham um grupo de ligação comum na enzima. (4) Os sítios de ligação são distintos para I e S mas se sobrepõem. (5) A união de um inibidor I a um sítio de ligação diferente provoca uma mudança conformacional na enzima que distorce e mascara o sítio de ligação do substrato, e vice-versa [Segel (1982)].

O modelo 1, mostrado na figura 2.15, ilustra a inibição competitiva clássica, quando um inibidor compete com um substrato por um sítio de ligação único. Os modelos 2,3 e 4 representam outras formas nas quais o inibidor e o substrato se excluem mutuamente: impedimento estérico (modelo 2), impedimento estérico ou competição por grupo de ligação comum (modelo 3) e sítios de ligação superpostos (modelo 4).

O esquema de reação que descreve a inibição competitiva é mostrado na figura 2.16. Baseando-se neste esquema, pode-se deduzir uma expressão de velocidades, analogamente à dedução feita para a equação de Michelis-Menten, e que pode ser vista na equação 2.3.

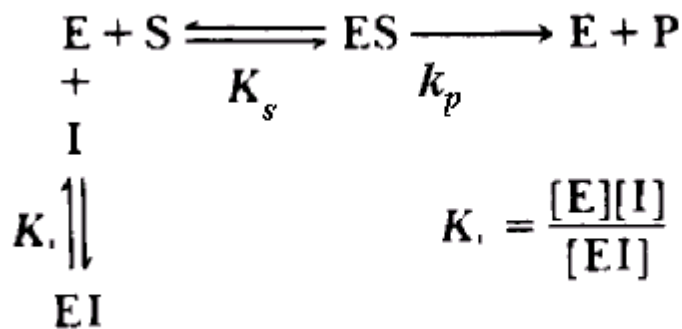


Figura 2.16 – Esquema de reação que descreve a inibição competitiva [Segel (1982)].

$$v = \frac{v_{\max} S}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + S}$$

Equação 2.3

onde :

v = velocidade de reação;

v_{\max} = velocidade máxima de reação quando toda enzima esta na forma ES (complexo enzima-substrato);

K_m = constante de Michelis-Menten;

K_i = constante de inibição;

I = concentração de inibidor;

S = concentração de substrato.

Um inibidor competitivo, portanto, atua apenas aumentando o valor de K_m aparente para o substrato. Quando I aumenta, K_m aumenta. v_{\max} permanece inalterável.

Inibição Não Competitiva

Um inibidor não competitivo clássico não tem nenhum efeito sobre a união do substrato na enzima e vice-versa. S e I se unem de forma reversível, ao acaso e independentemente em sítios diferentes. Em outras palavras, I se une a E ou a ES e S se une a E ou a EI. No entanto, o complexo resultante (ESI) é cataliticamente inativo. As figuras 2.17 e 2.18 mostram modelos de inibição não competitiva. O equilíbrio das reações enzimáticas na presença do inibidor é mostrado na figura 2.19. A equação 2.4 descreve a velocidade de reação na presença do inibidor.

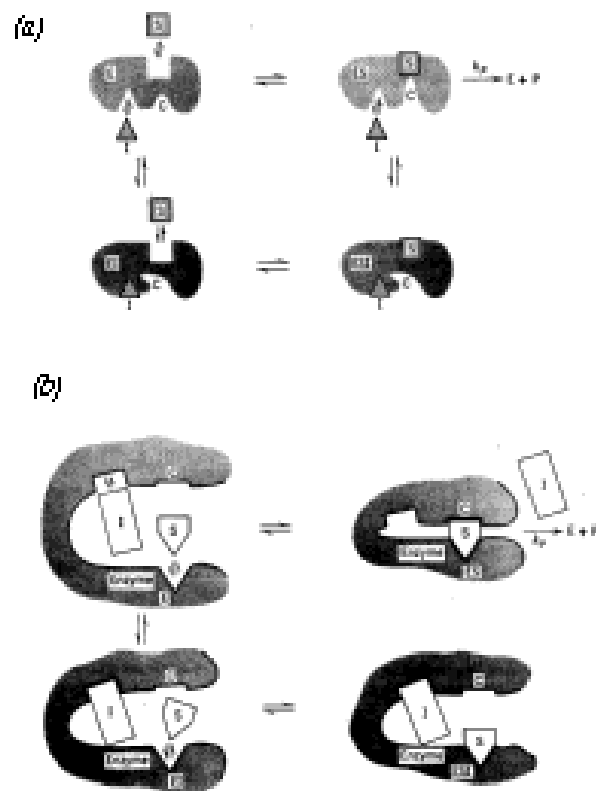


Figura 2.17 – Inibição não competitiva. (a) S e I não são mutuamente exclusivos mas ESI é cataliticamente inativo e (b) I não pode se ligar a ES, mas as propriedades do sistemas são idênticas às do caso a [Segel (1975)].

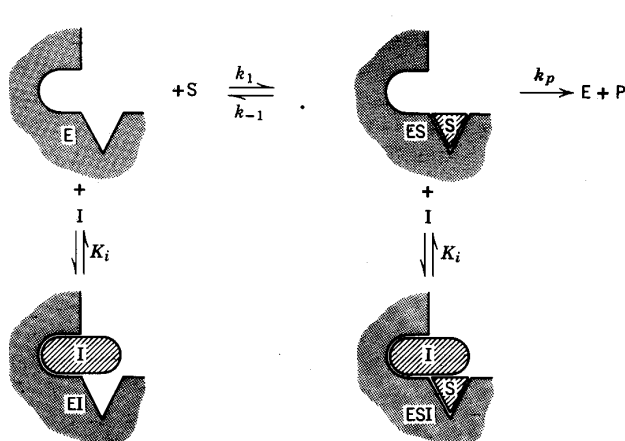


Figura 2.18 – Modelo para inibição não competitiva; I "esconde" o sítio de ligação de S [Segel (1975)].

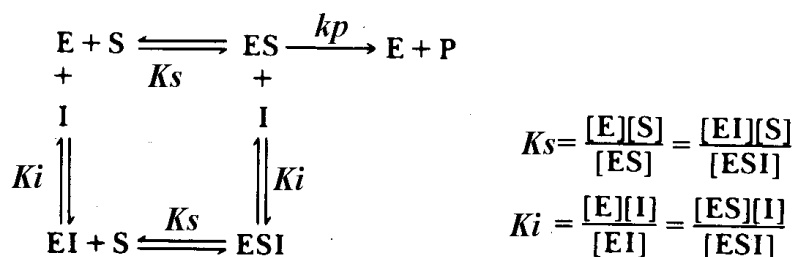


Figura 2.19 – Equilíbrio das reações catalisadas por enzima na presença do substrato S e do inibidor não competitivo I [Segel (1975)].

$$v = \frac{v_{\max} S}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + S \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

Equação 2.4

Inibição do Tipo Misto

O equilíbrio mostrado na figura 2.20 representa o esquema mais simples de inibição do tipo misto (na verdade, um tipo de inibição não competitiva). A presença de I na enzima muda a constante de dissociação S de K_s para αK_s . A equação 2.5 descreve a velocidade de reação na presença do inibidor.

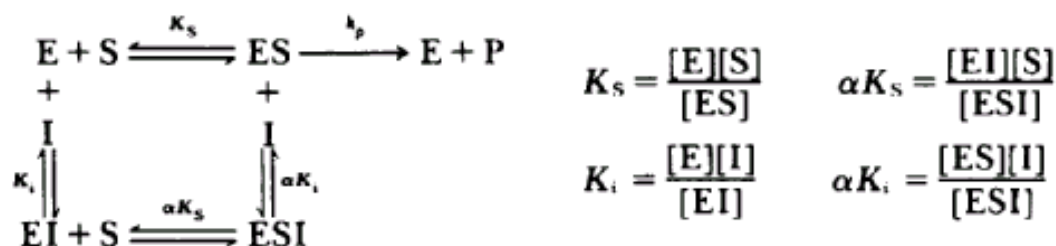


Figura 2.20 – Esquema de reações mais simples para inibição do tipo misto [Segel (1975)].

$$v = \frac{v_{\max} S}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + S \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)}$$

Equação 2.5

2.4.8.2 – Métodos de Representação de Dados

Representação de Lineweaver-Burk

A representação de Lineweaver-Burk (equação 2.6) se baseia na reestruturação da equação de Henri-Michelis-Menten (equação 2.2) em uma forma linear ($y = m x + b$). Se representarmos $1/v$ em função de $1/S$, a tangente é K_m/v_{\max} e a intersecção é $1/v_{\max}$.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Equação 2.6

Esta representação é a mais utilizada como diagnóstico primário. No entanto, seu uso é muito criticado por dois motivos: a) incrementos iguais na concentração de substrato não resultam em pontos eqüidistantes na representação de $1/S$ e b) pequenos erros na determinação de v aumentam quando se invertem os

valores. Os erros são mais importantes a baixas concentrações de substrato (e baixos valores de velocidade). Um ou dois pontos com erro para altos valores de $1/v$ e $1/S$ podem introduzir um erro significativo no valor da tangente da reta. Pontos correspondentes a baixas concentrações de substrato (sujeitos a erros experimentais maiores, pois correspondem às menores velocidades) tem maior influência no ajuste do coeficiente angular da reta.

A representação de Lineweaver-Burk é dada pela equação 2.7, na presença de um inibidor competitivo, e pela equação 2.8, na presença de um inibidor não competitivo. As figuras 2.21 e 2.22 mostram uma representação de $1/v$ contra $1/S$ na presença de diferentes concentrações de substrato, na presença de um inibidor competitivo e não competitivo, respectivamente.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Equação 2.7

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)$$

Equação 2.8

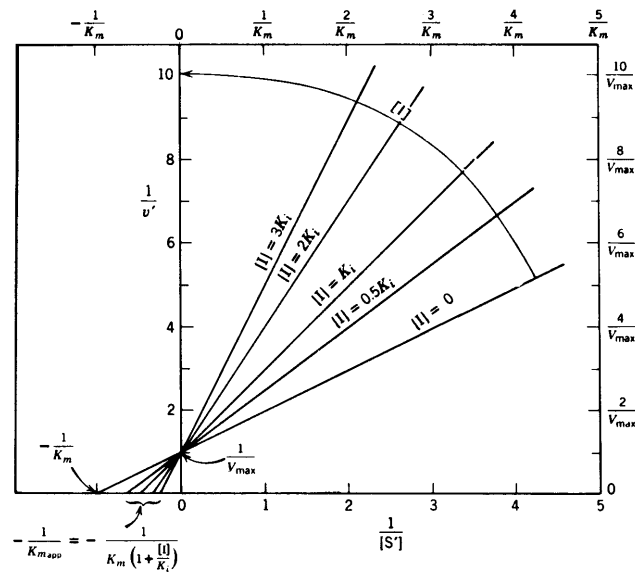


Figura 2.21 – Representação de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor competitivo [Segel (1982)].

A representação de Lineweaver-Burk não é a única transformação linear da equação de velocidade. Outras representações lineares são: Hanes-Woolf, Eadie-Scatchard, Woolf-augustinsson-Hofstee, Dixon, entre outras. Neste trabalho se utilizará também o método de Dixon para estimar parâmetros e discriminar modelos de inibição.

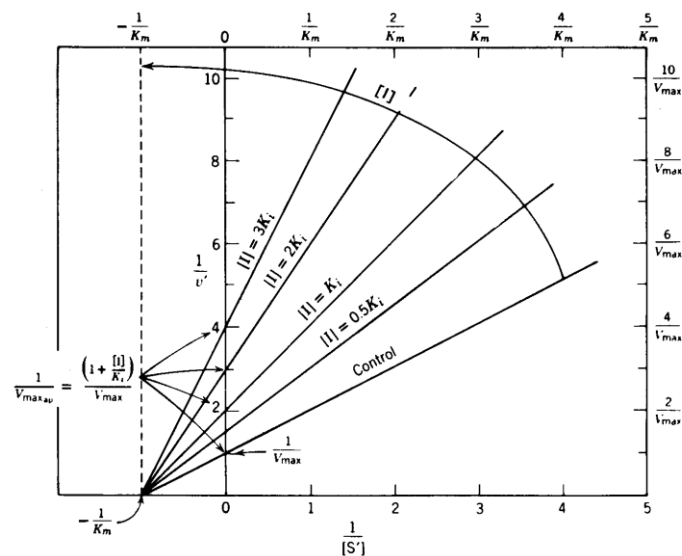


Figura 2.22 - Representação de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor não competitivo [Segel (1982)].

Representação de Dixon

Dixon, em 1972, descreveu um método gráfico elegante, simples e direto para a determinação de K_m e E_t (quantidade total de enzima) quando uma fração substancial do substrato adicionado está ligada à enzima. Este método é também freqüentemente utilizado para identificar o tipo de inibição enzimática e para determinação de K_i (constante de Inibição). Giordano e Schmidell (1992) realizaram estudo detalhado de inibição pelo produto para hidrólise enzimática de amido. Para a determinação do tipo de inibição, os autores compararam a representação Lineweaver-Burk com a de Dixon. Eles concluíram que o gráfico de Dixon era o mais apropriado para se discriminar entre os modelos de inibição.

A representação de Dixon converte a equação de velocidade para uma forma linear, na qual a variável independente é a concentração de inibidor (I). A família de retas obtidas para inibição competitiva se intercepta acima do eixo x (concentração de I) em $[I] = -K_i$ e $1/v = 1/v_{max}$, ver figura 2.23 e equação 2.9. Alguns tipos de inibição mista também apresentam este mesmo comportamento. Portanto, a representação de Dixon apenas estabelece que o inibidor não é acompetitivo nem não competitivo. Para inibição acompetitiva, a linearização de Dixon não contém um termo de concentração de S na expressão da tangente. Portanto, espera-se que as retas obtidas sejam paralelas para qualquer concentração de substrato. No caso de inibição não competitiva, a família de retas se intercepta no eixo x (concentração de I), ver figura 2.24 e equação 2.10.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max} K_i S} I + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{S} \right)$$

Equação 2.9

$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{K_m}{S} \right)}{v_{\max} K_i} I + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{S} \right)$$

Equação 2.10

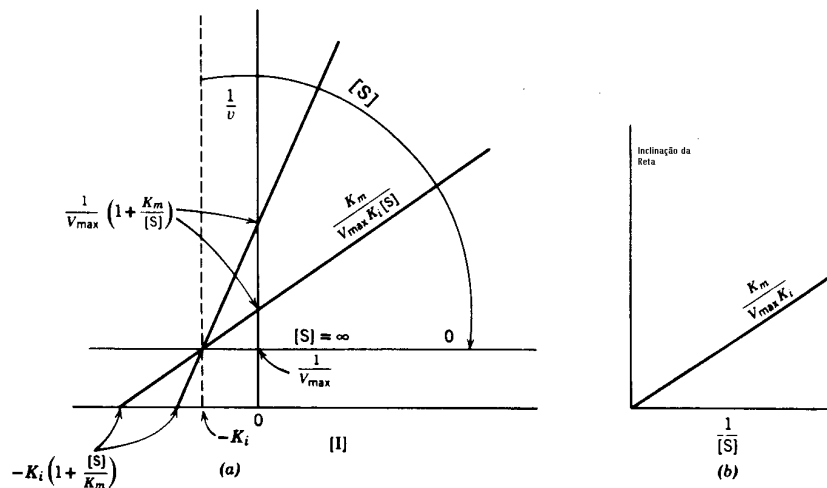


Figura 2.23 - Representação de Dixon para diferentes concentrações de inibidor não competitivo [Segel (1982)].

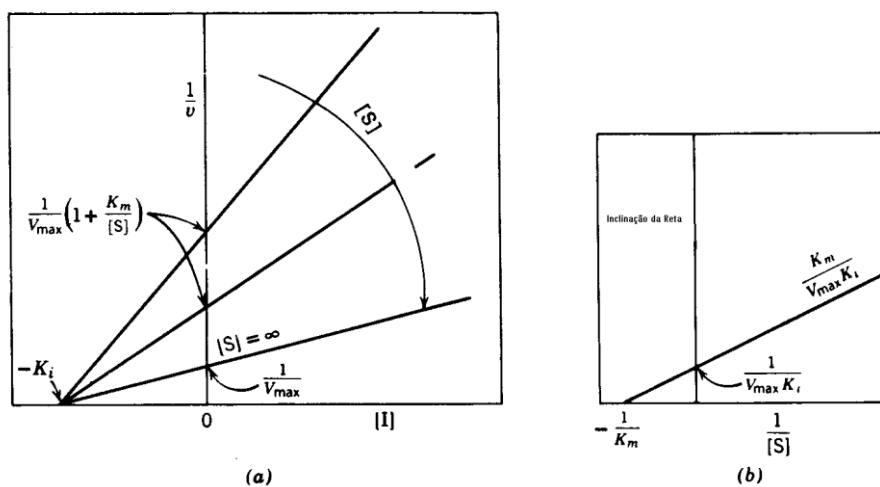


Figura 2.24 - Representação de Dixon para diferentes concentrações de inibidor não competitivo[Segel (1982)].

2.4.8.3 – Enzimas com Substratos Múltiplos

A maioria das enzimas catalisa reações entre dois ou mais substratos para produzir dois ou mais produtos. A tabela 2.3 mostra, de forma resumida, alguns mecanismos de reações enzimáticas com múltiplos reagentes.

Tabela 2.9 – Mecanismos de reação enzimática com múltiplos substratos.

Mecanismo	Características básicas	Esquema de reação
Randômico bi bi	Os dois substratos (A e B) podem se ligar à enzima de forma randômica, exatamente como fazem S e I em um sistema clássico de inibição do tipo mista ou não competitiva. Os dois produtos (P e Q) podem ser liberados também de forma randômica	Figura 2.25
Bi bi ordenado	Pode ser impossível que B se ligue à enzima antes que A se ligue e provoque uma mudança conformacional.	Figura 2.26
Ping pong bi bi	Neste mecanismo, um produto é liberado antes da ligação do segundo substrato à enzima. Mecanismos ping pong são comuns em reações de transferência de grupos.	Figura 2.27

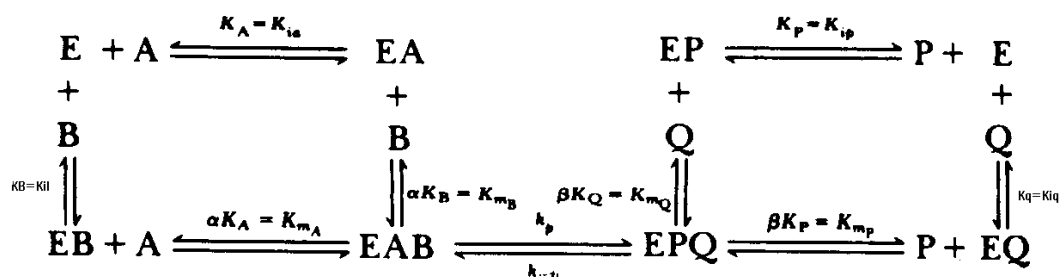


Figura 2.25 – Representação esquemática mecanismo randômico bi bi - dois substratos, dois produtos[Segel (1982)].

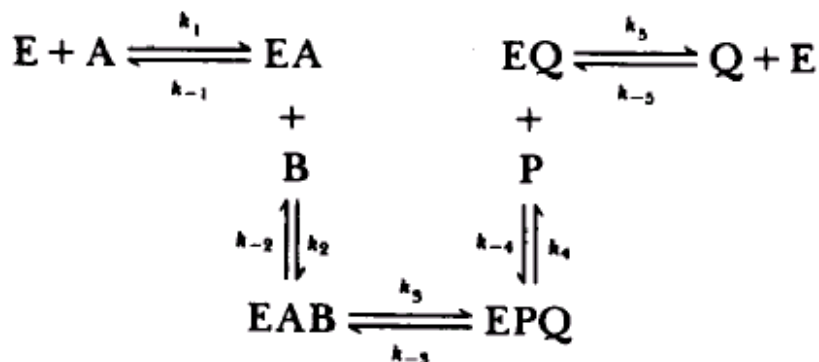


Figura 2.26 – Representação esquemática mecanismo ordenado bi bi - dois substratos, dois produtos [Segel (1982)].

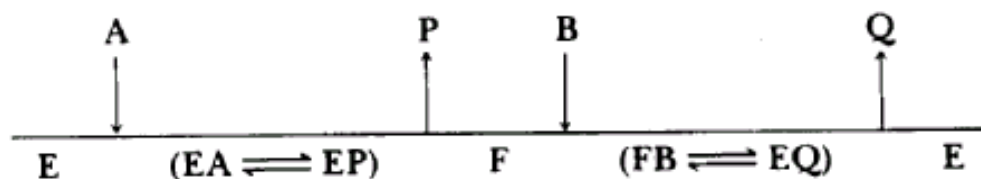


Figura 2.27 – Representação esquemática mecanismo ping pong bi bi - dois substratos, dois produtos[Segel (1982)].

2.4.9 – Enzimas Imobilizadas

A especificidade das enzimas é um fator importante na hora de se escolher um catalisador industrial para reações comerciais de interesse. No entanto, o custo destas enzimas é muitas vezes proibitivo e, além disso, elas são normalmente menos estáveis que os catalisadores químicos e não podem ser usadas em solventes orgânicos ou em altas temperaturas. Neste contexto, enzimas imobilizadas ganham espaço uma vez que são facilmente recuperadas e comumente mais estáveis que a enzima livre. Com enzimas imobilizadas ativas e estáveis a maioria das desvantagens é superada e aparecem algumas vantagens: estabilidade melhorada, melhor controle de reação, operação contínua, maior

pureza e rendimento dos produtos, possibilidade de reutilização da enzima e fácil separação do produto. As grandes vantagens da imobilização são sua simplicidade quando comparada a processos químicos puros, menor contaminação do produto, entre outras, devido a sua especificidade e as condições amenas de reação usadas [Kennedy et ali. (1988) e Tischer e Kasche (1999)].

Segundo Tischer e Kasche (1999), as propriedades dos preparados de enzima imobilizada são governadas pelas características da enzima e do suporte usados. A interação entre os dois resulta em um catalisador com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas (figuras 2.28 e 2.29).

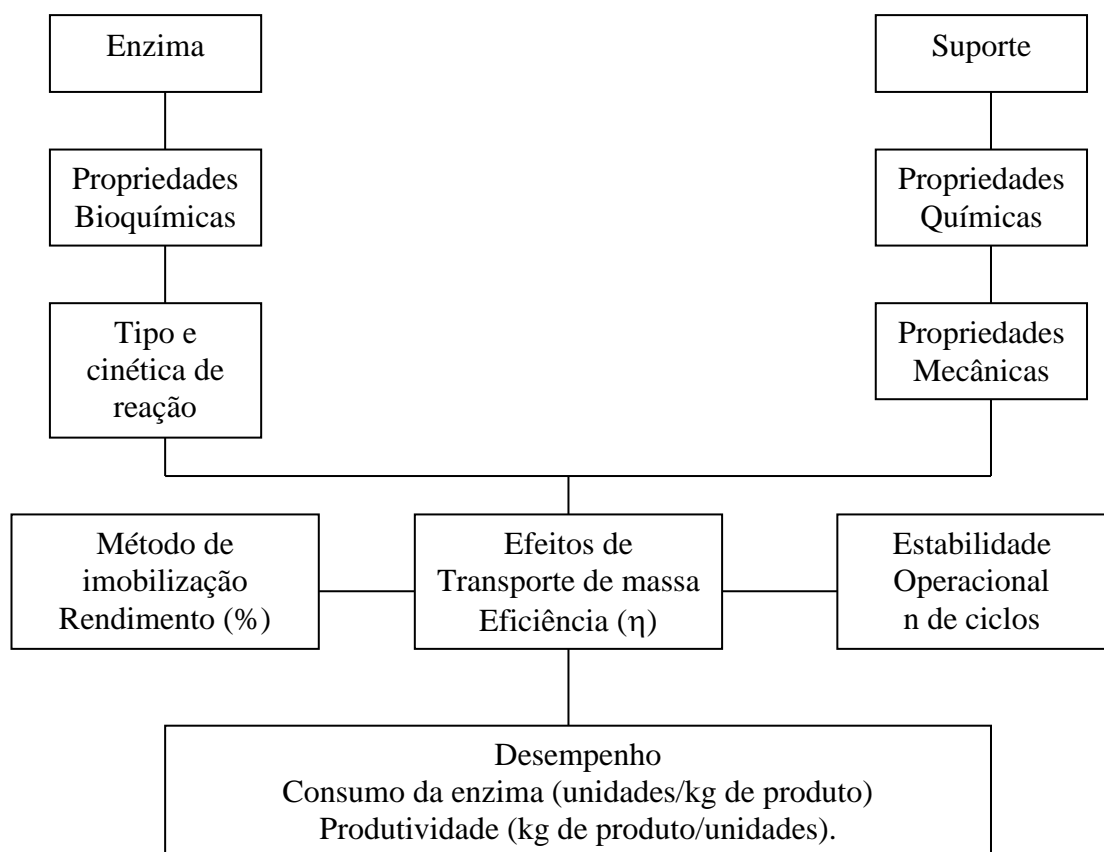


Figura 2.28 - As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pelas interações enzima-suporte. O rendimento de imobilização, a eficiência catalítica (resultante de interações físico-químicas, efeitos de transporte de massa) e a estabilidade operacional (em um reator CSTR, o número de ciclos) caracterizam a produtividade da enzima (produto produzido por unidade de enzima) [Tischer e Kasche (1999)].

Quando os custos de manufatura são considerados, o rendimento da imobilização é determinado pelo método de imobilização em relação à quantidade de enzima solúvel usada. Além disso, sob condições operacionais, a atividade enzimática pode ainda ser menor, devido a problemas de transporte de massa. Ou seja, o rendimento de imobilização não é apenas uma função das perdas causadas pela imobilização mas também dependente da difusão de substratos e produtos no interior do suporte. Estas limitações levam a uma redução na eficiência do catalisador. No entanto, a maior estabilidade da enzima sob condições de operação e a possibilidade de reutilização compensam estas desvantagens Tischer e Kasche (1999) recomendam, porém, que um estudo seja feito para cada caso em particular.

2.4.9.1 – Aplicações

Muitas são, hoje em dia, as aplicações de enzimas imobilizadas, entre elas podem ser citadas:

- Utilização em métodos analíticos (eletrodos);
- Usos terapêuticos;
- Aplicações Industriais (ver tabela 2.4)

Tabela 2.10 – Exemplos de aplicações industriais de enzimas imobilizadas [Messing, (1975), Chibata (1978) e Trevan (1980)].

Objetivo	Enzima	Suporte	Substrato	Produto
----------	--------	---------	-----------	---------

Resolução de misturas racêmicas	Aminoacilase	DEAE-Sephadex	D-L- Aminoácidos	L-Aminoácidos, Exemplo: L- metionina
Tratamento de leite	lactase	Fibras de celulose	Leite com lactose	Leite sem lactose
Produção de antibióticos	Penicilina acilase	diversos	Penicilina G ou Penicilina V	6-APA
Isomerização	Glicose isomerase	DEAE-celulose	Glicose	Frutose

Enzima	<p>Propriedades Bioquímicas:</p> <p>Massa molecular, grupos funcionais na superfície da proteína, pureza</p> <p>Parâmetros Cinéticos:</p> <p>Atividade específica perfil de temperatura e pH, parâmetros cinéticos (ativação e inibição), estabilidade em relação ao pH, a temperatura, a solventes, a contaminantes e a impurezas.</p>
Suporte	<p>Propriedades Químicas:</p> <p>Composição química, grupos funcionais, volume acessível na matriz, tamanho de poro e estabilidade da matriz.</p> <p>Propriedades Mecânicas:</p> <p>Diâmetro da partícula, comportamento sob compressão, resistência a fluxo (para uso em leito fixo), velocidade de sedimentação (para uso em leito fluidizado) e abrasão (para uso em reator de mistura)</p>
Enzima Imobilizada	<p>Método de Imobilização:</p> <p>Proteína ligada ao suporte, rendimento de imobilização e parâmetros cinéticos intrínsecos (livre dos efeitos de transporte de massa).</p> <p>Efeitos de Transporte de Massa:</p> <p>Partição (diferentes concentrações de soluto dentro e fora do biocatalisador), difusão externa e interna (poros). É comum a utilização de um fator de efetividade em relação a enzima livre para representar sistemas limitados por esses fatores, calculado sob condições apropriadas de reação.</p> <p>Estabilidade:</p> <p>Estabilidade Operacional (expressa em função do decréscimo da atividade da enzima sob condições de trabalho) e estabilidade de armazenamento.</p> <p>Desempenho:</p> <p>Produtividade (quantidade de produto formado por unidade ou massa de enzima) e Consumo de enzima (unidades de enzima consumidas por kg de produto formado)</p>

Figura 2.29 - Parâmetros característicos de enzimas imobilizadas (Tischer e Kasche, 1999).

2.4.9.2 – Métodos de Imobilização

Ainda segundo Kennedy et al. (1988), enzimas imobilizadas são aquelas que estão fisicamente confinadas com retenção do seu poder catalítico e que podem ser utilizadas repetitiva e continuamente. Os vários tipos de enzimas imobilizados podem ser classificados de diversas maneiras. Um sistema possível é (veja figura 2.30):

1. Enzimas modificadas para uma forma insolúvel em água;
2. Enzimas solúveis em água usadas em reatores equipados com membranas de ultrafiltração capazes de mantê-las confinadas e
3. Enzimas com mobilidade restrita por ligação a outra macromolécula.

Neste trabalho se utiliza o método de imobilização por ligação covalente a suporte insolúvel em água (no caso, agarose). Esta ligação é feita através da combinação química entre o suporte e grupos funcionais da enzima que não têm relação com sua atividade catalítica. A grande maioria dos suportes precisa de ativação, pois não possuem grupos reativos para o acoplamento direto. Esse tipo de ligação oferece alta força de ligação, que permite maior estabilidade do complexo enzima-suporte, alta atividade e alterações favoráveis na enzima, como mudanças no pH e na temperatura ótima.

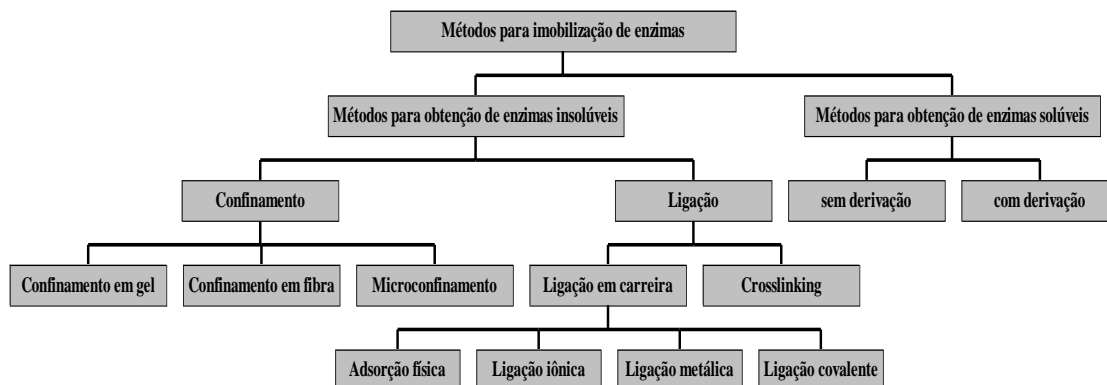


Figura 2.30 – Classificação dos métodos de imobilização de enzimas [Kennedy et al. (1988)].

2.4.9.3 Suportes para imobilização

Existe uma grande variedade de suportes para imobilização. Os inorgânicos apresentam uma série de vantagens, tais como: elevada força mecânica, estabilidade térmica, resistência a ataque de microrganismos e de solventes orgânicos. Quanto à morfologia, os suportes podem ser porosos, não porosos ou apresentar estrutura gel. Nos porosos, o tamanho do poro é fundamental, pois este deve ser suficientemente grande para permitir a acomodação da enzima e o livre acesso do substrato. No entanto, quanto maior o poro, menor a área superficial do suporte, conseqüentemente, menor o número de sítios disponíveis para a ligação da enzima. Além disso, o suporte deve apresentar numerosos grupos de fácil ativação, como por exemplo, grupos hidroxila para participar da formação de múltiplos enlaces entre os grupos reacionais. Portanto, podemos afirmar que para conseguir uma imobilização multipontual se requer uma elevada densidade de grupos funcionais no suporte e a existência de uma congruência geométrica entre a superfície da proteína e o suporte [Hernández-Jústiz (1996)]. A imobilização multipontual da enzima ao suporte, onde uma molécula da proteína se une através de vários pontos a vários grupos ativos do suporte, aumenta grandemente a estabilidade da enzima [Rossel (1993)].

Géis de agarose são bons suportes para a imobilização da enzima por possuírem uma grande área superficial, serem facilmente ativáveis a partir de grupos hidroxila e apresentarem boas propriedades mecânicas, que os tornam resistentes à agitação e a relativamente altas pressões, podendo ser utilizados sem dificuldade em condições industriais.

2.4.9.4 - Géis glioxil-agarose

No método de ativação do gel de agarose com grupos glioxil, proposto por Guisán (1988), no qual se obtém gel de agarose com elevada densidade de grupos aldeídos moderadamente separados de sua superfície. Como resultado de todo o processo de ativação, obtém-se gel glioxil-agarose que apresenta uma monocamada de aldeídos simples que reagirão com a proteína (enzima) pela zona que apresente maior densidade de grupos aminoácidos lisinas. As principais características deste sistema são:

- Ausência de impedimento estérico entre os grupos aldeído do suporte e os grupos amino da enzima;
- O primeiro enlace aldeído-amino é reversível mas a união da enzima ao suporte se estabiliza intensamente ao se produzir a formação de pontos de união simultâneos. Isto provoca uma menor distorção na estrutura tridimensional da proteína, em relação a uniões irreversíveis.

2.4.9.5 Efeitos de Transporte de Massa

Segundo Tischer e Kasche (1999), imobilização significa a deliberada restrição da mobilidade da enzima, que pode afetar também a mobilidade dos substratos. Este fenômeno é conhecido como efeitos de transporte de massa e pode causar a diminuição da velocidade de reação e a conseqüente perda da eficiência catalítica quando comparada com a enzima livre. Esta diminuição da velocidade de reação pode ser causada: a) pela restrição difusional externa na superfície do suporte; b) por efeitos de partição (diferença na concentração no interior e exterior do suporte causada pela interação entre o suporte e os solutos) e c) difusão interna dos solutos, no caso de suportes porosos. Todas as reações catalisadas por enzimas imobilizadas devem obedecer aos princípios de transporte

de massa. Uma maneira comum de tratar estes problemas é usar o coeficiente de efetividade ou fator de efetividade (η):

$$\eta = \frac{V_{\text{imobilizada}}}{V_{\text{livre}}}$$

Onde $V_{\text{imobilizada}}$ e V_{livre} são as velocidades de reação, catalisadas pela mesma concentração de enzima, para enzima imobilizada e livre, respectivamente, sob as mesmas condições operacionais.

O fator de efetividade pode ser utilizado para caracterizar sistemas com enzimas imobilizadas. Um desvio da unidade, ou seja, $\eta \neq 1$, indica que a cinética da enzima imobilizada sofre influência de outros fatores além daqueles que governam a expressão cinética para o biocatalisador em solução homogênea. Os valores do fator de efetividade são normalmente menores que um ($\eta < 1$) devido a limitações ao transporte de massa no exterior (difusão externa) e no interior (difusão interna) do biocatalisador. Em alguns casos, já se observaram valores de $\eta > 1$ em sistemas não isotérmico ou com inibição pelo produto. Na prática, é interessante que o fator de efetividade se aproxime da unidade, quando o uso do biocatalisador é ótimo [Kasche (1983)].

Tischer e Kasche (1999) exemplificam o cálculo do fator de efetividade para a difusão de penicilina G em diversos derivados imobilizados de penicilina G acilase de *E. coli*, com alta carga enzimática. Eles observaram que não há efeitos difusionais quando a concentração do substrato é muito maior que o K_m , o que é o caso das condições iniciais da hidrólise de penicilina G em larga escala. Para baixas concentrações de substrato, os efeitos de transporte de massa causam a diminuição do fator de efetividade para ambos os suportes estudados (Eupergit®

C e Eupergit® 250L). Os valores do coeficiente de difusão para penicilina G nestes suportes são mostrados na tabela 2.5.

Tabela 2.11 - Coeficientes de difusão molecular e efetiva para Penicilina G em diferentes suporte

Suporte	De (cm ² /s)
Água (difusão molecular)**	4,0 x 10 ⁻⁶
Eupergit® C*	1,44 x 10 ⁻⁶
Eupergit® 250L**	2,8 x 10 ⁻⁶

* Spieß et al. (1999)

**Tischer e Kasche (1999)

Na prática, deseja-se detectar os efeitos de transporte de massa de uma maneira simples e rápida. Para saber se esse efeito é significativo, aconselha-se utilizar condições drásticas, como por exemplo: a) aumentar a velocidade de agitação em um reator de mistura ou o fluxo em um reator tubular, para eliminar efeitos de difusão externa; b) diminuir o diâmetro da partícula para minimizar a difusão interna; c) adicionar solução tampão para evitar as variações no pH do meio; d) reduzir a carga enzimática e e) fazer a ligação da enzima preferencialmente na superfície do suporte [Tischer e Kasche (1999)]. Os autores comentam que o aumento local do pH ,que pode chegar a 3-4 unidades, quando se trabalha com enzimas imobilizadas pode ser significativo e causar decréscimo na atividade enzimática. Este gradiente de prótons está normalmente presente quando se realizam reações de hidrólise, caso das reações catalisadas por hidrolases (como a penicilina G acilase). É aconselhável que estes efeitos sejam minimizados de maneira a se otimizar a produtividade e diminuir a perda de catalisadores e produtos. Isto pode ser alcançado: a)diminuindo a carga enzimática ou o diâmetro da partícula; b) usando tampões com capacidade suficiente para minimizar o gradiente de pH, com valor de pK maior que o valor de pH ótimo da enzima; c) operando o reator a um pH externo maior que o ótimo da enzima e d)

coimobilizando uma enzima que consome prótons (urease, por exemplo, que forma amônia e neutraliza os prótons gerados).

Kumar et al. (1996) propõem um modelo reativo-difusivo para a hidrólise de penicilina G catalisada por dois derivados comerciais imobilizados de penicilina acilase. A atividade fornecida pelo fabricante foi de 180 unidades para a enzima A e 300 unidades para a enzima B, sendo que a unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de 6-APA formada (em micromoles) em 1 minuto usando como substrato penicilina G 5%(peso/volume) a pH 7,0 e 28°C. Ambas as enzimas possuíam um tamanho médio de 200µm. Os autores obtiveram o mesmo valor de difusividade efetiva (D_e) para ambos biocatalisadores: $D_e = 8,27 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$.

2.5 – Penicilina G Acilase

O nome oficial da penicilina G acilase é Penicilina amidohidrolase (E.C.3.5.1.11), mas ela também é conhecida como penicilina G acilase ou penicilina amidase. Penicilina G acilase é o mais utilizado por descrever a reação de remoção do grupo N-acil dos derivados N-acil 6-APA [Savidge (1984); Vandamme (1984)].

As penicilinas acilases catalisam a hidrólise da ligação amida linear nas moléculas de penicilina produzindo o núcleo β -lactâmico, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), e o ácido correspondente à cadeia lateral. Apesar da função natural da enzima ainda não estar muito clara, tem-se sugerido que ela esta envolvida na degradação de compostos fenilacetilados para gerar ácido fenilacético, que pode ser usado como fonte de carbono quando a bactéria está livre [Valle et al. (1991); Done et al. (1998)]. Este grupo de enzimas tem se tornado comercialmente importante pois um dos produtos desta reação, 6-APA, é precursor de uma ampla gama de penicilinas semi-sintéticas. Estes tipos de penicilinas semi-sintéticas apresentam melhores propriedades que as penicilinas

obtidas unicamente por fermentação, como por exemplo: são mais estáveis, são melhor absorvidas pelo organismo e apresentam menos reações laterais. Mais de 60% do 6-APA é produzido enzimaticamente e a produção está estimada em 5500 t/ano com uma projeção de 7000 t/ano para o ano 2000 (Shewale et al., 1990). A figura 2.31 mostra a hidrólise de penicilina G, catalisada pela penicilina G acilase para a produção do 6-APA.

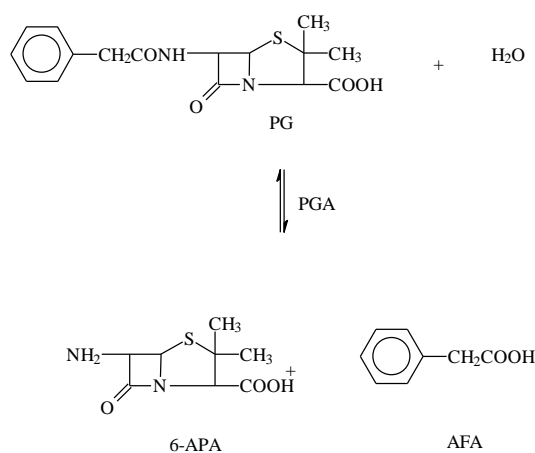


Figura 2.31 - Hidrólise da penicilina G.

Existe uma ampla variedade de penicilinas G acilases, dependendo de sua origem (podem ser produzidas por fungos, bactérias e leveduras) e dos substratos que hidrolisam [Hernández-Jústiz (1996)]. Baseado na especificidade pelo substrato, as penicilinas acilases são divididas em três grupos: penicilina G acilase, que hidrolisa preferencialmente penicilina G, penicilina V acilase, que hidrolisa preferencialmente penicilina V, e ampicilina hidrolase, que hidrolisa preferencialmente ampicilina [Shewale et al. (1990)].

Segundo Kheirulomoom et al. (1998), a maioria das penicilinas acilases é produzida por *E. coli*. O uso de *E. coli* recombinante elimina alguns dos problemas enfrentados na produção da enzima, tais como: efeitos de repressão catabólica causados por glicose, frutose, lactose e outras fontes de carbono.

2.5.1 – Aplicações

Este grupo de enzimas ganhou importância comercial quando se descobriu que elas eram capazes de produzir 6-APA, um precursor para a manufatura de uma vasta gama de antibióticos semi-sintéticos [Shewale et al. (1990)]. Penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada por ligação covalente é usada industrialmente na produção de ácido 6-aminopenicilânico por mais de 100 bateladas sem que seja necessária a adição de enzima fresca [Kheirloom et al. (1998)]. Esta enzima é usada industrialmente devido a sua habilidade em quebrar a ligação amida da cadeia lateral da penicilina sem afetar a estrutura cíclica da molécula [Shewale et al. (1990)].

Além da produção de 6-APA e 7-ADCA, outras aplicações apresentam alto potencial comercial, são elas: a) hidrólises de amidas (amidase), hidrólises de ésteres (esterase) e sínteses de amidas. A enzima pode ser usada na produção de aspartame, insulina, na resolução de misturas racêmicas (produção de L-fenilglicina, L-p-hidroxifenilglicina, L-tirosina, etc.), na síntese de compostos enantiômeros puros, entre outros processos. A ação hidrolítica da PGA não está restrita a amidas de fenilacetil. Sabe-se que estas enzimas são capazes de hidrolisar também ésteres de fenilacetil. Quando valores ácidos de pH são utilizados, as penicilinas acilases favorecem a reação de acilação de 6-APA, 7-ADCA, 7-ACA, peptídeos, etc.. As reações de acilação de 6-APA, 7-ADCA e 7-ACA geram antibióticos clinicamente importantes (ver tabela 2.6) e por isso elas têm sido bastante exploradas nos últimos anos [Shewale et al. (1990)]. O uso de penicilina acilase na direção da síntese foi demonstrada em 1960 por Kaufman e Bauer [appud Bruggink et al. (1998)] que publicou que penicilina acilase de *E. coli* catalisava a formação de penicilina G a partir de 6-APA e ácido fenilacético.

A partir de então, muitos exemplos tem sido publicados na literatura (Bruggink et al., 1998).

Tabela 2.12 – Antibióticos semi-sintéticos que podem ser produzidos pela acilação de 6-APA, 7-ADCA, 7-ACA por PGA [Shewale et al. (1990)].

Cadeia lateral	Núcleo β -lactâmico	Origem da enzima	Produto
Éster metílico de fenilglicina	6-APA	<i>Achromobacter spp.</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Flavobacterium spp.</i> <i>Kluyvera citrophila</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Proteus rettgeri</i> <i>P. melanogenum</i> <i>Pseudomonas ovalis</i>	Ampicilina

Tabela 2.6 – Antibióticos semi-sintéticos que podem ser produzidos pela acilação de 6-APA, 7-ADCA, 7-ACA por PGA [Shewale et al. (1990)] (continuação).

Cadeia lateral	Núcleo β -lactâmico	Origem da enzima	Produto
Éster metílico de p-hidroxifenilglicina	6-APA	<i>Achromobacter B402-2</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Kluyvera citrophila</i> <i>Pseudomonas cruciviae</i> <i>Pseudomonas geniculosa</i> <i>Pseudomonas maltophila</i> <i>P. melanogenum</i> <i>Xanthomonas citri</i> <i>Xanthomonas cucurbitae</i> <i>Xanthomonas physalidicola</i>	Amoxicilina
Ácido fenilacético	6-APA	<i>B. circulans</i>	Penicilina G
Fenilacetil glicina	6-APA	<i>E. coli</i>	Penicilina G
Éster metílico de fenilglicina	7-ADCA	<i>Achromobacter spp.</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Beneckea hyperoptica</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Kluyvera citrophila</i>	Cefalexina

Éster metílico de p-hidroxifenilglicina	7-ADCA	<i>Micrococcus luteus</i> <i>P. melanogenum</i> <i>E. coli</i> <i>Kluyvera citrophila</i>	Cefadroxil
Éster metílico de fenilglicina	7-ACA	<i>P. melanogenum</i> <i>B. magaterium</i> <i>Kluyvera citrophila</i> <i>P. melanogenum</i>	Cefaloglicina

2.5.2 – Estrutura, Especificidade e Mecanismo Catalítico da Penicilina G Acilase

PGA de *Escherichia coli* consiste em um α - β - heterodímero composto de duas subunidades distintas entrelaçadas de forma não covalente (209 e 266 aminoácidos, respectivamente). A subunidade menor, denominada α , tem peso molecular de 20500 Da e a subunidade maior, β , tem peso molecular igual a 69000 Da [Böck et al. (1983)]. O papel da subunidade menor é conferir a enzima a especificidade pela cadeia lateral do substrato. Enquanto a subunidade maior (β) contribui com um resíduo serina essencial para a atividade catalítica. Juntas as duas subunidades definem o sítio ativo da acilase [Daumy et ali. (1985)].

A penicilina G acilase tem uma grande especificidade pela metade acil das moléculas, aceitando unicamente o ácido fenilacético e análogos estruturais muito similares [Pessina et al. (1988); Fungati et al. (1992)], enquanto que em relação ao nucleófilo, admite uma grande variedade de estruturas [Sjorberg et al. (1967); Plaskie et al. (1978); Pessina et al. (1988)]. Karyekar e Hegde (1991) sugerem que o domínio hidrofóbico da penicilina G acilase é carregado negativamente e que esta densidade de carga está localizada mais provavelmente no interior do domínio hidrofóbico da enzima do que na superfície. O centro ativo

tem uma estrutura complexa envolvendo domínios hidrofóbicos, com a serina responsável pela ação catalítica só se expondo na presença de ácido fenilacético ou derivados muito similares a ele [Fernandez-Lafuente (1992)]. O ponto isoelétrico desta enzima é 6,7 ou 6,8 [Hernández-Jústiz (1996)].

As PGAs bacterianas catalisam a síntese/hidrólise de acilderivados de ácido fenilacético e derivados via formação de intermediários covalentes acil-enzima. Quanto ao nucleófilo, esta enzima aceita uma grande variedade: toda uma gama de anéis mono e β -lactâmicos, álcoois, aminoácidos e dipeptídeos, açúcares, aspartame, carnitina, etc.. [Fernandez-Lafuente (1992)].

Margolin et al. (1980), através de estudos da dependência do pH das constantes cinéticas de hidrólise, observaram que somente a forma desprotonada do substrato era capaz de se ligar a enzima penicilina amidase de *Escherichia coli*, ou seja, os grupos próximos à metade carboxila da molécula devem estar descarregados.

Kawamori et al. (1983) observaram que a velocidade de síntese de amoxicilina é menor que a de outros antibióticos. Isto se deve ao fato de 6-APA e éster metílico de p-hidroxifenilglicina serem substratos piores que éster metílico de fenilglicina e 7-ADCA, por exemplo.

Duggleby et al. (1995) observaram que o centro catalítico da penicilina acilase (penicilina amidohidrolase EC 3.5.1.11) é composto apenas de um único aminoácido. Sua análise mostra que a vizinhança do centro catalítico da serina N-terminal não contém nenhuma histidina adjacente, equivalente àquela encontrada nas serinas proteases. A base mais próxima do grupo hidroxila da serina é seu próprio grupo α -amino, que deve agir por um novo mecanismo para conferir à

enzima suas propriedades catalíticas. Os autores determinaram a estrutura cristalina da penicilina acilase de *E. coli*. A proteína tem forma de rim com uma depressão funda em forma de xícara no centro (ver figura 2.32). A formação do complexo enzima-ácido fenilacético (inibidor competitivo) e enzima-fluoreto de fenilmetilsulfonil permite localizar o sítio de ligação da cadeia lateral do substrato (ver figuras 2.33 e 2.34). A porção fenil desses inibidores aponta para o interior da proteína, para uma bolsa hidrofóbica que está coberta por muitos resíduos aromáticos e cadeias hidrofóbicas. Isto explica a especificidade da enzima pela parte fenil de uma ampla gama de substratos. Por exemplo, a introdução de outros grupos entre os grupos fenil e metil da benzilpenicilina acarreta uma redução drástica de atividade. A substituição de um grupo hidroxil na posição para do anel benzeno, como na p-hidroxibenzilpenicilina, aumenta a taxa de hidrólise. Esta hidroxila extra deve interagir de forma favorável com a cadeia lateral da serina na posição 67 na cadeia β (Ser B67) que está localizada no final da bolsa hidrofóbica. A serina B1 localizada na entrada da bolsa está envolvida com a catálise. Se a trocarmos por cisteína, abolimos a atividade enzimática. Além disso, a enzima é inativada por fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), uma afinidade comum às serinas proteases.

Há similaridades entre a penicilina acilase e as serinas proteases, que catalisam a hidrólise de ésteres e amidas usando um resíduo catalítico serina e pela formação do complexo acil-enzima. A penicilina acilase atua através da serina N-terminal da cadeia β e tanto a capacidade que a enzima tem de transferir o grupo acil quanto seu comportamento cinético são consistentes com a formação de um complexo acil-enzima. O complexo formado com o ácido fenilacético

(figuras 2.33 e 2.34) mostra que o O γ da serina B1 está em uma posição favorável ao ataque do carbono carbonil. A reação enzimática é reversível. No entanto, a reação de síntese só é favorecida em condições ácidas, quando a protonação do carboxilato favorece o ataque nucleofílico do carbono carbonila.

A figura 2.34 mostra a vizinhança da Ser B1 na enzima nativa, pode-se observar que, ao contrário das serinas proteases, não há nenhuma histidina adjacente ou carboxilato perto da serina B1 da penicilina acilase. Portanto, a capacidade nucleofílica da serina B1 deve ser promovida por um mecanismo diferente. Uma base adjacente a serina é necessária para conferir um caráter nucleofílico à hidroxila. Uma inspeção da estrutura da penicilina acilase mostra que o único candidato é o grupo seril α -amino. Apesar desse grupo α -amino ser capaz de atuar diretamente sob o seril hidroxila, há uma molécula de água que serve de ponte e que deve mediar o caráter básico do nitrogênio. O pKa do grupo α -amino livre da proteína está por volta de 6,8-7,9; desta maneira a forma desprotonada do grupo α -amino pode aceitar prótons desta molécula de água, permitindo que ela atue como uma base, retirando um próton do seril hidroxila. A rede de ligações de hidrogênio no sítio catalítico postulado suporta o mecanismo proposto e mostrado na figura 2.36.

A serina O γ faz três ligações tetraédricas (duas com a água, uma delas faz uma ponte entre o oxigênio do peptídeo e o nitrogênio, e a cadeia principal NH do B23). O nitrogênio do α -amino também forma um conjunto de ligações tetraédricas (com dois oxigênios amida carbonil e com a molécula de água ligante). Os oxigênios do carbonil em cada lado da cadeia N-terminal são do invariante Asn B241 e Gln B23; essas interações direcionam o par de elétrons do

nitrogênio α -amino descarregado para a molécula ponte (água). Isto deve facilitar a transferência de próton da serina O γ através da molécula de água para o grupo α -amino. O pH ótimo de hidrólise de penicilina G é 8, o que está de acordo com a necessidade do grupo α -amino estar desprotonado para que a ligação aconteça. O resultado do ataque nucleofílico pelo seril O γ ao carbono acil da penicilina G será um intermediário oxiânico tetraédrico, estabilizado por interações entre a cadeia amida principal do B23 e B69 e com o N δ do Ans B241 criando um buraco oxiânico como o observado para as serinas proteases. Este intermediário se romperá para a formação do acil-enzima e haverá liberação de 6-APA. O acil-enzima estará suscetível ao ataque da água, para formar o segundo intermediário tetraédrico, estabilizado pelas mesmas interações presentes no primeiro, que pode se romper para liberar o ácido fenil acético - ver figura 2.36 [Duggleby et al. (1995)].

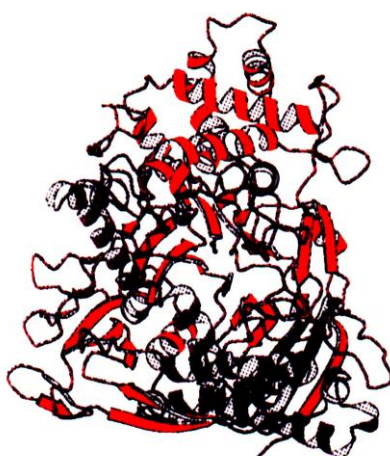


Figura 2.32 - Estrutura Tridimensional da Penicilina acilase: representação do heterodímero. A cadeia α é mostrada em vermelho e a β , em preto [Duggleby et al. (1995)].

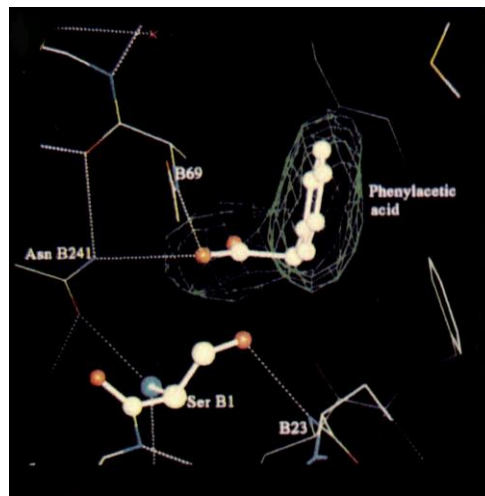


Figura 2.33 - Estrutura do sítio ativo do complexo penicilina acilase-ácido fenilacético [Duggleby et al. (1995)].

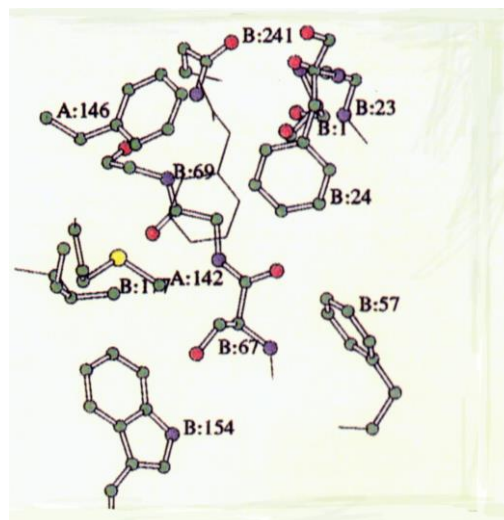


Figura 2.34 - Vista do ácido fenilacético na bolsa de ligação da enzima. A molécula de ácido é desenhada como uma linha e os resíduos como bolas e palitos. MetA142, PheA146, TrpB154 e IleB177 cobrem a bolsa, com a Ser B67 no final. A entrada desta bolsa é formada pela cadeia lateral da Ser B11 Asn B241 e pela cadeia principal de nitrogênios de B23 e B69 [Duggleby et al. (1995)].

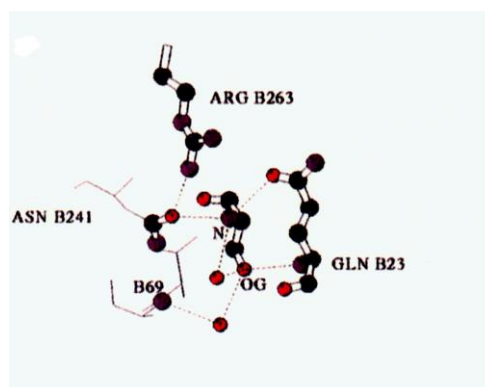


Figura 2.35 - A vizinhança da Ser B1 na enzima nativa, mostrando os arranjos tetraédricos dos ligantes do O γ (marcado por OG) e o grupo α -amino (chamado de N), incluindo a molécula ponte de água [Duggleby et al. (1995)].

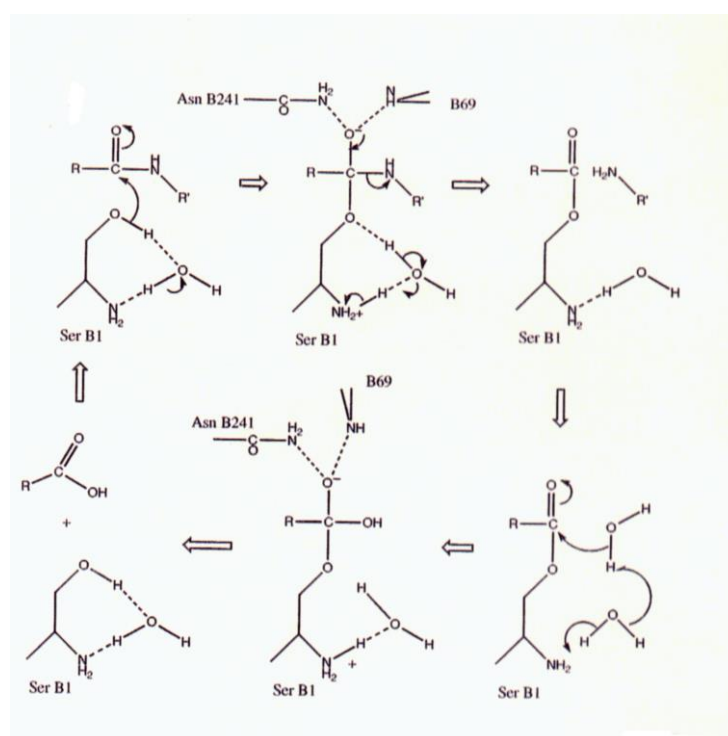


Figura 2.36 - Ação catalítica da penicilina acilase (hidrólise de penicilina G): passos do processo catalítico mostrando o papel da molécula ponte (água), que atua como uma base virtual, e do grupo α -amino para aumentar a nucleofilicidade da serina B1 e mostrando as interações para formar o buraco oxiânico para os intermediários tetraédricos. A deacilação acontece por ataque nucleofílico de uma molécula de água, que pode ser indireto, como mostrado aqui, com a molécula de água atuando como uma base virtual, ou a deacilação pode ser o resultado de um ataque nucleofílico direto pela água que está interagindo com o grupo α -amino. A

interação do seril O γ e a cadeia principal de nitrogênio do B23 não é mostrada e assumimos que se mantém constante ao longo da reação [Duggleby et al. (1995)].

Segundo McVey et al. (1997), a estrutura cristalina da penicilina G acilase de *E. coli* mostra que não há trilogia catalítica equivalente à observada nas serinas proteases. Sua capacidade nucleofílica é aumentada pela mediação do grupo seril- α -amino por uma molécula de água (ponte). Assim, a penicilina acilase usa somente um aminoácido para criar o centro catalítico. Esta enzima apresenta conformação na qual o nucleófilo e outros grupos catalíticos ocupam sítios equivalentes. Esta conformação consiste de um sanduíche da folha β cercada por um par de α -hélices e faz com que a serina N-terminal atue como nucleófilo no mecanismo proposto.

Done et al. (1998) utilizaram diversos derivados comerciais de ácido fenilacético para testar propriedades estéricas e eletrostáticas do sítio de ligação de penicilina acilase. Os autores obtiveram dados experimentais com raios-X para sete complexos de penicilina acilase. Quando compararam esse complexo com a estrutura nativa da enzima observaram apenas pequenas mudanças para todas as regiões, exceto para a do sítio ativo. Todos os ligantes têm a sua porção fenil localizada na bolsa hidrofóbica e seu grupo carboxílico apontando para fora na direção do solvente, perto do resíduo catalítico serina. Apesar da estrutura dos complexos serem muito similares, especialmente nas áreas remotas do sítio ativo, eles podem ser agrupados em dois subgrupos. O subgrupo 1 é formado por complexos nos quais a proteína permanece fixa, como na conformação da enzima nativa; inclui estruturas tais como ácido fenilacético, fenol e ácido p-hidroxifenilacético. Esses ligantes, que não causam mudança conformacional na proteína ao se ligarem, ocupam uma posição similar sendo que seus ácidos

carboxílicos permanecem na bolsa de ligação. Nos complexos contendo o ligante fenol ou o ácido p-hidroxifenilacético, o OH está direcionado para o O γ da serina B67. Sugeriu-se que o grupo OH interaja com um grupo da cadeia lateral da serina B67, mas nessas estruturas o OH não tem a geometria adequada para formar uma ponte de hidrogênio efetiva. No entanto, a proximidade do grupo OH ao O γ da serina pode ter um efeito estabilizante nesses ligantes, uma vez que o resíduo serina fornece uma vizinhança polar favorável em toda a bolsa hidrofóbica. Os autores sobrepuseram os raios-X dos complexos obtidos e observaram que os ligantes ocupam uma posição que permite que fenilalanina A146 e arginina A145 se mantenham na mesma posição observada na enzima nativa. Resultados de experimentos de inibição mostraram que em geral os ligantes que não causam uma mudança conformacional significativa têm um baixo valor da constante de inibição e pode-se considerar que eles se ligam melhor do que aqueles que provocam mudanças na conformação da enzima.

De acordo com Morillas et al. (1999), o átomo N η^1 do resíduo Arg-B263 é capaz de formar ponte de hidrogênio com o átomo O δ^1 do Asn-B241 e este resíduo está posicionado para formar ponte de hidrogênio com o nitrogênio α -amino da Ser-B1. Baseado em valores experimentais de pKa para a enzima, os autores propõem que o grupo Arg-B263 deve estar protonado e sua presença é obrigatória para a catálise, orientando o resíduo catalítico serina N-terminal e contribuindo para o decréscimo do pK do grupo α -amino.

2.6 – Efeito de Condições Operacionais na Síntese Enzimática de Antibióticos β -Lactâmicos

2.6.1 - Efeito do pH

Não é surpreendente que o pH influencie a velocidade de uma reação enzimática, uma vez que os sítios ativos de uma enzima são compostos por grupos ionizáveis. Esses grupos devem estar na forma iônica adequada a fim de manter a conformação do sítio ativo, unir os substratos e catalisar a reação. Além disso, o substrato pode conter grupos ionizáveis e somente a forma não iônica, por exemplo, é capaz de se ligar à enzima e dar sequência à catálise [Segel (1982)].

Cole (1969b) estudou os efeitos do pH (entre 6,0 e 8,5) na síntese de ampicilina catalisada por penicilina acilase de *E. coli* a 30°C. Cole obteve o maior rendimento de síntese entre pH 7,0 e 8,0. Como há um rápido consumo do produto e do substrato em altos valores de pH, o autor iniciou a reação a pH 7,0 e depois baixou o pH para 6,0, observando que este procedimento foi favorável para a manutenção do produto ampicilina.

Marconi et al. (1974) estudaram o efeito do pH na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina acilase de *E. coli* ATCC 9637 imobilizada em fibras de celulose triacetato. Os autores observaram que a pH 6,0 a taxa de formação do antibiótico é menor que a pH 7,0. No entanto, a pH 6,0, a concentração obtida de antibiótico permanece praticamente constante enquanto que a pH 7,0, ela alcança um valor máximo e depois decresce com a hidrólise, que prevalece sobre a síntese do antibiótico. A pHs menores que 6,0, a taxa de síntese foi muito baixa. O mesmo comportamento foi observado pelos autores para a síntese de ampicilina.

Segundo Maladkar (1994), as reações catalisadas por PGA são reversíveis. A pH alcalino (7,5 a 8,5), a reação de hidrólise é favorecida, enquanto a reação de acilação é favorecida a pHs ácidos ou neutros (4,0 a 7,0). O pH ótimo para a acilação de 7-ADCA depende da fonte da enzima e varia entre 6,0 e 7,0. A PGA imobilizada utilizada pelo autor mostrou como ótimo pH 6,5.

Ospina et ali. (1996a) estudam o efeito do pH na síntese de ampicilina catalisada por penicilina acilase. A pH 7,0 a reação mais lenta é a de síntese de ampicilina e, portanto, não se deve esperar acúmulo devido à alta taxa de hidrólise. A pH 6, a situação muda drasticamente. Enquanto a atividade da enzima permanece quase constante, a taxa de hidrólise de éster e de antibiótico é reduzida. Sendo assim, a síntese de ampicilina é dramaticamente favorecida. O comportamento das curvas, obtidas a partir de estudo cinético em ampla faixa de pH, permitiu aos autores concluir que V_{max} é uma função do pH, mas que K_m é independente. A partir da observação de mecanismo catalítico proposto por Duggleby et al. (1995), os autores comentam que o 6-APA deve estar na forma não dissociada para aceitar prótons e direcionar um ataque nucleofílico sob o grupo ácido do intermediário acil-enzima e, portanto, o efeito do pH na reação de síntese está fortemente relacionado com a dissociação do 6-APA.

Kaasgaard et al. (1996) estudaram a influência do pH na síntese de ampicilina catalisada por PGA de *E. coli* a 20°C e observaram que o rendimento era maior a pH 6,4 (alcançado em 21 h). Eles obtiveram um rendimento, calculado em relação à concentração do núcleo, de 93% a pH 7 (alcançado em 3h) e de 60% a pH 3 (alcançado em 48h).

Kheirrolomoom et al. (1998) analisaram a estabilidade de penicilina G acilase em relação ao pH. A atividade enzimática sofre influência de diversos fatores, entre eles o pH. Sob o ponto de vista estereoquímico, mudanças no pH podem afetar a estrutura da enzima. Quando esta alteração for na estrutura secundária ou terciária da enzima, a perda de atividade será irreversível.

Fernandez-Lafuente et al. (1998) estudaram o efeito do pH na razão atividade de síntese/atividade esterase durante a síntese de α -hidroxipenicilina a partir de 6-APA e éster metílico de ácido mandélico usando penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada em agarose. Os autores observaram um aumento na razão atividade de síntese/atividade esterase em baixos valores de pH e de concentração de núcleo. Estes resultados sugerem que o efeito do pH é alterar a adsorção do 6-APA na enzima.

Segundo Diender et al. (2000), o pH é uma variável que influencia não só a atividade, estabilidade e dissociação da enzima, mas também a dissociação dos substratos e a precipitação dos produtos, durante a síntese de antibióticos β -lactâmicos. Como os grupos nucleofílicos usados na síntese cineticamente controlada devem estar descarregados, a reação deve ser realizada em um valor de pH maior que o pK destes grupos. No caso de 6-APA e 7-ADCA, os valores de pK estão entre 4,5 e 5. Isto limita o pH da reação de síntese entre 6 e 8, para a obtenção de rendimentos altos [Kasche (1986)]. Já Clausen et al. (1998), concluem que a síntese enzimática de amoxicilina utilizando PGA de *E. coli* deve ser realizada num intervalo de pH de 5,5 a 6,5 para a obtenção de maior rendimento.

Diender et al. (2000) descrevem um modelo quantitativo para prever o pH e a concentração de substratos e produtos durante a síntese cineticamente controlada de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada, em meio heterogêneo, ou seja, na presença de substratos não completamente dissolvidos. O modelo se baseia: nas velocidades de reação, na solubilidade (dependentes do pH) de produtos e reagentes, na estequiometria da reação e em balanços macroscópicos e de carga. O modelo se mostrou adequado para descrever satisfatoriamente as variações de pH ao longo da reação. No entanto, em relação à concentração dos produtos e reagentes, conseguiu representar apenas a tendência dos dados experimentais.

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

Schroën et al. (1999) estudaram a estabilidade de penicilina G acilase de *E. coli* em água em função do pH. Os autores observaram que a estabilidade da

enzima permanece aceitável entre pH 5 e 8. Ensaios de hidrólise de cefadroxil e cefalexina mostraram que o pH ótimo para estas reações está em torno de 6,5-7. A velocidade de reação decresce a baixos valores de pH. Os autores não conseguiram explicar esse efeito mas acreditam que ele não pode ser explicado pela presença de carga nos substratos ou no grupo serina da enzima.

A escolha do pH, portanto, é um fator determinante no rendimento de síntese de antibióticos β -lactâmicos. A reação de deacilação catalisada por penicilina G acilase é uma reação reversível. Dessa forma, antibióticos semi-sintéticos são produzidos a pHs ácidos ou neutros, na região de pH 5 [Cole, (1969^a); Balasingham et al. (1972); Svedas et al. (1980^a); Pessina et al. (1988); Shewale et al. (1990) e Kheirulomoom et al. (1998)] enquanto 6-APA e 7-ADCA são produzidos em pHs alcalinos (7,5 – 8,5) [Maladkar (1994), Ospina et al. (1996) e Kheirulomoom et al. (1998)]. Para o caso específico da síntese de amoxicilina, Kato et al (1980b) observaram que o pH ótimo está entre 6 e 7, sendo que a reação é catalisada por α -amino ácido ester hidrolase de *Xanthomonas citri*,

2.6.2 – Efeito da Temperatura

Reações químicas acontecem com maior velocidade quando a temperatura aumenta. Um aumento da temperatura confere às moléculas dos reagentes mais energia cinética, dando mais colisões efetivas por unidade de tempo. As reações enzimáticas se comportam analogamente até certo ponto. As enzimas são moléculas protéicas complexas e sua atividade catalítica se deve a uma estrutura terciária altamente ordenada e exata que justapõe grupos de resíduos de aminoácidos específicos, dando lugar à formação de sítios estereoespecíficos. A estrutura terciária de uma enzima se conserva por um grande número de ligações

fracas, não covalentes. Em outras palavras, uma molécula de enzima é uma estrutura frágil e muito delicada. Se a molécula absorve muita energia, a estrutura terciária se rompe e a enzima se desnatura, ou seja, perde atividade catalítica. A estabilidade de uma enzima com a temperatura depende de uma série de fatores, incluindo o pH, força iônica e a presença ou ausência de ligantes (os substratos muitas vezes impedem a desnaturação). Em geral, as enzimas de baixo peso molecular, compostas de cadeias polipeptídicas pequenas e que possuem ligações dissulfeto são mais estáveis ao calor do que as enzimas de alto peso molecular ou oligoméricas [Segel (1982)].

Cole (1969b) estudou os efeitos da temperatura (entre 10°C e 50°C) na síntese de ampicilina catalisada por penicilina acilase de *E. coli* a pH 6,0. Este pH foi escolhido devido a maior estabilidade do produto. O autor obteve o maior rendimento de síntese a 40°C (em 2h).

Maladkar (1994) estudou a produção de cefalexina usando PGA de *E. coli* imobilizada em matriz de celulose e observou que a velocidade de acilação aumentou com o aumento da temperatura até 55°C, após este ponto ela decaiu. Apesar da temperatura ótima para a acilação ser de 55°C, o autor trabalhou a 33°C para reduzir a degradação de 7-ADCA e de cefalexina e aumentar a vida operacional da enzima imobilizada.

Kaasgaard et al. (1996) estudaram a influência da temperatura na síntese de ampicilina catalisada por PGA de *E. coli* a pH 6,4 e observaram que o rendimento era maior a 20°C (alcançado em 22 h). Eles obtiveram um rendimento de 95% a 10°C (alcançado em 72h) e de 60% a 35°C (alcançado em 4h).

2.6.3 – Efeito da Força Iônica

Diversas reações entre íons, que podem ser influenciadas pela força iônica do meio, estão presentes na síntese de antibióticos β -lactâmicos. Nas reações entre íons de diferentes cargas, as constantes de dissociação e os rendimentos devem diminuir com o aumento da força iônica. Isto é observado para a síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos indicando que há um sítio de ligação negativamente carregado para o nucleófilo [Kasche (1986)].

Kato et al. (1980b) observaram que a velocidade de reação e o rendimento de síntese de amoxicilina, a partir de 6-APA e éster metílico de p-hidroxifenilglicina hidrocloreto catalisada por α -amino ácido ester hidrolase de *Xanthomonas citri*, aumentou quando não se utilizou tampão fosfato no meio reacional. Resultados de síntese mostraram que a reação de síntese é muito inibida por altas concentrações de tampão fosfato e cloreto de sódio. Isto pode ser explicado pelo fato de que sais inorgânicos induzem a dissociação da molécula, resultando numa drástica redução da atividade enzimática.

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

2.6.4 – Influência da Concentração de Substratos e Produtos nas Reações de Síntese e Hidrólise de Antibiótico β -Lactâmicos

Balasingham et al. (1972) observaram que penicilina amidase de *E. coli* 9637 e penicilina amidase de *E. coli* 8743A eram inibidas por altas concentrações

de benzilpenicilina. Os produtos, ácido fenilacético e 6-APA, inibiam competitiva e não competitivamente, respectivamente, a reação de hidrólise. Além disso, observam também que há inibição pelo excesso de substrato (penicilina G).

Kato (1980a) observou que 7-ADCA inibe, dependendo de sua concentração, a hidrólise de éster metílico de fenilglicina, catalisada por α -amino ácido éster hidrolase de *X. citri*. A velocidade de hidrólise do éster é máxima na ausência do núcleo e vai diminuindo com a adição de concentrações crescentes de 7-ADCA. A medida que a velocidade de hidrólise diminuía, o autor observou que a velocidade de transferência de acil foi aumentando até chegar a um platô. Os autores observaram que o aumento da relação entre concentração de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA causou um aumento na conversão do núcleo. No entanto, a adição de mais de 20mg/ml de éster ou 10mg/ml de núcleo inibiram a reação de síntese de amoxicilina.

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

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

Ospina (1992) caracterizaram um biocatalisador composto por penicilina amidase imobilizada em resina epoxiacrílica. Os autores observaram que a reação

de hidrólise de benzilpenicilina, a pH 7,8 e 37°C, sofria inibição pelo substrato (com $K_s = 413 \text{ mmol/dm}^3$), inibição competitiva pelo produto ácido fenilacético ($K_{APP} = 68,6 \text{ mmol/dm}^3$) e inibição não competitiva pelo produto 6-APA ($K_{APA} = 100,7 \text{ mmol/dm}^3$).

Blinkovsky e Markaryan (1993) observaram que os produtos (fenilglicina e 7-ADCA) de hidrólise enzimática de cefalexina, catalisada por enzima D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase de *Xanthomonas sp.*, são inibidores competitivo e não-competitivo, respectivamente. Além disso, os autores concluem que a concentração de éster deve ser maior que a do núcleo. O aumento da razão entre as concentrações de éster e de núcleo (de 1:1 até 1:10) melhorou o rendimento de síntese. Quando esta razão foi de 1:12,5 ($C_{\text{ÉSTER}}:C_{\text{NÚCLEO}}$) o rendimento diminuiu.

Bryjak e Nowryta (1993) estudaram a cinética de hidrólise de penicilina acilase imobilizada em suporte acrílico. Os autores não observaram inibição pelo substrato nem tampouco inibição não competitiva por 6-APA. Ácido fenilacético, no entanto, comportou-se como inibidor competitivo.

Maladkar (1994) estudou a produção enzimática de cefalexina a partir de éster metílico de fenilglicina e 7-ADCA usando PGA de *E. coli* imobilizada em matriz de celulose. O autor observou que uma concentração de 25mM ou mais de 7-ADCA inibiu a reação enquanto que PGME não causou efeito inibitório até 300mM. Ele obteve valores de K_m de 4,3 e 24,2 mM para 7-ADCA e PGME, respectivamente, a partir de gráficos de Lineweaver-Burk. Quanto ao efeito inibitório do produto, observou que a taxa de conversão não era afetada até uma concentração de 50mg/ml de cefalexina.

Fernandez-Lafuente et al. (1995) observaram que 6-APA inibe a síntese de α -hidroxipenicilina catalisada por penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada em agarose. Segundo os autores, esta inibição pode ser causada por uma mudança conformacional na enzima promovida pela ligação do núcleo.

Fernandez-Lafuente et al. (1996) observaram que a utilização de um excesso de doador de acil promoveu um aumento significativo no rendimento de síntese cineticamente controlada de cefaloglicina utilizando penicilina amidase de *E. coli*, rendimento calculado em relação ao núcleo antibiótico.

Segundo Youshko et al. (2000), a síntese de ampicilina, por acilação do núcleo β -lactâmico em solução aquosa e catalisada por penicilina acilase, é muito dependente da concentração inicial dos substratos. Eles observaram que a solubilidade do 6-APA é significativamente maior na presença do doador de acil, o segundo substrato. Além disso, os autores compararam dois meios de reação: um homogêneo e outro heterogêneo, que eles designaram sistema "solução aquosa-precipitado". Este meio heterogêneo, contendo substrato em solução e na forma não dissolvida, era mais favorável para a síntese de ampicilina, alcançando um rendimento de 93% contra 70% de rendimento em meio homogêneo. Além disso, os autores realizaram síntese de ampicilina com excesso de doador de acil, em relação ao substrato 6-APA. Eles obtiveram 75% de conversão de 6-APA quando a concentração do doador de acil era 3,2 vezes maior que a do núcleo e 90% de conversão do 6-APA quando a concentração do doador de acil era 3,2 vezes maior que a do núcleo.

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

2.6.5 – Solubilidade dos Substratos e Produtos de Síntese

Tsuji et al. (1978) estudaram a solubilidade de diversos antibióticos β -lactâmicos e observaram que para amoxicilina, a solubilidade varia com o pH e tem seu mínimo no pH próximo ao ponto isoelétrico (ver figura 2.37).

Segundo Kasche (1986) a solubilidade de 6-APA e 7-ADCA é muito baixa em valores de pH menores que 5-6. Este é um dos fatores que inviabilizam a síntese termodinâmica de ampicilina.

Bruggink et al. (1998) menciona que a amoxicilina possui baixa solubilidade em água. Por causa desta baixa solubilidade, a razão entre a velocidade de síntese e a velocidade de hidrólise do antibiótico é alta, uma vez que há pouca quantidade de amoxicilina disponível para hidrólise, em solução. Além disso, a degradação deste antibiótico é mínima, devido também a sua baixa solubilidade.

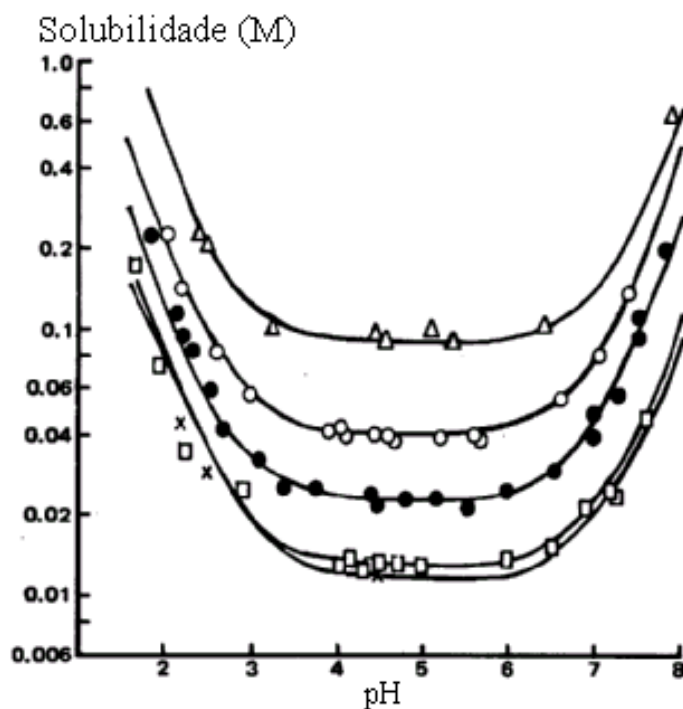


Figura 2.37 – Solubilidade de aminopenicilinas em função do pH a 37°C [Tsuji et al. (1978)]: (O) ampicilina anidra; (●) ampicilina trihidratada; (□) amoxicilina trihidratada e (x) epicilina trihidratada.

Diender et al. (1998b) determinaram a solubilidade em água de p-hidroxifenilglicina, 6-APA e amoxicilina em função do pH, a 25°C. A figura 2.38 mostra os resultados obtidos pelos autores.

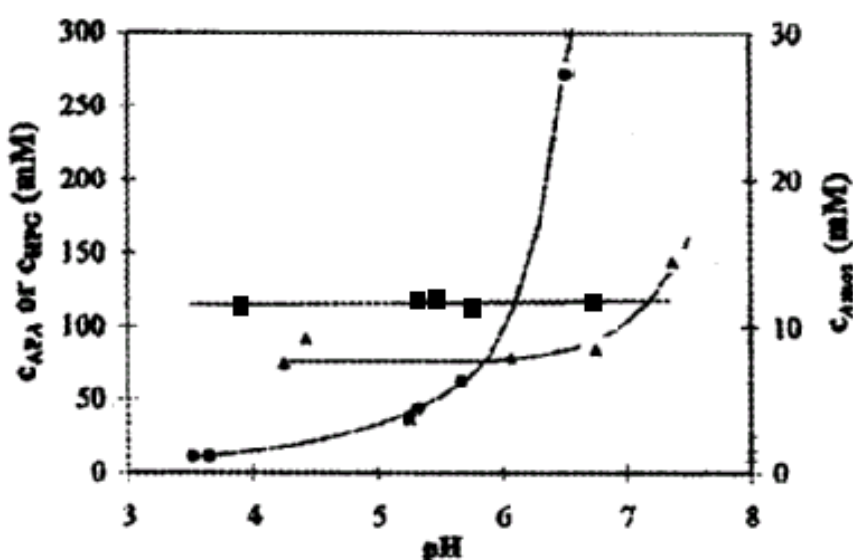


Figura 2.38 – Solubilidade em água de p-hidroxifenilglicina (■), 6-APA (●) e de amoxicilina (▲) em função do pH a 25°C (Diender et al., 1998): C_{APA} = concentração de 6-APA, C_{HPG} = concentração de p-hidroxifenilglicina e C_{AMOX} = concentração de amoxicilina [Youshko et al. (2000)].

Rudolph et al. (1999) estudaram a solubilidade de fenilglicina, 6-APA, p-hidroxi- fenilglicina, amoxicilina e ampicilina em sistemas aquosos e em misturas água-1-butanol. Os autores observaram que aumentando a hidrofobicidade do soluto, aumenta-se a solubilidade relativa.

Youshko et al. (2000) estudaram a solubilidade de ampicilina, 6-APA, fenilglicina, éster metílico de fenilglicina e amida de fenilglicina. Os autores observaram que a solubilidade de 6-APA aumenta muito a pH maiores que 6,5.

Os autores concluem que para valores de pH maiores que 6,5, a eficiência de transferência do grupo acil para este substrato deve ser melhor. No entanto, condições básicas de pH retardam a precipitação de ampicilina (mais solúveis a pHs básicos, acima de 7,5), além de contribuírem para a degradação do sistema β -lactâmico. Como a solubilidade dos reagentes pode ser diferente em misturas complexas, os autores mediram a influência de altas concentrações do doador de acil na solubilidade de 6-APA, fenilglicina e ampicilina. Eles observaram que tanto a solubilidade de ampicilina quanto a de 6-APA aumentaram com o aumento da concentração do doador de ácil (éster ou amida). A solubilidade de fenilglicina não se mostrou dependente do pH nem da concentração do doador de acil.

A tabela 2.7 mostra valores de solubilidade para as condições de pH e temperatura utilizados neste trabalho: pH 6,5 e 7,5 e 25°C.

Tabela 2.7 - Solubilidade em água de p-hidroxifenilglicina, 6-APA e de amoxicilina a 25°C

Espécie	Solubilidade a pH 6,5 (mM)	Solubilidade a pH 7,5 (mM)
p-hidroxifenilglicina	116,7*	116,7*
6-APA	275,0*	286,7**
Amoxicilina	8,3*	15,8*

* (Diender et al., 1998)

** Dados ainda não publicados

2.6.6 – Efeito de solventes orgânicos

Sínteses enzimáticas são normalmente limitadas por equilíbrios termodinâmicos. Por exemplo, baixo rendimento de síntese em água é obtido na condensação direta de um núcleo antibiótico e um doador de acil não ativado (termodinamicamente controlada, portanto), pois a hidrólise do antibiótico é favorecida. Para deslocar o equilíbrio na direção da síntese, deve-se mudar o pH

ou se adicionar altas concentrações de solventes orgânicos [Diender et al. (1998b)].

O uso de solventes orgânicos em sínteses enzimáticas oferece vantagens sobre a reação enzimática em meio aquoso. Por exemplo, pode-se aumentar a solubilidade dos substratos, deslocar o equilíbrio termodinâmico (por redução da atividade da água), alterar os valores dos pKs dos reagentes e controlar a especificidade/enantioseletividade das enzimas (Kim e Lee, 1996b). O efeito de solventes orgânicos no rendimento de reações enzimáticas de síntese de antibióticos cineticamente controladas não está relacionado com a mudança da posição do equilíbrio (as condições experimentais de trabalho estão normalmente afastadas das termodinamicamente favoráveis). Os solventes, nestas reações, afetam diretamente as características das enzimas e estes efeitos podem ser drásticos, uma vez que a atividade catalítica da enzima está intimamente ligada à sua estrutura terciária. Portanto, pequenas mudanças conformacionais nessa estrutura podem causar distorções no sítio ativo e promover grandes variações nas suas propriedades catalíticas [Fernandez-Lafuente et al. (1998)].

Alguns álcoois aumentam a conversão de 6-APA em amoxicilina, catalisada por α -amino ácido ester hidrolase de *Xanthomonas citri*. Dos álcoois testados por Kato et al. (1980) o 2-butanol foi o mais efetivo. Os autores observaram que com a adição de 2-butanol, a hidrólise do éster diminuiu bastante enquanto a reação de síntese sofreu apenas uma pequena diminuição.

Kasche (1985) observou que o rendimento de síntese de ampicilina aumentou com a adição de etanol ou metanol, mas não na presença de álcoois maiores, como n-butanol. A velocidade de hidrólise foi drasticamente reduzida

pela presença de álcoois o que mostra que estes solventes influenciam a estrutura do sítio ativo desta enzima. O autor acredita que este aumento no rendimento de síntese quando se utiliza etanol ou metanol é devido à regeneração do substrato.

Pessina et al. (1988) estudaram o uso de solventes orgânicos com o objetivo de aumentar o rendimento de síntese de algumas ligações amida. Como a água é um subproduto de síntese, solventes orgânicos miscíveis em água podem ser usados para aumentar o rendimento da reação (pela redução da concentração global de água). Outro efeito causado pela adição de um solvente orgânico é diminuir a constante de equilíbrio para a transferência de H^+ de $COOH$ para o NH_2 terminal do substrato. No entanto, apesar das vantagens mencionadas anteriormente, solventes orgânicos podem também causar desnaturação da enzima. Por isso, deve-se buscar o tipo e a concentração adequada de solvente que não cause desnaturação significativa. Os autores observaram que a adição de 25% metanol ou dimetilformamida levou a um aumento de 5% no rendimento de síntese.

Fernandez-Lafuente et al. (1995) estudaram o efeito do metanol na síntese de α -hidroxipenicilina catalisada por penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada em agarose e observaram que esse solvente causa um decréscimo na atividade da enzima. Isto sugere que o metanol deve promover mudanças conformacionais na estrutura da enzima. Os autores discutem a hipótese de Kasche (1984) e concluem que uma mudança conformacional na estrutura da enzima, induzida pelo metanol, é a mais provável explicação para o efeito desse solvente na síntese.

Isaka et al. (1995) estudaram o efeito do metanol nas reações de: síntese e hidrólise de ácido 7-(cloroacetil) amino-3-deacetoxicefalosporânico (D-7-Cl-

ACA), síntese e hidrólise de ácido 7-(fenilacetil) amino-3-deacetoxicefalosporânico (D-7-Ph-ACA) e hidrólise de penicilina G, usando penicilina amidase de *B. magisterium*. Os autores observaram que tanto na síntese quanto na hidrólise de D-7-Cl-ACA o metanol atua como inibidor não competitivo, com constante de inibição de 993mM quando 3,7% de metanol está presente. No entanto, metanol não reduziu as velocidades de reação de síntese e de hidrólise de D-7-Ph-ACA, mesmo quando 8% (v/v) foi utilizado. Tampouco a velocidade de hidrólise de penicilina G foi afetada pela presença deste solvente. A inibição por metanol pode ser explicada pelo fato dos substratos (D-7-Cl-ACA, D-7-Ph-ACA e Penicilina G) e do metanol poderem se ligar simultaneamente a enzima.

Ospina et ali. (1996b) propõem diferentes estratégias para o aumento de síntese de ampicilina: redução da atividade da água, extração contínua de ampicilina e controle de pH. Os autores testaram diferentes solventes no meio reacional (sorbitol, acetonitrila, acetona, dimetilformamida e dimetilsulfóxido). Observaram que o sorbitol não causou nenhum efeito na taxa de reação e os outros solventes testados causaram desativação da enzima. Os autores não encontraram nenhum meio que possibilitasse a separação contínua de ampicilina e que causasse um aumento no rendimento de síntese. Eles observaram também que o metanol atua como inibidor não competitivo, mas que não é possível sintetizar éster metílico de fenilglicina a partir de fenilglicina e metanol. Por último, observaram que o efeito do pH é o mais importante entre os estudados, sendo, portanto, um parâmetro de controle importante.

Kim e Lee (1996a) estudaram a síntese de ampicilina catalisada por penicilina acilase de *E. coli* imobilizada em Eupergit C a 20°C e pH 6,2 em misturas contendo –água e metanol. Os autores observaram que a adição de metanol aumentou o rendimento de síntese, 2 vezes maior para 40% (v/v) de metanol. Kim e Lee mediram também a estabilidade da enzima e observaram que, até 40% de metanol, a perda de atividade era insignificante. Eles observaram que a dependência da velocidade de reação e do rendimento de síntese depende da natureza dos substratos. Quando o doador de acil é um ácido carboxílico, a velocidade aumenta na presença de metanol, mas quando o doador de acil é uma amina, a velocidade sofre uma redução na presença de metanol.

Kim e Lee (1996b) estudaram o efeito de solventes orgânicos na síntese de ampicilina catalisada por penicilina acilase de *E. coli* imobilizada em Eupergit C a 30°C e pH 6,2. Os autores observaram que a velocidade de síntese de ampicilina sofre redução significativa pela presença de solventes com anéis estruturados e ácidos. Medidas de atividade residual mostraram que a redução na atividade da enzima na presença de solventes orgânicos não é atribuída à inativação da enzima. Os autores excluem a hipótese da influência do solvente ser causada pela diminuição da atividade da água pois eles obtiveram a_w em torno de 1, independentemente do solvente utilizado. Além disso, as alterações nos valores de pK foram insignificantes. Portanto, os autores concluíram que a redução da velocidade de reação deve ser atribuída a efeitos diretos do solvente na enzima, como a ligação reversível do solvente à enzima e interações entre o solvente e os resíduos de proteína da enzima.

Fernandez-Lafuente (1998) observaram que a presença de 20% de metanol causou um decréscimo significativo na atividade esterase de penicilina G acilase imobilizada em agarose durante síntese de α -hidroxipenicilina a partir de 6-APA e D-metil mandelato. A atividade de síntese, no entanto, foi preservada. Isto promoveu um aumento na razão atividade de síntese/atividade esterase e um conseqüente aumento no rendimento de síntese. Comportamento similar foi observado para outros núcleos antibióticos (7-ACA e 7-ADCA). Na síntese de antibióticos contendo fenilglicina na cadeia lateral (ampicilina, cefalexina e cefaloglicina) a adição de metanol promoveu uma diminuição significativa na razão atividade de síntese/atividade esterase. Este efeito, agora negativo, aumentou com o aumento da concentração de metanol no meio. Estes resultados indicam que diferentes “conformações da enzima” são afetadas de maneira diferente pela presença de metanol. Portanto, os autores concluíram que o efeito do metanol depende da natureza do doador de acil, da enzima e das condições de reação. Alguns resultados sugerem que o principal efeito do metanol é influenciar diretamente a estrutura da enzima. Fernandez-Lafuente et al. (1998) observaram ainda que quando o éster metílico de fenilglicina foi usado como doador de acil, a presença do metanol tem um efeito duplo. O metanol aumenta a razão síntese/hidrólise do antibiótico, mas diminui a razão síntese/hidrólise do doador de acil. Desta forma, há um aumento do rendimento de síntese quando se usa um excesso de éster (de 63% a 73%) porque o mais importante é diminuir a hidrólise do antibiótico recém-formado. Quando se usa um excesso de núcleo, a hidrólise do antibiótico é fortemente inibida e então a razão síntese/hidrólise do doador de acil é o ponto chave e os rendimentos sofrem um decréscimo (de 90% a 60%).

2.7 Estudo Cinético da Síntese e hidrólise de Antibióticos β -Lactâmicos

Há relativamente poucos relatos sobre a acilação enzimática de 6-APA para a produção de penicilinas. A razão é o baixo rendimento do produto acilado. Este baixo rendimento é atribuído à inibição por produtos e substratos e pela reversibilidade da reação [Rehm et al. (1987)]. Para entender melhor a reação enzimática e superar esses problemas, têm-se buscado elucidar o mecanismo catalítico das penicilinas amidases.

Balasingham et al. (1972) estudaram hidrólise enzimática de benzilpenicilina usando penicilina amidase de *E. coli*. A tabela 2. 8 mostra os parâmetros cinéticos estimados pelos autores.

Tabela 2.8 – Parâmetros cinéticos da penicilina amidase [Balasingham et al. (1972)]

Temp. (°C)	pH	V _{Enzima} (U/mg)	K _m x 10 ⁴ (M)	K _S x 10 (M)	K _I x 10 ³ (M)	
					6-APA (M)	Ácido fenilacético (M)
37	7,0	6,3	7,7	2,5	5,9	4,7
	7,5	6,6	7,4	2,7	6,5	4,8
	8,0	7,1	6,7	2,7	7,1	4,8
	8,5	7,1	8,0	2,8	5,3	5,1
27	8,0	4,6	7,7	2,5	5,7	5,8

Marconi et ali. (1975) estudaram a síntese enzimática de penicilinas (ampicilina e amoxicilina) e cefalosporinas (cefalexina) usando penicilina acilase de *Escherichia coli* ATCC 9637 confinada em fibras de celulose triacetato. A conversão de 6-APA e 7-ADCA em penicilinas e cefalexinas depende do tipo do agente doador de acil. A conversão foi mais alta para o derivado de fenilglicina

provavelmente porque a enzima hidrolisa o éster de p-hidroxifenilglicina 4 vezes mais rápido do que o éster de fenilglicina. Um resultado interessante para a síntese de cefalexina é que, em todos os experimentos, a hidrólise de cefalexina começa a prevalecer sob a síntese quando a concentração molar de éster e de antibiótico são aproximadamente as mesmas. Marconi et al. (1974) sintetizaram amoxicilina, a partir de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (POHPGME) e 6-APA, para diferentes concentrações iniciais de substrato a pH 7 e 25°C. A tabela 2. 9 mostra o rendimento de síntese (em relação a 6-APA).

Tabela 2.9 - Rendimento de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações iniciais de substrato a pH 7 e 25°C [Marconi et al. (1975)].

Concentração inicial de POHPGME (mM)	Concentração inicial de 6-APA(mM)	Concentração máxima de amoxicilina (mM)	Rendimento (%)
7,6	68,0	2,3	30,5
15,2	68,0	4,0	26,3
30,4	68,0	7,8	25,7
123,0	68,0	17,5	14,2

Takahashi et al. (1977) sintetizaram amoxicilina a partir de éster metílico de D-2-p-hidroxifenilglicina e 6-APA e cefalexina a partir de éster metílico de fenilglicina e 7-ADCA catalisada por α -amino ácido éster hidrolase. Obtiveram uma taxa de síntese de amoxicilina mais baixa do que a de cefalexina. Isto porque o éster metílico de D-2-p-hidroxifenilglicina é um substrato menos efetivo para esta enzima. Além disso, observaram que a hidrólise do doador de acil foi maior que a síntese de amoxicilina (por volta de 2:1 em velocidade inicial). Pode-se melhorar, no entanto, o rendimento de síntese, adicionando-se álcool ao meio reacional. Utilizando sec-butanol a 5% v/v e diminuindo a temperatura da reação

para 20°C (para reduzir a inativação da enzima pelo sec-butanol adicionado), os autores obtiveram uma conversão de 93% (mol/mol) de 6-APA em amoxicilina em 15 horas de reação.

Kato (1980a) estudou a cinética de transferência de acil por α -amino ácido éster hidrolase de *Xanthomonas citri*. O autor observou que a hidrólise de éster metílico de D- α -fenilglicina (D-PG-OMe) deu quantidades equimolares de D- α -fenilglicina e metanol. Quando utilizou D-PG-Ome como doador de acil e ácido 7-aminodeacetoxicefalosporânico (7-ADCA) como receptor, a enzima transferiu o grupo acil do D-PG-Ome para o 7-ADCA em competição com a água. A adição de nucleófilos (7-ADCA e 6-APA) diminuiu a atividade molecular da reação de hidrólise de D-PG-Ome. Estes resultados, segundo Kato, mostram que: a) o processo global de hidrólise e transferência de acil acontece tendo como intermediário comum um complexo acil-enzima, b) a etapa de acilação é determinante e c) a transferência do acil compete com a hidrólise do doador de acil. O autor observou que a velocidade de desaparecimento de D-PG-OMe era constante e independente da concentração de 7-ADCA. Essa velocidade era praticamente igual à soma das velocidades de hidrólise e de transferência de acil. Resultado semelhante foi obtido por Stambolieva et al. (1992) para a síntese de ácido 7-benzoxicefalosporânico.

Kato et al. (1980b) estudaram a síntese enzimática de amoxicilina utilizando α -amino ácido éster hidrolase de *Xanthomonas citri* a pH 7,0 e 20°C e observaram que a concentração de amoxicilina atinge um platô após 6 horas de reação e que a conversão de 6-APA em antibiótico era de apenas 23% em base molar. A taxa de reação e o rendimento de síntese sofreram aumento pela troca de

sistema de controle de pH, de tampão fosfato para titulação com NaOH, ou seja, a redução da força iônica do meio reacional aumentou o rendimento de produção de antibiótico para 60%. Alguns álcoois aumentaram a taxa de conversão de 6-APA em amoxicilina sendo que o 2-butanol foi o que causou o maior efeito. Eles observaram que a velocidade de hidrólise do éster é muito maior do que a velocidade de transferência de acil na ausência de 2-butanol. Quando se adicionou este álcool, a velocidade de hidrólise diminuiu e a de síntese (transferência de acil) aumentou mas a soma destas duas velocidades permaneceu constante. Os autores também observaram que um excesso de substrato (6-APA e éster metílico de p-hidroxifenilglicina) causou uma diminuição na taxa de conversão de 6-APA em amoxicilina.

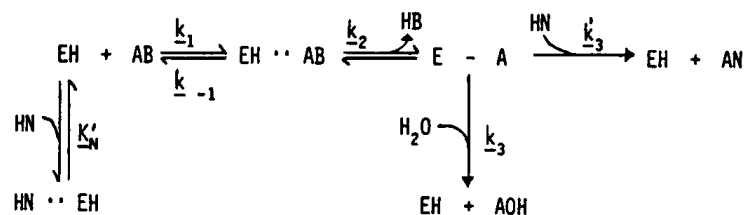
Konecny et ali. (1983) comentam que a reação da quimotripsina envolve dois passos: a formação do acil-enzima a partir da enzima e do doador de acil (éster, amida ou ácido) e a transferência do radical acil para a água, amina ou, por inferência do princípio de reversibilidade microscópica, para um álcool como receptor. Os autores apresentam um esquema catalítico que se aplica bem a proteases e penicilinas acilases: ambas são amidases e esterases e acil transferases. Esse esquema considera fatos bem conhecidos para a penicilina G e a cefalexina, tais como:

- Inibição competitiva pelo ácido formado;
- Inibição não competitiva pela amida;
- Transferência de acil simultânea com hidrólise do éster e da amida produzida

Eles observam ainda que a velocidade de desaparecimento do éster na síntese do cefalexina permanece constante para baixas concentrações da amina e é independente da concentração do receptor de acil.

Kasche et al. (1984) realizaram estudo cinético do mecanismo de síntese de ampicilina e benzilpenicilina catalisada por penicilina acilase. Os autores comparam dois mecanismos de síntese (mostrados na figura 2.39): a) um mecanismo já estabelecido para serina proteases (como a quimotripsina) e b) um mecanismo proposto para proteases e β -galactosidases. No mecanismo a, a velocidade de deacilação deve ser independente da concentração do nucleófilo (NH) e, no mecanismo b, o nucleófilo (NH) deve se ligar ao complexo acil-enzima antes da deacilação. Os autores concluíram que o mecanismo a (da figura 2.39) podia ser descartado, pois a velocidade de formação de fenilglicina não se aproxima de zero mesmo a altas concentrações de 6-APA, o que indica que tanto $E - A$ quanto $ENH - A$ pode ser hidrolisado pela água. Os resultados desses autores suportam um modelo no qual a enzima possui dois sítios de ligação para o 6-APA e um para o éster, que não se sobrepõem. Há um grupo com carga positiva no sítio preferencial de ligação para o 6-APA, ou perto dele. Isso está de acordo com o fato do núcleo ser um inibidor do tipo misto e fenilglicina ser um inibidor competitivo. Quando substratos maiores são utilizados, tais como ampicilina e benzilpenicilina, 6-APA é considerado um inibidor não competitivo e por isso o complexo enzima-núcleo não deve ser capaz de hidrolisar os produtos formados na semi-síntese.

(A)



(B)

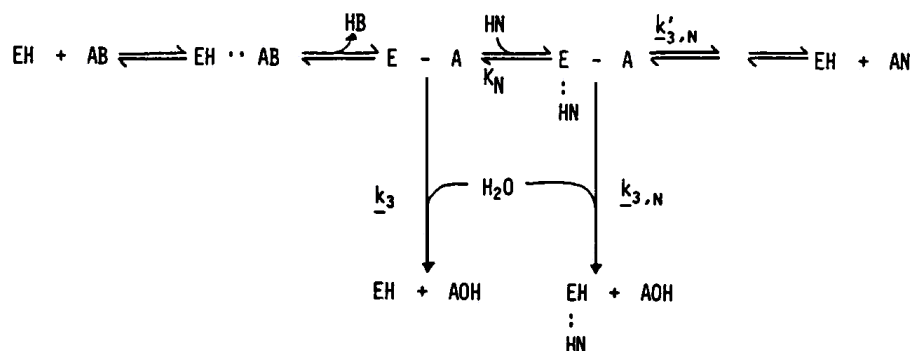


Figura 2.39 – Mecanismo da reação de transferência de acil para um nucleófilo, água ou núcleo β-lactâmico. Neste caso: EH = enzima; HB = metanol; AOH= produto de hidrólise; AB = doador de acil ativado; E-A = acil-enzima; NH = nucleófilo; AN = produto de síntese [Kasche et al. (1984)].

Kasche (1985) estudou o aumento de rendimento na síntese de ampicilina e cefalexina, catalisada por penicilina amidase de *E. coli*, na presença de metanol. O autor observou que o álcool e o 6-APA ocupam sítios de ligação diferentes. Na presença de 6-APA e um álcool, o equilíbrio mostrado na figura 2.40 é possível.

Fernandez-Lafuente et al. (1991) utilizaram derivados ativos e estáveis de penicilina G acilase imobilizada em agarose para estudar a síntese de antibióticos lactâmicos. Fizeram a condensação enzimática de ácido fenilacético e ácido 6-aminopenicilânico para produzir penicilina G, na presença de solventes orgânicos. Estudaram principalmente os efeitos integrados de diferentes variáveis que definem o meio reacional sobre parâmetros de interesse industrial: tempo de

síntese do antibiótico, rendimento de síntese, estabilidade do catalisador, estabilidade e solubilidade de substratos e produtos. As principais variáveis testadas foram: a natureza e a concentração do solvente orgânico, pH e temperatura.

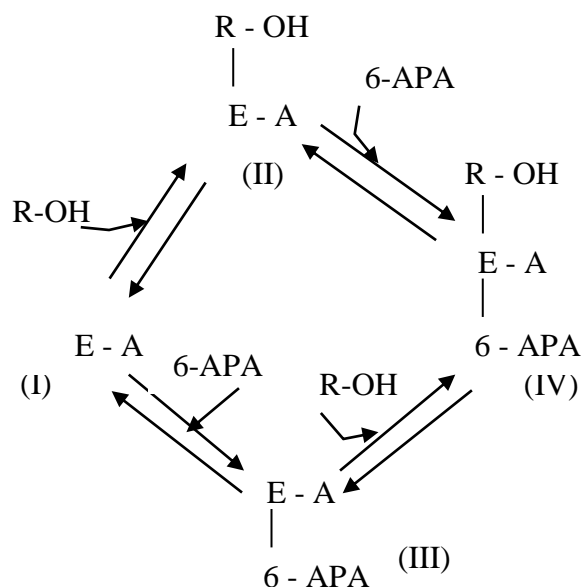


Figura 2.40 - Equilíbrio envolvendo penicilina amidase-doador de acil (E-A) , 6-APA e um álcool (R-OH) (Kasche, 1985).

Os efeitos das variáveis testadas por Fernandez-Lafuente et al. (1991) foram diferentes e as vezes opostos (por exemplo, uma alta concentração de solvente apolar é muito boa do ponto de vista termodinâmico mas é a pior situação para atividade/estabilidade da enzima). Assim, as condições experimentais ótimas foram estabelecidas através de uma solução de compromisso de maneira a se obter bons valores de todos os parâmetros de interesse industrial. A seleção do solvente deve ser feita de maneira cuidadosa pois solventes que produzem efeitos similares do ponto de vista termodinâmico (aumento similar no pK dos grupos carboxílicos) podem exercer efeitos diferentes na estrutura da

enzima (atividade / estabilidade). A partir dos dados apresentados, os autores puderam calcular valores de parâmetros de interesse industrial para a síntese de penicilina G nas condições experimentais de compromisso. Os autores concluíram ainda que os dados obtidos para a penicilina G podem ser extrapolados para a síntese de outros antibióticos semi-sintéticos. É evidente que algumas mudanças serão necessárias, deve-se testar novamente os valores de pK dos novos doadores de acil e a especificidade da enzima frente a esses novos substratos.

Stambolieva et al. (1992) estudaram a síntese de ácido 7-benzoxazolonylacetamido desacetoxicelalosporânico (BOAMDCA), a partir de éster metílico de 2-benzolon-3-yl- acetic- acid (BOAAME, doador de acil) e 7-ADCA (receptor de acil), catalisada por penicilina amidase de *E. coli*. Eles observaram a formação de 2-benzoxazol-3-yl-acetic-acid (BOAA) e BOAMDCA. Viram que a soma das quantidades obtidas de produtos, de hidrólise e de síntese, foi igual à quantidade consumida de BOAAME, o que sugere que ambos receptores (água e 7-ADCA) competem pelo acil-enzima. Essa conclusão concorda com a observação de Kato (1980). Esses autores viram que um aumento na concentração inicial de 7-ADCA levava a um aumento na taxa inicial de síntese e a um decréscimo na taxa inicial de hidrólise. Através da comparação dos valores de $K_{N,app}$, eles concluíram que a penicilina amidase, no caso estudado, comporta-se mais como uma transferase do que uma hidrolase.

Hyun et al. (1993) estudaram o efeito de polietileno glicol (PEG) na síntese enzimática de cefalexina a partir de 7-ADCA e éster metílico de fenilglicina (PGME) usando uma acilase de *Xanthomonas citri*. A adição de PEG (MW 300 a 20000) aumentou o rendimento de forma significativa. A adição de

PEG não afetou a hidrólise de cefalexina nem de PGME. O PEG adicionado ao meio não diminuiu a atividade da água de forma significativa para explicar o aumento no rendimento. O caráter hidrofóbico do PEG e sua interação com o substrato hidrofóbico foi a razão principal do aumento do rendimento da síntese de cefalexina. Os autores observaram que a constante de Michaelis-Menten para o 7-ADCA, K_{7-ADCA} , obtida na presença de PEG foi menor que a encontrada para o sistema sem a adição de PEG. Isto indica que a afinidade entre a enzima e o 7-ADCA era significativamente maior no sistema reacional contendo PEG.

Hyun et al. (1989) estudaram o efeito da atividade da água (a_w) na síntese enzimática de cefalexina a partir de 7-ADCA e éster metílico de fenilglicina (PGME) usando enzima α -amino ácido éster hidrolase de *Xanthomonas citri*. Os autores observaram que a atividade de síntese da enzima e o rendimento foram melhorados quando a atividade do meio foi abaixada para 0,97. Encontraram que os agentes que diminuía a atividade do meio eram: glicerol, sacarose e sorbitol. Os rendimentos de síntese foram melhorados em 170% com 15% de glicerol, 230% com 30% de sacarose e 270% com 20% de sorbitol. O rendimento de conversão de cefalexina apresentou uma tendência a aumentar à medida que a_w aumentava até um valor ótimo de a_w (0,96 - 0,97). Os autores observaram que os depressores de pH não afetaram de forma significativa a hidrólise de cefalexina. Quando se utilizou sorbitol, eles observaram uma diminuição na taxa de hidrólise de PGME. Sabe-se que o PGME atua não só como doador de acil para o 7-ADCA na síntese de cefalexina mas também para a água, segundo mostrado por Nam et al., 1985. Como o depressor de a_w diminui a hidrólise de PGME, pode-se diminuir a concentração inicial de PGME e mesmo assim obter o rendimento

máximo obtido sem a adição de depressores de a_w e usando uma concentração maior de PGME.

Maladkar (1994) estudou a produção enzimática de cefalexina utilizando penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada em matriz de celulose. Os fatores que afetam a conversão de 7-ADCA em cefalexina, tais como: pH, temperatura, concentração de 7-ADCA, concentração de éster metílico de fenilglicina (PGME), concentração de enzima, tempo e razão molar de 7-ADCA/PGME, foram investigados. Sob condições otimizadas, o autor atingiu 85% de conversão de 7-ADCA em cefalexina. O autor obteve uma taxa de produção de cefalexina linear e crescente até 4 horas de reação. Em 4h, observou-se uma conversão de 85%, com parâmetros otimizados. O autor testou a influência de algumas variáveis tais como: pH, temperatura, concentração de substrato, de produtos e de enzima.

Ospina et al. (1996a) testaram diferentes modelos matemáticos disponíveis na literatura para a hidrólise de Penicilina G (PG) a pH 7,8 e 37°C. Os autores concluíram que a equação 2.11 foi a que melhor representou os dados disponíveis, com os parâmetros mostrados na tabela 2.10, sendo que PAA = ácido fenilacético.

$$v = \frac{v_{\max} PG}{Km \left(1 + \frac{PAA}{K_{app}} + \frac{6-APA}{K_{APA}} + \frac{PAA \cdot 6-APA}{K_{PAA} K_{APA}} \right) + PG \left(1 + \frac{6-APA}{K_{APA}} + \frac{PG}{K_S} \right)}$$

Equação 2.11

Tabela 2.10 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise de Penicilina G (PG) a pH 7,8 e 37°C [Ospina et al. (1996a)]

Parâmetro	Valor
-----------	-------

v_{max} (U/g)	170
K_m (mmol/dm ³)	4,17
K_s (mmol/dm ³)	413
K_{PAA} (mmol/dm ³)	68,8
K_{APA} (mmol/dm ³)	100,7

Fernandez-Lafuente et al. (1996) estudaram a síntese cineticamente controlada de cefaloglicina utilizando penicilina amidase de *E. coli*. A razão entre a atividade esterase/hidrolase é um dos parâmetros críticos deste processo. Normalmente, o objetivo é maximizar a transformação do núcleo em antibiótico, uma vez que este substrato é o mais caro e o menos estável. Os autores observaram que o uso de excesso do doador de acil aparentemente causa uma diminuição da atividade amidase e um aumento da atividade de síntese, resultado em aumento do rendimento. Além disso, a adição de metanol (como aditivo) permitiu a obtenção de melhor rendimento de síntese. Isto porque há uma mudança na estrutura da enzima. Como o mecanismo de hidrólise de amidas é mais complexo, a variação na estrutura da enzima deve afetar a atividade amidase de forma mais significativa.

2.8 – Modelos Matemáticos para a síntese e hidrólise enzimática de antibióticos β -lactâmicos

Rhee et al. (1980) estudaram a síntese enzimática de cefalexina a partir de PGME e 7-ADCA usando enzima de *Xanthomonas citri*. A energia de ativação, valores de K_m para 7-ADCA e PGME, valores de K_i para PGME foram determinados e são: 8,63 kcal/mol; 3,7 mM; 14,5 mM e 70 mM, respectivamente.

A energia de ativação (ΔE) para a síntese de cefalexina foi estimada usando gráfico de Arrhenius em intervalo de temperatura de 12 a 47°C.

Como a enzima que faz a síntese está envolvida numa reação com dois substratos, os autores estimaram os parâmetros cinéticos usando a seguinte expressão de velocidade:

$$V = \frac{V_{\max} (7-ADCA)(PGME)}{K_{7-ADCA} K_{PGME} + K_{7-ADCA} (PGME) + K_{PGME} (7-ADCA) + (7-ADCA)(PGME)}$$

Equação 2.12

onde:

(7-ADCA) = concentração de 7-ADCA;

(PGME) = concentração de PGME;

V_{\max} = velocidade máxima;

K_{PGME} e K_{7-ADCA} = constante de Michaelis-Menten para PGME e 7-ADCA, respectivamente.

Os valores de parâmetros foram obtidos utilizando gráficos primários (taxa recíproca inicial de reação em função da concentração recíproca de substrato) e gráficos secundários (intersecção dos gráficos primários em função da concentração recíproca de substrato) e são mostrados na tabela 2.11.

Tabela 2.11 - Valores de parâmetros obtidos por Rhee et al. (1980).

Parâmetro	Valor
V_{\max}	0,31 $\mu\text{mol/min/mg cel.}$
K_{7-ADCA}	3,7 mM
K_{PGME}	14,5 mM

Svedas et al. (1980b) propuseram modelo matemático para a síntese de benzilpenicilina a partir de 6-APA e fenilacetilglicina (PGA). A velocidade de

hidrólise de benzilpenicilina (V_2), com inibição competitiva por ácido fenilacético é dada pela equação 2.13 e a velocidade de síntese (V_1), pela equação 2.14.

$$V_2 = \frac{k_2[E_0]S_2}{S_2 + K_2\left(1 + \frac{P}{K_3}\right)}$$

Equação 2. 13

$$V_1 = \frac{k_2[E_0]S_1/\left(1 + \frac{K_N}{N}\right)}{S_1 + K_1\left(1 + \frac{K_N}{N}\right)}$$

Equação 2. 14

sendo que P = ácido fenilacético, S_1 = PGA, S_2 = benzilpenicilina, N = 6-APA, K_N = constante de adsorção de 6-APA, K_3 = constante de inibição por ácido fenilacético, k_1 e k_2 = constante do catalisador para a reação 1 e 2, K_1 e K_2 = constante de Michaelis-Menten para a reação 1 e 2. A tabela 2.12 mostra os parâmetros cinéticos. Os autores observaram que k_1 , k_2 e K_N são os parâmetros que mais afetam a velocidade de formação de benzilpenicilina.

Tabela 2.12 - Parâmetros cinéticos ótimos para a síntese de benzilpenicilina [Svedas et. al. (1980b)].

pH	$k_1 (s^{-1})$	$k_2 (s^{-1})$	$K_1 (M)$	$K_2 (M)$	$K_3 (M)$	$K_N (M)$
8,0	39,0	44,6	$6,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$9,0 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-3}$
7,0	44,1	35,4	$6,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$9,0 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^{-3}$
6,0	22,1	26,2	$3,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$9,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-3}$
5,0	12,8	7,6	$4,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$9,0 \times 10^{-6}$	$0,7 \times 10^{-3}$

Choi et al. (1981) prepararam e purificaram - com sulfato de amônio, coluna DEAE-celulose e coluna cromatográfica Sepharose-4B - uma enzima de *Xanthomonas citri* (IFO 3835) que catalisa a síntese de cefalexina a partir de 7-ADCA e PGME. Os valores de K_m para 7-ADCA, PGME e cefalexina (CEX) foram determinados e seus valores são: 11,1; 2,1 e 1,61 mM, respectivamente. Segundo os autores, a síntese enzimática de CEX segue a cinética de reação bi-uni reversível. A constante de equilíbrio é influenciada pela razão molar inicial de 7-ADCA e PGME. A hidrólise de cefalexina é catalisada pela mesma enzima que faz a síntese mas metanol não participa da reação de hidrólise. A quantidade de enzima na mistura reacional influencia a taxa inicial mas não afeta a concentração de equilíbrio de produto. Choi et al. fizeram a imobilização da enzima sobre vários adsorventes. Kaolin e bentonite mostraram uma maior retenção de atividade e estabilidade para reaproveitamento do biocatalisador. A cinética da enzima imobilizada foi analisada e comparada com a da enzima solúvel. Os autores fizeram também algumas simulações utilizando as equações obtidas. O resultado da simulação apresentou boa concordância com os dados experimentais.

Reconhecendo que a enzima envolvida na síntese de cefalexina participa de uma reação com dois substratos, os autores estimaram os parâmetros cinéticos usando expressões para dois substratos propostas por Segel (1975). Eles construíram gráficos de Lineweaver-Burk com dados de velocidade, obtidos com concentração variável de PGME e 7-ADCA. O ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas foi replotado em função do inverso da concentração de 7-ADCA e PGME. Dos pontos de intersecção e da inclinação destas novas curvas, as constantes cinéticas (k_{7-ADCA} , k_{PGME} , V_{max}) foram determinadas e seus valores

são: 11,1 mM, 2,1mM, 12,5 µmol/min/mg de proteína, respectivamente. O valor de K_m para a reação reversa (hidrólise de cefalexina) foi também determinado e seu valor é: 1,7mM. Metanol, produto secundário da reação de síntese, não mostrou nenhum efeito estimulante para a reação de hidrólise. Assim, os autores concluíram que a síntese de cefalexina segue um mecanismo de reação reversível bi-uni. Eles determinaram parâmetros cinéticos para a enzima imobilizada por adsorção em Kaolin e bentonite. Os valores encontrados foram similares aos da enzima livre (ver tabela 2.13) sugerindo que a enzima está ligada à superfície dos adsorventes e que a difusão do substrato não é um problema significativo.

Tabela 2.13 - Comparação de constantes cinéticas entre enzimas solúveis e imobilizadas [Choi et al. (1981)].

Parâmetro	Enzima solúvel	Enzima imobilizada (Kaolim)	Enzima imobilizada (Bentonite)
K_{7-ADCA}	$1,11 \times 10^{-2}$ M	$1,15 \times 10^{-2}$ M	$1,29 \times 10^{-2}$ M
K_{PGME}	$2,10 \times 10^{-3}$ M	$2,10 \times 10^{-3}$ M	$2,23 \times 10^{-3}$ M
K_{CEX}	$1,61 \times 10^{-3}$ M	$2,0 \times 10^{-3}$ M	$1,70 \times 10^{-3}$ M

Baseados na observação dos resultados, os autores concluíram que a reação de síntese de cefalexina era uma reação reversível bi-uni e derivaram uma expressão de velocidade para descrevê-la, ver equação 2.15.

$$V = V_f \frac{\left[(PGME)(7-ADCA) - (CEX) / K_{eq} \right]}{K_{PGME} K_{7-ADCA}} \left(1 + \frac{(CEX)}{K_{CEX}} + \frac{(CEX)(PGME)}{K_{CEX} K_{PGME}} + \frac{(PGME)}{K_{PGME}} + \frac{(7-ADCA)}{K_{7-ADCA}} + \frac{(7-ADCA)(PGME)}{K_{7-ADCA} K_{PGME}} \right)^{-1}$$

Equação 2.15

onde:

(CEX) = concentração de cefalexina;

(PGME) = concentração de PGME;

(7-ADCA) = concentração de 7-ADCA;

K_{CEX} , K_{PGME} e K_{7-ADCA} = constante de Michaelis-Menten cefalexina, PGME e 7-ADCA, respectivamente;

K_{EQ} = constante de equilíbrio e

V_f = velocidade máxima

A conversão (x) pode ser definida em base molar:

$$x = \frac{(CEX)}{(7-ADCA)_0} = \frac{(PGME)_0 - (PGME)}{(7-ADCA)_0} = \frac{(7-ADCA)_0 - (7-ADCA)}{(7-ADCA)_0}$$

Equação 2. 16

Substituindo os termos de concentração por conversão, a equação de velocidade fica:

$$\frac{dx}{dt} = V_f \frac{\left\{ [(PGME)_0 - (7-ADCA)_0 x] (1-x) - \frac{x}{K_{EQ}} \right\}}{K_{PGME} K_{7-ADCA} \left[1 + \frac{(7-ADCA)_0 x}{K_{CEX}} + \frac{(7-ADCA)_0 (PGME)_0 x}{K_{CEX} K_{PGME}} + \frac{(PGME)_0}{K_{PGME}} + \frac{(7-ADCA)_0 (1-x)}{K_{7-ADCA}} + \frac{(PGME)_0 (7-ADCA)_0 (1-x)}{K_{PGME} K_{7-ADCA}} \right]}$$

Equação 2. 17

A equação integrada de velocidade foi usada pelos autores para prever o progresso da reação em reator batelada. Eles obtiveram boa concordância entre os dados experimentais e os resultados da simulação.

Konecny et al. (1983) estudaram o mecanismo e a cinética da transferência de acil por penicilina acilase de *B. megaterium* ATCC 14945. Eles propuseram o sistema de reações mostrado na figura 2.41, correspondente a uma seqüência de três reações com um intermediário comum (complexo acil-enzima). Os autores obtêm um modelo matemático assumindo que: as etapas de quebra a_1 , b_2 e c_2 são lentas e que as espécies envolvidas nas etapas subsequentes estão em equilíbrio ($Ka=a_{-1}/a_1$, $Kb= b_{-1}/b_1$, $Kc=c_{-1}/c_1$). Estas hipóteses implicam que a concentração

do intermediário (EAc) é muito pequena quando comparada com a concentração das outras espécies.

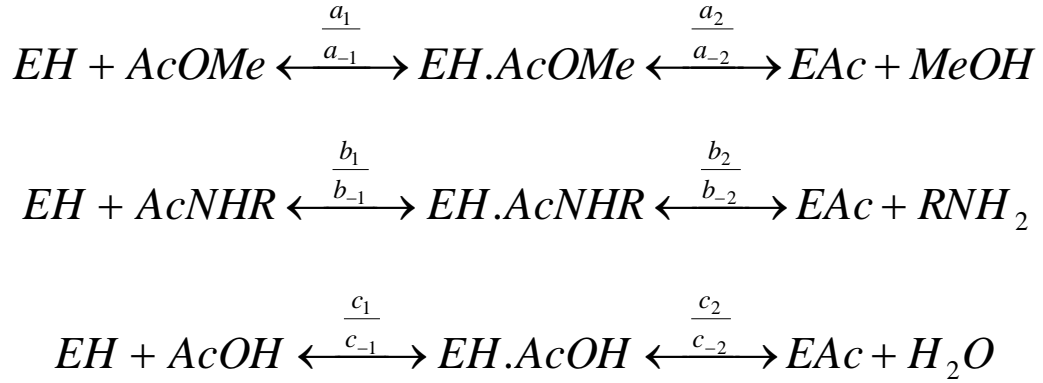


Figura 2.41 – Sequência de reação proposto por Konecny et al. (1983). EH = enzima, EAc = intermediário, RNH_2 = doador de acil, Ac = radical acil (neste caso $Ac = CNCH_2CO$).

O modelo 1 proposto por Konecny et al. (1983) é composto pelas seguintes equações:

$$-Va = Vb + Vc = \frac{a_2(AcOMe)}{Ka} \frac{1 + (RNH_2)/\beta}{1 + (MeOH)/\alpha + (RNH_2)/\beta} (EH)$$

Equação 2. 18

$$\frac{Vc}{Vb} = \frac{\beta}{(RNH_2)}$$

Equação 2. 19

$$Vc = \frac{a_2(AcOMe)}{Ka} \frac{1}{1 + (MeOH)/\alpha + (RNH_2)/\beta} (EH)$$

Equação 2. 20

onde:

$$\alpha = \frac{c_{-2}(H_2O)}{a_{-2}}$$

$$\beta = \frac{c_{-2}(H_2O)}{b_{-2}}$$

MeOH = metanol e

$$(EH) = \frac{(EH)_{TOTAL}}{1 + (AcOMe)/Ka + (AcNHR)/Kb + (AcO^-)/Ki}$$

Para o caso de altas concentrações do receptor de acil, os autores usaram um outro modelo, considerando a reação mostrada na figura 2.42.

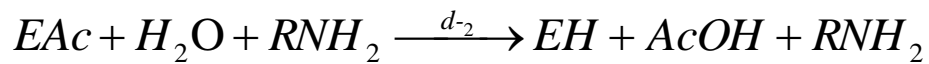


Figura 2.42 –Reação proposta por Konecny et al. (1983) quando na presença de altas concentrações do receptor de acil.

Neste caso, as equações do modelo são:

$$\frac{Vc}{Vb} = \frac{\beta}{(RNH_2)} \left[1 + \frac{(RNH_2)_0}{\delta} \right]$$

Equação 2. 21

$$Vc = \frac{a_2(AcOMe)}{Ka} \frac{1 + (RNH_2)_0/\delta}{1 + (MeOH)/\alpha + (RNH_2)/\beta + (RNH_2)_0/\delta} (EH)$$

Equação 2. 22

$$e (EH) = \frac{(EH)_{TOTAL}}{1 + (AcOMe)/Ka + (AcNHR)/Kb + (AcO^-)/Ki + (RNH_2)/Ks}$$

onde δ e Ks são parâmetros empíricos. Ks pode ser interpretada como sendo a constante de inibição competitiva da enzima por 7-ADCA. O modelo 1 proposto por Konecny et al. (1983) representa bem dados experimentais para baixas concentrações de 7-ADCA mas não é satisfatório para altas concentrações desta

espécie. O modelo 2 foi capaz de representar uma grande faixa de concentração de receptor de acil.

Nam et al. (1985) observaram que durante a síntese de cefalexina a partir de 7-ADCA e PGME usando α -acilamino- β -lactam acilhidrolase, esta enzima catalisa três reações: hidrólise de PGME, síntese de cefalexina e hidrólise de cefalexina. Baseado em seus resultados experimentais, os autores propuseram um mecanismo cinético para a síntese enzimática de cefalexina com um intermediário acil-enzima, analisando compostos intermediários no meio reacional por HPLC (cromatografia líquida a alta pressão). Deste mecanismo, eles derivam as três equações de velocidade e estimam os seus parâmetros cinéticos utilizando gráficos de Lineweaver-Burk e Dixon. Realizaram simulação em computador utilizando o modelo cinético proposto e obtiveram uma boa concordância entre os resultados da simulação e os dados experimentais. Os autores utilizaram metanol e fenilglicina (PG) como substratos na síntese de PGME (reação reversa à hidrólise) mas não detectaram PGME, o que indica que a hidrólise de PGME é uma reação irreversível. O mesmo resultado foi obtido na hidrólise de cefalexina (CEX) na presença de metanol. Não foi possível sintetizar cefalexina a partir de PG e 7-ADCA, que são produtos hidrolíticos de CEX, o que sugere que a hidrólise e a síntese de CEX são irreversíveis. Os autores verificaram ainda a existência de um intermediário comum às três reações. Observaram também que o pH ótimo para as três equações é praticamente o mesmo (por volta de 6,0). Isto sugere que PGME e CEX devem reagir no mesmo sítio ativo da enzima para formar um intermediário comum neste sistema reacional. A figura 2.43 mostra o mecanismo cinético proposto por Nam et al. (1985) que consiste em:

- Passos rápidos de ligação de PGME, PG e CEX à enzima;
- Acilação com PGME, PG e CEX ligados à enzima;
- Acilação da enzima com PGME, PG e CEX ligados para formar acil-enzima;
- Hidrólise do acil-enzima por água e
- Reação do acil-enzima com 7-ADCA por ataque nucleofílico.

A partir do mecanismo proposto, Nam et al. (1985) derivaram as equações de velocidade para a hidrólise de PGME, síntese de CEX e hidrólise de CEX utilizando método quase-estacionário, com as seguintes considerações:

- k_2 é o fator limitante de todos os passos;
- PG produzida atua como inibidor por se ligar à enzima livre;
- No estado quase-estacionário, a concentração de acil-enzima e CEX ligada a enzima são mantidos constantes durante a reação.

As equações de 2.23 a 2.35 representam o modelo cinético proposto por Nam et al. (1985). Os parâmetros cinéticos estimados por eles podem ser observados na tabela 2. 14. Posteriormente, os autores utilizaram as equações integradas para prever o perfil de reação em reator batelada e obtiveram bons resultados quando compararam a previsão do modelo com os dados experimentais.

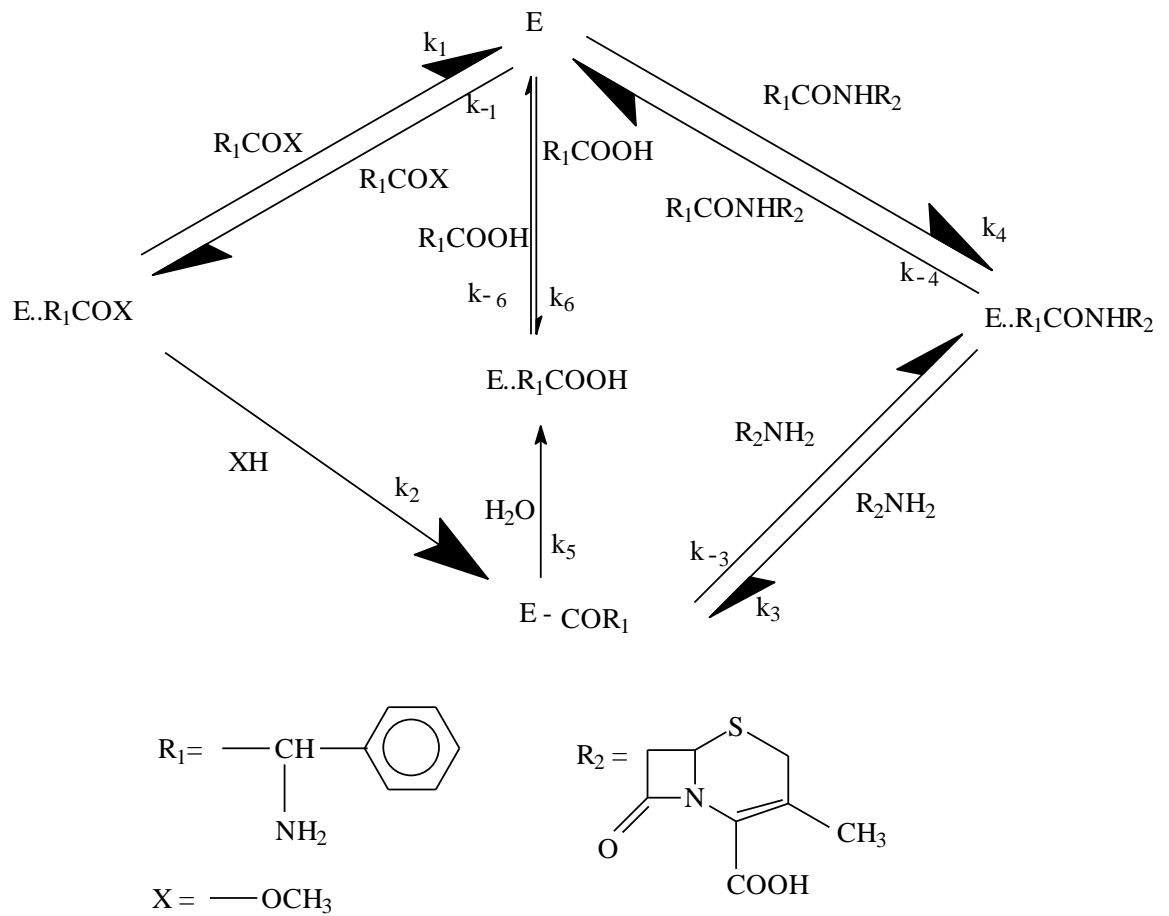


Figura 2.43 - Modelo cinético com intermediário acil-enzima proposto por Nam et al., 1985

Das duas primeiras considerações as seguintes equações foram obtidas:

$$(EA) = \left(\frac{k_1}{k_{-1}} \right) (E)(PGME)$$

Equação 2. 23

$$(ED) = \left(\frac{k_{-6}}{k_6} \right) (E)(PG)$$

Equação 2. 24

Usando a terceira consideração, as concentrações de acil-enzima e CEX ligada à enzima podem ser expressas pelas seguintes equações a partir de

$$\frac{d(EB)}{dt} = 0 \text{ e } \frac{d(EC)}{dt} = 0.$$

$$(EB) = \frac{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)k_2(k_{-3} + k_4)(E)(PGME) + k_{-3,-4}(E)(CEX)}{k_3k_4(7 - ADCA) + k_5(k_{-3} + k_4)}$$

Equação 2. 25

$$(EC) = \frac{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)k_2k_3(E)(PGME)(7 - ADCA) + k_{-4}k_3(7 - ADCA) + k_5(E)(CEX)}{k_3k_4(7 - ADCA) + k_5(k_{-3} + k_4)}$$

Equação 2. 26

O total de enzima na mistura reacional é constante a pesar de existir em diferentes formas a cada instante:

$$(E)_t = (E) + (EA) + (EB) + (EC) + (ED)$$

Equação 2. 27

$$\frac{(E)_t}{(E)} = \frac{(\text{numerador})_5}{k_3k_4(7 - ADCA) + k_5(k_{-3} + k_4)}$$

Equação 2. 28

onde:

$$\begin{aligned} (\text{numerador})_5 = & k_5(k_{-3} + k_4) + \left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)(k_2 + k_5)(k_{-3} + k_4)(PGME) + \\ & k_3k_4(7 - ADCA) + \left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)k_3(k_2 + k_4)(PGME)(7 - ADCA) + k_5(k_{-3} + k_4) \\ & \times \left(\frac{k_{-6}}{k_6}\right)(PG) + k_3k_4\left(\frac{k_{-6}}{k_6}\right)(PG)(7 - ADCA) + k_3k_{-4}(CEX)(7 - ADCA) + \\ & k_{-4}(k_{-3} + k_5)(CEX) \end{aligned}$$

Equação 2. 29

A velocidade de hidrólise de PGME pode ser obtida como:

$$-\frac{d(\text{PGME})}{dt} = \left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right) k_2 (E)(\text{PGME})$$

Equação 2. 30

$$\begin{aligned} -\frac{d(\text{PGME})}{dt} \frac{1}{(E)_t} &= \frac{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right) k_2 (\text{PGME}) + \left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right) k_3 k_4 \left(\frac{k_2}{k_5}\right) (\text{PGME})(7 - \text{ADCA})}{(\text{denominador})_6} = \\ &= \frac{V_{\text{PGME}} (\text{PGME}) + V_{7-\text{ADCA}} (\text{PGME})(7 - \text{ADCA})}{(\text{denominador})_7} \end{aligned}$$

Equação 2. 31

$$\begin{aligned} (\text{denominador})_6 &= 1 + \frac{k_1(k_2 + k_5)}{k_{-1}k_5} (\text{PGME}) + \frac{k_3k_4}{k_5(k_{-3} + k_4)} (7 - \text{ADCA}) + \\ &\frac{k_1k_3(k_2 + k_4)}{k_{-1}k_5(k_{-3} + k_4)} (\text{PGME})(7 - \text{ADCA}) + \frac{k_{-6}}{k_6} (\text{PG}) + \frac{k_{-6}}{k_6} \frac{k_3k_4}{k_5(k_{-3} + k_4)} (\text{PGME})(7 - \text{ADCA}) + \\ &+ \frac{k_3k_{-4}}{k_5(k_{-3} + k_4)} (\text{CEX})(7 - \text{ADCA}) + \frac{k_{-4}(k_{-3} + k_5)}{k_5(k_{-3} + k_4)} (\text{CEX}) \end{aligned}$$

Equação 2. 32

$$\begin{aligned} (\text{denominador})_7 &= 1 + \frac{(\text{PGME})}{K_{\text{PGME}}} + \frac{(7 - \text{ADCA})}{K_{7-\text{ADCA}}} + \frac{(\text{PGME})(7 - \text{ADCA})}{K_{\text{APGME}}} + \frac{(\text{PG})}{K_{\text{PG}}} + \\ &+ \frac{(\text{PG})(7 - \text{ADCA})}{K_{\text{PG}} K_{7-\text{ADCA}}} + \frac{(\text{CEX})(7 - \text{ADCA})}{K_{\text{ACEX}}} + \frac{(\text{CEX})}{K_{\text{CEX}}} \end{aligned}$$

Equação 2. 33

onde:

$$V_{\text{PGME}} = \left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right) k_2$$

$$K_{\text{PGME}} = \frac{k_{-1}k_5}{k_1(k_2 + k_5)}$$

$$V_{7-\text{ADCA}} = \frac{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right) \left(\frac{k_2}{k_5}\right) k_3 k_4}{(k_{-3} + k_4)}$$

$$K_{7-ADCA}=\frac{k_5(k_{-3}+k_4)}{k_3k_4}$$

$$K_{APGME}=\frac{k_{-1}k_5(k_{-3}+k_4)}{k_1k_3(k_2+k_4)}$$

$$K_{\rm PG}=\frac{k_6}{k_{-6}}$$

$$K_{\rm ACEX}=\frac{k_5(k_{-3}+k_4)}{k_3k_{-4}}\;\;{\bf e}$$

$$K_{\rm CEX}=\frac{k_5(k_{-3}+k_4)}{k_{-4}(k_{-3}+k_5)}$$

Da mesma maneira, as taxas de reação para produção de PG e síntese de CEX podem ser derivadas:

$$\frac{d(\text{PG})}{dt} \frac{1}{(E)_t} = \frac{[V_{\text{PGME}}(\text{PGME}) + V_{\text{CEX}}(\text{CEX})]K_{\text{PG}}}{(\text{denominador})_7}$$

Equação 2. 34

$$\frac{d(\text{CEX})}{dt} \frac{1}{(E)_t} = \frac{V_{7-\text{ADCA}}(\text{PGME})(7 - \text{ADCA}) + V_{\text{CEX}}(\text{CEX})}{(\text{denominador})_7}$$

Equação 2. 35

onde:

$$V_{\text{CEX}} = \frac{k_{-3}k_4}{(k_{-3} + k_4)}$$

Segundo Nam et al. (1985), as três reações simultâneas e a participação de um intermediário comum durante a reação exclui a possibilidade de modelo ordenado uni-bi-reacional. A irreversibilidade das etapas de acilação da enzima pode ser explicada pelo conceito de nucleofilicidade. O metanol é o menos nucleofílico entre os agentes atacando o acil-enzima.

Tabela 2. 14 - Parâmetros cinéticos envolvidos na síntese enzimática de cefalexina [Nam et al. (1985)]

Parâmetro Cinético	Unidade	Valor
V_{PGME}	$\mu\text{mol/min/unidade}$	0,12
V_{CEX}	$\mu\text{mol/min/unidade}$	0,28
$V_{7-\text{ADCA}}$	$\mu\text{mol/min/unidade}$	0,012
K_{PGME}	mM	11
$K_{7-\text{ADCA}}$	mM	6,7
K_{CEX}	mM	9,3
K_{APGME}	mM	48

K_{ACEX}	mM	53
------------	----	----

Os autores enumeram algumas propriedades que são comuns às enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de antibióticos β -lactâmicos:

1. Usam os antibióticos β -lactâmicos como substrato preferido. São mais específicas por grupos acil do que por núcleos β -lactâmicos.
2. Catalisam as três reações envolvidas na síntese de antibióticos β -lactâmicos e tem intermediário comum às três reações.
3. A cadeia em forma ácida liberada atua como inibidor na hidrólise da cadeia lateral ativada e na hidrólise dos antibióticos.

Kasche (1987) propôs um mecanismo catalítico para a síntese cineticamente controlada de produtos de condensação (AN) catalisada por hidrolases a partir de substrato ativado (AB) e Nucleófilo (NH), ver figura 2.44.

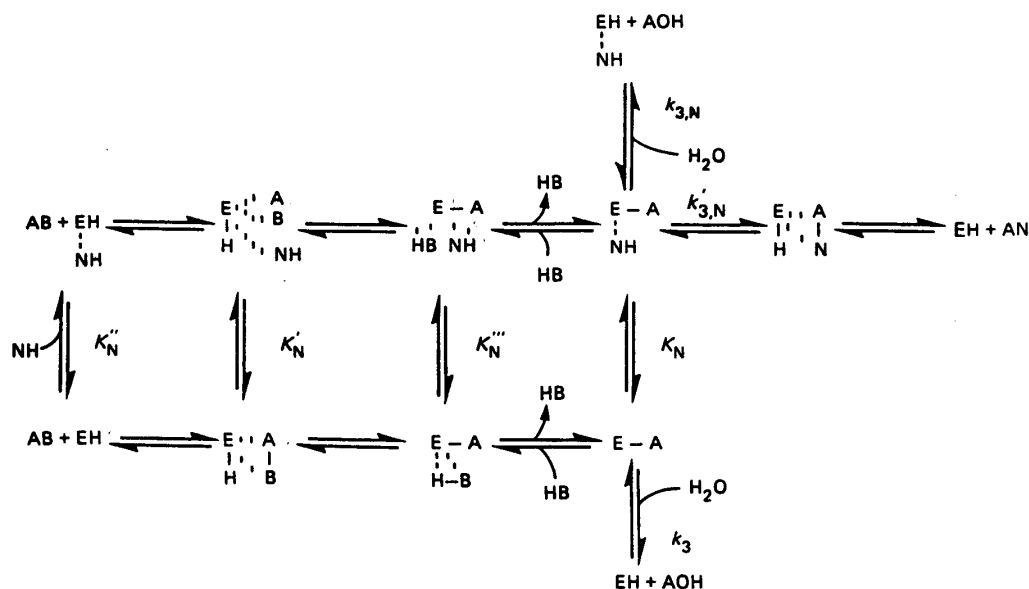


Figura 2.44 – Mecanismo de síntese de produtos de condensação (AN) catalisada por hidrolases a partir de substrato ativado (AB) e Nucleófilo (NH). O mecanismo se aplica a hidrolases com intermediário covalente acil-enzima (E-A) [Kasche (1987)]

O mecanismo se aplica a hidrolases com intermediário covalente acil-enzima (E-A). Nesse esquema, o nucleófilo (NH) deve se ligar ao complexo acil-enzima antes da deacilação. A água pode hidrolisar ambos complexos enzimáticos, com ou sem o nucleófilo adsorvido. Segundo Kasche (1987) a razão entre a atividade transferase e hidrolase é uma propriedade da enzima que influencia o rendimento na síntese cineticamente controlada. Neste caso, o rendimento máximo é obtido quando a velocidade de formação de AN a partir de AB é igual a velocidade de consumo de AN. Este máximo é um ponto conveniente para se terminar a reação de síntese.

Blinkovsky et al. (1993) isolaram, purificaram e caracterizaram a enzima D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase de *Xanthomonas sp.* Segundo eles, a D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase é uma enzima altamente específica com afinidade por substratos que possuem um grupo α -aminofenilacético. Benzil-penicilina, ácido 7-fenilacetamidodeacetoxi-cefalosporânico e éster etílico de ácido fenilacético são bons substratos para a penicilina G acilase mas não são hidrolisados pela D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide Amidohydrolase. Os autores estudaram a dependência do pH pois os substratos por eles utilizados possuem um grupo amino livre em sua estrutura. Esses grupos amino têm valor de pK próximo a 7,00 (pK = 7,12 para PGME e 7,15 para cefalexina). Isto quer dizer que os substratos da amidohidrolase existem em duas formas, protonados e desprotonados, em um grande intervalo de pH. Para PGME

e cefalexina, os autores obtiveram curvas padrão tipo sino para a dependência de K_{cat}/K_m em relação ao pH. A inclinação das curvas na parte direita é menor que -1 indicando que há uma dissociação dos grupos aminos do substrato. Se a enzima se liga apenas a formas protonadas do substrato e apenas a forma “neutra” da enzima é ativa, a dependência do pH da constante de velocidade de segunda ordem é:

$$\frac{K_{cat}}{K_m} = \frac{k_2/K}{\left(1 + \frac{K_c}{[H^+]}\right) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}\right)}$$

Equação 2.36

onde K_a e K_b são as constantes de ionização dos grupos ionogênicos da enzima livre e K_c é a constante de ionização do grupo amino do substrato. De acordo com a equação 36, o declínio de K_{cat}/K_m é maior para valores alcalinos de pH, onde a forma inativa da enzima e a forma não carregada do substrato se acumulam. Assim, a amidohidrolase se liga preferencialmente a formas carregadas de PGME e cefalexina. A posição de sino é praticamente a mesma para a hidrólise de PGME e cefalexina. O pH ótimo para as reações hidrolíticas desses substratos, e também de ampicilina e outros ésteres de fenilglicina que tenham pK (por volta de 7) similar, coincide e está entre 6,3 e 6,4.

Foi mostrado anteriormente que a penicilina acilase de *E. coli* é capaz de se ligar apenas às formas desprotonadas do substrato que tem um grupo amino em sua estrutura. Esta peculiaridade da penicilina acilase poderia ser o maior obstáculo para a realização da síntese direta de antibióticos β -lactâmicos.

Os autores fizeram um estudo termodinâmico da síntese de cefalexina e ampicilina direto de fenilglicina e 7-ADCA ou 6-APA, respectivamente. Estudou-se a termodinâmica reversível de ambos os antibióticos para se determinar as características gerais dessas reações. Eles observaram que a constante de equilíbrio da reação k_h' é uma função do pH e foi determinada como o quociente do produto de concentrações totais de equilíbrio de todas as formas iônicas. Deduziram também equações para o cálculo da dependência em relação ao pH da energia de Gibbs para a hidrólise de ampicilina ou cefalexina catalisada por D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide Amidohydrolase. Os valores encontrados para a energia de Gibbs para a hidrólise da ligação amida na cefalexina e ampicilina são muito menores que os de outros antibióticos β -lactâmicos. Assim, uma vez que ΔG não depende da enzima, a inabilidade da penicilina acilase de *E. coli* de se ligar a formas protonadas do substrato não é o maior obstáculo para a síntese de cefalexina (ou ampicilina) diretamente de fenilglicina e 7-ADCA (ou 6-APA). O maior problema é a ausência de condições termodinâmicas favoráveis e a baixa solubilidade de 7-ADCA sob valores ácidos de pH. A utilização não do ácido livre mas dos seus derivados (éster, amida e N-fenilglicina acilada) se mantém uma possibilidade de sintetizar cefalexina e ampicilina.

Os autores estudaram a seguir a síntese de cefalexina a partir de éster metílico de fenilglicina (PGME) e ácido 7-aminodeacetoxicefalosporânico (7-ADCA). A transferência de grupos acil de PGME para 7-ADCA, catalisada por D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide Amidohydrolase, compete com a transferência catalítica indesejável de acil para a água (hidrólise de PGME). Além disso, a cefalexina formada é quase completamente hidrolisada pela amidohidrolase nas

condições da reação. De maneira a descobrir o mecanismo da reação, esquematicamente representada como:



os autores utilizaram métodos para reações com múltiplos substratos recomendados por Segel (1975). A análise de dependência de velocidades iniciais de reação em relação à concentração de todos os substratos permitiu discriminar mecanismos cinéticos e conseguir informações sobre a sequência dos estágios. De acordo com Segel (1975), a intersecção dos gráficos recíprocos exclui o mecanismo Ping-Pong, que resulta em uma família de curvas paralelas. No caso do mecanismo randômico bi bi, os gráficos recíprocos são teoricamente não lineares. Analisando os resultados obtidos, os autores concluíram que a síntese de cefalexina catalisada por D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide Amidohydrolase a partir de PGME e 7-ADCA é uma reação ordenada. No entanto, a curvatura pode ser difícil de ser observada quando dados experimentais são utilizados. Um estudo de inibição pelo produto é uma maneira adicional e melhor para confirmar o mecanismo cinético de reação. Metanol e cefalexina são os produtos da reação. Entretanto, a cefalexina é também um substrato para a amidohidrolase, sofrendo hidrólise. Já o metanol não influencia a síntese de cefalexina até a concentração de 1,5 M. De maneira a determinar o mecanismo cinético da síntese de cefalexina catalisada por D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide Amidohydrolase os autores estudaram a hidrólise de cefalexina catalisada por esta mesma enzima:



Essa reação pode ser considerada como reação bi bi onde a água é o segundo substrato. Os dados obtidos pelos autores mostram que a fenilglicina e 7-

ADCA são inibidores competitivos e não-competitivos, respectivamente, da D-(-)-phenylglycyl-β-lactamide Amidohydrolase durante a hidrólise de cefalexina. Este tipo de inibição corresponde a um sistema ordenado bi bi . A única outra possibilidade é um mecanismo Theorell-Chance bi bi sem a formação de complexos ternário centrais. De fato, pode ser considerado como um caso especial de sistema ordenado bi bi (no qual a concentração do complexo ternário é igual a zero). É razoável assumir que a reação reversa (síntese direta de cefalexina a partir de fenilglicina e 7-ADCA) também segue um mecanismo ordenado bi bi. A ligação de fenilglicina e seu éster metílico pela amidohidrolase não deve ser diferente devido ao tamanho pequeno do radical metil. Assim, os autores supõem que a síntese de cefalexina a partir de fenilglicina e 7-ADCA catalisada por amidohidrolase é uma reação ordenada bi bi. A equação de velocidade completa para uma reação ordenada bi bi é complexa. Se a reação é reversível, a equação resultante reduz:

$$v_1 = \frac{V_1[A][B]}{K_{ia}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [B][A]}$$

Equação 2.37

onde V_1 é a velocidade máxima, K_A e K_B são constantes de ligação para os substratos A e B, respectivamente, $K_{ia} = k_{-a}/k_a$ e igual a constante de ligação para o substrato A quando [B] tende a zero.

A síntese de cefalexina a partir de PGME e 7-ADCA catalisada por amidohidrolase pode ser considerada uma reação irreversível. A formação de éster metílico de D-fenilglicina a partir de cefalexina e metanol não foi detectada.

Portanto, eles utilizaram a equação 2.37 na simulação do processo de produção de cefalexina a partir de PGME e 7-ADCA catalisada por amidohidrolase.

Duas reações laterais, a hidrólise enzimática do éster metílico de fenilglicina e a do antibiótico recém formado, acompanham a síntese de cefalexina. A figura 2.45 mostra o esquema cinético que descreve estas reações laterais. As equações 38 e 39 para o consumo de PGME e cefalexina, respectivamente, seguem este esquema.

$$v_2 = \frac{V_2[A]}{K_2 \left[\left(1 + \frac{[D]}{K_3} \right) \left(1 + \frac{[B]}{K_N} \right) + \frac{[F]}{K_F} \right] + [A]}$$

Equação 2.38

$$v_2 = \frac{V_3[D]}{K_3 \left(1 + \frac{[A]}{K_2} + \frac{[F]}{K_F} + \frac{[B]}{K_N} \right) + \left(1 + \frac{[B]}{K_N} \right) [D]}$$

Equação 2.39

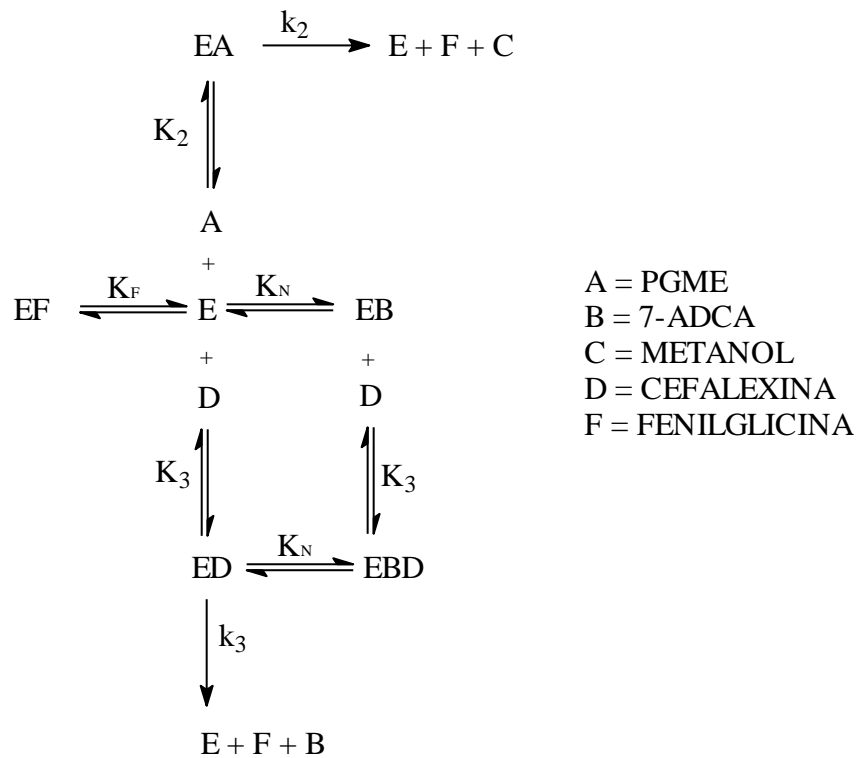


Figura 2.45 - Esquema cinético que descreve as reações laterais envolvidas na síntese de cefalexina

O processo inteiro pode ser descrito matematicamente por um sistema formado por duas equações diferenciais e duas de balanço de massa (equações 2.40 a 2.43):

$$\frac{d[D]}{dt} = v_1 - v_2 = \frac{V_1[A][B]}{K_{ia}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B]} - \frac{V_3[D]}{K_3\left(1 + \frac{[A]}{K_2} + \frac{[F]}{K_F} + \frac{[B]}{K_N}\right) + \left(1 + \frac{[B]}{K_N}\right)[D]}$$

Equação 2.40

$$\frac{d[A]}{dt} = -v_1 - v_2 = \frac{V_1[A][B]}{K_{ia}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B]} - \frac{V_2[A]}{K_3\left[\left(1 + \frac{[D]}{K_3}\right)\left(1 + \frac{[B]}{K_N}\right) + \frac{[F]}{K_F}\right] + [A]}$$

Equação 2.41

$$[A]_0 = [A] + [D] + [F]$$

Equação 2.42

$$[B]_0 = [B] + [D]$$

Equação 2.43

Os autores utilizaram métodos numéricos de integração de equações diferenciais para resolver o sistema. Eles obtiveram uma boa correlação entre as curvas experimental e calculada. Os valores de parâmetros estimados são mostrados na tabela 2.15.

Tabela 2.15 - Parâmetros cinéticos para a Síntese de Cefalexina [Blinkovsky e Markaryan (1993)].

Parâmetro	K _{ia} (mM)	K _A (mM)	K _B (mM)	K ₂ (mM)	K _F (mM)	K ₃ (mM)	K _N	V ₁ (mM/ min)	V ₂ (mM/ min)	V ₃ (mM/ min)
Experimental	20,0	2,7	11,8	4,0	0,84	0,45	6,0	1,5	7,0	0,5
Calculado	27,0	4,0	16,0	5,4	0,66	0,46	6,8	1,1	6,3	0,5

Ospina et ali. (1996a) apresentam modelo matemático com inibição não competitiva por 6-APA na hidrólise do antibiótico e inibição competitiva por fenilglicina na hidrólise do éster e inibição por excesso de substrato na síntese de ampicilina. Observam que a inibição pelo produto é mais forte que a inibição pelo

substrato e que o mecanismo não parece ser ping-pong apesar de parecer conflitante com o mecanismo proposto, que para formação do complexo acil-enzima requer a liberação do primeiro produto de reação, o metanol.

Diender et al. (2000) propuseram equações cinéticas simplificadas para as velocidades de síntese e hidrólise de amoxicilina (equações 2.44 e 2.45, respectivamente) e hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (equação 2.46). Os autores assumem que todas as equações cinéticas dependem igualmente do pH, ou seja, $k_{síntese}$, $k_{hidrólise1}$ e $k_{hidrólise2}$ variam com pH segundo uma mesma função. A validação do modelo é feita para três diferentes condições iniciais de concentração inicial de substratos. Os resultados são mostrados em função da conversão de POHPGME, pois o modelo matemático não é capaz de representar a concentração de substratos e produtos ao longo do tempo. De qualquer maneira, o modelo cinético se mostra capaz apenas de prever a tendência dos dados experimentais.

$$v_{síntese} = k_{síntese} C_{POHPGME} C_{6-APA} C_{ENZIMA}$$

Equação 2.44

$$v_{hidrólise2} = k_{hidrólise2} C_{AMOX} C_{ENZIMA}$$

Equação 2.45

$$v_{hidrólise1} = k_{hidrólise1} C_{POHPGME} C_{ENZIMA}$$

Equação 2.46

onde:

$v_{síntese}$ velocidade de síntese de amoxicilina;

$V_{hidrólise1}$	velocidade de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina;
$V_{hidrólise2}$	velocidade de hidrólise de amoxicilina;
k	constante cinética;
$C_{POHPGME}$	Concentração de éster metílico de p-hidroxifenilglicina;
C_{6-APA}	Concentração de 6-APA;
C_{ENZIMA}	Concentração de enzima e
C_{AMOX}	Concentração de amoxicilina.

A tabela 2.16 resume algumas das características encontradas na literatura para a síntese de antibióticos semi-sintéticos (ampicilina, cefalexina). Devido à diversidade de enzimas utilizadas e a discordância dos diversos autores quanto ao mecanismo de reação de síntese de antibióticos semi-sintéticos, decidiu-se estudar o mecanismo que mais se adequa à síntese de amoxicilina a partir de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA catalisada por penicilina G acilase (PGA) de *E. coli* imobilizada em agarose. Depois de decidido o mecanismo de reação, buscar-se-á modelo matemático e seus respectivos parâmetros cinéticos para representar o sistema em estudo.

Tabela 2.16 – Resumo das Informações Encontradas na literatura para a Síntese de Antibióticos Semi-sintéticos

Referência	Enzima usada	Modelo matemático	Parâmetros cinéticos	Mecanismo de reação
Rhee et al. (1980)	Enzima de <i>X. citri</i>	Eq. 2.12	Tabela 2.11	Dois substratos
Svedas et al. (1980b)	Penicilina Amidase	Eq. 2.13 a 2.14	Tabela 2.12	
Choi et al.	Enzima de <i>X. citri</i>	Eq. 2.15 a	Tabela 2.13	Bi-uni

(1981)		2.17		reacional
Konecny et al. (1983)	Pencilina Amidase de <i>B. megaterium</i>	Eq. 2.18 a 2.22	-	
Nam et al. (1985)	α -acilamino- β - lactam acilhidrolase	Eq. 2.23 a 2.35	Tabela 2.14	Exclui uni-bi ordenado
Blinkovsky e Markaryan (1993)	D(-)-phenylglycyl- β - lactamide amidohidrolase	Eq. 2.36 a 2.43	Tabela 2.15	Bi-bi- ordenado
Ospina et ali. (1996)	Penicilina acilase de <i>E. coli</i>	-	-	Descarta mecanismo ping-pong
Diender et al. (2000)	Penicilina acilase de <i>E. coli</i>	Eq. 2.44 a 2.46	-	-

2.9 Sistemas Bifásicos aplicados á síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos

A extração contínua de produtos pode ser vantajosa, ou mesmo necessário, para melhorar muitas transformações enzimáticas, por exemplo: a) para deslocar o equilíbrio termodinâmico; b) prevenir a hidrólise de produtos, como acontece na síntese cineticamente controlada de antibióticos, e c) prevenir inibição da enzima pelos produtos da reação. Quando os produtos são solúveis em solvente, a extração contínua pode ser facilmente realizada usando um sistema multifásico água-solvente. No entanto, a extração se torna mais complexa quando os produtos são polares e altamente solúveis em água (antibióticos, açúcares, glicopeptídeos e etc.). Neste caso, o uso de sistemas aquosos bifásicos pode ser uma alternativa [Hernández-Jústiz et al. (1998)].

Os sistemas bifásicos aquosos são gerados pela mistura de dois polímeros diferentes ou pela mistura de polímeros com uma solução concentrada de sais (polietilenoglicol e soluções de sulfato de amônio, por exemplo). Estes sistemas são muito usados para purificação de proteínas, imobilização de enzimas e para a

remoção de produtos durante biotransformações catalisadas por células livres ou enzimas [Hernández-Jústiz et al. (1998)].

Hernández-Jústiz et al. (1998) usaram um sistema bifásico aquoso para a extração contínua de cefalexina durante síntese enzimática usando enzima imobilizada em suporte poroso e observaram que o rendimento da reação de interesse sofreu aumento significativo. Antes de se iniciar a reação, a estrutura porosa do biocatalisador é lavada e preenchida com uma das fases (previamente selecionada). Desta forma, quando o biocatalisador pré-equilibrado é colocado na segunda fase (para onde o produto da reação será extraído), a enzima imobilizada permanece na primeira fase selecionada, apesar de sua diferente tendência natural. Os autores utilizaram um meio composto de 100% PEG 600 (fase I) e 3M sulfato de amônio (fase II), sendo que a cefalexina migrava para a fase PEG, e obtiveram um rendimento de síntese de 90%, contra um rendimento de 55% obtido quando se usa meio monofásico. A figura 2.46 mostra um esquema do sistema bifásico usado.

Fase I

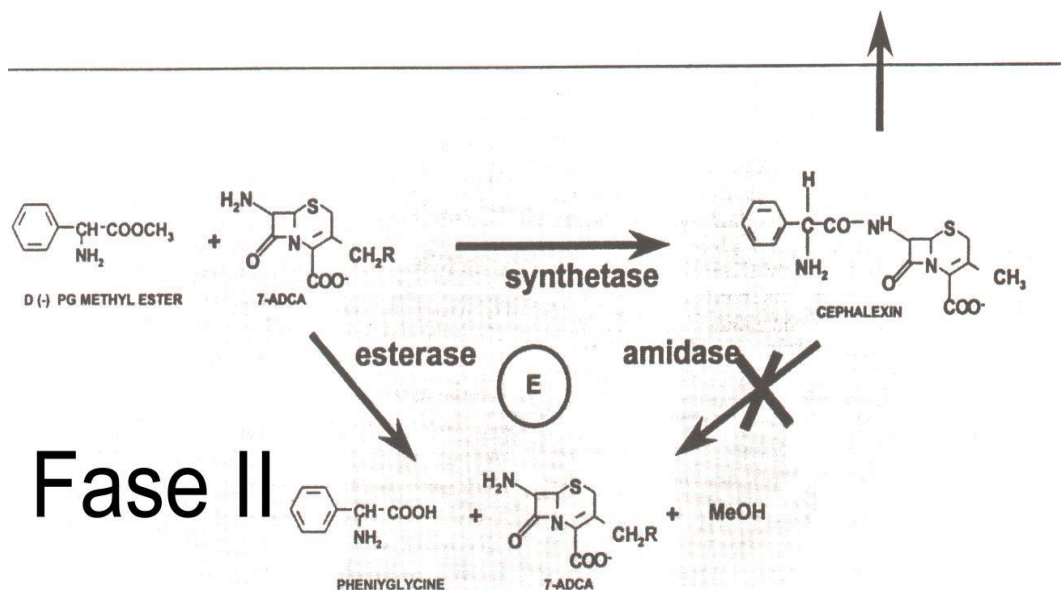
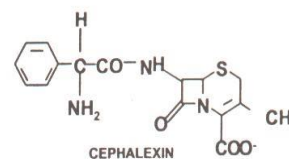


Figura 2.46 – Síntese cineticamente controlada de antibióticos em um sistema bifásico aquoso [Hernández-Jústiz et al. (1998)].

2.10 Redes Neurais

Redes neurais são aproximadores universais, ou seja, elas possuem a habilidade de aproximar qualquer função contínua com a precisão desejada. Além disso, as redes não requerem muito tempo para sua construção nem o conhecimento prévio da relação entre as variáveis que se deseja representar. Portanto, são consideradas sistemas do tipo “caixa preta”. Esta técnica busca imitar o comportamento do cérebro humano: a rede é primeiramente treinada com conhecimento pré-existente; posteriormente, a rede se “lembra” do que aprendeu e aplica este conhecimento em novas situações. Uma rede neural aprende como uma criança o faria, através da repetição de experiência. O conhecimento é adquirido

por treinamento, através de procedimentos iterativos que se baseiam em exemplos anteriores, porém o treinamento excessivo deve ser evitado, sob o risco de se reduzir a capacidade de generalização da rede. Como se baseia em exemplos, uma rede neural será tão boa quanto os dados usados para o seu treinamento. Portanto, antes de seu uso, uma rede neural bem treinada deve ser validada utilizando para isso um conjunto independente de dados. Muitos são os fatores que afetam o desempenho das redes neurais, tais como, arquitetura, topologia, função de transferência, qualidade dos dados de entrada e saída utilizados no treinamento, entre outros. Para se definir a melhor configuração para a rede, muita intuição é necessária. Além disso, todo o conhecimento sobre as características da rede e do treinamento é baseado em tentativa e erro, pois as informações variam de caso para caso [Linko et al. (1999)].

Uma prática que vem sendo crescentemente adotada é a utilização de modelos híbridos para a representação de um processo. Modelos híbridos combinam equações determinísticas, como por exemplo, balanços de massa, e redes neurais, para fornecer parâmetros importantes do modelo determinístico mas que são difíceis de medir. Neste trabalho se utilizou esta abordagem para simular a síntese cineticamente controlada de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase em reator batelada.

2.10.1 - Arquitetura e Topologia de Redes Neurais

A arquitetura de uma rede neural descreve como a rede é construída. Assim como o sistema nervoso organiza seus neurônios, os modelos artificiais são arranjados de forma organizada para construir redes neurais artificiais. Várias arquiteturas são propostas na literatura, dentre elas podemos citar: a) rede de múltiplas camadas, onde a informação segue uma única direção (rede direta ou

“feedforward”); b) rede recursiva e c) rede com conexões laterais [Cruz (1996); Linko et al. (1997)].

O número de neurônios (ou nós) em cada camada define a topologia da rede. Em um caso típico tem-se: uma camada de entrada, pela qual os dados são apresentados à rede; uma ou mais camadas escondidas (usualmente se utiliza apenas uma camada intermediária ou oculta) e uma camada de saída, que fornece a resposta da rede. A figura 2.47 mostra uma representação esquemática da arquitetura de uma rede multicamadas com retropropagação. Nessa figura, representa-se também o fluxo de informação retropropagada durante a fase de treinamento. Neste caso, trata-se de uma rede direta, treinada pelo algoritmo de retropropagação. Essa é uma das arquiteturas mais utilizadas, principalmente em redes estáticas (sem a influência explícita do tempo), como é o caso deste trabalho.

O número de neurônios (ou nós) nas camadas de entrada e saída é determinado pelo número de variáveis de entrada e saída, respectivamente. O número de neurônios na camada escondida (também chamada de oculta) pode ser considerado um parâmetro de projeto. Um coeficiente (peso) é atribuído para cada conexão entre dois neurônios [Linko et al. (1997)]. Nos neurônios, processam-se duas operações básicas [Cruz (1996)]: a) o somatório dos sinais de entrada, ponderados pelos pesos associados a cada um e b) a aplicação de uma função de transferência ao resultado obtido na primeira etapa (a tabela 2.17 mostra algumas funções de transferência). A escolha da arquitetura e topologia adequadas é de grande importância para o sucesso da aplicação desta técnica.

Em muitos casos, é necessário incluir um nó adicional (ou “bias”) em cada camada, com entrada sempre igual ao máximo valor do sinal (+1), de forma a estabilizar a resposta da rede.

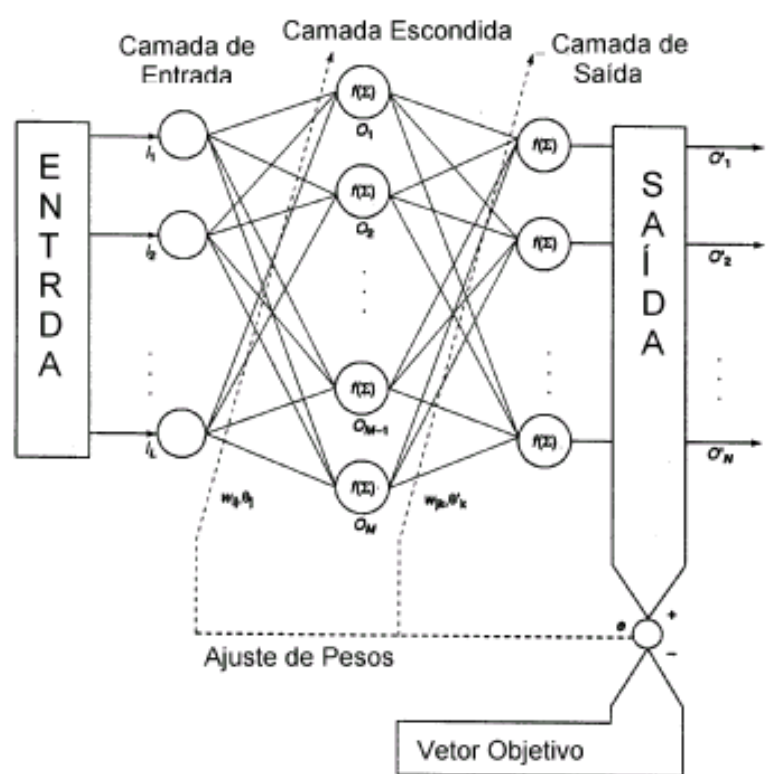


Figura 47 - Representação esquemática da arquitetura de uma rede direta com uma camada intermediária treinada por algoritmos de retropropagação [Linko et al. (1997)].

2.10.2 – Número Ótimo de Neurônios na Camada Escondida

A escolha da topologia de uma rede neural é muito importante para o sucesso de sua aplicação. Apesar da importância do número de neurônios da camada escondida, não há nenhum método universal para determinar um número ótimo. Este parâmetro depende da complexidade do problema e normalmente é obtido por tentativa e erro.

Um aumento no número de neurônios da escondida normalmente causa uma melhora no aprendizado: o uso de poucos neurônios limita a habilidade da rede para modelar o processo desejado. Já o uso de um número excessivo de neurônios permite maior liberdade para o ajuste de pesos, o que pode levar ao aprendizado do ruído presente nos conjuntos usados no treinamento [Linko et al.

(1996)] e, conseqüentemente, piora-se o desempenho da rede nos testes de validação.

2.10.3 – O Algoritmo de Retropropagação

Na metade dos anos oitenta, as pesquisas envolvendo a técnica de redes neurais sofreram um grande impulso com a publicação de um livro por Rumelhart e colaboradores, que descrevia um algoritmo de aprendizado denominado de retropropagação. Este algoritmo é o mais empregado para realizar o treinamento de redes neurais diretas multicamadas [Cruz (1996)].

Rumelhart et al. (1986) descrevem um procedimento de aprendizado simples para redes que apresentam: uma camada de entrada, qualquer quantidade de camadas intermediárias e uma camada de saída. Conexões laterais entre camadas e conexões entre uma camada superior e uma camada inferior estão proibidas.

A retropropagação se baseia em uma modificação da técnica do gradiente descendente (regra delta), usada para minimizar uma função custo. A função mais comumente utilizada para realizar o ajuste dos pesos é a Soma dos Quadrados dos Erros (SQE). Aos pesos da rede são atribuídos valores iniciais arbitrários, que vão sendo modificados ao longo do treinamento até que um mínimo (local ou global) de SQE seja alcançado. A desvantagem mais óbvia deste procedimento de aprendizado é que quando a superfície da função objetivo SQE tem um mínimo local, o gradiente descendente pode não encontrar o mínimo global [Rumelhart et al. (1986); Cruz (1996); Linko et al. (1997)].

O aprendizado da rede é iterativo; apresentam-se repetidamente pares de vetores de entrada e saída, e os pesos são atualizados por retropropagação após cada apresentação dos dados. Durante o treinamento, após a apresentação de um

conjunto de dados à rede, cada neurônio das camadas escondida e de saída calcula a soma ponderada do seu conjunto de sinais de entrada; a função de transferência mapeia essa somatório em um sinal de saída daquele nó. A saída da rede é comparada com os valores desejados e o erro é retropropagado para que se faça novo ajuste dos pesos, de acordo com a regra de treinamento. Este procedimento se repete até que se alcance o valor pré-estipulado de SQE ou um número máximo de iterações.

2.10.4 – Funções de transferência

O tipo de função de transferência empregado afeta a taxa de aprendizado da rede neural e é determinante no seu desempenho. A tabela 2.17 mostra algumas funções de transferência.

Tabela 2.17 – Funções de transferência tipicamente utilizadas na modelagem de neurônios artificiais [Cruz (1996)].

Função	Fórmula – f (x)	Características
Degrau	$+1 \text{ se } x > 0$ $0 \text{ se } x < 0$	<ul style="list-style-type: none"> • Não diferenciável • Degrau unitário • Positiva
Sigmóide	$\frac{1}{1 + \exp(-x)}$	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciável • Degrau suave • Positiva
Tangente Hiperbólica	$\tanh(x)$	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciável • Degrau suave
Gaussiana	$\exp\left(\frac{-x^2}{\sigma^2}\right)$	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciável • Pulso suave

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

- **Suporte:** Agarose 6BCL, 8BCL e 10BCL (6%, 8% e 10% de ligações cruzadas) produzida por Hispanagar S.A. (Burgos, Espanha) doada por Dr. J. M. Guisán, do Instituto de Catálise e Petróleo Química (ICP/CSIC), Madrid, Espanha.
- **Enzima:** Penicilina G acilase de *Escherichia coli* doada por Antibióticos S.A, Espanha.
- **Reagentes de imobilização:** borohidreto de sódio, glicidol, periodato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido fenilacético e hidróxido de sódio, todos de grau analítico de diversas marcas.
- **Dosagem enzimática:** Penicilina G da Paraquímica e paradimetilaminobenzaldeído da Q.M. para quantificação do 6 APA liberado.
- **Substratos:** Éster metílico de p-hidroxifenilglicina, sintetizada na Universidade de Salamanca, Espanha; Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) da Winlab, Amoxicilina sódica (Glamoxyl, remédio intramuscular), Espanha e amoxicilina trihidratada doada pelo Laboratório Basf.
- **Meio Bifásico:** Polietileno Glicol 600 e sulfato de amônio;
- **Reagentes HPLC:** Todos os reagentes utilizados no preparo das fases móveis eram grau HPLC de diferentes fontes comerciais.
- Todos os outros reagentes usados eram de grau analítico de diferentes fontes comerciais.

3.2 - Equipamentos

- Balança analítica marca METTLER modelo PB 3002
- Balança de precisão marca KERN modelo 410
- pHmetro marca Orion modelo 420A
- Espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000
- Banho termostático marca BROOKFIELD modelo EX – 200
- pHstato marca METROHM modelo 718 STAT Titrimo
- Bomba de vácuo marca FABBE modelo 341
- Software de análise de imagens (Image-Pro Plus, Media Cybernetics)
- Microscópio óptico Olympus BX50
- Reator de vidro com camisa de água
- Picnômetro de vidro
- Agitador mecânico
- Controlador automático de pH New Brunswick modelo pH-40
- Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) marca Waters
- Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) marca Shimadzu
- Coluna para HPLC Nova-Pak, C18, 60Å, 4µm, 3.9x150mm da Waters
- Coluna para HPLC C18 Analisis Vinicus, 5µm

3.3 - Métodos

3.3.1 - Caracterização do gel de agarose

A densidade do gel de agarose foi determinada por picnometria. Este procedimento consiste em colocar uma massa conhecida de gel no interior de um picnômetro e completar seu volume com água destilada, sendo o conjunto posteriormente pesado.

Um software de análise de imagens (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, e um microscópio ótico Olympus BX50) foi usado para medir o diâmetro das partículas de gel. Este mesmo software foi utilizado para se verificar a integridade do gel de agarose após ensaios de equilíbrio sob agitação mecânica e magnética.

3.3.2 - Imobilização da PGA

3.3.2.1 - Ativação e Oxidação do Suporte

Os suportes glioxil-agarose são muito adequados para a imobilização de proteínas, pois:

- Possuem uma boa congruência geométrica enzima-suporte,
- É possível obter suportes com numerosos grupos glioxil, que a pH 10 reagem com os grupos aminos Lys desprotonados, dando lugar a bases de Schiff.
- A ligação enzima-suporte é de baixa energia: se a formação de uma ligação suporte(glioxil)-proteína (Lys) implicar uma grande distorção, não se formará o enlace. Por este motivo, a distorção da proteína provocada pela imobilização é mínima.
- A distância proteína-suporte é muito curta.
- São grupos estáveis, que permitem tempos longos de imobilização de forma que é possível uma grande quantidade de proteína por volume de suporte e realizar uniões multipontuais enzima-suporte.
- Segundo Guisán (1998), a concentração de grupos glioxil de um suporte ativado armazenado durante um ano a 4 °C permanece constante.
- A modificação química da superfície da enzima é mínima: grupos amino primário que se transformam em secundários.

Os géis glioxil-agarose ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CHO}$) foram preparados por esterificação (ativação) do gel de agarose com glicidol (2,3 epoxipropanol) e posterior oxidação da gliceril-agarose resultante ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$) com periodato de sódio.

Para a ativação do suporte, colocaram-se 105g de gel (150 ml) lavado com água e 30 ml de água de água destilada em um copo de becker. Preparou-se, separadamente, NaOH (1,7N - 3,4g em 50ml) a frio e se adicionou borohidreto de sódio (NaBH_4 : 1,425g) de maneira a ter 28,5mg/ml gel. Misturou-se esta solução aos 150 ml de gel e 30ml de água e acrescentaram-se 36 ml de glicidol gota a gota. Esta etapa foi feita em banho de gelo para manter a temperatura baixa. Agitou-se a mistura reacional com pás por 15-18h e, após esse tempo, lavou-se o gel abundantemente com água destilada, para retirar o excesso de reagentes.

Para a posterior oxidação, colocaram-se 105g de gel ativado (ou 150 ml) e NaIO_4 0,1M (75 $\mu\text{mol/ml}$) = 112,5ml e suspendeu-se o gel na relação 1/10 com água (levar o volume até 1,5l com água destilada). Deixou-se oxidando por 1,5-2h com agitador de pás e, após este tempo, lavou-se abundantemente com água.

O número total de grupos gliceril na agarose será a soma dos grupos formados pela eterificação com os grupos da agarose, subprodutos da reação de entrecruzamento. Pode-se conseguir géis com uma quantidade de grupos aldeído desde 0 a 200 $\mu\text{M/ml}$, equivalente a uma densidade superficial de 17-20 resíduos aldeído/1000A²[Fernandez-Lafuente (1992)].

3.3.2.2 - Imobilização da PGA

Para a preparação dos derivados utilizados neste trabalho, partiu-se de um extrato liofilizado de PGA com 10UI/mg de sólido e preparava-se uma solução de enzima de acordo com a quantidade total a ser imobilizada no gel, ou seja, dissolvia-se uma quantidade pré-determinada de enzima em tampão fosfato 25mM e pH 6.

Para a imobilização, preparou-se solução de tampão bicarbonato sódico 50mM, pH=10 (NaHCO_3 , PM = 84,01) e Ácido fenilacético 100mM ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$, PM = 136,2). Primeiramente, preparou-se a solução de ácido fenilacético, elevou-se o pH para 10 e, posteriormente, adicionou-se NaHCO_3 . Isto porque se o pH está ácido há formação de CO_2 quando se adiciona o bicarbonato, que é volátil. A seguir, suspendeu-se 50 ml de gel ativado para 500 ml totais de solução (gel + enzima + tampão bicarbonato). Acertou-se novamente o pH em 10.

A mistura reacional foi mantida sob agitação lenta (com pás) a temperatura inferior a 22°C . Retirou-se uma amostra no tempo zero (quando se coloca a enzima) e depois de meia hora para verificar se toda a enzima já estava imobilizada. Ao final dessa meia hora, se a enzima já estava imobilizada, deixou-se reagir por mais 3h para aumentar o número de enlaces e depois reduziu-se com NaBH_4 por 30min (de maneira a ter 1mg de NaBH_4 por ml de solução total, ou seja, para 500 ml de solução, deve-se usar 500mg de NaBH_4). Por último, lavou-se o derivado com tampão fosfato 25mM e pH=7,5 e, posteriormente, com bastante água destilada para retirar o excesso de borohidreto de sódio. As amostras retiradas no tempo zero e no tempo $\frac{1}{2}$ h foram analisadas utilizando o método PDAB, que mede a atividade da enzima. A figura 3.1 mostra uma representação esquemática da imobilização de PGA em agarose

Em paralelo ao processo de imobilização, fez-se um branco. Este branco é preparado substituindo o gel ativado por agarose inerte no processo descrito anteriormente.

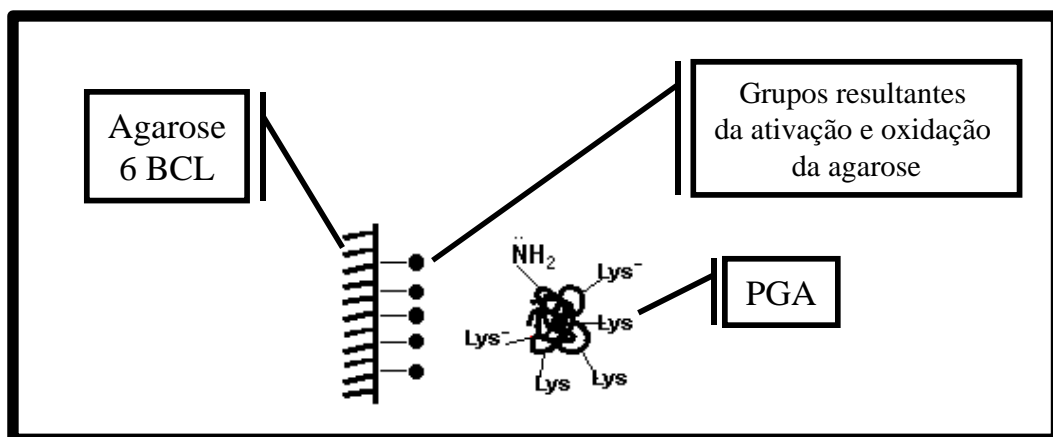


Figura 3.1 - Imobilização de PGA em agarose

3.3.3 - Determinação da atividade enzimática: Método colorimétrico do PDAB

O método colorimétrico do PDAB é comumente empregado na determinação da atividade amidase da penicilina G acilase utilizando o p-dimetilaminobenzaldeído. O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) produzido na reação de hidrólise da penicilina G, reage com o PDAB, gerando um produto colorido que é acompanhado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 415nm.

A hidrólise da Penicilina G 5%(p/v) era realizada a 38°C, em reator com camisa de água, em tampão fosfato 10mM pH 8,0. Adicionava-se ao reator 1 ml da solução de enzima sob agitação. Tomavam-se alíquotas em diferentes tempos de reação e estas eram colocadas em cubetas preparadas com reagente PDAB. Deixava-se reagir por 2,5 minutos e lia-se a absorbância resultante em espectrofotômetro a 415nm. A concentração de 6-APA era obtida por comparação do resultado com curva de calibração previamente preparada. Construíam-se um gráfico de concentração de 6-APA em função do tempo e a tangente da reta (velocidade inicial de formação do produto) era usada para o cálculo da atividade enzimática (At):

$$At = \frac{\text{tangente (mol / l min)} * \text{Volume de reação (l)}}{\text{Volume de enzima (ml)}}$$

O reagente PDAB era composto por: 0,5 ml de PDAB 0,5% p/v em metanol, 2,0 ml de ácido acético 20% v/v e 1,0 ml de solução de hidróxido de sódio 0,05M.

A atividade enzimática é normalmente medida como velocidade inicial por quatro razões:

1. Evitar os efeitos da reação reversa;
2. Evitar a curvatura na velocidade à medida que a concentração do substrato diminui;
3. Evitar a inibição da reação pelos produtos acumulados e
4. Evitar efeitos de perda de atividade enzimática com o tempo.

Segundo este método, 1 U (unidade) de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1μmol de penicilina G por minuto a pH 8.0 e 38°C.

Para se determinar a atividade dos derivados, ou seja, a carga enzimática do gel, utilizava-se a diferença entre as atividades enzimáticas do sobrenadante antes e depois da imobilização.

3.3.4 - Análises de concentração de substratos e produtos de hidrólise e síntese

As concentrações de éster metílico de p-hidroxifenilglicina, amoxicilina, 6-APA e p-hidroxifenilglicina (ácido) foram determinadas usando HPLC:

- coluna C18 Analysis Vinicus: MFE-SIL 5μm, 10cm de comprimento 4,6mm de diâmetro ou coluna C18 Waters: Nova-Pak, C18, 60Å, 4μm, 3.9x150mm;
- Vazão = 1,5 ml/min
- Comprimento de onda (λ) = 215 nm

Duas fases móveis diferentes foram utilizadas:

- fase móvel 1: 27% acetonitrila, 2‰ SDS (Lauril Sulfato de Sódio); tampão fosfato 12mM e pH 2,6 a 25°C para a coluna C18 Analysis Vinicus e
- Fase móvel 2: 35% acetonitrila, 2‰ SDS (Lauryl sodium sulphate); 0,01M H₃PO₄, 0,005M K₂H₂PO₄ e pH 4,6 a 25°C para a coluna C18 Waters.

As amostras retiradas do meio de reação eram diluídas, normalmente na razão de 1:10 ou 1:20, com água destilada. A figura 3.2 mostra um cromatograma típico obtido para uma amostra contendo: p-hidroxifenilglicina, 6-APA, amoxicilina e éster metílico de p-hidroxifenilglicina. A concentração das espécies químicas presentes na amostra era obtida por comparação do cromatograma obtido com uma curva de calibração previamente elaborada.

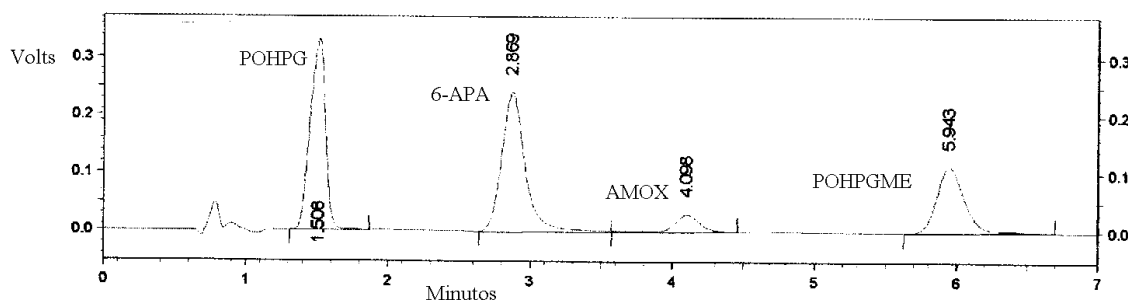


Figura 3.2 – Cromatograma típico de uma amostra de síntese enzimática de amoxicilina, onde: POHPG = p-hidroxifenilglicina, AMOX = amoxicilina e POHPGME = éster metílico de p-hidroxifenilglicina.

3.4 - Condições Experimentais

3.4.1 - Experimentos de Síntese e Hidrólise para Estimativa de Parâmetros do Modelo Empírico: Ensaios Preliminares

Todos os experimentos de síntese e hidrólise foram realizados em batelada usando reator de vidro sob agitação magnética, ver figura 3.3. A temperatura era

controlada por banho de gelo. O pH era monitorado por medições periódicas usando pHmetro. Todas as reações foram realizadas em tampão fosfato 25mM, a pH 6,5 ou 7,5. O volume de reação foi de 20ml. Amostras foram coletadas usando pipetas automáticas, com filtro na ponta para não se coletar o gel de agarose contendo enzima imobilizada, em tempos pré-determinados e analisadas conforme descrito no item 3.3.4. Nos ensaios com inibidores, no tempo zero, adicionava-se ao meio reacional, além dos substratos, uma concentração conhecida de inibidor.

Os parâmetros cinéticos foram determinados medindo-se a velocidade inicial de reação para diferentes concentrações iniciais de substrato. Os valores dos parâmetros foram estimados não linearmente usando o software Origin 5.0.



Figura 3.3 - Equipamento utilizado para realização das reações de síntese e hidrólise, 20ml de meio reacional.

3.4.2 Estudos Cinéticos

Após estudos de integridade do gel de agarose, optou-se por se modificar algumas das condições experimentais adotadas para a estimativa dos parâmetros do modelo empírico. Assim todos os experimentos posteriores envolvendo enzima imobilizada, de síntese ou hidrólise, foram realizados a pH 7,5 ou pH 6,5 e 25°C

sob agitação mecânica, pois se verificou que este tipo de agitação não causava danos ao gel de agarose. O pH passou a ser monitorado por um controlador automático e a temperatura, por banho termostático (ver figura 3.4). O volume de reação foi de 30ml. Manteve-se a força iônica do tampão fosfato (25mM) e o procedimento de coleta de amostras (ver figura 3.5). Todas as reações eram iniciadas (tempo zero) com a adição de uma quantidade conhecida de enzima imobilizada à solução contendo os substratos e todos os ensaios foram realizados com um derivado imobilizado de PGA com carga enzimática de 10 ou 30 UI/ml de gel. Desta forma, garantiu-se que o processo era controlado pela velocidade de reação e não pela difusão intrapartícula dos substratos e produtos.

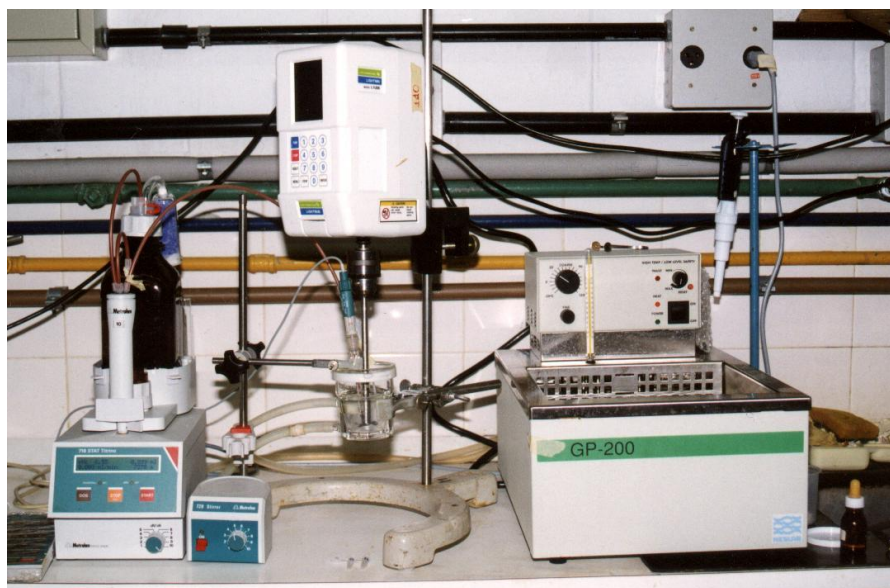


Figura 3.4 – Equipamento experimental utilizado para as reações de síntese e hidrólise, 30ml de volume de meio reacional.



Figura 3.5 - Equipamento utilizado para realização das reações de síntese e hidrólise: detalhe do reator.

3.4.2.1 – Ensaios de Hidrólise de Éster Metílico de p-hidroxifenilglicina na Ausência ou na Presença de Inibidores

Realizaram-se ensaios de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina na ausência e na presença de inibidores (amoxicilina, p-hidroxifenilglicina e metanol) nas condições descritas anteriormente. Nestes ensaios, determinaram-se as velocidades iniciais de reação para diferentes

concentrações de substrato e inibidor. No caso dos ensaios na presença de inibidores, à solução de substratos se adicionava uma quantidade conhecida de inibidor (no tempo zero). Normalmente, acompanhava-se a reação de hidrólise pela formação do produto p-hidroxifenilglicina, porém quando no início da reação adicionava-se uma concentração muito alta deste inibidor, acompanhava-se a concentração de éster.

3.4.2.2 – Ensaios de Hidrólise de Amoxicilina na Ausência ou na Presença de Inibidores

Ensaios de hidrólise de amoxicilina foram realizados na ausência e na presença de inibidores (éster metílico de p-hidroxifenilglicina, 6-APA, p-hidroxifenilglicina e metanol) nas condições descritas anteriormente. Velocidades iniciais de reação foram determinadas para diferentes concentrações de substrato e inibidor. Nos ensaios com inibidor, à solução de substratos se adicionava uma quantidade conhecida da espécie química a ser estudada inibidor (no tempo zero). Normalmente, as velocidades iniciais de hidrólise foram determinadas pela formação do produto p-hidroxifenilglicina, porém quando esta espécie foi adicionada no início da reação, acompanhava-se a concentração do outro produto (6-APA).

3.4.2.3 – Ensaios de Síntese de Amoxicilina: Velocidades Iniciais

Ensaios de síntese enzimática de amoxicilina foram realizados nas condições operacionais descritas anteriormente, para tempos curtos de reação (em torno de 20min). Mediram-se velocidades iniciais de formação de amoxicilina e p-hidroxifenilglicina, em condições operacionais descritas acima, para diferentes condições iniciais de substratos (éster ou 6-APA). As velocidades iniciais eram

determinadas pela medida simultânea de dois produtos da reação: amoxicilina e p-hidroxifenilglicina.

3.4.2.4 – Síntese de Amoxicilina com Saturação Prévia de Enzima com 6-APA

Nos ensaios com saturação pelo núcleo antibiótico, preparava-se uma solução contendo 6-APA e adicionava-se o derivado, deixando-se equilibrar por 3h. Terminado esse tempo, adicionava-se então o éster e se dava início a reação de síntese.

3.4.2.5 – Ensaios de Síntese de Amoxicilina

Ensaios de síntese enzimática de amoxicilina foram realizados, sob as condições descritas anteriormente, para longos tempos de reação (3 a 10h). O objetivo destes ensaios era acompanhar todo o curso de reação do processo de síntese: formação e hidrólise do produto amoxicilina. Neste caso, acompanhava-se a formação dos produtos amoxicilina e p-hidroxifenilglicina. A concentração dos substratos (éster e 6-APA) eram obtidas por balanço de massa, ou seja:

- a) Concentração de 6-APA = Concentração de 6-APA no início – Concentração de amoxicilina;
- b) Concentração de Éster = Concentração de Éster no início – Concentração de amoxicilina – Concentração de p-hidroxifenilglicina;

3.4.3 - Ensaios com enzima livre

Todos os ensaios com enzima livre foram realizados em Phstato (equipamento mostrado na figura 3.1) sob agitação magnética. Um volume de 0,1 ml de amostra era coletado em tempos pré-determinados e este volume era adicionado a 0,9ml de tampão fosfato (usado para diluição) em tubo de ensaio. Este tubo de ensaio era então colocado em banho de água fervente por cinco minutos para inativação da PGA. Posteriormente, analisavam-se as concentrações

de 6-APA e amoxicilina em HPLC conforme procedimento descrito no item 3.3.4. As concentrações de éster e ácido não foram levadas em consideração, pois o éster sofre hidrólise inespecífica durante o aquecimento. Antes de se utilizar este método de inativação, fez-se testes com 6-APA e amoxicilina e se observou que estas substâncias não sofriam degradação com a temperatura. Dava-se início a reação (tempo zero) quando se adicionava uma quantidade conhecida de enzima ao meio reacional contendo os dois substratos.

No caso dos ensaios com saturação pelo núcleo antibiótico, preparava-se uma solução contendo 6-APA e adicionava-se a enzima, deixando-se equilibrar por 1h. Terminado esse tempo, adicionava-se então o éster e se dava início a reação de síntese (tempo zero).

3.4.4 - Ensaios em meio bifásico

Diferentes misturas de polietileno glicol (fase I) e sulfato de amônio (fase II) foram testadas e escolheu-se a que deu melhor coeficiente de partição ($K = C_{\text{fase I}} / C_{\text{fase II}}$) para produtos e substratos. Em todos os casos, 50ml de cada fase eram misturadas e colocadas sob agitação vigorosa por uma hora e, após esse tempo, o pH foi ajustado para 6,5. Posteriormente, as duas fases (completamente equilibradas) foram separadas por gravidade. Os substratos foram adicionados a fase I e o derivado foi lavado com a fase II, de maneira que quando colocado no meio bifásico ele se mantenha nesta fase. As condições experimentais usadas foram: 150 mM de 6-APA e 25 mM de éster metílico de p-hidroxifenilglicina, 20 ml de meio reacional (10 ml da fase I e 10ml da fase II) e 1 ml de derivado 200UI/ml a pH = 6,5 e T = 25°C. Retiraram-se amostras ao longo do tempo para serem analisadas em HPLC. A concentração total pôde ser então calculada pela soma das concentrações de cada espécie presentes em ambas as fases.

3.4.5 - Ensaios de Velocidade Inicial

A velocidade inicial de uma reação enzimática é a medida da velocidade instantânea de formação de produtos ($\Delta P/\Delta t$) ou consumo de substratos ($-(\Delta S/\Delta t)$), para uma concentração conhecida do substrato. Na prática, a velocidade pode ser medida em função de $\Delta P/\Delta t$ (ou $-\Delta S/\Delta t$) desde que a aparência do produto (ou desaparecimento de S) seja linear com o tempo e que menos de 5% da concentração inicial de substrato seja consumida (Segel, 1975). Além disso, a baixa concentração de produto formado torna insignificante os possíveis efeitos inibitórios. Portanto, seguindo-se essas recomendações, mediam-se as concentrações de produto formado ao longo do tempo. Por regressão linear da concentração média em função do tempo, calculavam-se as velocidades iniciais de reação. A figura 3.6 mostra um exemplo de cálculo da velocidade inicial de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina.

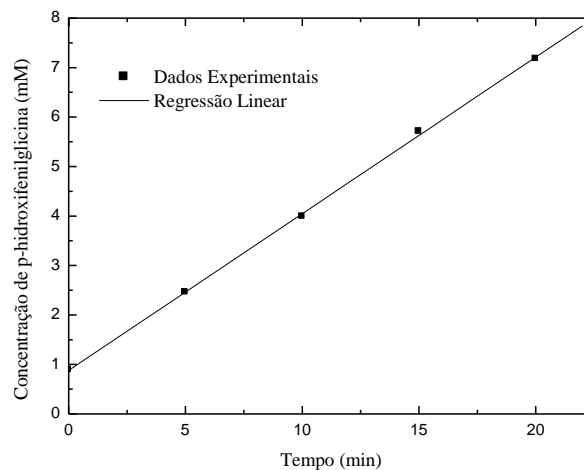


Figura 3.6 – Determinação da velocidade inicial de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina

3.5 Métodos Numéricos

3.5.1 Método de Colocação Ortogonal

O método de colocação ortogonal empregado neste trabalho foi desenvolvido por Villadsen e Michelsen, 1978. Neste método, a solução é aproximada por uma série de polinômios ortogonais (Polinômios de Jacobi $P^{(1,1/2)}$); a equação diferencial é satisfeita somente em certos pontos discretos, chamados de pontos de colocação.

3.5.2 Ddassl

A solução das equações diferenciais ordinárias foi obtida por algoritmo de retrodiferenciação denominado DASSL (differential-algorithm-system-solution) que suporta inclusive resolver equações algébricas acopladas às diferenciais. A rotina é aberta e foi desenvolvida por Petzold, 1989.

Capítulo 4 – Modelos Cinéticos

4.1 - Introdução

O objetivo deste projeto de pesquisa foi estabelecer um modelo matemático para descrever a cinética de reação de síntese enzimática de amoxicilina a partir de p-hidroxifenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) catalisada por penicilina G acilase de *E. coli* imobilizada em gel de agarose. Neste capítulo, apresentam-se as equações principais dos modelos desenvolvidos ao longo deste trabalho.

Na síntese cineticamente controlada, o uso de éster ou amidas como substratos ativados se faz necessário. O rendimento obtido depende de um balanço entre as três reações catalisadas simultaneamente pela mesma enzima [Fernandez-Lafuente (1992)]: síntese de um antibiótico β -lactâmico AN, hidrólise do substrato ativado AB (h1) e a hidrólise do antibiótico recém formado (h2). O rendimento máximo depende do grau de saturação do centro ativo da enzima pelo nucleófilo, da razão de síntese/hidrólise do antibiótico (s/h2) e da razão de síntese do antibiótico/hidrólise do éster (s/h1). O esquema da figura 4.1 mostra que o rendimento máximo em AN é obtido quando a taxa de formação de AN a partir de AB e a taxa de hidrólise de AN são iguais, uma vez que estas reações são consecutivas com AN sendo um intermediário.

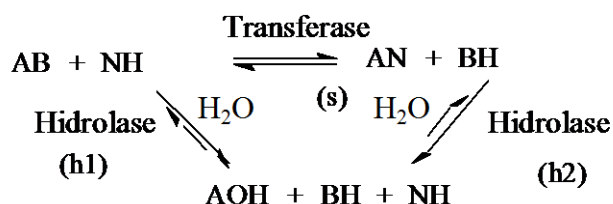


Figura 4.1 – Reações envolvidas na síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos, Kasche (1986).

Iniciou-se a busca de um modelo cinético para o processo com um modelo simples, aqui denominado semi-empírico, que foi sendo elaborado à medida que novas informações a respeito do sistema eram obtidas. Posteriormente, propôs-se um modelo cinético mecanístico, deduzido a partir de mecanismo catalítico proposto para o sistema. Finalmente, um modelo híbrido, com as velocidades de reação calculadas usando redes neurais, foi usado para representar a síntese enzimática.

4.2- Modelo Semi-Empírico

O primeiro modelo testado, aqui denominado semi-empírico, foi desenvolvido em conjunto com o Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Catálise e Petroquímica (ICP/CSIC), Madri, Espanha, coordenado pelo Dr. José Manuel Guisán. O modelo foi desenvolvido tendo como base à experiência acumulada dos pesquisadores envolvidos neste projeto e informações de literatura.

Os parâmetros cinéticos deste modelo foram estimados para diferentes condições de pH e temperatura e sua validação é feita através de comparação com dados experimentais de síntese. Devido à complexidade do sistema, o processo foi desmembrado e estudado em etapas para estimar todos os parâmetros do modelo. No caso do modelo bifásico, as concentrações de todas as espécies foram multiplicadas pelo coeficiente de partição para que se possa obter o valor real presente na fase que contém a enzima.

Seguindo o exemplo de Kasche (1986), assumimos que a síntese do antibiótico requer que o nucleófilo se adsorva ao centro ativo da enzima antes da

formação do complexo acil enzima. A razão $V_{AN}/(V_{AN}+V_{AOH})$ é a fração de substrato ativado consumido que rende a condensação do produto AN. Aqui $(V_{AN})/(V_{AN}+V_{AOH}) = T_{max} \cdot X$, onde T_{max} é a taxa de conversão máxima do complexo acil-enzima-núcleo em produto (AN), e X é a fração de enzima saturada com o núcleo.

As equações matemáticas seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten (equação 4.1) com ou sem efeitos de inibidores. O modelo cinético para a hidrólise do antibiótico considera que o éster (AB) é um inibidor competitivo e que o nucleófilo (NH) é um inibidor não competitivo (veja equação 4.2). O antibiótico é um inibidor competitivo na reação de hidrólise do éster (equação 4.3). Também se considera que a presença de 6-APA (NH) não interfere na velocidade de reação de desaparecimento de éster (AB).

$$v = \frac{k_{cat} C_S C_{EZ}}{K_m + C_S}$$

Equação 4. 1

onde:

C_S = concentração de substrato;

C_{EZ} = Concentração de enzima;

k_{cat} = Constante de reação (“turnover”) e

K_m = constante de Michaelis-Mentes

A velocidade de hidrólise do antibiótico (v_{h2}) é dada por:

$$v_{h2} = \frac{k_{cat2} C_{AN} C_{EZ}}{K_{m2} \left(1 + \frac{C_{AB}}{k_{AB}} + \frac{C_{NH}}{k_{IN}} \right) + C_{AN} \left(1 + \frac{C_{NH}}{k_{IN}} \right)}$$

Equação 4.2

A velocidade de desaparecimento do éster (v_{AB}) é:

$$v_{AB} = \frac{k_{cat1} C_{AB} C_{EZ}}{K_{m1} \left(1 + \frac{C_{AN}}{k_{AN}} \right) + C_{AB}}$$

Equação 4.3

A velocidade de síntese de amoxicilina (v_s):

$$v_s = \frac{k_{cat1} C_{AB} C_{EZ}}{K_{m1} \left(1 + \frac{C_{AN}}{k_{AN}} \right) + C_{AB}} T_{max} X$$

Equação 4.4

$$\text{onde: } X = \frac{C_{NH}}{K_{EN} + C_{NH}}$$

C_{AB} = concentração de éster;

C_{AN} = concentração de amoxicilina;

C_{NH} = concentração de núcleo;

k_{AB} = constante de inibição por éster;

k_{IN} = constante de inibição por núcleo

k_{AN} = constante de inibição por amoxicilina;

O balanço de massa para um reator em batelada é:

$$\frac{dC_{AB}}{dt} = -v_{AB}$$

Equação 4.5

$$\frac{dC_{AN}}{dt} = v_s - v_{h2}$$

Equação 4.6

$$\frac{dC_{NH}}{dt} = v_{h2} - v_s$$

Equação 4.7

As equações 4.5 a 4.7 são um conjunto de equações diferenciais ordinárias, resolvidas numericamente utilizando o método de dssal.

4.3- Modelo Reativo-Difusivo

O modelo reativo-difusivo é baseado em balanços de massa para produtos e substratos nas vizinhanças e no interior da partícula de biocatalisador. As seguintes hipóteses são seguidas: resistência ao transporte de massa externo desprezível, enzima imobilizada de maneira uniforme nos poros do gel, difusividades efetivas invariantes e processo isotérmico. A concentração dos solutos se refere ao volume de gel disponível para difusão, ou seja, $\varepsilon_{\text{gel}} V_{\text{gel}}$.

Balanço de massa para o soluto i na superfície da partícula, considerada esférica:

$$\frac{dC_{i\text{il}}}{dt} = \frac{\partial C_i}{\partial t} \Big|_{\zeta=1} = - \frac{3}{R_p^2} \frac{(1-\varepsilon_r)}{\varepsilon_r} \varepsilon_g D_{ei} \frac{\partial C_i}{\partial \zeta} \Big|_{\zeta=1}$$

Equação 4.8

c.i.: $t = 0, C_i = C_i(0)$

Balanço de massa para o soluto i dentro do gel:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \frac{1}{R_p^2} \frac{D_{ei}}{\zeta^2} \frac{\partial}{\partial \zeta} \left(\zeta^2 \frac{\partial C_i}{\partial \zeta} \right) - \frac{v_i}{\varepsilon_g}$$

Equação 4.9

c.i.: $t = 0, C_i = 0$; c.c.1: $\zeta = 0, \frac{\partial C_i}{\partial \zeta} = 0$; c.c.2: $\zeta = 1, C_i(\zeta) = C_{i\text{il}}$.

Onde ε_r é porosidade do reator; ε_g é porosidade do gel; ζ é o raio adimensional: $\zeta = r/R_p$; R_p é o raio da partícula; v é velocidade de reação; C_i é concentração de i (mM) e D_{ei} é difusividade Efetiva (cm^2/s).

As equações 4.8 e 4.9 são discretizadas no espaço usando colocação ortogonal [Viladsen e Michelsen (1978)]. Testes com diferentes números de pontos de colocação mostraram que 10 raízes internas são suficientes para dar resultados precisos. A integração do sistema de equações diferenciais resultante é feito usando a subrotina DDASSL [Petzold (1989)]. Os coeficientes de difusividade efetiva são obtidos por procedimento de busca direta.

4.4- Modelo Cinético Mecanístico

A figura 4.2 mostra o esquema para o mecanismo de síntese de amoxicilina a partir de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA catalisada por PGA, desenvolvido até o momento tomando como base informações de literatura e resultados experimentais.

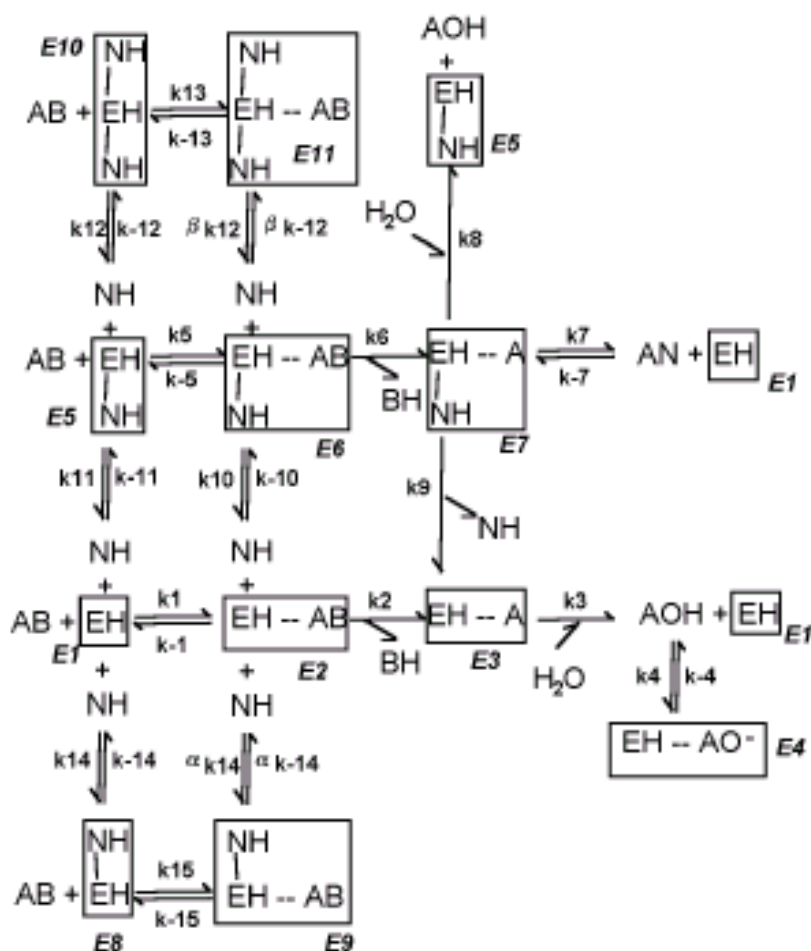


Figura 4.2 - Mecanismo cinético para a síntese de amoxicilina a partir de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA, usando PGA imobilizada em agarose, baseado em informações de literatura e dados experimentais.

A velocidade de formação de cada complexo enzimático é dada por:

$$\begin{aligned}\frac{d[E1]}{dt} = & -k_1[AB][E1] + k_{-1}[E2] + k_3[E3] - k_4[E1][AOH] + k_{-4}[E4] - k_{-11}[E1][NH] + \\ & k_{11}[E5] + k_7[E7] - k_{-7}[AN][E1] - k_{14}[NH][E1] + k_{-14}[E8]\end{aligned}$$

Equação 4.10

$$\begin{aligned}\frac{d[E2]}{dt} = & k_1[AB][E1] - k_{-1}[E2] - k_2[E2] - k_{-10}[E2][NH] + k_{10}[E6] - \alpha k_{14}[E2][NH] \\ & + \alpha k_{-14}[E9]\end{aligned}$$

Equação 4.11

$$\frac{d[E3]}{dt} = k_2[E2] + k_9[E7] - k_3[E3]$$

Equação 4.12

$$\frac{d[E4]}{dt} = k_4[E1][AO^-] - k_{-4}[E4]$$

Equação 4.13

$$\begin{aligned}\frac{d[E5]}{dt} = & -k_5[E5][AB] + k_{-5}[E6] + k_{-11}[E1][NH] - k_{11}[E5] + k_8[E7] - k_{-12}[E5][NH] \\ & + k_{12}[E10]\end{aligned}$$

Equação 4.14

$$\frac{d[E6]}{dt} = k_5[E5][AB] - (k_{-5} + k_6 + k_{10})[E6] - \beta k_{-12}[E6][NH] + \beta k_{12}[E11] + k_{-10}[E2][NH]$$

Equação 4.15

$$\frac{d[E7]}{dt} = k_6[E6] - (k_8 + k_9 + k_7)[E7] + k_{-7}[AN][E1]$$

Equação 4.16

$$\frac{d[E8]}{dt} = k_{14}[E1][NH] - k_{-14}[E8] - k_{15}[AB][E8] + k_{-15}[E9]$$

Equação 4.17

$$\frac{d[E9]}{dt} = \alpha k_{14}[E2][NH] - (\alpha k_{-14} + k_{-15})[E9] + k_{15}[AB][E8]$$

Equação 4.18

$$\frac{d[E10]}{dt} = k_{-12}[E1][NH] - k_{112}[E10] - k_{13}[E10][AB] - k_{-13}[E11]$$

Equação 4.19

$$\frac{d[E11]}{dt} = k_{13}[E10][AB] - (k_{-13} + \beta k_{12} + k_7)[E11] + \beta k_{-12}[E6][NH]$$

Equação 4.20

Considera-se:

- estado estacionário ($\frac{d[Complexo\text{enzimático}]}{dt} = 0$).

- quantidade de enzima total (E_{TOTAL}) no sistema:

$$[E_{TOTAL}] = [E1] + [E2] + [E3] + [E4] + [E5] + [E6] + [E7] + [E8] + [E9] + [E10] + [E11]$$

- velocidade de formação do antibiótico (v_{AN}):

$$v_{AN} = \frac{d[AN]}{dt} = k_7[E7] - k_{-7}[AN][E1]$$

- velocidade de formação da p-hidroxifenilglicina (v_{AOH}):

$$v_{AOH} = \frac{d[AOH]}{dt} = k_3[E3] + k_8[E7] - k_4[E1][AO^-] + k_{-4}[E4]$$

4.4.1 – 1ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: sem inibição por 6-APA nas Reações de Síntese de Amoxicilina e Hidrólise de Éster

A figura 4.3 mostra o mecanismo cinético sem inibição por 6-APA do tipo misto nas reações de hidrólise do substrato éster e de síntese de amoxicilina. A inibição competitiva por 6-APA na hidrólise do antibiótico é considerada, pois AN não pode se ligar ao complexo EH-NH. Novamente, a velocidade de formação de cada complexo enzimático é dada por:

$$\frac{d[E1]}{dt} = -k_1[AB][E1] + k_{-1}[E2] + k_3[E3] - k_4[E1] + k_{-4}[E4] - k_{-11}[E1][NH] + k_{11}[E5]$$

$$+ k_7[E7] - k_{-7}[AN][E1]$$

$$\frac{d[E2]}{dt} = k_1[AB][E1] - k_{-1}[E2] - k_2[E2] - k_{-10}[E2][NH] + k_{10}[E6]$$

$$\frac{d[E3]}{dt} = k_2[E2] + k_9[E7] - k_3[E3]$$

$$\frac{d[E4]}{dt} = k_4[E1][AO^-] - k_{-4}[E4]$$

$$\frac{d[E5]}{dt} = -k_5[E5][AB] + k_{-5}[E6] + k_{-11}[E1][NH] - k_{11}[E5] + k_8[E7]$$

$$\frac{d[E6]}{dt} = k_5[E5][AB] - (k_{-5} + k_6 + k_{10})[E6] + k_{-10}[E2][NH]$$

$$\frac{d[E7]}{dt} = k_6[E6] - (k_8 + k_9 + k_7)[E7] + k_{-7}[AN][E1]$$

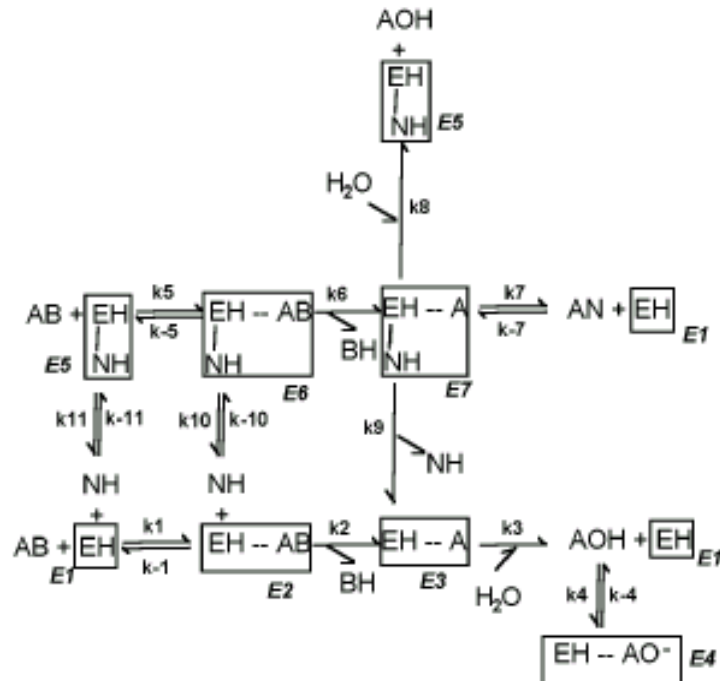


Figura 4.3 - Mecanismo cinético sem inibição do tipo misto por 6-APA para a síntese de amoxicilina catalisada por PGA.

Neste caso, considera-se:

- estado estacionário ($\frac{d[\text{Complexo enzimático}]}{dt} = 0$).

- quantidade de enzima total (E_{TOTAL}) no sistema:

$$[E_{\text{TOTAL}}] = [E1] + [E2] + [E3] + [E4] + [E5] + [E6] + [E7]$$

- velocidade de formação do antibiótico (v_{AN}):

$$v_{AN} = \frac{d[AN]}{dt} = k_7[E7] - k_{-7}[AN][E1]$$

- velocidade de formação da p-hidroxifenilglicina (v_{AOH}):

$$v_{AOH} = \frac{d[AOH]}{dt} = k_3[E3] + k_8[E7] - k_4[E1][AO^-] + k_{-4}[E4]$$

Resolveu-se o sistema para velocidades iniciais de síntese de amoxicilina, quando:

- k_4 e $k_{-4} = \text{zero}$;
- $E4 = \text{zero}$ e $k_{-7} = \text{zero}$

Agruparam-se as constantes e obteve-se:

$$v_{AN} = \frac{C_1 * AB * NH^2 + C_2 * AB * NH + C_3 * NH * AB^2}{C_4 * NH + C_5 * AB + C_6 * NH^2 + C_7 + C_8 * AB^2 + C_9 * NH * AB + C_{10} * NH * AB^2 + C_{11} * AB * NH^2}$$

Equação 4.21

Para $AB = \text{constante}$:

$$v_{AN} = \frac{A * NH^2 + B * NH}{C * NH^2 + D * NH + E}$$

Equação 4.22

sendo que: $A = C_1 * AB$; $B = C_2 * AB + C_3 * AB^2$; $C = C_6 + C_{11} * AB$; $D = C_4 + C_9 * AB + C_{10} * AB^2$ e $E = C_7 + C_5 * AB + C_8 * AB^2$

Para NH constante:

$$v_{AN} = \frac{F * AB^2 + G * AB}{H * AB^2 + J + I * AB}$$

Equação 4.23

sendo que: $F = C_3 * NH$; $G = C_2 * NH + C_1 * NH^2$; $H = C_8 + C_{10} * AB$; $I = C_5 + C_9 * NH + C_{11} * NH^2$ e $E = C_7 + C_4 * NH + C_6 * NH^2$

4.4.2 – 2ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: 6-APA Se Liga Apenas ao Complexo Enzima-Éster

Na tentativa de se obter uma boa representação dos dados de síntese, fez-se uma nova simplificação no mecanismo mostrado na figura 4.3. Considerou-se que o núcleo só se une ao complexo enzima-éster e, portanto, k_{11} e k_{-11} são iguais a zero. A equação de velocidade de formação de AN fica:

$$v_{AN} = \frac{C_1 * AB * NH}{C_2 * AB + C_3 * NH + C_4 * AB * NH + C_5 * NH^2 + C_6}$$

Equação 4.24

Se AB for constante:

$$v_{AN} = \frac{A * NH}{B * NH^2 + C * NH + D}$$

Equação 4.25

sendo que: $A = C_1 * AB$; $B = C_5$; $C = C_3 + C_4 * AB$; $D = C_2 * AB + C_6$

Se fizermos NH constante:

$$v_{AN} = \frac{E * AB}{F * AB + G}$$

Equação 4.26

sendo que: $E = C_1 * NH$; $F = C_2 + C_4 * NH$; $G = C_6 + C_3 * NH + C_5 * NH^2$

4 .5- Modelo Híbrido

4.5.1 – Rede Neural

Redes neurais são modelos matemáticos baseados na estrutura de neurônios do cérebro humano. É uma técnica de inteligência artificial que tem como característica fundamental a capacidade de “aprender” a lógica existente em um conjunto de dados e, posteriormente, predizer valores diferentes dos utilizados no treinamento.

Neste trabalho, utilizou-se uma rede direta (“feedforward”) multicamandas treinada por retropropagação (“backpropagation”), com a informação fluindo em uma única direção. A rede possuía uma camada de entrada (concentração de substratos e produtos), uma camada oculta e uma camada de saída (velocidade de

formação ou consumo dos produtos). A topologia da rede é mostrada na figura 4.4.

Utilizou-se um treinamento estático da rede. Esse processo de aprendizagem é um procedimento iterativo: um par de vetores entrada-saída ($\underline{x}_i, \underline{d}_i$) da base de dados ($\underline{X}^T = [\underline{x}_1^T, \dots, \underline{x}_s^T]$, $\underline{D}^T = [\underline{d}_1^T, \dots, \underline{d}_n^T]$), empregada para o treinamento, é apresentado por vez; a entrada \underline{X}_i é propagada pela rede para se obter um sinal resposta \underline{y}_i^T (previsão da rede). No início do treinamento, os pesos \underline{W}_1 e \underline{W}_2 são definidos aleatoriamente, entre 0 e 1 ou entre -0,5 e 0,5. O vetor $\underline{x}_1^T = [x_1, \dots, x_n]$, onde o índice denota sua posição na base de dados, é apresentado à rede e processado através dela para se obter um vetor de saída $\underline{y}_1^T = [y_1, \dots, y_n]$. O sinal obtido na saída é então comparado com o correspondente valor esperado para aquela entrada $\underline{d}_1^T = [d_1, \dots, d_n]$, e através de um algoritmo de treinamento, efetuam-se alterações nos pesos \underline{W}_1 e \underline{W}_2 . A seguir, um novo par entrada-saída da base de dados ($\underline{x}_2^T, \underline{d}_2^T$) é fornecido à rede e o procedimento é repetido [Cruz (1996)]. A entrada total (S_j) de uma unidade processante (neurônio ou nó) j é uma função linear da saída y_i das unidades anteriores, conectadas a j , e dos pesos w_{ji} nestas conexões:

$$S_j = \sum_i y_i W_{ji}$$

Equação 4.27

Pode se introduzir uma entrada extra (“bias”) em cada camada, cujo sinal tem sempre o valor 1. A saída da unidade processante y_j é uma função não linear da entrada total, por exemplo, para uma função sigmóide:

$$y_j = \frac{1}{1 + e^{-S_j}}$$

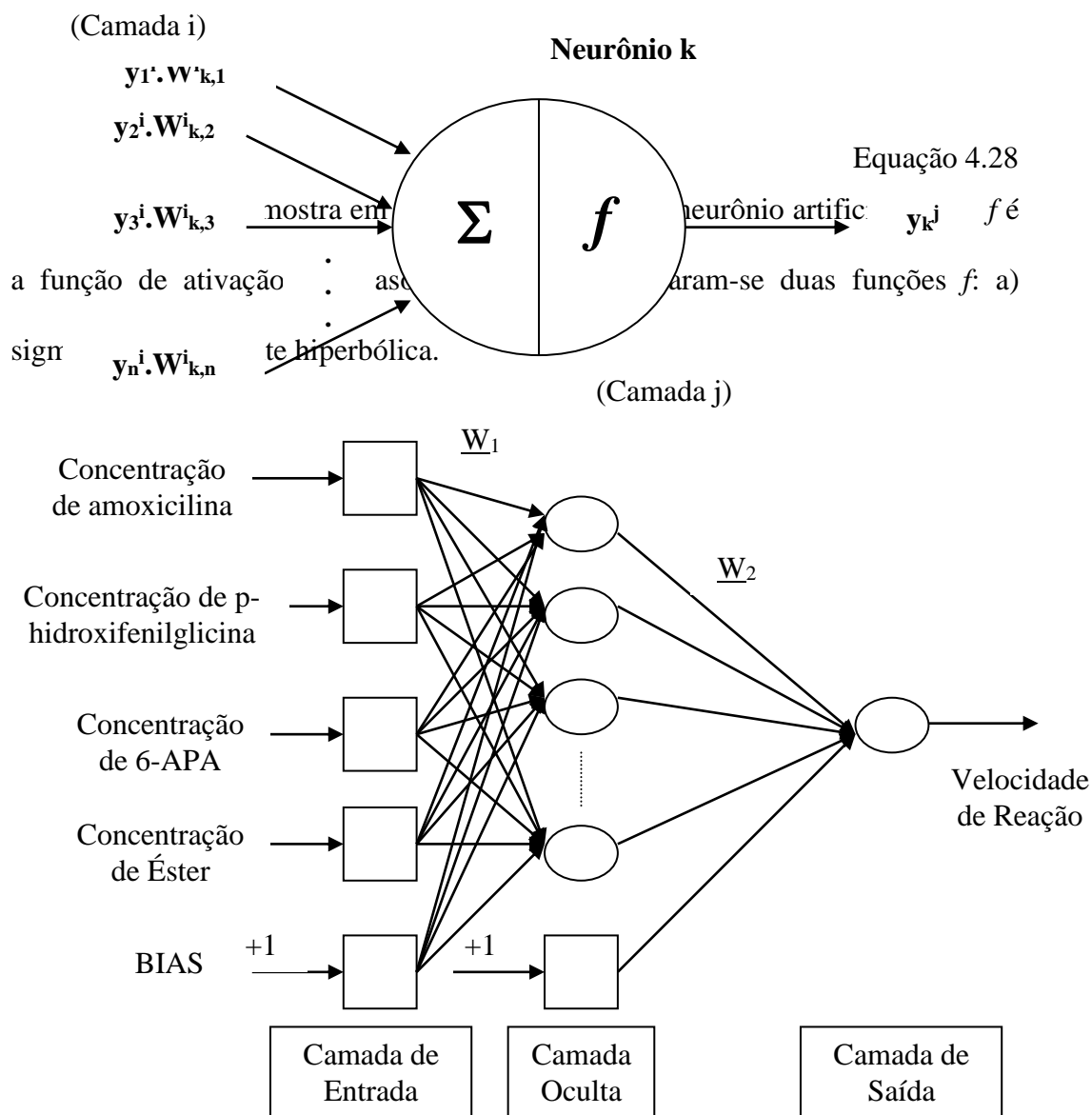


Figura 4.4 – Topologia de rede neural multicamadas utilizada neste trabalho.

Figura 4.5 – Modelo de elemento processante da rede neural: neurônio artificial. (Cruz, 1996).

Utilizou-se o algoritmo da retropropagação. Uma descrição detalhada desse algoritmo, que não é apresentada aqui, pode ser encontrada em Rumelhart et al. (1986) e Cruz (1996). A função a ser minimizada é dada por:

$$\Phi_p = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^{mx} \varepsilon_{k,p}^T \varepsilon_{k,p}$$

Equação 4.29

Onde:

p = indica o número da apresentação de um par entrada-saída;

Φ = Função SQE (Soma dos Quadrados dos Erros) e

mx = número de pares de vetores entrada-saída.

E $\varepsilon_{k,p}$ é definido como:

$$\varepsilon_{k,p} = d_{k,p} - y_{k,p}$$

Equação 4.30

No algoritmo da retropropagação, os pesos (\underline{W}) são definidos como:

$$\underline{W}_{p+1} = \underline{W}_p + \eta(-\nabla\Phi_p)$$

Equação 4.31

onde η é um parâmetro que controla a estabilidade e a taxa de convergência, aqui denominado taxa de aprendizado, $\nabla\Phi_p$ é o valor do gradiente da função Φ calculado por aproximação na apresentação p.

Utilizaram dois programas de treinamento neste trabalho:

- a) Programa 1: rotina simples, implementação direta das equações 4.29 a 4.31 em linguagem Fortran 90.
- b) Programa 2: rotina otimizada, implementada por Nascimento e Yamamoto (1993) e atualizada por Cruz (1996).

4.5.2 - Modelo Híbrido 1

A figura 4.6 mostra uma representação esquemática da síntese cineticamente controlada de amoxicilina.

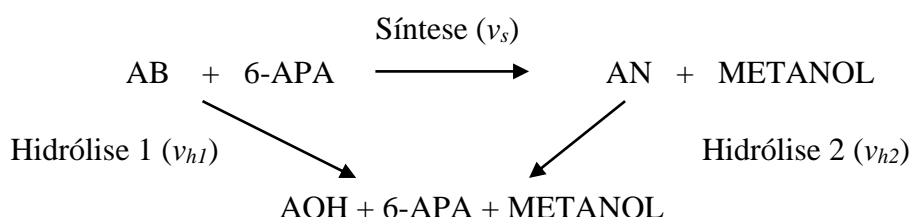


Figura 4.6 - Síntese cineticamente controlada de amoxicilina, onde AB = éster metílico de p-hidroxifenilglicina, AOH = p-hidroxifenilglicina e AN = amoxicilina.

No primeiro modelo Híbrido testado, definiu-se o sistema considerando:

- a) Velocidade de síntese de amoxicilina: v_s ;
- b) Velocidade de hidrólise de POHPGME: v_{h1} e
- c) Velocidade de hidrólise de amoxicilina: v_{h2} .

e treinaram-se três redes com velocidades iniciais de síntese, hidrólise de POHPGME e de amoxicilina. A entrada de todas as redes são as concentrações de amoxicilina, p-hidroxifenilglicina, 6-APA e éster metílico de p-hidroxifenilglicina. A figura 4.4 ilustra a topologia das três redes aqui utilizadas sendo que: a saída da primeira rede é a velocidade de síntese de amoxicilina, a saída da segunda rede é a velocidade de hidrólise do éster e a saída da terceira rede é a hidrólise de amoxicilina. O modelo híbrido 1 é composto pelas seguintes equações de balanço de massa para reator em batelada:

$$\frac{dC_{AN}}{dt} = v_s - v_{h2}$$

Equação 4.32

$$\frac{dC_{AOH}}{dt} = v_{h1} + v_{h2}$$

Equação 4.33

$$C_{6-APA} = C_{6-APA0} - C_{AN}$$

Equação 4.34

$$C_{AB} = C_{AB0} - C_{AN} - C_{AOH}$$

Equação 4.35

Onde C_{6-APA0} e C_{AB0} são as concentrações de 6-APA e POHPGME, respectivamente, no início do ensaio. As equações 4.32 e 4.33 são um conjunto de equações diferenciais ordinárias, resolvidas numericamente utilizando o algoritmo de DSSAL [Petzold (1989)].

4.5.3 – Modelo Híbrido 2

No segundo modelo Híbrido, definiu-se o sistema considerando:

- a) Velocidade de formação/consumo de amoxicilina (v_{AN}): $v_{AN} = v_s - v_{h2}$
- b) Velocidade de formação de POHPG (v_{AOH}): $v_{AOH} = v_{h1} + v_{h2}$

e treinaram-se duas redes com dados de velocidade formação/consumo de amoxicilina e velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina durante síntese cineticamente controlada de amoxicilina em batelada. O modelo híbrido 2 é composto pelas seguintes equações de balanço de massa para reator em batelada:

$$\frac{dC_{AN}}{dt} = v_{AN}$$

Equação 4.36

$$\frac{dC_{AOH}}{dt} = v_{AOH}$$

Equação 4.37

$$C_{6-APA} = C_{6-APA0} - C_{AN}$$

Equação 4.38

$$C_{AB} = C_{AB0} - C_{AN} - C_{AOH}$$

Equação 4.39

As equações 4.36 a 4.39 são resolvidas numericamente utilizando o método de Runge-Kutta (Petzold, 1989).

Duas redes neurais foram empregadas. A topologia das duas redes pode ser observada na figura 4.4. As entradas das duas redes são as mesmas: concentração de produtos (amoxicilina e p-hidroxifenilglicina) e substratos (6-APA e éster metílico de p-hidroxifenilglicina). A primeira rede tem como saída a velocidade de formação e consumo de amoxicilina e a segunda rede prediz a velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina.

Capítulo 5 – Resultados e Discussões

5.1 - Influência do pH e da temperatura na síntese de

amoxicilina

Estudaram-se, em dois pH e temperatura, as reações de hidrólise de: éster metílico de p-hidroxifenilglicina e amoxicilina, substratos esses que competem pela enzima, buscando-se condições que favoreçam a hidrólise do éster preferencialmente. Segundo a literatura [Stambolieva et al. (1992), Kato (1980a)], a ligação da enzima ao éster é independente da presença ou não do núcleo. Nesse caso, a hidrólise do éster seria a mesma na presença ou na ausência do núcleo, o que permite que se estimem os parâmetros em etapas, conforme metodologia utilizada neste trabalho. Realizaram-se experimentos de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e hidrólise de amoxicilina, catalisadas por derivado imobilizado de PGA, a pHs 6,5 e 7,5 e temperaturas de 4°C e 25°C, para diferentes concentrações iniciais de éster (10, 30, 90 e 120mM) e de amoxicilina sódica (10, 30, 60 e 90mM). Os valores de pH foram escolhidos em função da atividade/estabilidade da enzima e estabilidade e solubilidade dos substratos e produtos (Fernandez-Lafuente et alli., 1996). As velocidades iniciais das reações em função da concentração de substrato, para cada condição de pH e temperatura, são mostradas na Figura 5.1. Observando esta figura, vemos que, tanto para a temperatura de 25°C quanto 4°C, a velocidade de hidrólise de ambos os substratos é desfavorecida pela mudança de pH de 7,5 para 6,5. Este comportamento se deve ao fato dos grupos amino da molécula de éster e de amoxicilina possuírem um pK em torno de 7, o que faz com que a 6,5 a maioria desses grupos estejam

protonados. Como a enzima aqui empregada aceita apenas substratos desprotonados, a pH 6,5 a concentração de substrato realmente disponível é menor que a pH 7,5, conforme se constata experimentalmente.

Para que a enzima seja cataliticamente ativa, o grupo amino terminal da serina pertencente ao sítio ativo precisa estar neutro. Assim, tanto a concentração de substrato quanto a de enzima são menores a pH 6,5. Contudo, a hidrólise do antibiótico é mais significativamente afetada pelo pH na temperatura de 4°C do que a 25°C. É nessa condição que se observam as menores velocidades relativas de hidrólise de amoxicilina em relação ao éster. Uma vez que se deseja atividade esterase maior que amidase (hidrólise do antibiótico), aparentemente a realização da síntese a pH 6,5 e 4°C favoreceria preferencialmente a formação do complexo acil-enzima com o éster ao invés de com a amoxicilina, com conseqüente aumento do rendimento na produção do antibiótico. Contudo, conforme já comentado, esses foram resultados iniciais, pois a complexidade do sistema recomendava que ele fosse estudado mais detalhadamente.

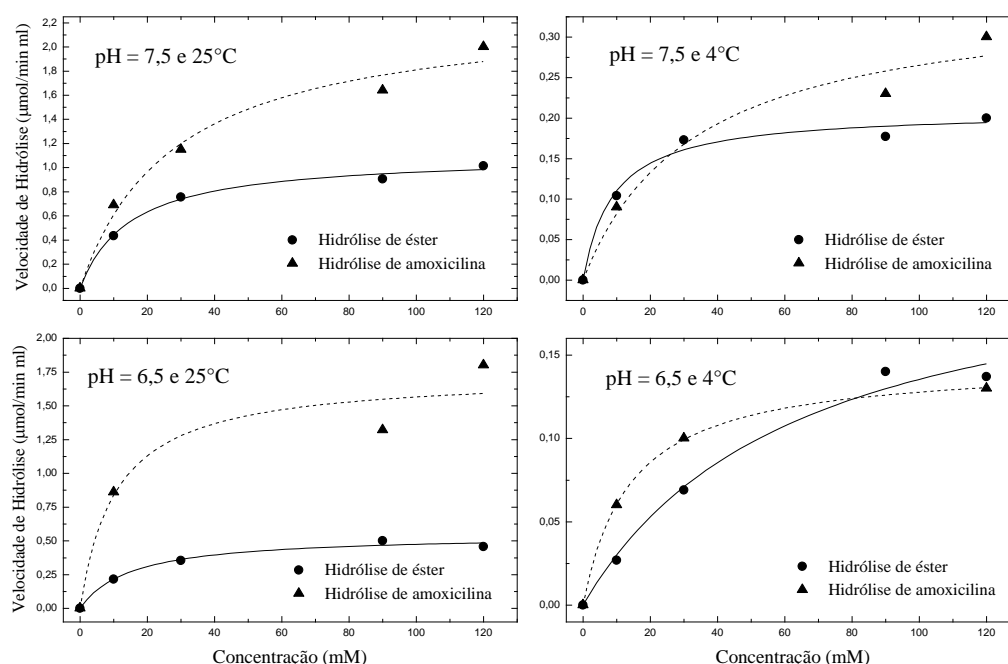


Figura 5.1 – Velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e de amoxicilina em função da concentração de substrato, a diferentes pHs e temperaturas.

5.2 - Modelo Semi-Empírico: Resultados Preliminares

5.2.1 - Estimativa de parâmetros do modelo semi-empírico

Devido a complexidade do sistema estudado, as reações envolvidas (hidrólise e síntese de amoxicilina e hidrólise do éster) foram estudadas separadamente e, desta forma, os respectivos parâmetros cinéticos puderam ser estimados. Neste momento, considerava-se que a presença do 6-APA não influenciaria na formação do complexo acil-enzima. Iniciou-se, assim, a busca pelo modelo de hidrólise do éster. Através de ensaios de velocidade inicial obtiveram-se dados de velocidade de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina na presença e ausência de amoxicilina (inibidor) para duas condições de pH (6,5 e 7,5) a 25°C. A Figura 5.2 mostra os dados experimentais e o ajuste do modelo obtido com 95% de intervalo de confiança através de ajuste

não linear utilizando o software Origin 5.0. Repetiu-se o mesmo procedimento para a hidrólise de amoxicilina na presença e na ausência de inibidores (éster e 6-APA), a Figura 5.3 mostra os dados experimentais e o ajuste do modelo.

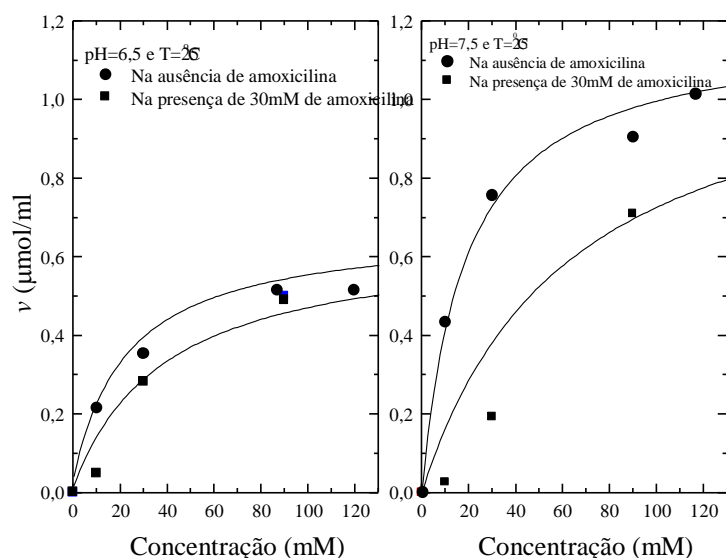


Figura 5.2 - Hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina na presença e na ausência de amoxicilina: dados experimentais e modelo cinético.

Os valores de T_{max} e K_N foram estimados a partir de ensaios de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações iniciais de 6-APA. A Figura 5.4 mostra os resultados obtidos. A tabela 5.1 os valores dos parâmetros estimados. Para a temperatura de 4°C estimaram-se apenas os parâmetros cinéticos para as hidrólises de éster e amoxicilina na ausência de inibidores, ou seja, K_{cat1} , K_{cat2} , K_{m1} e K_{m2} . Os resultados do ajuste são mostrados nas figuras 5.5 e 5.6, e os parâmetros, na tabela 5.2.

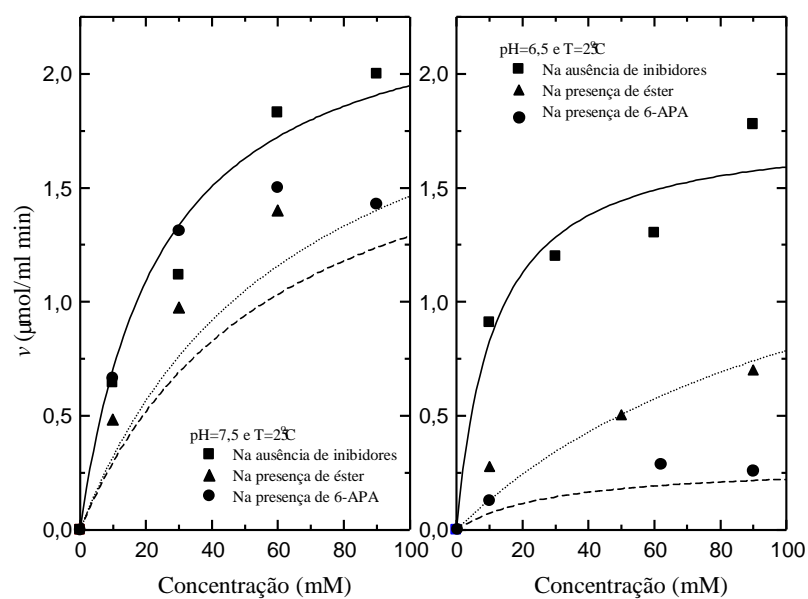


Figura 5.3 - Hidrólise de amoxicilina na presença e na ausência de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA: dados experimentais e modelo cinético.

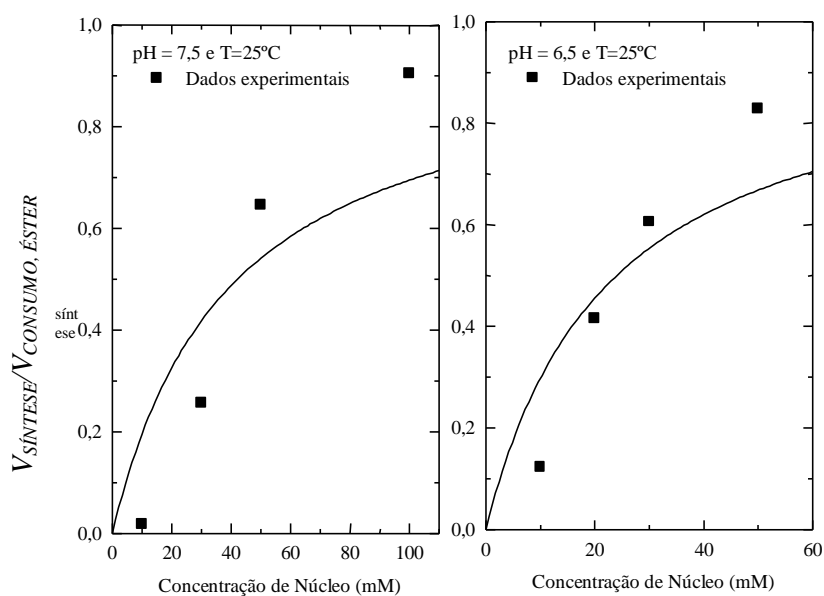


Figura 5.4 - Dados de síntese de amoxicilina para diferentes valores de concentração inicial de núcleo.

Tabela 5.2– Parâmetros estimados, com 95% de intervalo de confiança, 25°C

Parâmetro	Valor (pH = 7.5 e 25°C)	Valor (pH = 6.5 e 25°C)
k_{cat1} ($\mu\text{mol/ mim UI}$)	$0,1180 \pm 0,014$	$0,0633 \pm 0,006$
k_{cat2} ($\mu\text{mol/ mim UI}$)	$0,2424 \pm 0,022$	$0,1775 \pm 0,015$
K_{m1} (mM)	$18,578 \pm 8,71$	$23,195 \pm 7,46$
K_{m2} (mM)	$24,437 \pm 6,31$	$11,520 \pm 3,90$
K_{AB} (mM)	$5,941 \pm 1,91$	$1,008 \pm 0,34$
K_{NA} (mM)	$12,605 \pm 6,64$	$42,759 \pm 26,77$
K_{IN} (mM)	$55,176 \pm 24,83$	$1,947 \pm 0,70$
K_N (mM)	$39,54 \pm 18,23828$	22.57 ± 7.15403
Tmax	0.97	0.97

Tabela 5.3 – Parâmetros estimados, com 95% de intervalo de confiança, 4°C

Parâmetro	Valor (pH = 7.5 e 4°C)	Valor (pH = 6.5 e 4°C)
k_{cat1} ($\mu\text{mol/ mim UI}$)	0.209 ± 0.01	0.222 ± 0.03
k_{cat2} ($\mu\text{mol/ mim UI}$)	0.428 ± 0.07	0.152 ± 0.00
K_{m1} (mM)	8.978 ± 2.40	63.885 ± 19.63
K_{m2} (mM)	43.926 ± 18.82	15.472 ± 0.20

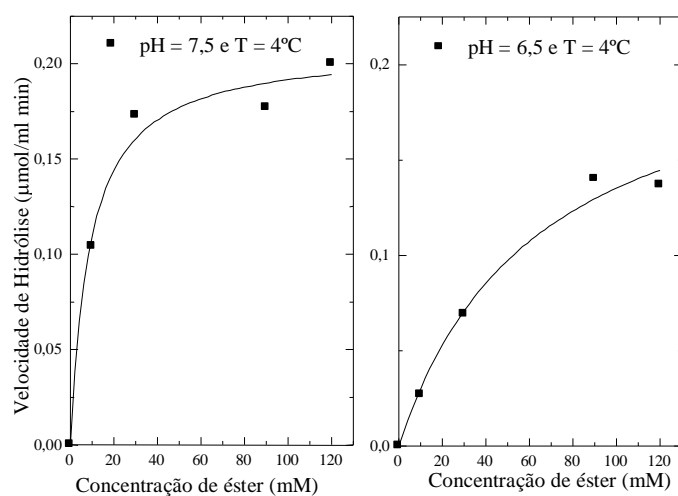


Figura 5.5 - Hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina a 4°C e pH = 7,5 e 6,5

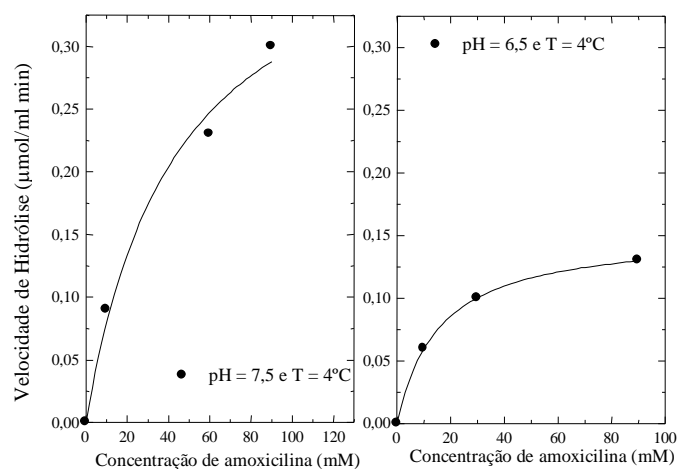


Figura 5.6 - Hidrólise de amoxicilina a 4°C e pH = 7,5 e 6,5

5.2.2 - Validação do modelo semi-empírico

Com o objetivo de validar o modelo cinético e os parâmetros estimados, alguns experimentos de síntese de amoxicilina foram realizados para diferentes condições iniciais. As figuras 5.7 a 5.10 mostram os resultados obtidos.

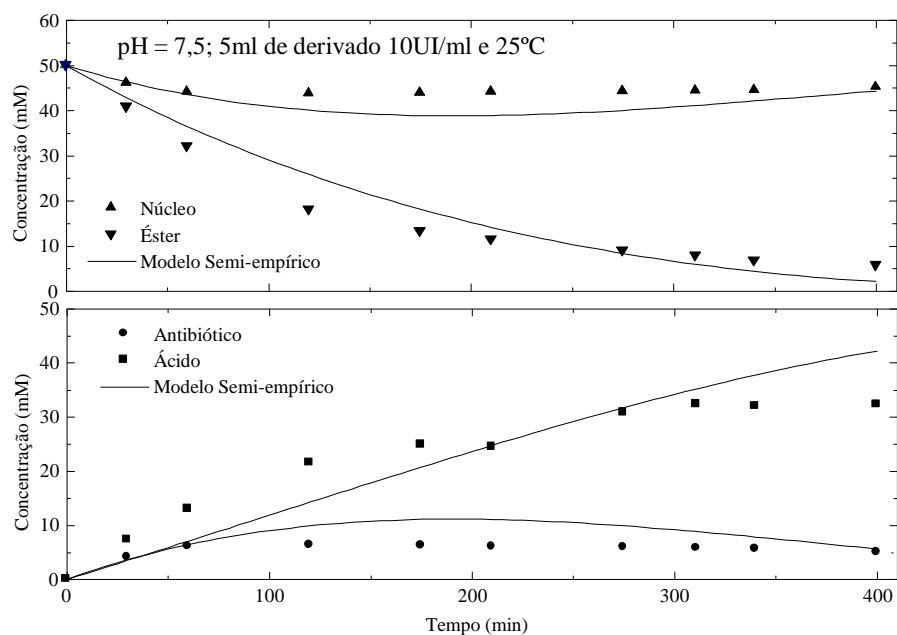


Figura 5.7 - Síntese de amoxicilina: pH=7,5, T= 25°C e 5ml de derivado 10UI/ml para 20ml totais.

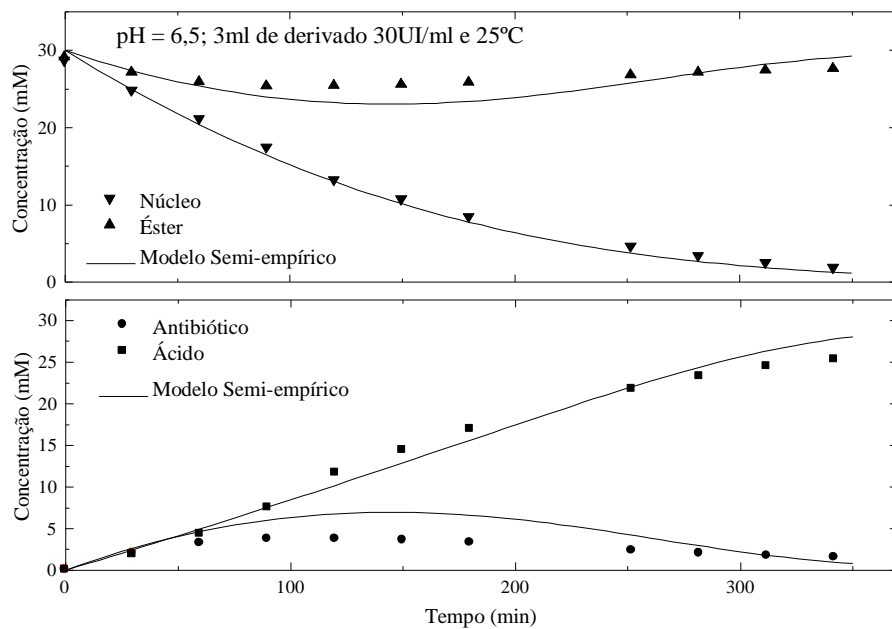


Figura 5.8 - Síntese de amoxicilina: pH=6,5, T= 25°C e 3ml de derivado 30UI/ml para 20ml totais.

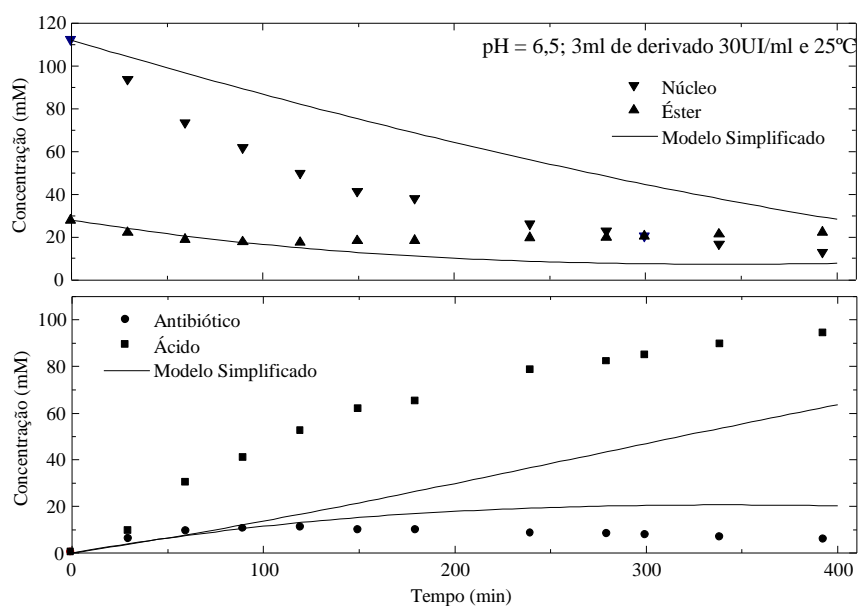


Figura 5.9 - Síntese de amoxicilina: pH=6,5, T= 25°C e 3ml de derivado 30UI/ml para 20ml totais, alta concentração inicial de éster.

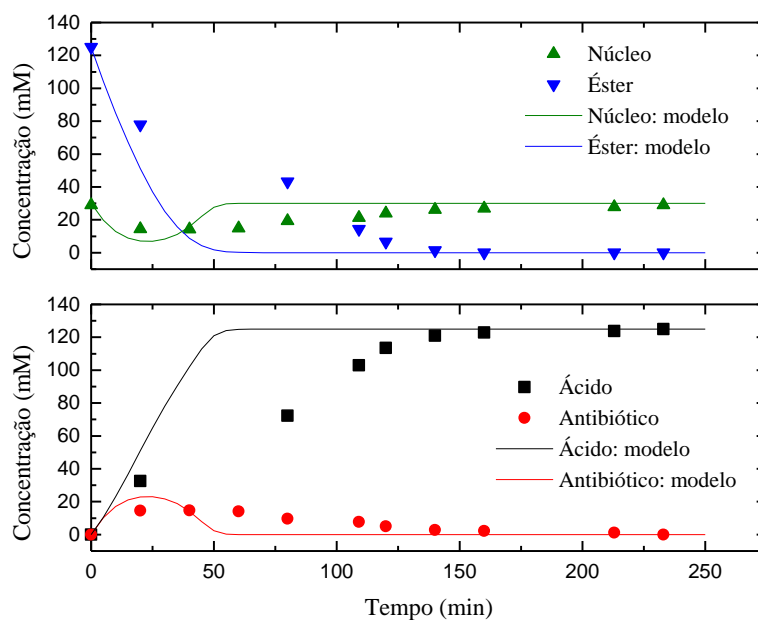


Figura 5.10 - Síntese de amoxicilina: pH=6,5, T= 25°C e 4ml de derivado 200UI/ml para 20ml totais.

Pode se observar que o modelo apresenta uma boa representação para algumas condições (baixas concentrações de substrato e derivado com baixa carga enzimática), mas falha para outras (alta concentração de substrato e alta carga enzimática). Estes resultados indicam que o modelo cinético necessitava ser melhorado. Em outras palavras, as hipóteses deveriam ser revisadas e/ou outros efeitos inibitórios deveriam ser considerados. Ospina et al. (1996a) estudaram a síntese de ampicilina, que é muito similar a amoxicilina, usando a mesma enzima. Eles apontam efeitos inibitórios que não foram considerados no modelo aqui proposto, como por exemplo, o efeito inibitório não competitivo do metanol e a inibição competitiva da fenilglicina (PG) formada na reação de hidrólise do éster e o efeito inibitório competitivo da PG na hidrólise de ampicilina. Eles também propuseram um modelo cinético, obtendo uma boa correlação entre os resultados experimentais e a predição do modelo, exceto para altas concentrações de substrato. Este comportamento também foi observado para o modelo aqui proposto. Blinkovsky e Markaryan (1993) observaram que PG se comporta como um inibidor competitivo na hidrólise de cefalexina, mas também observaram que metanol não influencia a síntese deste antibiótico até a concentração de 1,5mM.

Observando a Figura 5.10, podemos ver também que a resposta do modelo é mais rápida que a obtida experimentalmente. Isto pode ser explicado pela existência de problemas difusivos (difusão interna), fato este que não foi considerado no modelo matemático.

5.2.3 - Simulação de condições ótimas para a síntese de amoxicilina

Uma vez que o modelo havia conseguido representar algumas condições experimentais, decidiu-se utilizá-lo para realizar algumas simulações de modo a examinar a influência de algumas variáveis no rendimento de síntese, tais como:

concentração inicial de substrato, adsorção de núcleo (K_{EN}) e ausência de velocidade de hidrólise de amoxicilina. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5.11. O rendimento de síntese foi dado por:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{C_{\text{amoxicilina}}}{C_{6\text{-APA}}} * 100$$

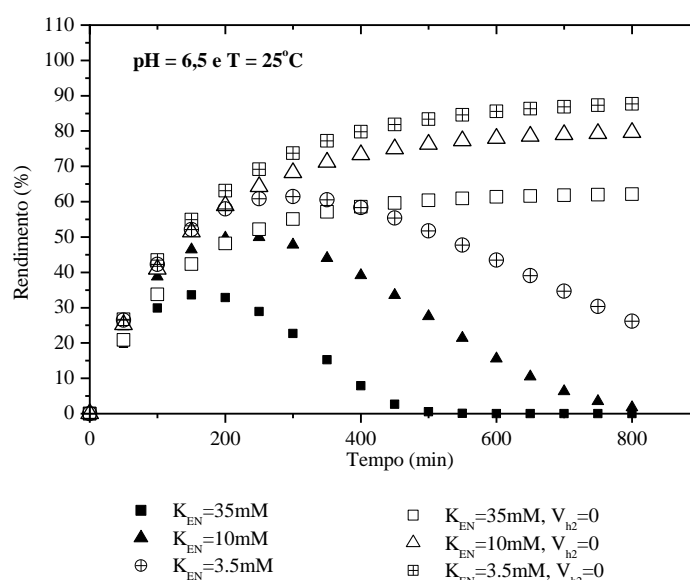


Figura 5.11 – Rendimento de síntese de amoxicilina para diferentes condições de reação – resposta do modelo matemático para $C_{AB} = C_{NH} = 100\text{mM}$.

Pode-se observar que o rendimento de síntese é maior a medida que se:

- aumenta a adsorção do núcleo na enzima (K_{EN} menor) e
- elimina a hidrólise do antibiótico recém formado.

Com base nesses resultados, podemos dizer que para se conseguir um melhor resultado de síntese deveríamos, por exemplo, melhorar algumas características do biocatalisador, tais como adsorção do núcleo e atividade esterase. Além disso, poderíamos modificar algumas condições do meio reacional como, por exemplo, trabalhar com um meio bifásico aquoso que permitisse a

separação da enzima e dos produtos, o que evitaria a hidrólise do antibiótico recém formado.

Realizou-se, assim, um ensaio de síntese de amoxicilina em meio bifásico aquoso (ver Figura 5.12). O objetivo deste experimento é separar a enzima do produto formado para evitar a reação de hidrólise. As fases utilizadas foram:

- Fase I: Polietilenoglicol 600 60% (v/v) e tampão fosfato 25mM;
- Fase II: NH_4SO_4 3,1M (em tampão fosfato).

A tabela 5.3 mostra os valores do coeficiente de partição obtidos experimentalmente. Cabe ressaltar que não se buscou um meio bifásico ótimo, utilizou-se o primeiro que forneceu uma boa partição de substratos e produtos, pois o objetivo final deste ensaio era apenas comprovar a validade do modelo matemático.

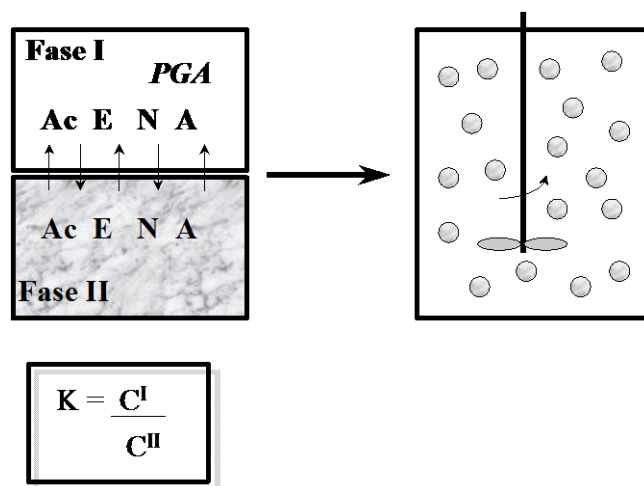


Figura 5.12 – Representação esquemática de um meio bifásico aquoso

Tabela 5.4 – Coeficientes de partição para o sistema bifásico aquoso.

Componente	Coeficiente de partição (K)
Éster	0,15
Núcleo	0,00
Ácido	0,26

Amoxicilina	0,10
-------------	------

Observando-se a Figura 5.13 podemos ver que o modelo matemático não se mostrou adequado para a representar os dados experimentais. Vários fatores podem estar afetando este resultado, tais como:

- existência de problemas de transferência externa de massa, uma vez que o derivado utilizado contém alta carga de enzima, o que não é levado em conta no modelo matemático;
- parâmetros cinéticos diferentes já que neste ensaio o derivado é colocado em solução de sulfato de amônio/tampão fosfato, o que pode mudar a conformação da enzima.

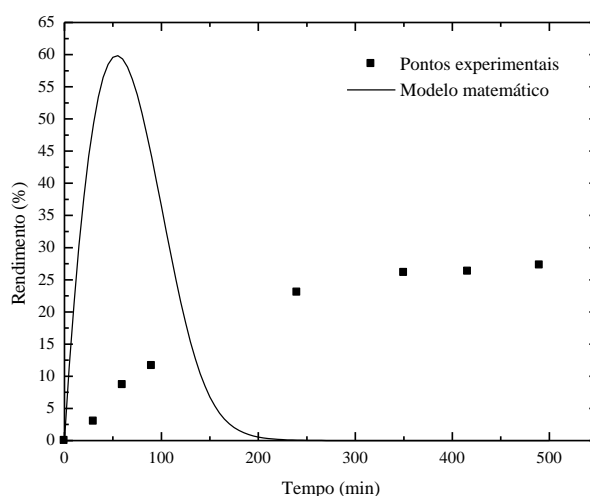


Figura 5. 13 – Rendimento de síntese de amoxicilina em meio bifásico aquoso.

Em vista dos resultados obtidos e levando em consideração a discordância dos diferentes autores sobre o mecanismo de ação da enzima durante a síntese de antibióticos β -lactâmicos, concluímos que a questão está ainda aberta para discussão. Por isso, com intuito de melhor entender o problema, diferentes efeitos inibitórios foram analisados ao longo deste trabalho, tais como: 6-APA, metanol, PG entre outros, o que permitiu a elaboração de um mecanismo cinético, no qual

intermediários enzima-substrato são considerados. Além disso, fez-se necessária a busca de condições operacionais que permitissem a realização do estudo cinético na ausência de efeitos difusivos.

5.3 - Escolha das condições experimentais para o estudo cinético das reações envolvidas na síntese enzimática de amoxicilina

Para a determinação de condições operacionais favoráveis, fez-se necessário caracterizar o gel de agarose utilizado para a imobilização e verificar a ocorrência de problemas de transporte de massa. Neste momento não se buscou determinar a difusividade de substratos e produtos mas apenas determinar condições operacionais que evitassem o problema da transferência de massa intra ou extra-partícula. Ou seja, o objetivo dos ensaios mostrados a seguir é de assegurar que as condições operacionais usadas para a estimativa dos parâmetros estejam livres de efeitos difusivos.

5.3.1 - Caracterização do gel de agarose utilizado para imobilização

Algumas propriedades do gel de agarose - tais como densidade, raio médio e porosidade - foram determinadas pelo método descrito anteriormente e os resultados são mostrados nas tabelas 5.4 e 5.5. A Figura 5.14 mostra uma imagem do gel de agarose 6BCL partícula pequena obtida usando software de análise de imagens.

Tabela 5.5 - Agarose 6 BCL (partículas pequenas)

Parâmetro	Valor
Densidade (g/ml)	1.0215 ± 0.0016
Raio médio(μm)	86.438 ± 26.356
Porosidade (%)	94.457 ± 0.159

Tabela 5.6 - Agarose 10 BCL (partículas pequenas)

Parâmetro	Valor
Densidade (g/ml)	1.0434 ± 0.0017
Raio médio (μm)	150.679 ± 78.695
Porosidade (%)	92.044 ± 0.044

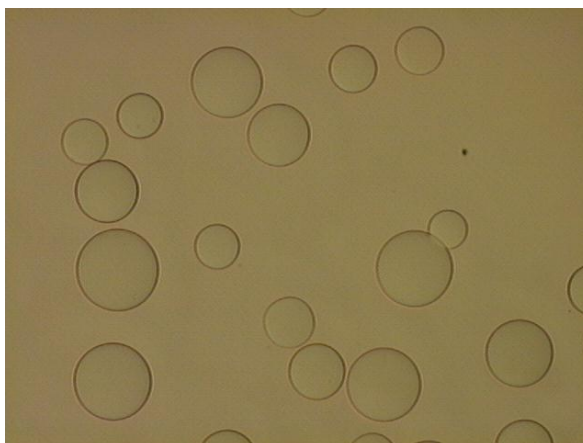


Figura 5.14– Gel de agarose 6BCL partícula pequena.

5.3.2 - Efeitos de Transporte de massa

5.3.2.1 - Efeitos de Transferência de Massa Externa

Realizam-se experimentos em batelada usando o mesmo biocatalisador, mas diferentes velocidades de agitação. A figura 5.15 mostra os resultados de síntese de amoxicilina obtidos: concentração adimensional de éster e antibiótico em função do tempo de reação. Não se observa diferença nos perfis de concentração ao longo do tempo para as diferentes velocidades de agitação usadas. Se o processo fosse limitado por difusão externa, o curso de reação deveria ser diferente para cada velocidade de agitação, o que não é observado. Portanto, pode-se dizer que, nas condições estudadas, não há problemas de transporte de massa externos influenciando estes experimentos de síntese.

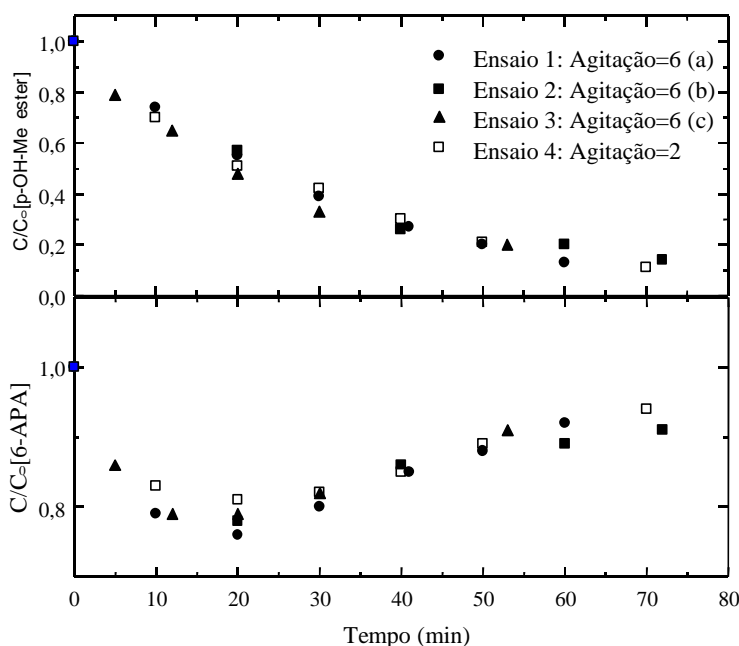


Figura 5.15 – Concentração adimensional de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA em função do tempo para diferentes velocidade de agitação. Agitação 6=800rpm e agitação 2=400rpm, as letras a, b e c indicam uma triplicata.

5.3.2.2 - Efeitos de Transferência de Massa Interna

Realizam-se experimentos de síntese de amoxicilina em batelada utilizando biocatalisadores com diferentes propriedades, tais como: diferentes diâmetros e tamanho de poros da partícula de gel para a mesma carga enzimática. Será utilizada baixa carga enzimática, condição essa em que se espera que a enzima esteja imobilizada na superfície do suporte, não causando efeitos difusivos dentro da partícula. Contudo, essa hipótese será testada a partir de ensaios de síntese de amoxicilina usando biocatalisadores com diferentes diâmetros de partícula e diferentes entrecruzamentos (diâmetros de poro) para uma mesma carga enzimática. A Figura 5.16 mostra os resultados obtidos para concentração adimensional dos substratos em função do tempo de reação. Pode-se observar que os perfis de concentração ao longo do tempo não foram afetados pelas mudanças

efetuadas no biocatalisador, o que é uma indicação da ausência de efeitos difusivos. No entanto, trabalhos posteriores realizados no laboratório de tecnologia enzimática do DEQ/UFSCar (Ferreira, 1999) mostraram a existência tanto de problemas de difusão externa, para velocidades muito baixas de agitação, quanto de problemas de difusão interna, para biocatalisadores que contêm altas cargas de enzima imobilizada (acima de 90UI/ml).

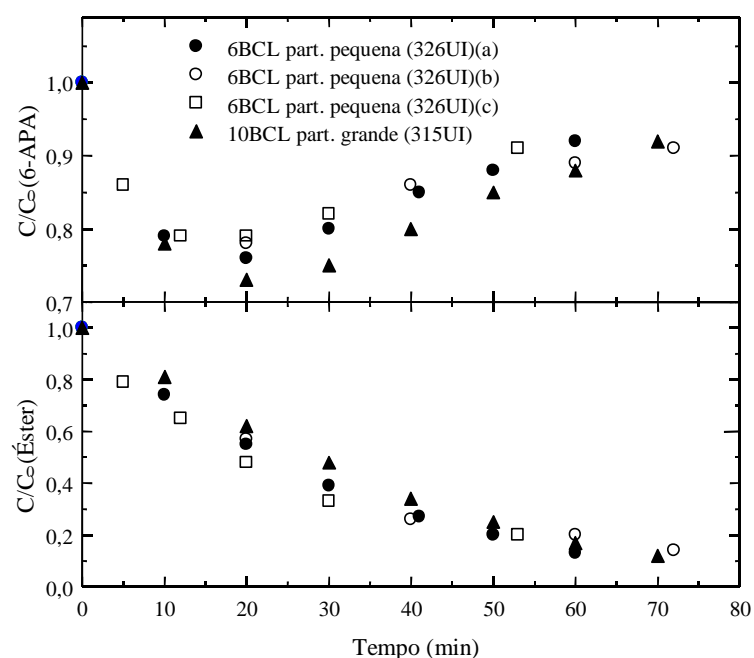


Figura 5.16 – Concentração adimensional de éster metílico de p-hidroxifenilglicina e 6-APA em função do tempo para diferentes diâmetros de partículas e concentração de enzima na matriz e tamanho de poro.

A análise dos resultados obtidos, para a caracterização do gel de agarose e para a determinação de existência de efeitos difusivos na síntese de amoxicilina, permitiu a escolha das condições experimentais a serem utilizadas para a busca do novo modelo matemático e a estimativa de seus parâmetros. Como se deseja trabalhar em uma região que não seja influenciada por problemas de transporte de

massa, escolheu-se a maior velocidade de agitação, o menor diâmetro de partícula disponível e baixa carga enzimática. Estas condições são mostradas na tabela 5.6.

Tabela 5.7 – Condições experimentais escolhidas para o estudo cinético da síntese enzimática de amoxicilina

Parâmetro	Valor
Velocidade de agitação	800 rpm
Diâmetro da partícula	86,43 μm
Carga enzimática	30UI/ml de agarose

Além disso, substituiu-se a agitação magnética, pois ensaios de equilíbrio mostraram que ela causa ruptura no gel, o que pode levar a liberação da enzima imobilizada e, conseqüentemente, perda de carga enzimática (Ferreira, 1999). A partir de então utilizou-se agitação mecânica.

5.4 - Estudos Difusivos na Síntese de Amoxicilina em Gel de

Agarose: Estimativa dos Coeficientes de Difusão Efetiva de substratos e produtos de

O modelo pseudo-homogêneo não representou bem os pontos experimentais para a síntese de amoxicilina quando o derivado enzimático utilizado continha 200UI/ml (ver Figura 5.10). Conforme se observa nesta figura, o modelo prevê velocidades de reação maiores do que as obtidas experimentalmente. Esse comportamento é típico de sistemas reativos sujeitos a limitações difusionais. Ferreira (1999) estudou os efeitos difusionais na síntese de ampicilina catalisada por derivados imobilizados de PGA em agarose, para diferentes diâmetros de poro do suporte e carga enzimática do derivado. O autor concluiu que o atraso difusional é significativo apenas para derivados com altas cargas de enzima imobilizada (mais de 90UI/ml). Esses resultados sugerem que o

mesmo fenômeno poderia também estar acontecendo na síntese de amoxicilina (Figura 5.10), confirmando a hipótese de atraso difusional sugerida pela comparação dos resultados de síntese obtidos para derivados com baixa e alta carga enzimática.

A partir da hipótese de que estaria ocorrendo limitação difusional intra-partícula estimaram-se as difusividades efetivas em gel de agarose, contendo PGA imobilizada, através do ajuste de modelo reativo-difusivo a dados experimentais de síntese de amoxicilina. Esses dados foram obtidos em condições operacionais de alta velocidade de agitação, conforme estudo de Ferreira (1999), para evitar limitação por difusão externa, em condições experimentais em que o modelo semi-empírico havia representado bem o sistema. As Figuras 5.17, 5.18 e 5.19 mostram os resultados obtidos para diferentes condições experimentais. A Tabela 5.7 mostra os valores dos parâmetros estimados por busca direta para o sistema em estudo e os valores calculados, pelo método de Wilke-Chang [Reid et al. (1987)], para os coeficientes de difusão molecular em água. Os valores estimados para o gel de agarose são 100 vezes menores que os calculados para os mesmos solutos em água. Essa grande resistência ao transporte de massa nos poros do gel é provavelmente causada pela presença da própria enzima, uma molécula grande de proteína (90kDa de peso molecular) que se transforma em barreira para a difusão de substratos e produtos. Valores de coeficientes de difusividade estimados por outros autores, para: síntese de ampicilina com PGA imobilizada em agarose – ajuste de modelo reativo-difusivo [Ferreira (1999)] e hidrólise de penicilina G com PGA imobilizada em poliacrilamida Boehringer Mannheim – apenas difusão [Kumar et al. (1996)], são mostrados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Difusividades efetivas estimadas nos poros de gel de agarose e difusividade molecular em água calculada pelo método de Wilke-Chang [Reid et al. (1987)].

Soluto	Coeficiente de difusão molecular em água (cm ² /s)	Difusividade efetiva em gel de agarose (cm ² /s)
POHPG	7.0×10^{-6}	$7,6 \times 10^{-8}$
6-APA	$7,6 \times 10^{-6}$	6.13×10^{-8}
AMOX	4.2×10^{-6}	$7,6 \times 10^{-8}$
POHPGME	7.2×10^{-6}	$7,6 \times 10^{-8}$

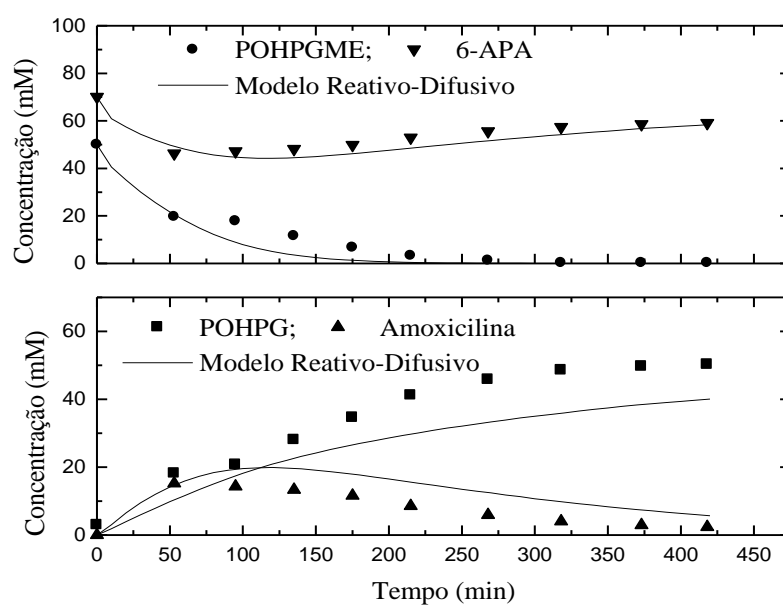


Figura 5.17 – Síntese de Amoxicilina: 25°C pH 6,5 e 3ml de derivado 200UI/ml_{gel} para 20ml totais.

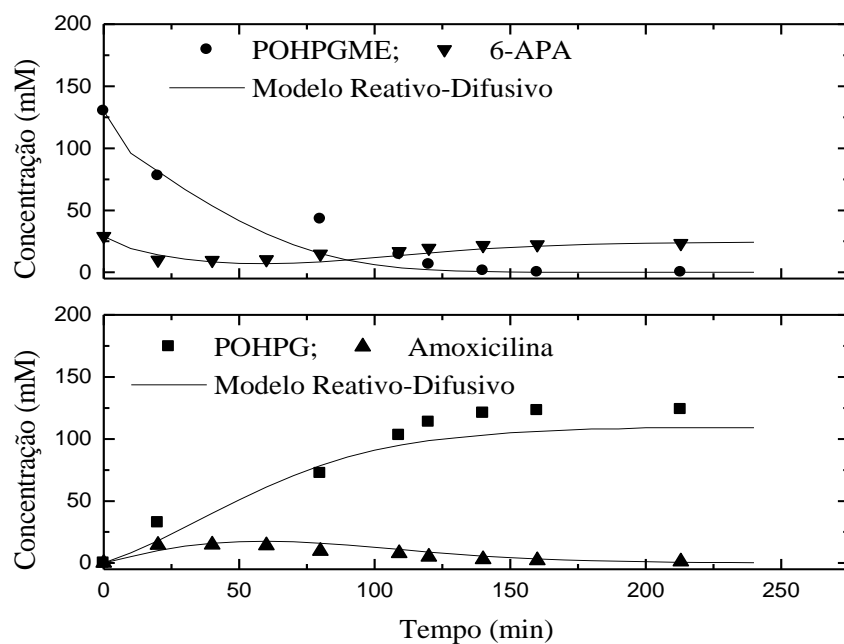


Figura 5.18 – Síntese de Amoxicilina: 25°C pH 6,5 e 4ml de derivado 200UI/ml_{gel} para 20ml totais.

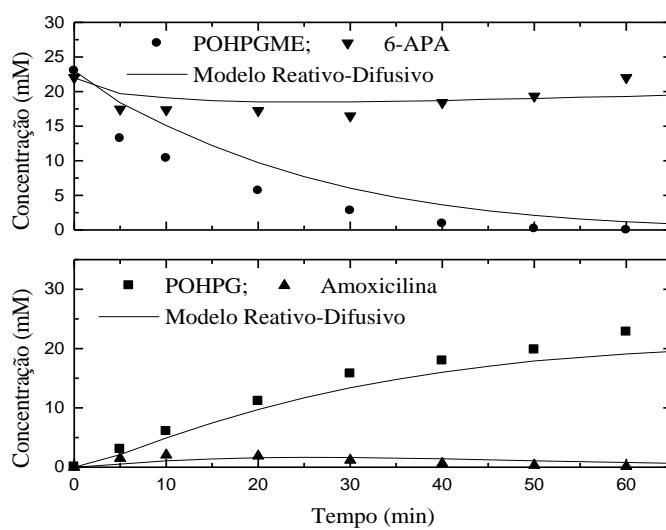


Figura 5.19 – Síntese de Amoxicilina: 25°C, pH 7,5 e 3ml de derivado 200UI/ml_{gel} para 20ml totais.

Tabela 5.9 – Difusividades Efetivas estimadas por diferentes autores.

Soluto	De (cm ² /s)
6-APA ^a	6,9 x 10 ⁻⁸
Ampicilina ^a	5,0 x 10 ⁻⁸
Éster metílico de fenilglicina ^a	7,6 x 10 ⁻⁸
Penicilina G ^b	8,3 x 10 ⁻⁸
Fenilalanina ^c	96,4 x 10 ⁻⁸
Fenilalanina ^d	24,9 x 10 ⁻⁸

^a Ferreira, 1999

^b Kumar et al., 1996

^c Fernández-Sanchez, 2000: gel de agarose

^d Fernández-Sanchez, 2000: gel de agarose com PGA imobilizada.

Um estudo do efeito da presença da enzima imobilizada (PGA) na difusividade efetiva de fenilalanina em gel de agarose foi apresentado por Fernández-Sanchez (2000) e os parâmetros obtidos para a difusividade efetiva são mostrados na Tabela 5.8. Os autores observaram que a difusividade diminui com a presença da enzima, o que reafirma a hipótese já levantada anteriormente por Ferreira (1999): a própria molécula de enzima se torna uma barreira a difusão dos solutos no gel.

Os valores de difusividade obtidos neste trabalho são muito próximos aos disponíveis em literatura, inclusive para penicilina G (180 UI/gsuporte e 300 UI/g de suporte), onde o suporte de imobilização era diferente, o que reforça ainda mais a hipótese de que a presença da enzima é a principal causa da resistência difusional. Ressalte-se ainda que tanto neste trabalho, quanto no de Ferreira (1999) e Kumar (1996), acima de um certo patamar, onde já se operava com alta carga enzimática, não se observou diminuição no valor estimado de difusividade quando se aumentou a carga do derivado. Isso indica que a maior resistência difusional deve ocorrer na entrada do poro, onde a formação de uma barreira pelas

moléculas de enzima imobilizada cria restrição difusional igual tanto para carga de 90 como de 300 UI/ml de gel, caso deste trabalho. Acreditamos, pois, que os valores obtidos são consistentes.

A Figura 5.20 mostra o perfil de concentração calculado usando o modelo pseudo-homogêneo (como se a enzima estivesse livre em solução) e o modelo reativo-difusivo para um gel de agarose contendo 30UI/ml, carga enzimática para a qual se observou que não havia limitação difusional [Ferreira (1999)]. O objetivo deste teste foi avaliar a consistência do modelo reativo-difusivo. Se consistente, espera-se uma sobreposição das curvas geradas pelos dois modelos ao se utilizar um alto valor de difusividade no modelo reativo-difusivo. Podemos observar que, de fato, as respostas se sobrepõem, indicando consistência do modelo matemático. Para derivados imobilizados de PGA contendo 10UI/ml e 30UI/ml, não há diferença na resposta do modelo quando diferentes valores de difusividades efetivas são usados (um grande intervalo é estudado: de 10^{-5} a 10^{-8}). Além disso, a resposta do modelo difusivo-reativo, quando D_e é muito grande, ajusta-se aos dados experimentais para síntese de amoxicilina com esses derivados com baixa carga enzimática (Figura 5.21). Finalmente, utilizou-se o modelo matemático proposto para se calcular o fator de efetividade (η) para a produção de amoxicilina. Os resultados são mostrados na Figura 5.22 e, como se esperava, derivados com 10 e 30UI/ml possuem $\eta = 1$, confirmando ausência de efeitos difusionais atuando no sistema. Para derivados com 200UI/ml, obtivemos sempre $\eta < 1$, para todo o curso reacional.

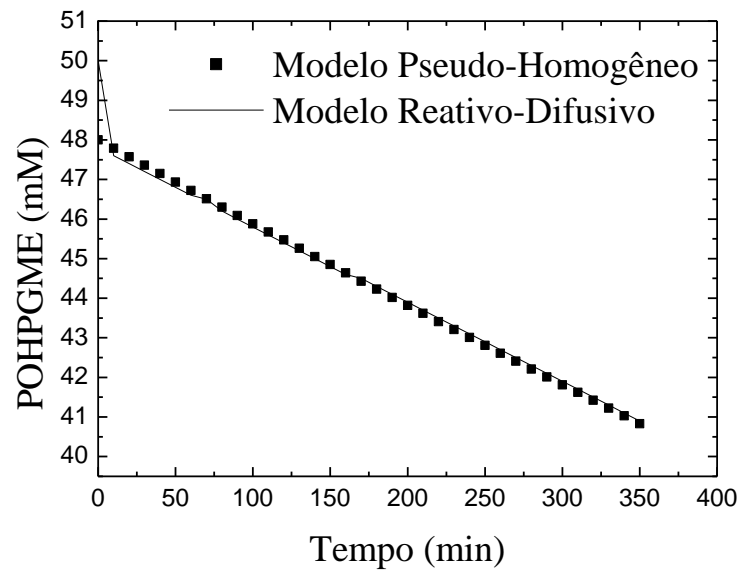


Figura 5.20 – Teste de consistência do modelo reativo-difusivo.

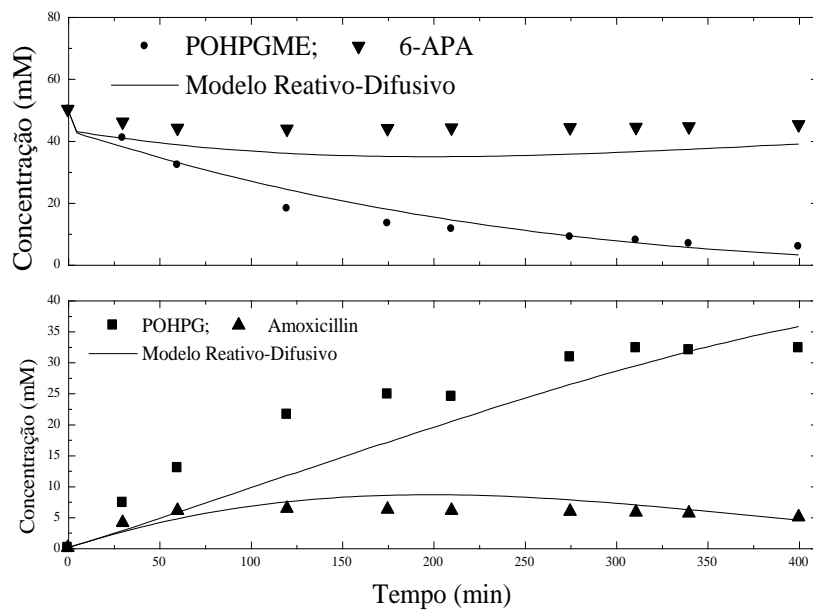


Figura 5.21 – Síntese de amoxicilina: 25°C, pH = 7,5 e 5ml de derivado 10UI/ml_{gel} para 20ml totais.

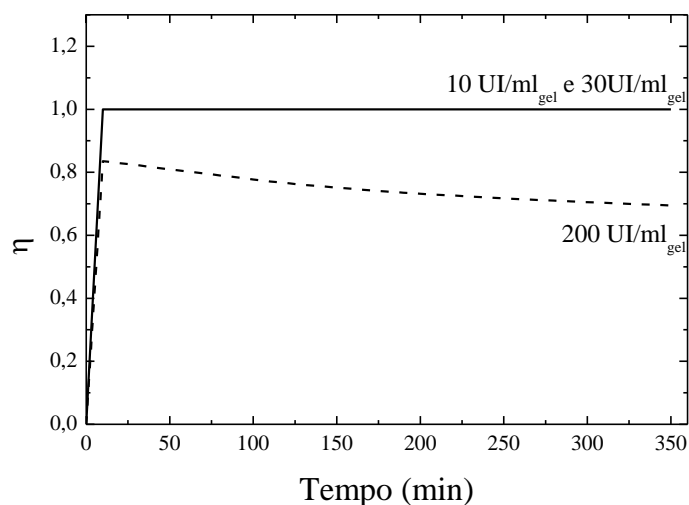


Figura 5.22 – Fator de efetividade (η) para derivados com diferentes cargas de enzima imobilizada.

5.5 - Efeito de Inibidores nas Reações Laterais da Síntese

Enzimática de Amoxicilina

Com o objetivo de entender melhor as etapas envolvidas na rota enzimática de produção de amoxicilina, estudaram-se os efeitos dos produtos e substratos nas reações laterais (hidrólise do éster e do antibiótico recém formado) da síntese de amoxicilina. A seguir, descrevem-se os resultados obtidos para ensaios de hidrólise de amoxicilina e éster metílico de p-hidroxifenilglicina, na ausência e na presença de inibidores, a 25°C e para dois valores de pH (6,5 e 7,5).

5.5.1 - Efeito do 6-APA na hidrólise de amoxicilina

Diversos autores reportam que o 6-APA atua como inibidor não competitivo na hidrólise de ampicilina, penicilina G e outros antibióticos [Ospina et al. (1992); Ospina et al. (1996); Plaskie et al. (1978); Balasingham et al. (1972)], ver tabela 5.9. Kasche et al. (1984), no entanto, observaram que este núcleo β -lactâmico é um inibidor competitivo quando substratos maiores são

utilizados, tais como: benzilpenicilina ou ampicilina. Para tentar elucidar o efeito inibitório do 6-APA na hidrólise de amoxicilina, fez-se um estudo gráfico e se utilizaram dois tipos de métodos: os gráficos de Dixon e de Lineweaver-Burk.

Tabela 5.10 – Efeito inibitório do 6-APA, relatos na literatura

Fonte	Enzima	Substrato	Núcleo antibiótico	Tipo de inibição
Ospina et al. (1996a)	PGA de <i>E. coli</i>	Éster metílico de fenilglicina	6-APA	Não competitiva
Blinkovsky e Markaryan (1993)	D-Phenylglycyl β -lactamide amidohidrolase	Éster metílico de fenilglicina	7-ADCA	Não competitiva
Konecny et al. (1983)	PGA de <i>B. megaterium</i>	Éster metílico de fenilglicina	6-APA	Não competitiva
Brujak e Noworlyta (1993)	PGA <i>E.coli</i>	Benzilpenicilina	6-APA	Não competitiva
Cole (1969a)	PGA <i>E.coli</i>	Benzilpenicilina	6-APA	Não competitiva
Kasche et al. (1984)	Penicilina Amidase	Benzilpenicilina ou ampicilina	6-APA	Competitiva

A figura 5.23 mostra um gráfico de Lineweaver-Burk para velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de 6-APA a 25°C e pH 7,5. Podemos ver que as retas obtidas por regressão linear dos pontos experimentais para diferentes concentrações iniciais de inibidor praticamente se encontram na ordenada. Isto é uma indicação de que esse núcleo β -lactâmico atua como inibidor competitivo. A figura 5.24 mostra o gráfico de Dixon. Também neste caso, as retas obtidas por regressão linear se encontram de maneira a indicar que o 6-APA atua como inibidor competitivo. Pode-se observar (figuras 5.23 e 5.24) que há uma grande dispersão dos dados, como ocorre com frequência em

estudos de inibição com dados de velocidades iniciais. Essa dispersão é causada por ampliação do erro experimental devido à inversão dos valores das velocidades. Usando-se a linearização de Lineweaver-Burk, esse erro é mais grave, pois os pontos mais influentes na inclinação da reta ajustada seriam os correspondentes às menores concentrações de substrato, onde se incorre em maior erro (velocidades absolutas menores). O método de Dixon evita esse último problema, uma vez que a variável independente é a concentração do inibidor e não o inverso da concentração do substrato. Contudo, a ampliação do erro experimental na inversão da velocidade (variável dependente) permanece [Giordano e Schmidell (1989)].

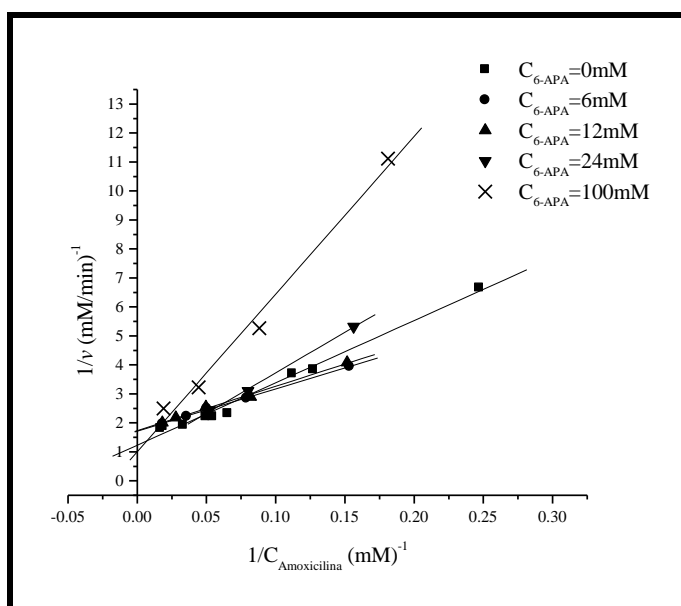


Figura 5.23 – Gráfico de Lineweaver-Burk para velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina na presença de 6-APA a 25°C e pH = 7,5, catalisada por penicilina G acilase imobilizada.

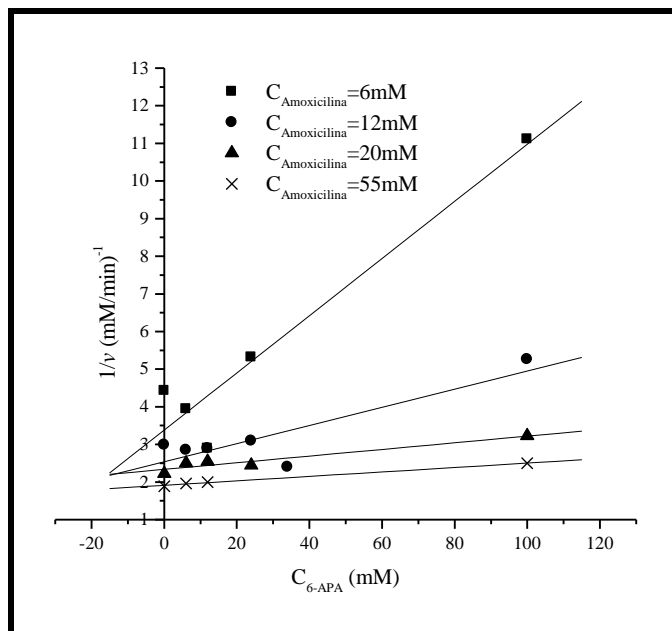


Figura 5.24 – Gráfico de Dixon para hidrólise de amoxicilina na presença de 6-APA a 25°C e pH = 7,5, catalisada por penicilina G acilase imobilizada.

5.5.2 - Efeito do Metanol na Hidrólise Éster Metílico de p-hidroxifenilglicina e de Amoxicilina

Gráficos de Dixon para a hidrólise de amoxicilina e POHPGME, para diferentes concentrações iniciais de metanol, são mostrados nas figuras 5.25 e 5.26, respectivamente.

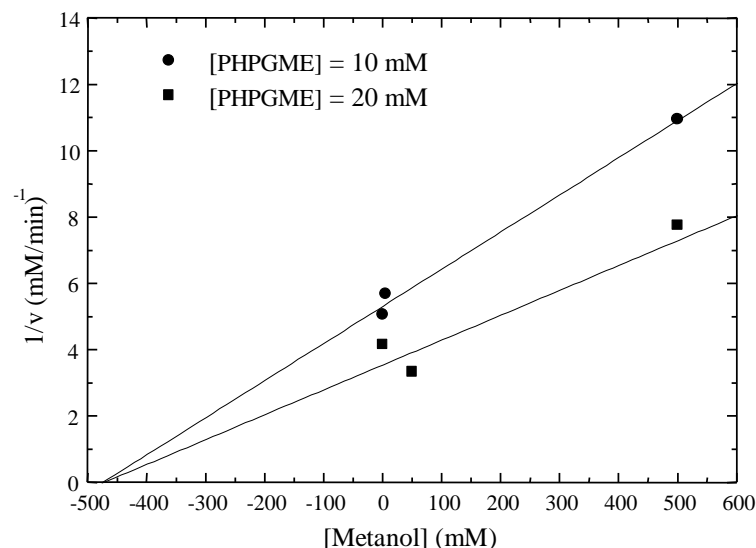


Figura 5.25– Gráfico de Dixon para a hidrólise de PHPGME na presença de metanol a pH 7,5 e 25°C.

Pode-se observar que metanol atua como um inibidor não-competitivo tanto na hidrólise de POHPGME quanto na de amoxicilina quando altas concentrações são adicionadas (para concentrações superiores a 0,5 M). No entanto, ele não afeta a velocidade de reação quando presente em baixas concentrações. Resultados similares foram obtidos por Ospina et al. (1996a), que observou que metanol é inibidor não competitivo na síntese enzimática de ampicilina, para 20% (v/v). Blinkovsky e Marakayan (1993) também observaram que a hidrólise de éster metílico de fenilglicina (precursor de ampicilina) só foi afetada pela presença de altas concentrações de metanol (concentrações acima de 1,5M). Os resultados obtidos também estão de acordo com Isaka et al. (1995), que observaram que o metanol é inibidor não-competitivo tanto na síntese quanto na hidrólise de D-7-CL-ACA. Os autores concluíram que o grau de afinidade entre o derivado de cloroacetil e a enzima foi reduzido pelo metanol. Ao contrário, a

afinidade entre o derivado fenilacetil e a enzima não sofreu influência da ligação do metanol à enzima.

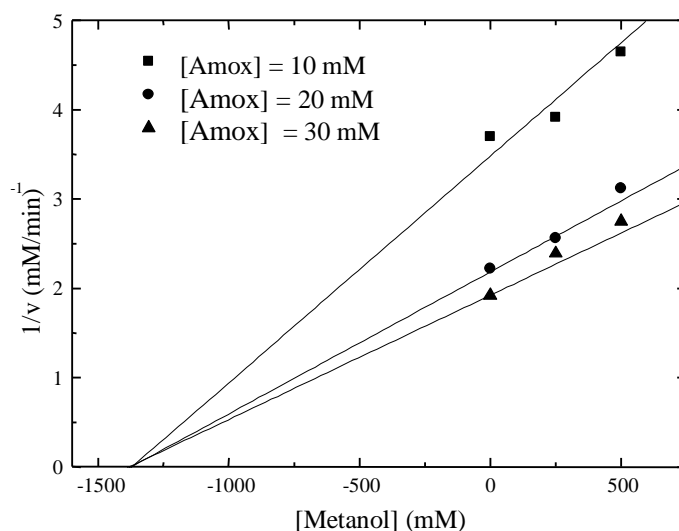


Figura 5.26 – Gráfico de Dixon para a hidrólise de amoxicilina (Amox) na presença de metanol a pH 7,5 e 25°C.

Kasche (1985) observou que a velocidade de hidrólise, usando penicilina amidase, sofreu redução significativa na presença de álcoois e que o rendimento de formação de ampicilina aumentou quando a reação de síntese foi realizada na presença de metanol ou etanol. O autor atribui este comportamento à regeneração do substrato ativado pela transferência de acil do complexo acil-enzima para o álcool, que na ausência deste é deacilado pela água. Por este motivo, o rendimento de síntese pode ser incrementado por reciclagem do substrato na presença de álcoois que podem se ligar ao complexo acil-enzima simultaneamente com 6-APA ou 7-ADCA. Por outro lado, segundo Fernandez-Lafuente et al. (1995), a diminuição da atividade enzimática causada pelo metanol pode ser promovida por um mecanismo de reciclagem do substrato ou por mudanças conformacionais na estrutura da PGA. Se a última hipótese for verdadeira, derivados estabilizados

devem ser mais resistentes a variações no meio reacional. Os autores observaram que derivados mais “rígidos” (agarose-PGA: imobilização multipontual), foram mais resistentes ao efeito do metanol na estrutura da enzima. Os autores concluíram que a mudança conformacional induzida pelo metanol é a teoria mais adequada para explicar o efeito deste solvente. Fernandez-Lafuente (1998) acreditam que o efeito do metanol na síntese cineticamente controlada depende da natureza do doador de acil, do derivado enzimático e das condições do meio reacional..

Kim e Lee (1996a) estudaram o efeito do metanol na velocidade de reação de síntese de quatro antibióticos β -lactâmicos catalisada por penicilina acilase. Eles observaram que, na presença de metanol, as velocidades iniciais foram maiores quando um ácido carboxílico (ácido fenilacético) foi usado como doador de acil. Quando uma amina (éster metílico de fenilglicina) foi usada como doador de acil a velocidade diminuiu na presença de metanol. Os autores concluíram que essas diferenças no efeito causado pelo solvente podem ser atribuídas a mudanças na solvatação do substrato (a julgar pela variação nos valores aparentes do pK). Em outro artigo, Kim e Lee (1996b) não observaram uma redução significativa na velocidade da reação catalisada por penicilina acilase na presença de solventes hidrofóbicos. Este comportamento se deve provavelmente a interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais de aminoácidos no sítio ativo da enzima e o solvente orgânico. Desta forma, a ligação direta do solvente à enzima deve ser considerada como um fator que contribui para a velocidade de catálise enzimática em meio orgânico.

Para elucidar o papel do metanol nas velocidades de reação aqui estudadas, dois tipos de ensaios foram realizados: a) síntese de POHPGME a partir de p-hidroxifenilglicina e metanol e b) hidrólise de amoxicilina na presença de excesso de metanol. Se o mecanismo de reciclagem de substrato se aplicar, espera-se que haja formação de POHPGME em ambos os casos. No entanto, nenhum éster foi detectado em ensaios de longa duração. Resultados similares foram obtidos por Ospina et al. (1996a). Os autores não conseguiram sintetizar éster metílico de fenilglicina (PGME) a partir de fenilglicina (PG) e metanol.

5.5.3 - Efeito de p-hidroxifenilglicina na Hidrólise Éster Metílico de p-hidroxifenilglicina e de Amoxicilina

As figuras 5.27 e 5.28 mostram gráficos de Dixon para hidrólise de POHPGME e amoxicilina na presença de p-hidroxifenilglicina.

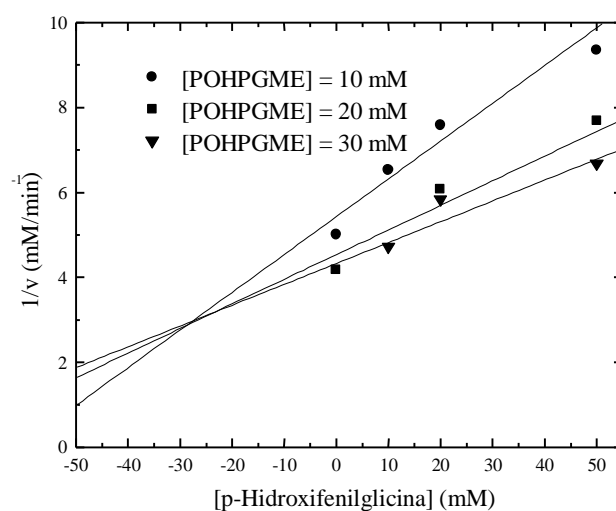


Figura 5.27 – Gráficos de Dixon para hidrólise de POHPGME na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.

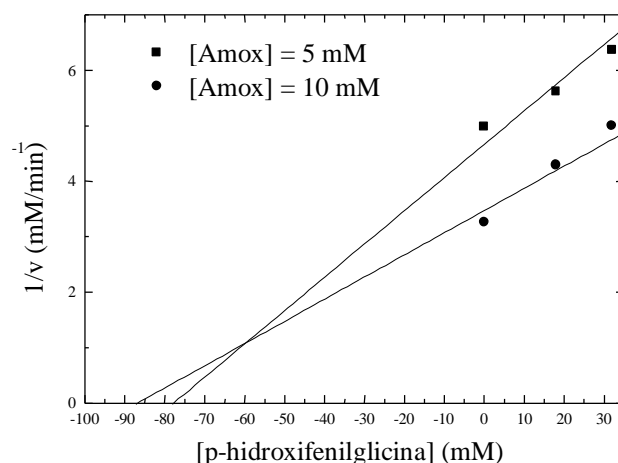


Figura 5.28 – Gráficos de Dixon para hidrólise de amoxicilina (Amox) na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.

Os resultados obtidos indicam que este produto atua como inibidor competitivo nas hidrólises de POHPGME e amoxicilina. Este comportamento está de acordo com os resultados obtidos por Blinkovsky e Marakayan (1993) e Ospina et al. (1996b), que estudaram a síntese enzimática de cefalexina e ampicilina, respectivamente. Eles observaram que fenilglicina inibe a hidrólise de éster metílico de fenilglicina (um precursor de ampicilina e cefalexina). O mecanismo proposto por Duggleby et al. (1995) e o fato que somente substratos descarregados se ligam à PGA [Margolin et al. (1980)] reitera que p-hidroxifenilglicina é um inibidor competitivo nas hidrólise de POHPGME e amoxicilina. Uma vez que p-hidroxifenilglicina está carregado negativamente nas condições de reação, ele forma um complexo improdutivo com a enzima, ao invés do complexo acil-enzima. Além disso, a dificuldade de se utilizar a rota

termodinâmica para a produção de amoxicilina ilustra a formação de um complexo improdutivo com p-hidroxifenilglicina se ligando à serina B1, responsável pela catálise, sem a formação do complexo acil-enzima, devido a forças de repulsão entre as cargas negativas do sítio ativo da enzima e do suposto substrato (p-hidroxifenilglicina).

5.5.4 - Estimativa de Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros (K_m e V_{max}) da equação de Michaelis-Menten foram determinados por ajuste não linear a dados de velocidade inicial de hidrólise de PHPGME e amoxicilina na ausência de inibidores a 25°C e a pH 6.5 e 7.5. A tabela 5.10 mostra os parâmetros estimados neste trabalho e outros parâmetros para diferentes autores a 25°C. Nos ensaios preliminares, descritos no item 5.2, as condições operacionais foram as mesmas, porém a origem da enzima era diferente, por isso as diferenças observadas nos valores dos parâmetros cinéticos. A enzima usada por Margolin et al. (1980) foi penicilina amidase de *E. coli*. Estes autores estimaram valores de K_m , a pH 7,5 e 25°C, para ampicilina, cefalexina e benzilpenicilina, que são também antibióticos β -lactâmicos, assim como amoxicilina. Pode se notar que valores similares de K_m foram estimados para ambos os pHs (6,5 e 7,5). Estes resultados estão de acordo com os de Ospina et al. (1996b), que estudaram o efeito do pH durante hidrólise de éster metílico de fenilglicina (PGME). Eles observaram que o gráfico $\log(V_{max}/K_m)$ em função do pH apresentou uma curva em forma de sino e que a inclinação em altos e baixos valores de pH era igual a 1, o que indica que os valores de K_m não dependem do pH. Eles também observaram que os valores de V_{max} são função do pH. No entanto, V_{max} , não pode ser facilmente comparado com dados de outros autores

uma vez que este parâmetro é muito dependente da quantidade e do tipo da enzima utilizada.

Tabela 5.11 – Parâmetros cinéticos para equação de Michaelis-Menten a 25°C.

Substrato	Enzima	V_{max} (mM/min)		K_m (mM)	
		pH 7,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 6,5
POHPGME	Penicilina G acilase	0,453±0,02	0,178±0,02	12,383±1,45	7,905±3,61
Amoxicilina	Penicilina G acilase	0,659±0,03	0,327±0,03	11,019±1,58	12,509±3,21
POHPGME (ensaio preliminar)	Penicilina G acilase de <i>E. coli</i>	1,105±0,04	0,546±0,03	14,950±2,15	15,320±3,44
Amoxicilina (ensaio preliminar)	Penicilina G acilase de <i>E. coli</i>	2,218±0,28	1,857±0,27	21,460±8,53	12,830±7,83
Ampicilina Margolin et al. (1980)	Penicilina amidase			5,2	
Benzilpenicilina Margolin et al. (1980)	Penicilina amidase			4,6x10 ⁻³	
Cefalexina Margolin et al. (1980)	Penicilina amidase			2,1	

No item 5.5.2 estudaram-se os efeitos do metanol na hidrólises de amoxicilina e POHPGME e concluiu-se que este produto atua como inibidor não competitivo quando altas concentrações estão presentes no meio reacional. Portanto, usou-se uma equação do tipo Michaelis-Menten com inibição não competitiva e estimaram-se as constantes de inibição (K_{iMeOH}) a pH 6,5 e 7,5 e 25°C. Os resultados do ajuste são mostrados nas figuras 5.29, 5.30 e 5.31. A tabela 5.11 mostra os parâmetros obtidos neste trabalho e parâmetros cinéticos de outros autores. Os valores estimados de K_{iMeOH} para a hidrólise de amoxicilina e para a hidrólise de éster são muito próximos (1170 mM e 1563mM a pH 7,5 e 25°C) e a diferença pode ser atribuída a erros experimentais. Isaka et al. (1995)

obtiveram os mesmos valores de K_{iMeOH} (993 mM a pH 7,5 e 25°C) para síntese e hidrólise de D-7-CL-ACA. Ospina et al. (1996b) obtiveram $K_{iMeOH} = 2700\text{mM}$ para a hidrólise de PGME a pH 6,0 e 25°C.

Tabela 5.12 – Constantes de inibição por Metanol (K_{iMeOH}) para diferentes reações enzimáticas a 25°C

Substrato	Enzima	K_{iMeOH} (mM)		
		pH 7,5	pH 6,5	pH 6,0
Síntese de D-7-Cl-ACA [Margolin et al. (1980)]	Penicilina amidase	993	-	-
Hidrólise de D-7-Cl-ACA [Margolin et al. (1980)]	Penicilina amidase	993	-	-
Hidrólise de amoxicilina (este trabalho)	Penicilina G acilase	1562,7±282	1691,4 ±332	-
Hidrólise de POHPGME (este trabalho)	Penicilina G acilase	1170,1±301	-	-
PGME [Ospina et al. (1996b)]	Penicilina amidase	-	-	2700

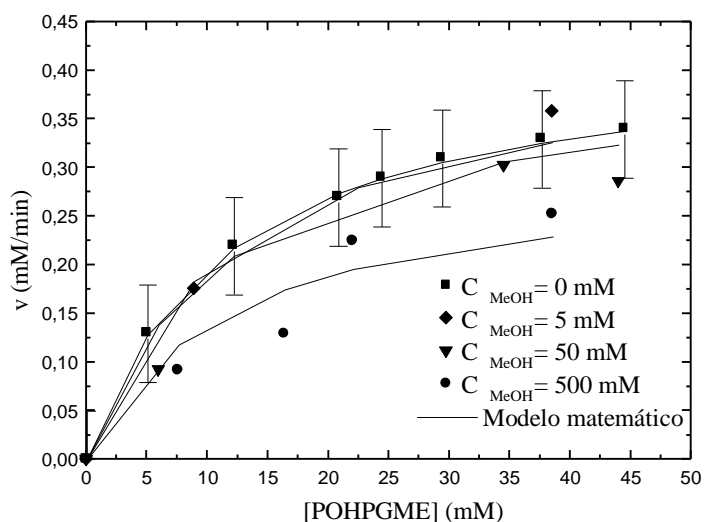


Figura 5.29 – Hidrólise de POHPGME na ausência e na presença de metanol a 25°C e pH 7,5.

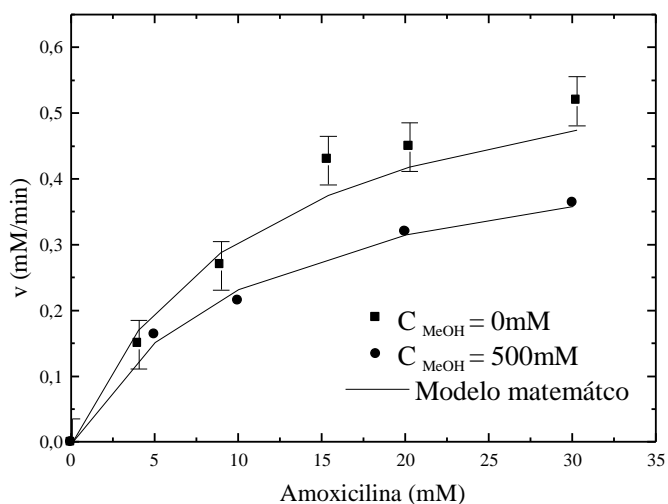


Figura 5.30 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de metanol a pH 7,5 e 25°C.

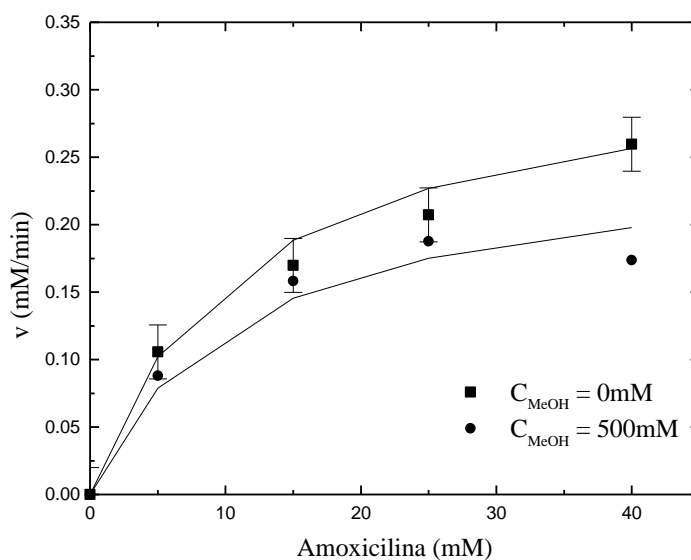


Figura 5.31 - Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de metanol a pH 6,5 e 25°C.

Como p-hidroxifenilglicina é um inibidor competitivo nas hidrólises de POHPGME e amoxicilina (item 5.5.3), a constante de inibição (K_{iAOH}) foi estimada usando equação tipo Michaelis-Menten com inibição competitiva (equação 2.3). As figuras 5.32, 5.33 e 5.34 mostram o resultado do ajuste. A

tabela 5.12 mostra parâmetros cinéticos aqui estimados e resultados obtidos por Blinkovsky e Markaryan (1993). Estes autores estudaram o efeito de fenilglicina nas hidrólises de PGME e cefalexina catalisada por D- (-)-fenilglicil- β -lactamide Amidohidrolase.

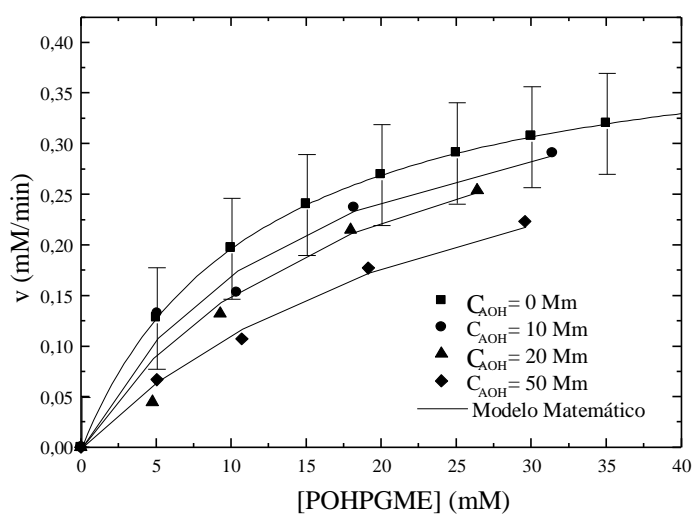


Figura 5.32 – Hidrólise de POHPGME na ausência e na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.

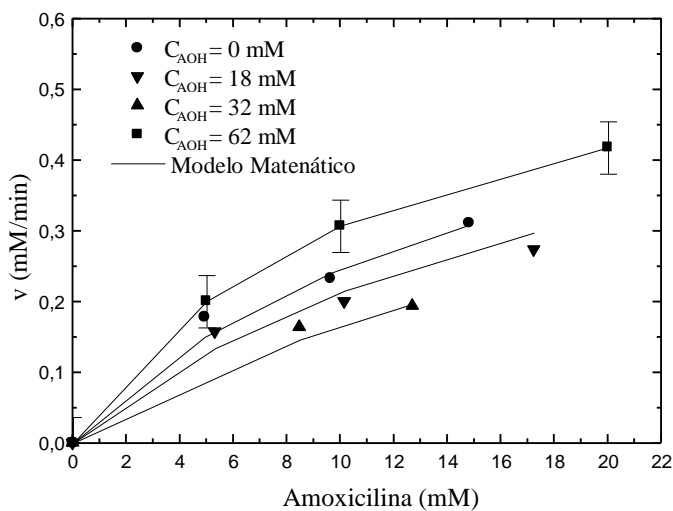


Figura 5.33 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C.

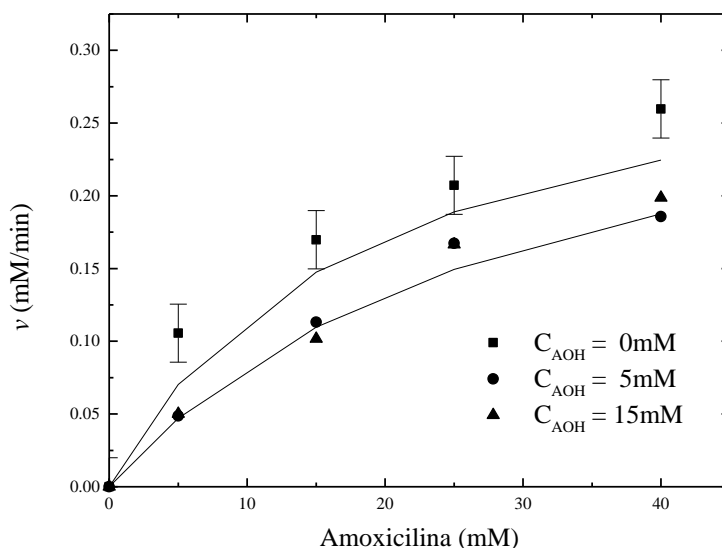


Figura 5.34 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de p-hidroxifenilglicina a pH 6,5 e 25°C.

Tabela 5.13 – Constantes de inibição competitiva (K_{iAOH}) para hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (POHPGME), amoxicilina, éster metílico de fenilglicina (PGME) e cefalexina.

Substrato	Enzima	K_{iAOH} (mM)		
		pH 7,5	pH 6,5	pH 6,0
PHPGME*	PGA	17,66±2,9	-	-
Amoxicilina *	PGA	14,41±2,8	10,91±2,1	-
PGME**	D- (-)-fenilglicil- β -lactamide Amidohidrolase	-	-	0,84
Cephalexina**	D- (-)-fenilglicil- β -lactamide Amidohidrolase	-	-	0,84

*Neste trabalho

** Blinkovsky e Markaryan (1993)

A constante de inibição não competitivo (K_{iAOH}) é diferente da obtida por Blinkovsky e Markaryan (1993). Isto é razoável uma vez que diferentes enzimas e substratos foram usados. O que se quer ressaltar, no entanto, é que a constante de inibição (estimada neste trabalho e por esses autores) é igual tanto para a hidrólise do éster quanto para a hidrólise do antibiótico. Este comportamento era esperado e pode ser explicado pelo mecanismo proposto por Duggleby et al., 1995. Neste mecanismo, o processo de ligação do inibidor é exatamente igual, não importando se o éster ou o antibiótico está sendo hidrolisado.

No item 5.5.1 observamos que 6-APA atuava como inibidor competitivo na hidrólise de amoxicilina. Portanto, usou-se uma equação do tipo Michelis-Menten com inibição competitiva (equação 4) e estimaram-se as constantes de inibição (K_{i6-APA}) a pH 6,5 e 7,5 e 25°C. Os resultados do ajuste são mostrados nas figuras 5.35 e 5.36 e os parâmetros cinéticos, na tabela 5.13.

Tabela 5.14 – Constantes de inibição competitiva (K_{i6-APA}) para hidrólise de amoxicilina a pH 6,5 e 7,5 e 25°C.

pH	K_{i6-APA} (mM)
6,5	62.04 ± 7.5
7,5	$69,49 \pm 7,3$

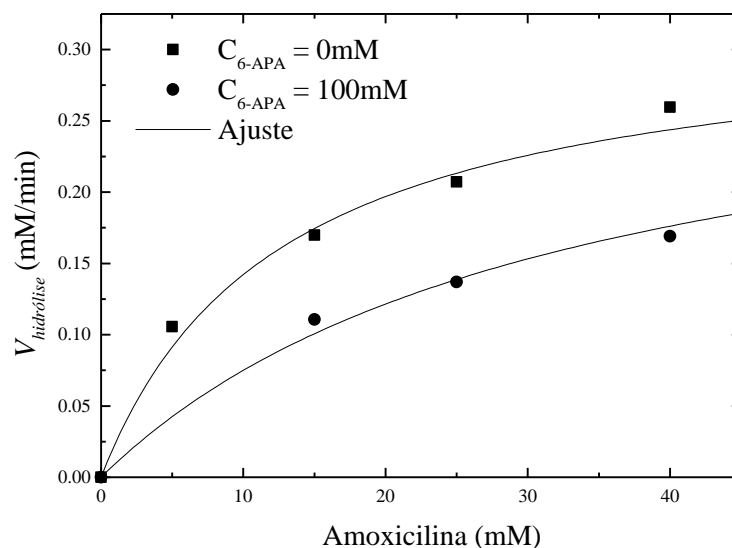


Figura 5.35 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de 6-APA a pH 7,5 e 25°C.

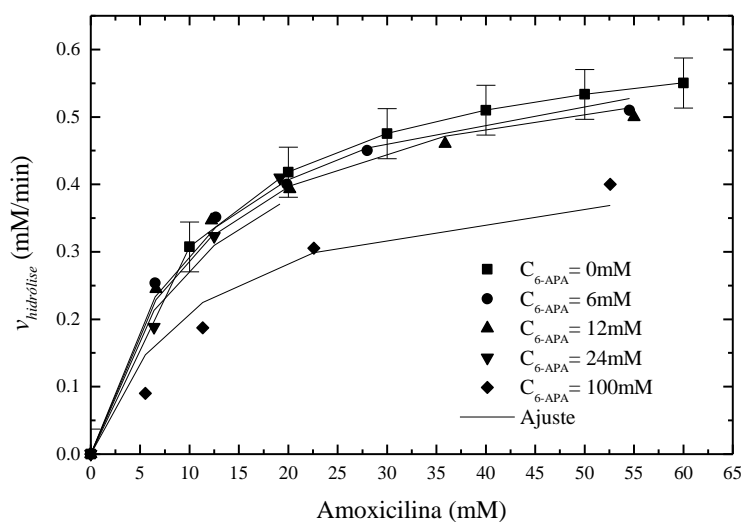


Figura 5.36 – Hidrólise de amoxicilina na ausência e na presença de 6-APA a pH 6,5 e 25°C.

Segundo Segel (1975) quando uma enzima atua em dois substratos diferentes, e ambos estão presentes simultaneamente, cada um deles vai atuar como inibidor competitivo com respeito ao outro. Se pelo menos um dos produtos

das reações dos dois substratos é diferente, então o sistema pode ser tratado pelas relações usuais de inibição competitiva. Desta maneira, considerou-se que o éster atuava como inibidor competitivo na hidrólise de amoxicilina e que o antibiótico atuava como inibidor competitivo (K_{iAN}) na hidrólise do éster. Desta forma, estimaram-se as constantes de inibição por ajuste não linear de equação do tipo Michelis-Menten com inibição competitiva a dados de velocidade inicial. O resultado do ajuste pode ser visto nas figuras 5.37, 5.38 e 5.39 e os parâmetros estimados são mostrados na tabela 5.14.

Tabela 5.15 – Constantes de inibição competitiva a 25°C, estimadas com 95% de intervalo de confiança.

Parâmetro	pH 6,5	pH 7,5
K_{iAB} (Mm)	$3,78 \pm 0,71$	$8,706 \pm 1,11$
K_{iAN} (Mm)	$9,174 \pm 2,13$	-

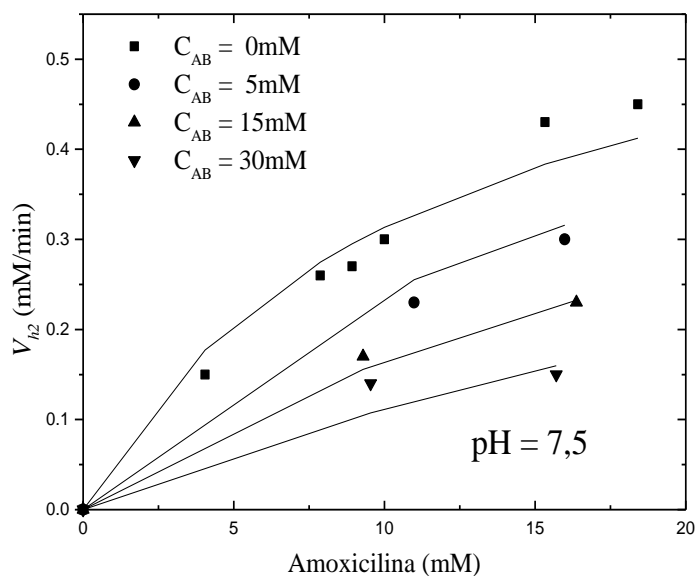


Figura 5.37 - Hidrólise enzimática de amoxicilina na presença de éster (inibidor competitivo: K_{iAB} a pH 7,5 e 25°C.

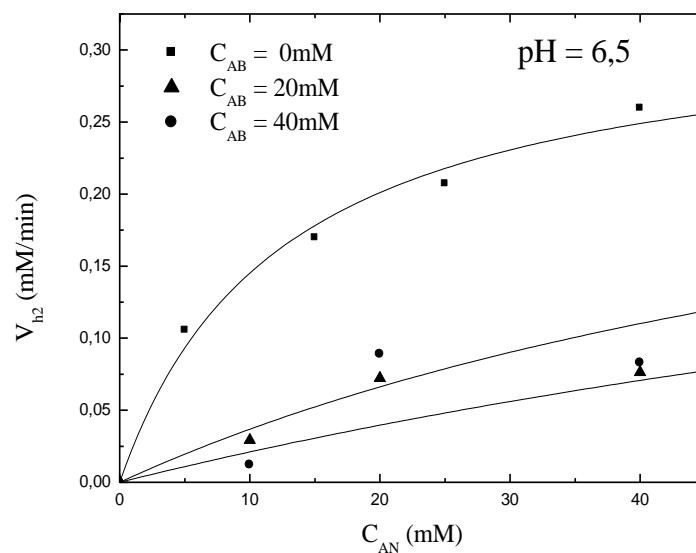


Figura 5.38 - Hidrólise enzimática de amoxicilina (AN) na presença de éster (inibidor competitivo: K_{iAB}) a pH 6,5 e 25°C.

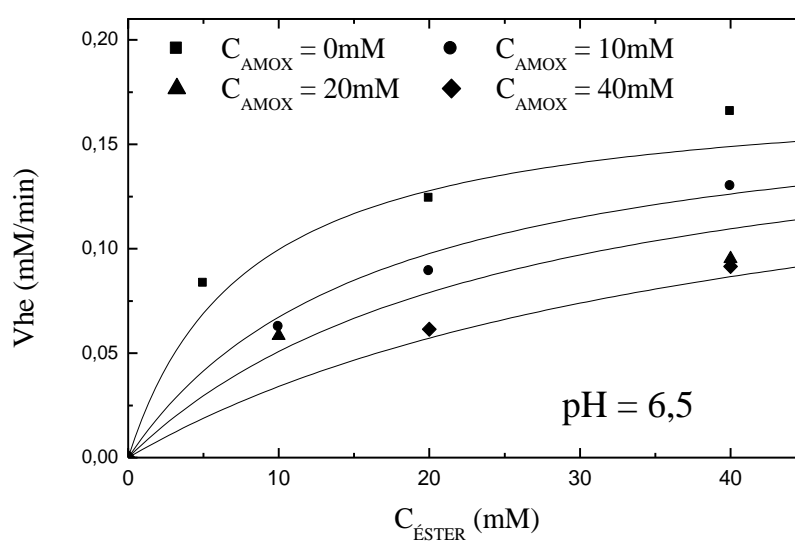


Figura 5.39 – Hidrólise enzimática de éster metílico de p-hidroxifenilglicina na presença de amoxicilina (inibidor competitivo: K_{IAN}) a 25°C e pH 6,5.

5.6 – Adequação do Modelo Semi-Empírico e Estimativa de

Novos Parâmetros Cinéticos

Nos estudos preliminares, mostrados no item 5.2, experimentos de síntese e hidrólise não foram realizados para uma vasta gama de condições operacionais e tampouco se fizeram estudos de inibição detalhados. Portanto, de maneira a ter uma visão mais ampla da reação aqui estudada, novos experimentos de síntese e hidrólise, na presença e na ausência de inibidores (6-APA, metanol e p-hidroxifenilglicina) foram realizados (item 5.3). Face aos resultados obtidos, foi necessário modificar o modelo semi-empírico, para incluir todos os efeitos detectados.

As seguintes mudanças foram feitas, baseadas no resultados obtidos nos estudos de inibição (item 5.5):

- Acrescentou-se a inibição competitiva por p-hidroxifenilglicina, produto das reações laterais de hidrólise;
- A inibição por 6-APA, na hidrólise de amoxicilina, passou a ser competitiva ao invés de não competitiva como antes (ver item 5.5.1).

Neste trabalho, a concentração de metanol formado esteve sempre abaixo de 0,5 M e, como este efeito só foi significativo para concentrações muito altas (acima de 0,5M), a inibição por metanol não foi levada consideração no modelo. Os novos parâmetros cinéticos são mostrados na tabela 5.15. Os parâmetros T_{\max} e K_{EN} , foram determinados por ajuste não linear da equação:

$$f = \frac{V_{SÍNTESE}}{V_{SÍNTESE} + V_{HIDRÓLISE\ DE\ ÉSTER}} = \frac{T_{\max} C_{NH}}{K_{EN} + C_{NH}}$$

a dados de velocidade inicial de síntese de amoxicilina, para diferentes concentrações de substrato. Os resultados do ajuste são mostrados na figuras 5.40 e 5.41. As figuras 5.42 a 5.50 mostram a validação do modelo com dados de síntese de amoxicilina, para diferentes condições iniciais. Pode-se observar que o modelo continua não sendo capaz de representar algumas condições experimentais (figuras 5.45 a 5.48), mas pode ser utilizado para determinadas condições operacionais, como por exemplo as mostradas nas figuras 5.42, 5.43 e 5.44.

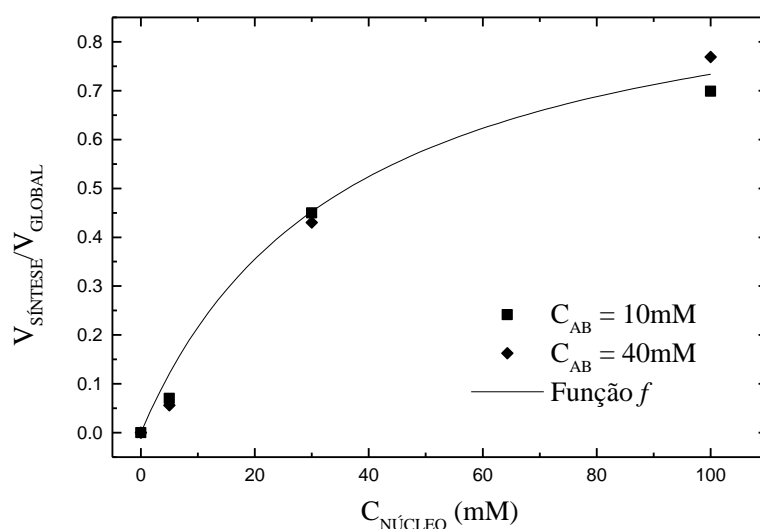


Figura 5.40 – Fração da velocidade de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações de 6-APA a pH =7,5 e 25°C: estimativa de K_{EN} e T_{max} .

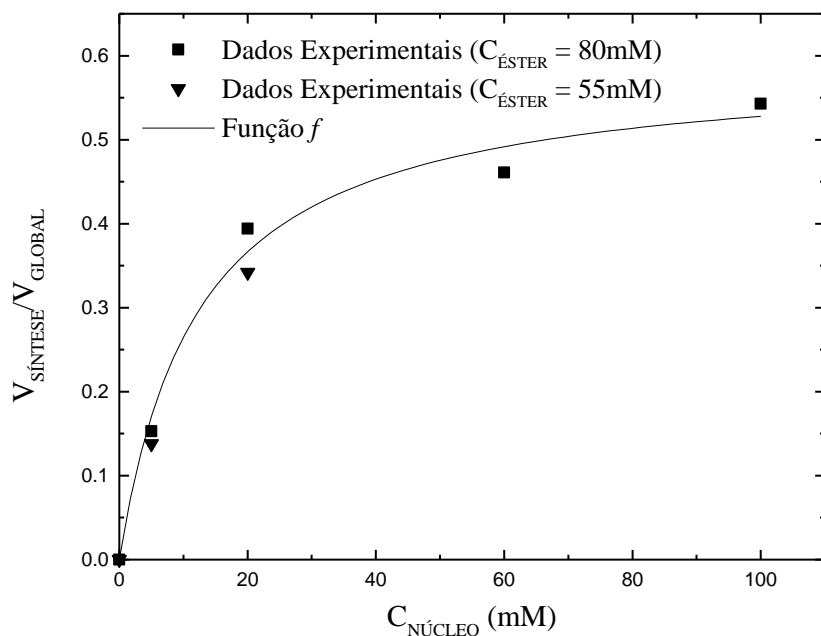


Figura 5.41 – Fração da velocidade de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações de 6-APA a pH=6,5 e 25°C: estimativa de K_{EN} e T_{max} .

Tabela 5.16 – Parâmetros cinéticos para a síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em agarose (modelo semi-empírico), estimados com 95% de intervalo de confiança.

Parâmetro	pH 7,5 e 25°C	pH 6,5 e 25°C
V_{max1} (mM/min)	$0,453 \pm 0,02$	$0,178 \pm 0,02$
V_{max2} (mM/min)	$0,659 \pm 0,03$	$0,327 \pm 0,03$
K_{m1} (mM)	$12,383 \pm 1,45$	$7,905 \pm 3,61$
K_{m2} (mM)	$11,019 \pm 1,58$	$12,509 \pm 3,21$
K_{AB} (Mm)	$8,706 \pm 1,11$	$3,78 \pm 0,71$
K_{AN} (Mm)	$9,133 \pm 1,48$	$9,174 \pm 2,13$
K_{AOH} (Mm)	$14,410 \pm 2,81$	$10,907 \pm 2,087$
K_{NH} (Mm)	$69,487 \pm 7,25$	$62,044 \pm 7,51$
K_{EN}	$12,043 \pm 0,87$	$14,350 \pm 2,13$
T_{max}	$0,997 \pm 0,07$	$0,606 \pm 0,03$

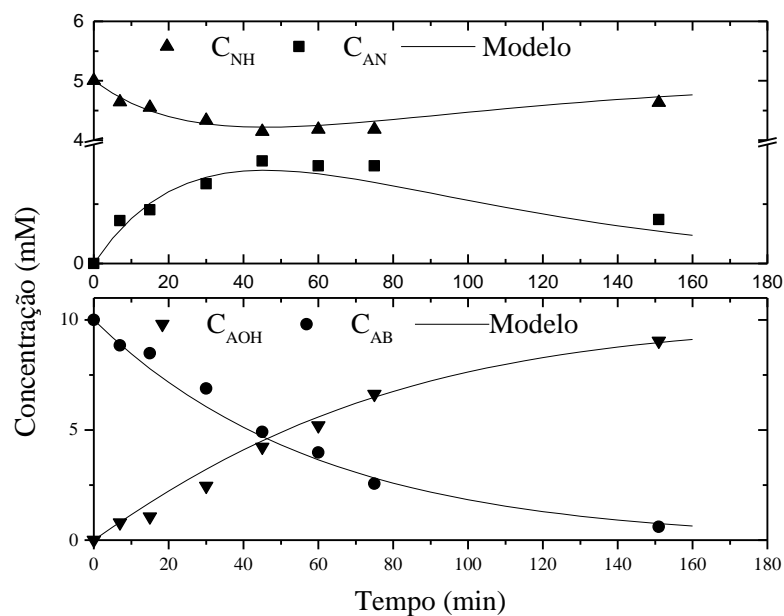


Figura 5.42 – Síntese de amoxicilina a pH 7,5 e 25°C: 1g (0,7ml) de derivado 30IU/ml para 30ml totais, $C_{AB} = 10\text{mM}$ e $C_{NH} = 5\text{mM}$.

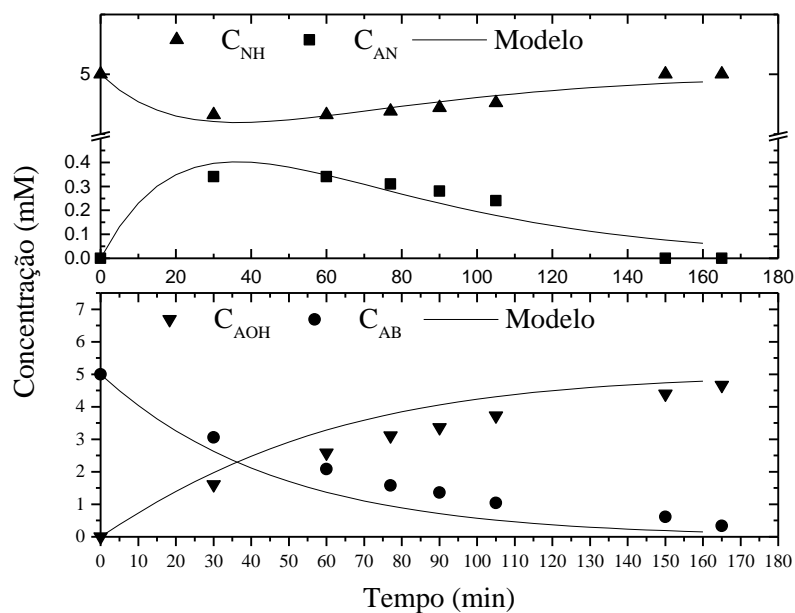


Figura 5.43 - Síntese de amoxicilina a pH 7,5 e 25°C: 1g (0,7ml) de derivado 30IU/ml para 30ml totais, $C_{AB} = 5\text{mM}$ e $C_{NH} = 5\text{mM}$.

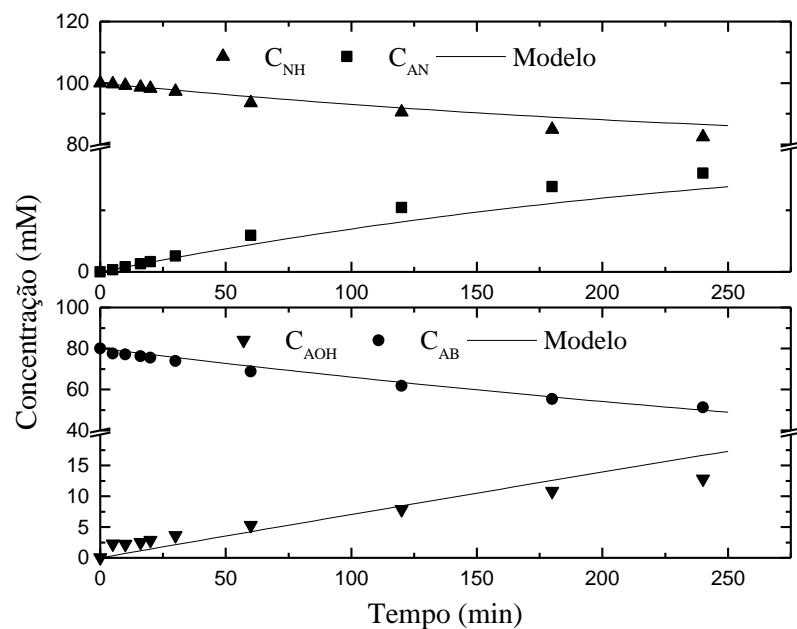


Figura 5.44 - Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g (0,7ml) de derivado 30IU/ml para 30ml totais, $C_{AB} = 80\text{mM}$ e $C_{NH} = 100\text{mM}$.

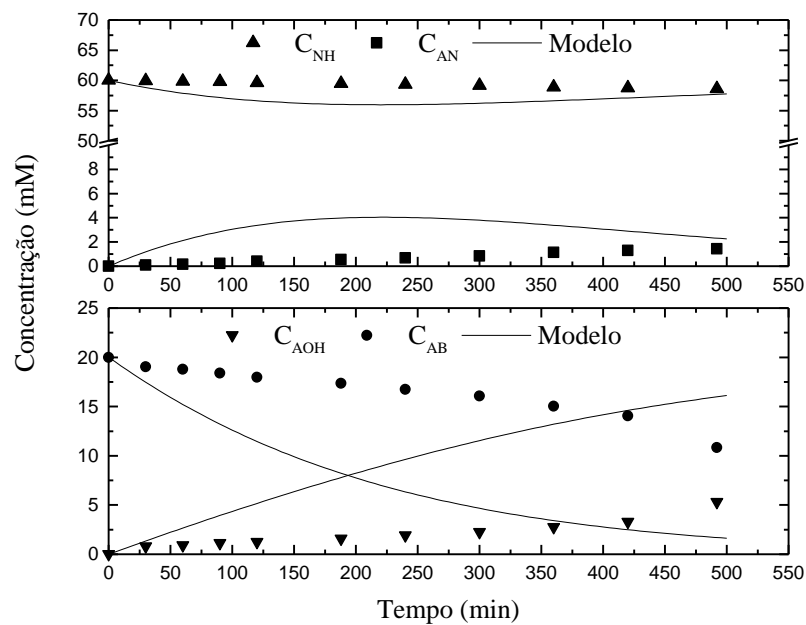


Figura 5.45 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g (0,7ml) de derivado 30IU/ml para 30ml totais, $C_{AB} = 20\text{mM}$ e $C_{NH} = 60\text{mM}$.

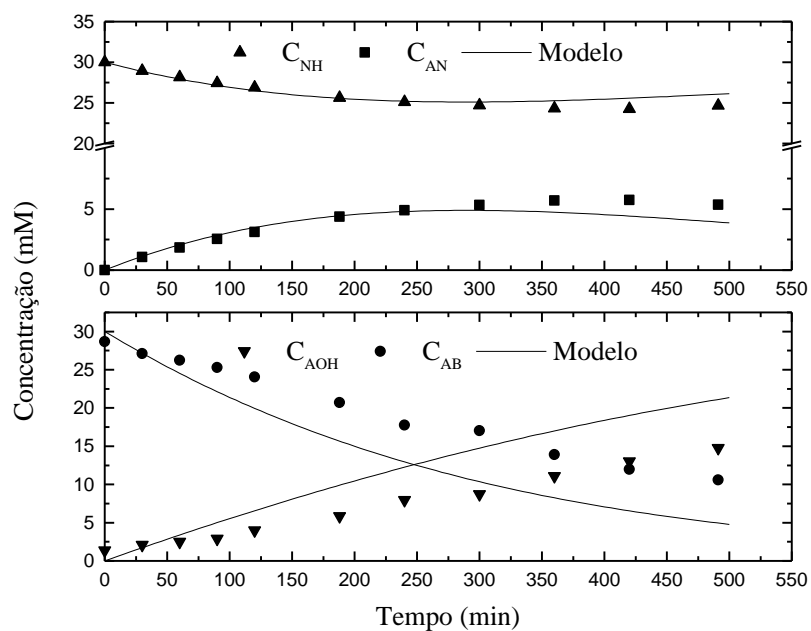


Figura 5.46 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g (0,7ml) de derivado 30IU/ml para 30ml totais, $C_{AB} = 30\text{mM}$ e $C_{NH} = 30\text{mM}$.

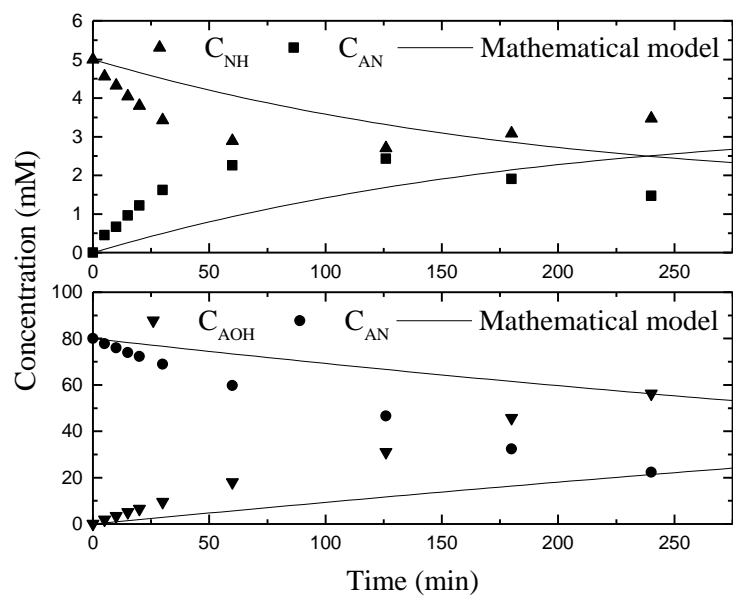


Figura 5.47 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g (0,7ml) de derivado 30IU/ml para 30ml totais, $C_{AB} = 80\text{mM}$ e $C_{NH} = 5\text{mM}$.

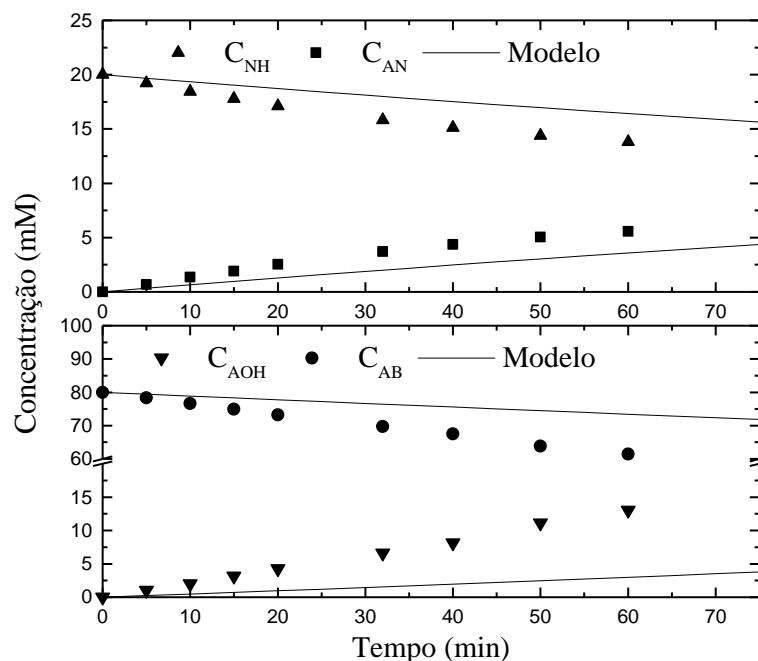


Figura 5.48 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: 1g (0,7ml) de derivado 30IU/ml para 30ml totais, $C_{AB} = 80\text{mM}$ e $C_{NH} = 20\text{mM}$.

5.7 - Efeito da concentração de ácido 6-aminopenicilânico na síntese de amoxicilina

5.7.1 - Efeito da concentração de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima, durante síntese de amoxicilina.

O fato do modelo, mesmo com a inclusão de novos efeitos inibitórios, não ser capaz de representar todas as condições operacionais usados conduziu a nova tentativa de elucidação do mecanismo. A hipótese da presença do núcleo não influenciar na formação do complexo acil-enzima, considerada válida até aqui, passa a ser questionada: ensaios experimentais que permitissem a averiguação desta hipótese foram então realizados. Desta forma, ensaios de velocidade inicial de síntese de amoxicilina foram realizados na presença de diferentes

concentrações iniciais de 6-APA e éster, a pHs 7,5 e 6,5. Velocidades iniciais de síntese foram obtidas com o objetivo de se estudar a influência do núcleo β -lactâmico na velocidade de formação do complexo acil-enzima ($V_{\text{Global}} =$ velocidade de síntese de antibiótico + velocidade de hidrólise do substrato éster). As figuras 5.49 e 5.50 mostram os resultados obtidos a pH 7,5 e 6,5, respectivamente. A figura 5.51 mostra a superfície obtida para pH 6,5 e 25°C.

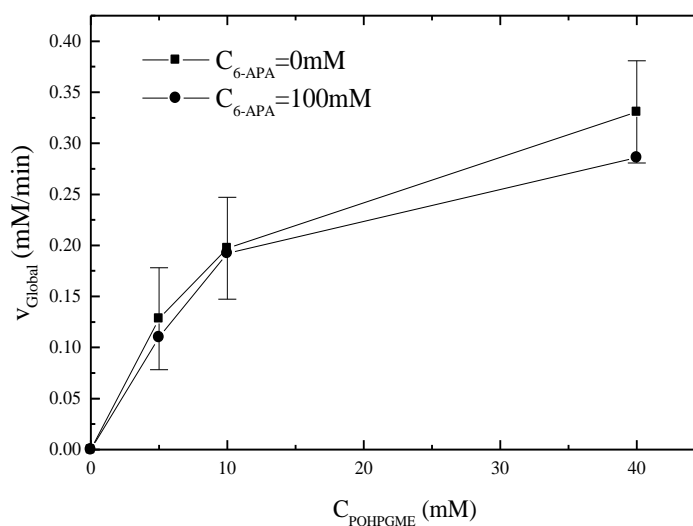


Figura 5.49 – Efeito de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima durante síntese de amoxicilina a 25°C e pH =7,5.

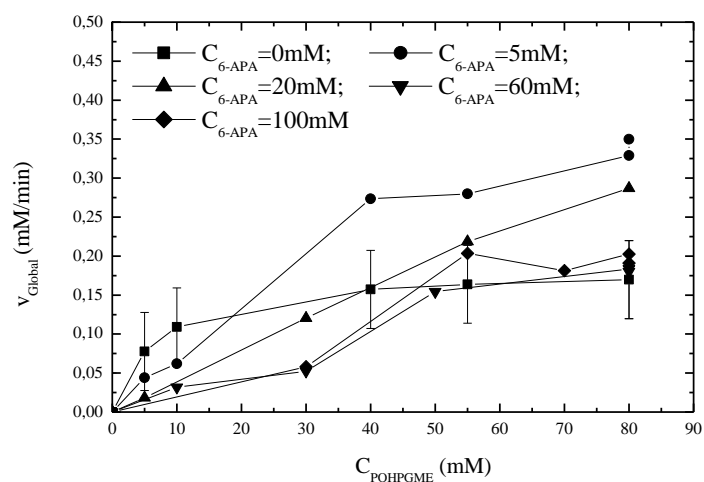


Figura 5.50 – Efeito de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima durante síntese de amoxicilina a 25°C e pH =6,5

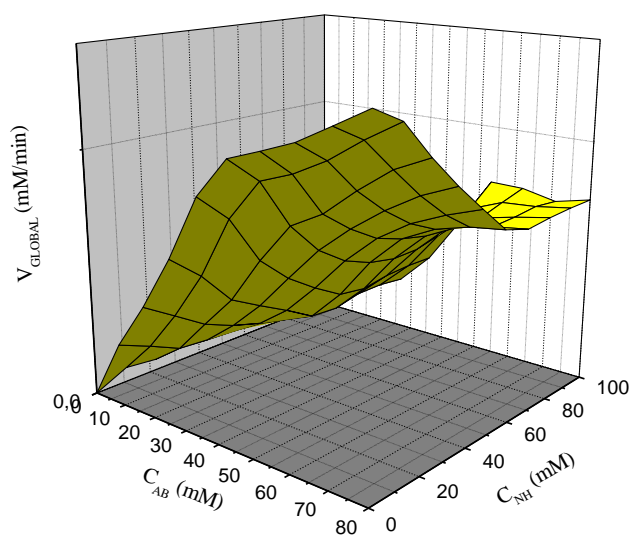


Figura 5.51 – Efeito de 6-APA na velocidade de formação do complexo acil-enzima durante síntese de amoxicilina a 25°C e pH =6,5

Como se pode observar na figura 5.49 (pH 7,5), a velocidade de formação de complexo acil-enzima não variou devido a presença de 6-APA. O mesmo comportamento não foi observado a pH 6,5 (figura 5.50), quando efeito inibitórios podem ser observados para baixas concentrações iniciais de éster e altas concentrações iniciais de 6-APA (maiores que 20mM). Um efeito ativador pode ser observado para baixas concentrações de núcleo (até 20mM). Este efeito ativador não foi ainda mencionado na literatura consultada até o momento. Para Kasche et al., 1984, 6-APA é um inibidor: a) do tipo misto para a hidrólise de ésteres (como por exemplo éster metílico de D-fenilglicina) e b) competitivo para a hidrólise de substratos maiores (como por exemplo ampicilina). Portanto, as moléculas de enzima, que já possuem 6-APA adsorvido, não devem ser capazes de hidrolisar os produtos formados na semisíntese. De acordo com os autores, este efeito inibitório deve ser causado por uma mudança conformacional da enzima, induzida pela presença do 6-APA. Na figura 5.52 podemos observar que a velocidade de formação do complexo acil-enzima é máxima para altas concentrações de éster e baixas concentrações de núcleo, indicando uma condição de operação para a síntese de amoxicilina. Nota-se que à medida que se aumenta a concentração de núcleo, diminui-se a velocidade inicial de reação. Este fato indica que o excesso de núcleo inibe a formação do complexo acil-enzima.

Uma influência mais acentuada da concentração de 6-APA na formação do complexo acil-enzima pH 6,5 já era esperada uma vez que muitos autores mencionam que há uma melhor adsorção do núcleo à enzima neste pH. Isto implica que um maior número de moléculas de enzima devem conter 6-APA

adsorvido a pH 6,5 do que a pH 7,5. Este efeito deve ser responsável pelo maior rendimento de núcleo em antibiótico obtido a pH 6,5 [Ospina et al. (1996b)]. Kasche et al. (1984), a partir de resultados de síntese para diferentes forças iônicas e pHs, concluíram que a enzima tem outro grupo positivamente carregado no sítio ativo, com pK em torno de 6, que influencia a ligação do nucleófilo a baixos valores de pH. Esta maior adsorção de núcleo a pH 6,5 também nos permite observar o comportamento alostérico da enzima quando o núcleo foi adicionado. Uma explicação plausível para este efeito pode ser a existência de dois sítios de ligação na PGA para o 6-APA: um deles é o sítio que favorece a síntese do antibiótico, onde a transferência do acil para o núcleo é energeticamente mais favorável do que a transferência para a água (ativação). O outro sítio deve ser responsável por um efeito inibitório(modulação negativa). A confirmação desta hipótese requer a análise da estrutura da PGA cristalizada na presença do núcleo. Estes resultados, no entanto, nos permitiram concluir que a hipótese bastante aceita na literatura [Kato (1980a) e Stambolieva et al. (1992)], que a presença de 6-APA não afeta a formação do complexo acil-enzima a partir do éster, não é verdadeira para todas as condições operacionais. Os resultados apresentados na literatura, onde esta hipótese é aparentemente válida, podem ser explicados por uma compensação dos efeitos ativador e inibidor em um intervalo específico de concentração [Kato (1980a) e Stambolieva et al. (1992)].

5.7.2 – Dependência da Razão das Constantes de Deacilação (k_3/k'_3)_{app} com a concentração de 6-APA

De acordo com Kasche et al. (1984) o mecanismo proposto para a ação de serinas proteases (tripsina e quimotripsina) não se aplica à semisíntese de benzilpenicilina e ampicilina. Esse mecanismo envolve a formação de um

complexo acil-enzima covalente (E-A) como intermediário que pode ser deacilado tanto pela H₂O como por outros nucleófilos NH. Se isto é verdade a razão aparente entre as constantes de deacilação (k_3/k'_3)_{app} deve ser independente da concentração de 6-APA. Os autores observaram que essa razão era linearmente dependente da concentração do núcleo e concluíram que 6-APA deve se ligar ao acil-enzima antes da deacilação e que ambos acil-enzima, com e sem o núcleo adsorvido, podem ser deacilados pela H₂O. A razão aparente entre as velocidades de deacilação é definida como:

$$\left(\frac{k_3}{k'_3} \right) = \frac{[NH]}{[H_2O]} \times \frac{[v_{AOH}]}{[v_{AN}]}$$

onde v é a velocidade inicial de formação do produto; NH, AN e AOH são 6-APA, amoxicilina e p-hidroxifenilglicina, respectivamente. A razão aparente pode ser determinada a partir das velocidades iniciais de formação do produto e da inicial concentração de HN e H₂O. Somente se 6-APA se liga ao complexo acil-enzima antes da deacilação, a razão (k_3/k'_3)_{app} dependerá linearmente da concentração de 6-APA. A figura 5.52 mostra a influencia da concentração de 6-APA nas velocidades iniciais formação de p-hidroxifenilglicina e amoxicilina e a razão (k_3/k'_3)_{app} na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina acilase. Os resultados obtidos para a síntese de amoxicilina (figura 5.52) confirmam os obtidos por Kasche et al. (1984) para ampicilina e benzilpenicilina. A dependência linear observada entre a razão aparente das constantes de deacilação e a concentração de 6-APA indica que o núcleo deve se ligar ao complexo acil-enzima antes da deacilação, na síntese de amoxicilina.

5.7.3 – Síntese de Amoxicilina: Comparação entre Resultados Experimentais e Simulados para Diferentes Condições Experimentais

As condições operacionais (pH e concentração inicial de substrato) onde o modelo é capaz ou não de representar dados de síntese foram comparados com as condições operacionais onde a hipótese é válida ou não (Figuras 5.49 e 5.50). Esta comparação permite observar que o modelo só representa adequadamente os dados experimentais obtidos nas condições operacionais onde a hipótese é válida.

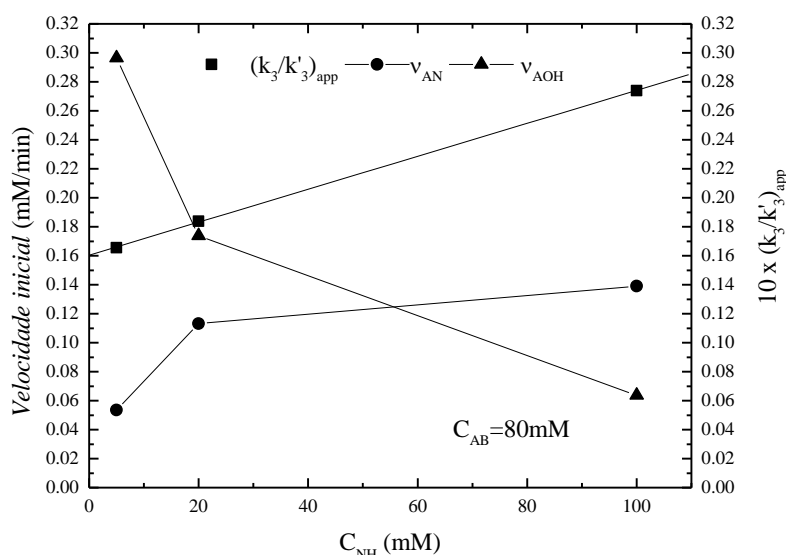


Figura 5.52 – Influencia da concentração de 6-APA nas velocidades iniciais de formação de amoxicilina e p-hidroxifenilglicina na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase a 25°C, em tampão fosfato (pH = 6,5) e $C_{AB} = 80\text{mM}$.

A comparação entre resultados experimentais e simulados de síntese, para diferentes condições operacionais, pode ser vista nas figuras 5.42 a 5.48. Nas figuras 5.42, 5.43 e 5.44, pode se observar que o modelo representa muito bem os dados experimentais. Se o pH e as concentrações iniciais de substrato usadas nestes ensaios forem comparados com a dos ensaios mostrados nas figuras 5.49 e

5.50, esse comportamento era esperado pois essas condições operacionais estão na faixa onde a formação do acil-enzima não é influenciada pela concentração de 6-APA. Por outro lado, os ensaios mostrados nas figuras 5.45 e 5.46 foram realizados na condições operacionais onde a formação do complexo acil-enzima sofre efeito inibidor pela presença do núcleo. Portanto, espera-se que o modelo superestime os dados experimentais, comportamento que pode ser observado nas figuras 5.49 e 5.50. Quando o efeito ativador do 6-APA foi observado (figura 5.50), as concentrações de substrato e produtos calculadas pelo modelo devem estar subestimadas em relação aos dados experimentais. Este comportamento pode ser visto nas figuras 5.47 e 5.48. Portanto, a partir destes resultados, podemos concluir que a hipótese que a presença de 6-APA não afeta a formação do complexo acil-enzima não é sempre verdadeira, embora possa ser aplicada em condições operacionais específicas.

5.8 - Síntese de Amoxicilina: Ensaios com Saturação da Enzima por 6-APA

5.8.1 Ensaios com enzima livre

Realizaram-se ensaios com enzima livre para se verificar o efeito da adsorção do núcleo à enzima antes da formação do complexo acil-enzima durante a síntese de amoxicilina. Para as mesmas condições experimentais, realizaram-se dois tipos de ensaio: com saturação e sem saturação da enzima com o núcleo antibiótico. Os resultados obtidos são mostrados nas figuras 5.53 a 5.55. Não se pode concluir que a adsorção prévia do núcleo antibiótico à enzima é necessária. No entanto, esta hipótese não pode ser descartada, uma vez que a velocidade de adsorção pode ser muito rápida quando comparada com a velocidade de formação

do complexo acil-enzima. Os resultados obtidos para a síntese de amoxicilina a partir de concentração elevada de 6-APA (figura 5.55, com saturação) confirmam o efeito inibitório do núcleo na hidrólise do antibiótico uma vez que a amoxicilina demora mais tempo para ser consumida durante a reação.

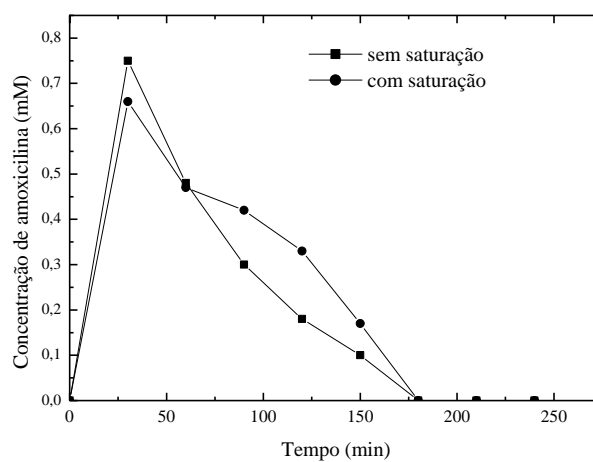


Figura 5.53 – Síntese de amoxicilina com enzima livre: $C_{N0} = 10\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C

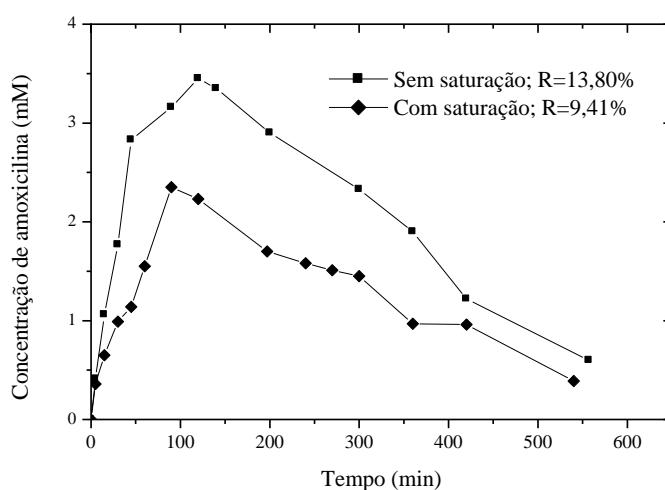


Figura 5.54 – Síntese de amoxicilina com enzima livre: $C_{N0} = 25\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C

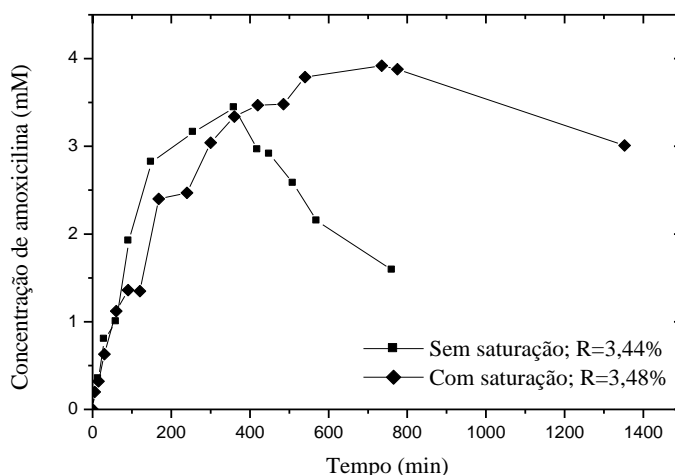


Figura 5.55 - Síntese de amoxicilina com enzima livre: $C_{N0} = 100\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C

5.8.2 Ensaios com enzima imobilizada

Realizaram-se ensaios com e sem saturação da enzima com o núcleo antibiótico. Estes ensaios são semelhantes aos mostrados no item 5.8.1 mas se utiliza enzima imobilizada em agarose ao invés da enzima livre. Os resultados obtidos para a síntese de amoxicilina com enzima imobilizada (figuras 5.56 a 5.58) foram semelhantes aos obtidos anteriormente usando enzima livre. Neste caso, pode-se observar que a hidrólise do éster acontece tanto nos ensaios com saturação quanto nos sem saturação (ver figura 5.59). Isto é um indicativo de que a água pode atacar o complexo acil-enzima estando ou não núcleo adsorvido na enzima. Kasche (1986) propôs um mecanismo para a síntese cineticamente controlada de antibióticos semi-sintéticos que já previa que a água pode hidrolisar o complexo acil-enzima com ou sem nucleófilo adsorvido.

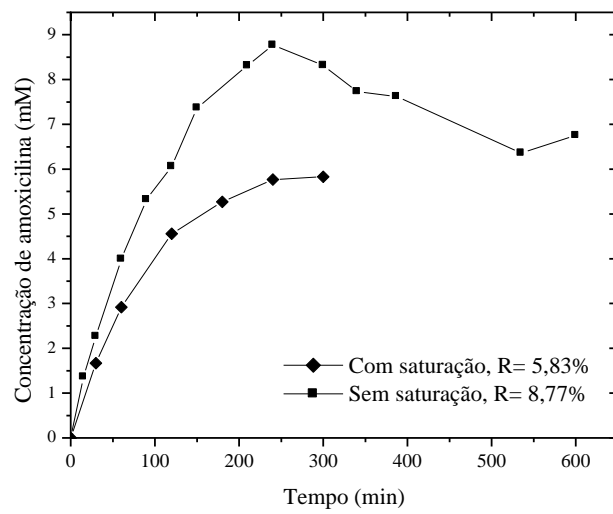


Figura 5.56 - Síntese de amoxicilina com enzima imobilizada: $C_{N0} = 100\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C

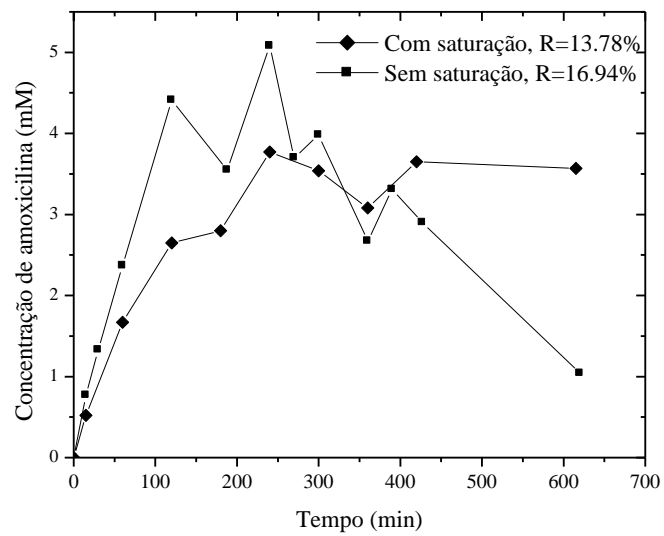


Figura 5.57 - Síntese de amoxicilina com enzima imobilizada: $C_{N0} = 30\text{mM}$, pH 6,5 e 25°C

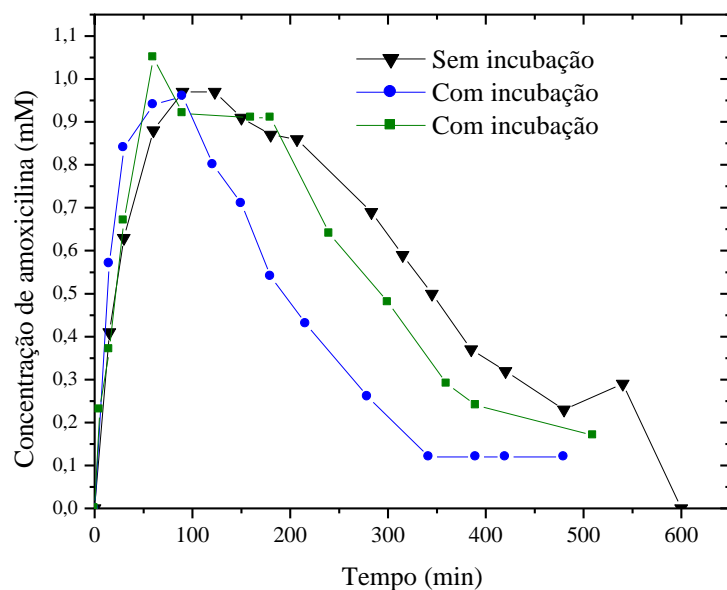


Figura 5.58 - Síntese de amoxicilina com enzima imobilizada: $C_{N0} = 5\text{mM}$

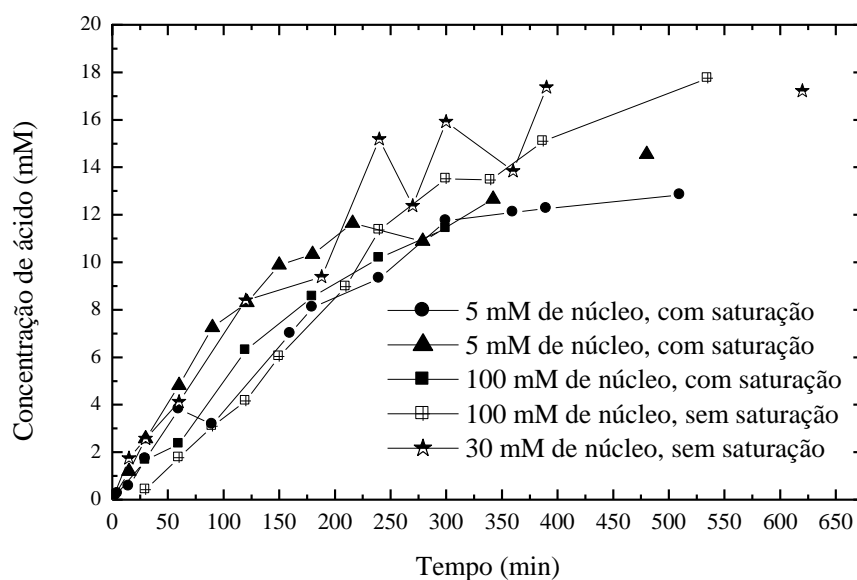


Figura 5.59 - Produção de ácido durante síntese de amoxicilina com enzima imobilizada e diferentes concentrações iniciais de núcleo.

5.9 – Busca de modelo Cinético Mecanístico para síntese de amoxicilina

Os experimentos realizados até o momento permitiram comprovar que:

- A reação de hidrólise de éster não é reversível;
- O p-hidroxifenilglicina atua como inibidor competitivo nas hidrólises do éster e da amoxicilina e, portanto, este efeito deve ser somado ao mecanismo proposto;
- O núcleo antibiótico atua como inibidor competitivo na hidrólise da amoxicilina e, portanto, este efeito deve ser somado ao mecanismo proposto;
- o metanol inibe as hidrólises do antibiótico e do éster mas são ainda necessários mais estudos para se elucidar como ele atua sobre a enzima, o que foge do escopo deste trabalho.

Resolveu-se o sistema de equações descritos no capítulo 4, item 4.4, equações 4.10 a 4.20, usando o software Maple, mas o resultado obtido não atendeu às expectativas. As equações de velocidade v_{AN} e v_{AOH} resultantes possuíam um número excessivo de parâmetros e, portanto, não eram de interesse prático. Simplificou-se o sistema na intenção de se conseguir uma equação cinética utilizável.

5.9.1 – 1ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: sem inibição por 6-APA nas Reações de Síntese de Amoxicilina e Hidrólise de Éster

Fazendo um ajuste não linear da equação 4.22 a dados de velocidade de síntese de amoxicilina para AB constante, estimaram-se as constantes A, B, C, D e E (tabela 5.16). A partir delas, calcularam-se as constantes da equação 4.21 (tabela 5.17). A figura 5.60 mostra o ajuste do modelo aos pontos experimentais. Recapitulando:

$$v_{AN} = \frac{C_1 * AB * NH^2 + C_2 * AB * NH + C_3 * NH * AB^2}{C_4 * NH + C_5 * AB + C_6 * NH^2 + C_7 + C_8 * AB^2 + C_9 * NH * AB + C_{10} * NH * AB^2 + C_{11} * AB * NH^2}$$

Equação 4.21

$$v_{AN} = \frac{A * NH^2 + B * NH}{C * NH^2 + D * NH + E}$$

Equação 4.22

sendo que: $A = C_1 * AB$; $B = C_2 * AB + C_3 * AB^2$; $C = C_6 + C_{11} * AB$; $D = C_4 + C_9 * AB + C_{10} * AB^2$ e $E = C_7 + C_5 * AB + C_8 * AB^2$

$$v_{AN} = \frac{F * AB^2 + G * AB}{H * AB^2 + J + I * AB}$$

Equação 4.23

sendo que: $F = C_3 * NH$; $G = C_2 * NH + C_1 * NH^2$; $H = C_8 + C_{10} * AB$; $I = C_5 + C_9 * NH + C_{11} * NH^2$ e $E = C_7 + C_4 * NH + C_6 * NH^2$

Tabela 5.16 – Constantes da equação 4.22 estimadas para velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

C_{AB} (mM)	A (mM/min)	B (mM ² /min)	C	D (mM)	E (mM) ²
30	0,003	0,08	0,08	0,01	52
55	0,010	0,30	0,10	0,02	60
80	0,020	0,40	0,15	0,05	80

Tabela 5.17 – Constantes da equação 4.21 para velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

Constante	Valor
C_1 (min) ⁻¹	$3,4 \times 10^{-4}$
C_2 (mM/min)	$3,4 \times 10^{-3}$
C_3 (min) ⁻¹	$2,0 \times 10^{-5}$
C_4 (mM)	$9,0 \times 10^{-6}$
C_5 (mM)	0,004
C_6	0,033
C_7 (Mm) ²	42,52
C_8	0,15
C_9	1×10^{-6}
C_{10} (mM) ⁻¹	$5,2 \times 10^{-4}$

$C_{11} \text{ (mM)}^{-1}$	0,0014
----------------------------	--------

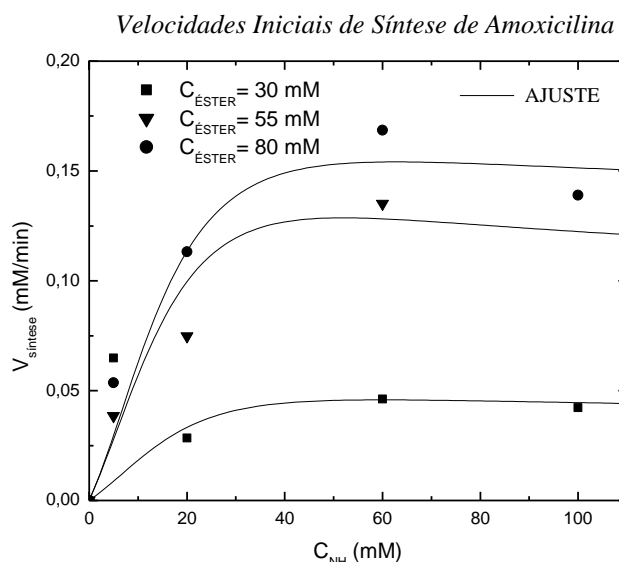


Figura 5.60 - Ajuste do modelo cinético mecanístico a dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C.

Para se testar a validade dos parâmetros estimados, calcularam-se as constantes F, G, H, I e J da equação 4.23 (tabela 5.18) e comparou-se a resposta do modelo com dados experimentais. Como se pode observar na figura 5.61, o modelo não foi capaz de prever o comportamento dos dados de síntese (com NH constante) de maneira satisfatória. Fez-se outra tentativa de ajustar o modelo mostrado na equação 1: invertendo o procedimento descrito anteriormente, ou seja, primeiro se fixou a concentração de NH, estimaram-se as constantes e depois se validaram estas constantes fazendo AB constante. O mesmo resultado foi obtido: as constantes estimadas com NH constante não foram capazes de representar os dados com AB constante.

Tabela 5.18 – Constantes da equação 4.23 para velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

$C_{NH} \text{ (mM)}$	$F \text{ (mM/min)}$	$G \text{ (mM}^2\text{/min)}$	H	$I \text{ (mM)}$	$J \text{ (mM)}^2$
5	0,0001	$2,55 \times 10^{-2}$	$1,53 \times 10^{-1}$	0,04	42,69
20	0,0004	$2,04 \times 10^{-1}$	0,16	0,57	43,18
60	0,0012	1,43	1,81	5,04	44,50

80	0,0020	3,74	0,202	14,00	45,81
----	--------	------	-------	-------	-------

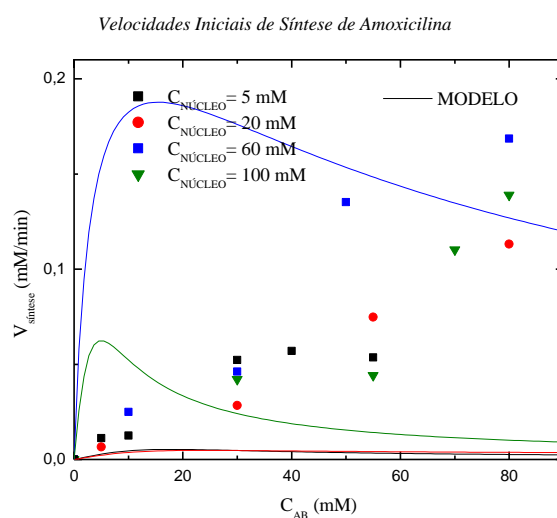


Figura 5.61 - Comparação do modelo cinético mecanístico com dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C, com NH constante.

5.9.2 – 2ª Simplificação do Modelo Cinético Mecanístico: 6-APA Se Liga Apenas ao Complexo Enzima-Éster

A figura 5.62 mostra o ajuste do modelo cinético mecanístico, quando 6-APA se liga apenas ao complexo enzima-éster (equação 4.25), aos dados experimentais de síntese de amoxicilina, pH 6,5 e 25°C, e as tabelas 5.19 e 5.20 mostram as constantes estimadas (equações 4.24 e 4.25). Novamente:

$$v_{AN} = \frac{C_1 * AB * NH}{C_2 * AB + C_3 * NH + C_4 * AB * NH + C_5 * NH^2 + C_6}$$

Equação 4.24

$$v_{AN} = \frac{A * NH}{B * NH^2 + C * NH + D}$$

Equação 4.25

sendo que: $A = C_1 * AB$; $B = C_5$; $C = C_3 + C_4 * AB$; $D = C_2 * AB + C_6$

$$v_{AN} = \frac{E * AB}{F * AB + G}$$

Equação 4.26

sendo que: $E = C_1 * NH$; $F = C_2 + C_4 * NH$; $G = C_6 + C_3 * NH + C_5 * NH^2$

Tabela 5.19 – Constantes da equação 4.25: velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

C_{AB} (mM)	A (mM ² /min)	B	C (mM)	D (mM) ²
30	0,1	0,015	0,5	20
55	0,18	0,015	0,6	25
80	0,32	0,015	0,7	28

Tabela 5.20 – Constantes da equação 4.24 para a síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

Constante	Valor
C_1 (mM/min)	$3,9 \times 10^{-3}$
C_2 (mM)	0,16
C_3 (mM)	0,38
C_4	0,004
C_5	0,015
C_6 (Mm) ²	15,53

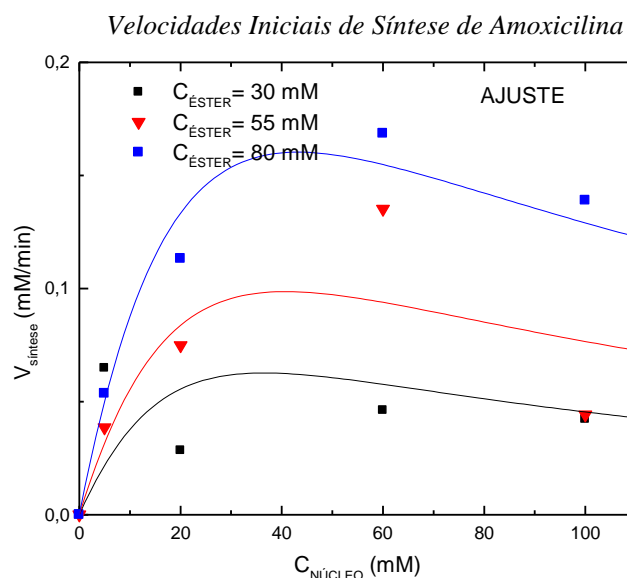


Figura 5.62 - Ajuste do modelo cinético mecanístico (equação 4.25) a dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C.

Calculam-se as constantes E, F e G da equação x.26 (tabela 5.21) e compara-se o modelo (equação 4.26) com dados experimentais fazendo NH constante. Podemos observar pela figura 5.63 que, novamente, não se consegue uma representação razoável dos dados experimentais. Desta forma, concluiu-se que o modelo mecanístico, com as simplificações feitas não foi capaz de representar os dados de síntese. Seria, portanto, necessário utilizar outro enfoque para a determinação de um modelo matemático para o sistema reativo estudado. O que foi feito e será descrito a seguir.

Tabela 5.21 – Constantes da equação 4.26: velocidades iniciais de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

$C_{NH} \text{ (mM)}$	$E \text{ (mM}^2\text{/min)}$	$F \text{ (Mm)}$	$G \text{ (mM)}^2$
5	0,02	0,18	17,81
20	0,08	0,24	29,13
60	0,24	0,40	92,33
80	0,31	0,48	141,93

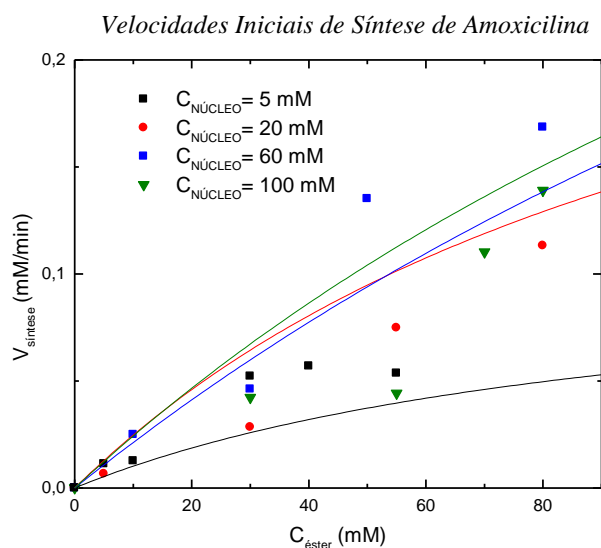


Figura 5.63 - Comparação do modelo cinético mecanístico com dados experimentais de velocidade inicial de síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C, com NH constante.

5.10 - Rede Neural: Treinamento com Dados de Velocidades

Iniciais – Modelo Híbrido 1

A falha dos modelos cinéticos semi-empírico e mecanístico na representação dos dados experimentais de síntese de amoxicilina, levou a utilização de redes neurais para a obtenção de modelo cinético para a síntese de amoxicilina em batelada.

5.10.1 – Treinamento da Rede

Treinou-se a rede neural descrita no capítulo 4 item 4.5 para três situações diferentes: velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (na presença e na ausência de 6-APA, amoxicilina e p-hidroxifenilglicina), velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina (na presença

e na ausência de 6-APA) e velocidades iniciais de síntese de amoxicilina. Neste caso, utilizaram-se:

- 25 neurônios entre a camada de entrada e a camada de escondida,
- 1 neurônio na camada de saída e
- 5000 apresentações.

Os resultados obtidos no treinamento podem ser observados nas figuras 5.64 a 5.69. As figuras 5.64, 5.66 e 5.68 mostram gráficos de dispersão entre a resposta esperada (reta) e a fornecida pela rede (pontos). As figuras 5.65, 5.67 e 5.69 mostram a comparação entre a velocidade medida e a prevista pela rede, durante o treinamento. Pode-se observar que a resposta da rede ao treinamento é muito boa, uma vez que ela consegue representar todas as situações a ela apresentadas, ao contrário do que aconteceu com o modelo cinético mecanístico mostrado no item 4.7. Nota-se um desvio entre os valores esperado e previsto, principalmente nos dados representados na figura 5.64. Porém, pode-se dizer que este desvio não existe quando se leva em consideração o desvio padrão na medida de velocidade de hidrólise de éster, obtido a partir de ensaio em triplicata. Essa dificuldade apresentada no treinamento pode ser causada pela grande diversidade dos dados apresentados à rede.

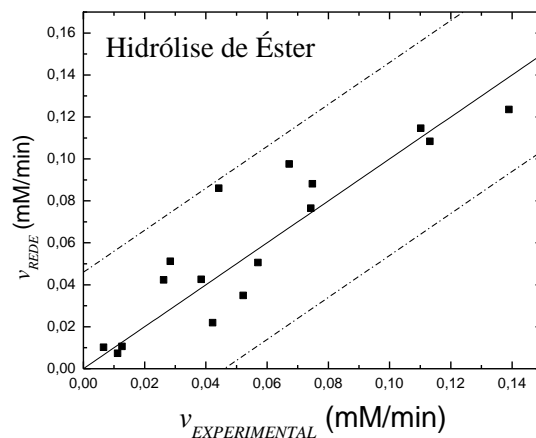


Figura 5.64 – Treinamento da rede com velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (na presença e na ausência de 6-APA, amoxicilina e p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,046$ mM/min).

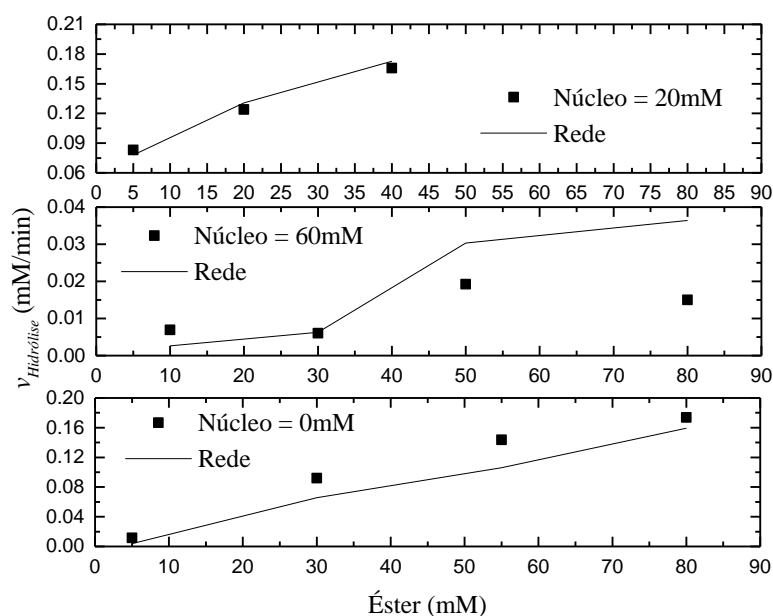


Figura 5.65 – Velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina (na presença e na ausência de 6-APA, amoxicilina e p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: Treinamento da rede.

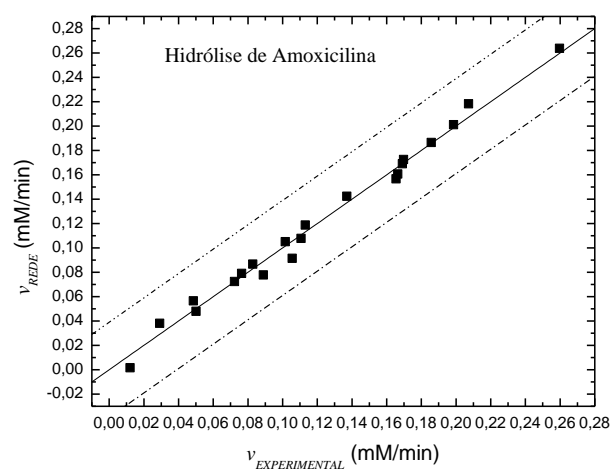


Figura 5.66 – Treinamento da rede com velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina (na presença e na ausência de 6-APA e p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,039 \text{ mM/min}$).

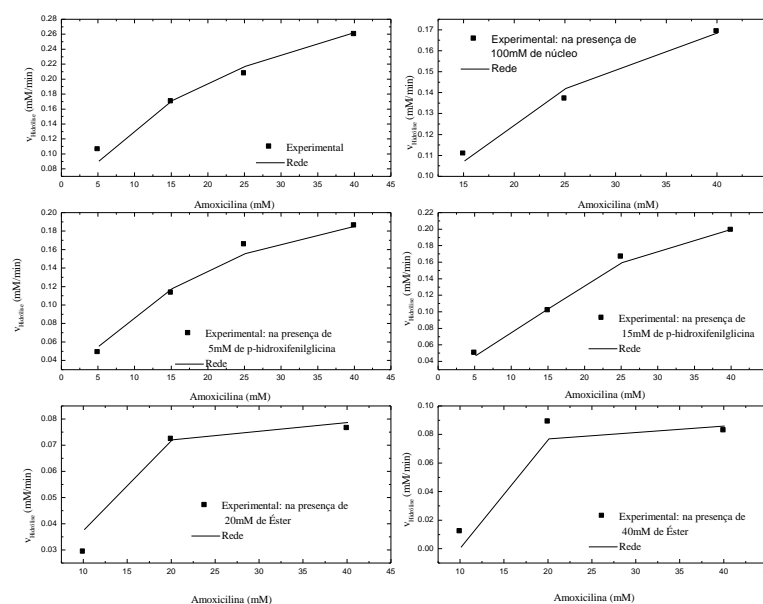


Figura 5.67 – Velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina (na presença e na ausência de 6-APA, p-hidroxifenilglicina e éster metílico de p-hidroxifenilglicina) a pH 6,5 e 25°C: treinamento da rede.

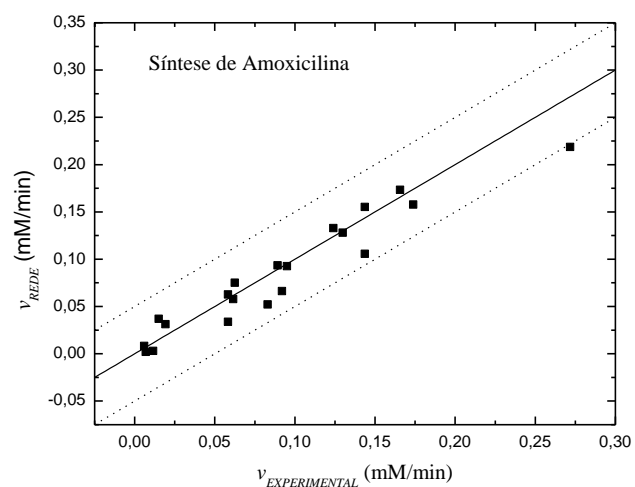


Figura 5.68 – Treinamento da rede com velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,05 \text{ mM/min}$).

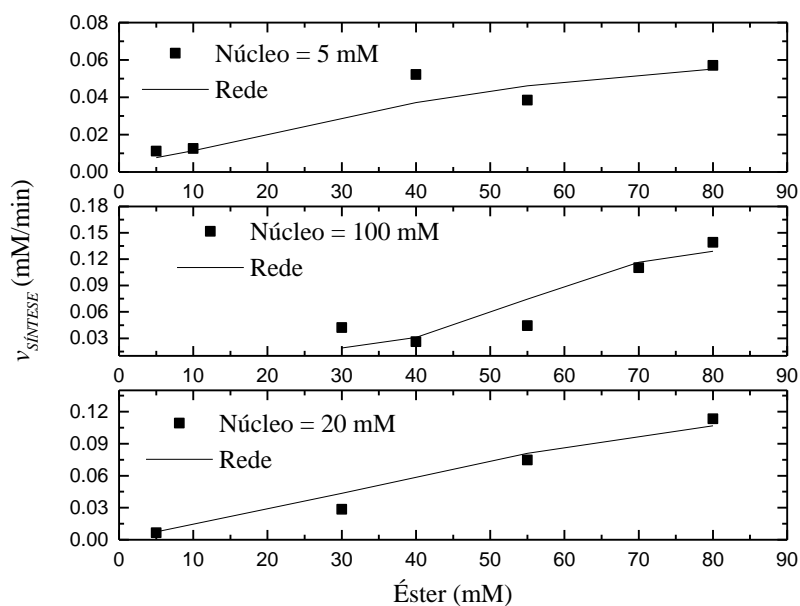


Figura 5.69 – Velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: treinamento da rede.

5.10.2 – Validação com Dados de Velocidade Inicial

As figuras 5.70, 5.72 e 5.74 mostram gráficos de dispersão e as figuras 5.71, 5.73 e 5.75 mostram a velocidade de reação em função da concentração do substrato para a validação da rede treinada com velocidades iniciais. Observa-se que a rede se mostrou capaz de prever, de forma satisfatória, todas as condições a que ela foi submetida.

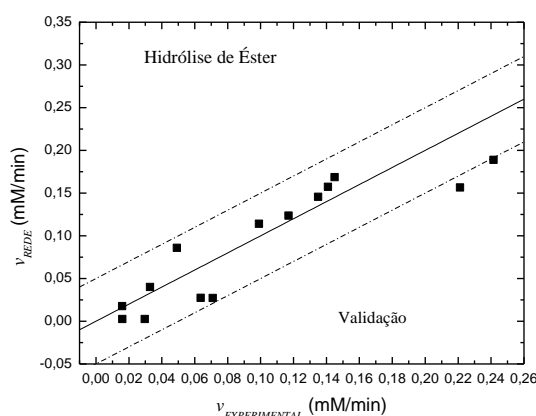


Figura 5.70 – Gráfico de dispersão para validação da rede com velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina a pH 6,5 e 25°C: as linhas pontilhadas representam o desvio padrão ($\sigma = 0,046$ mM/min) da medida.

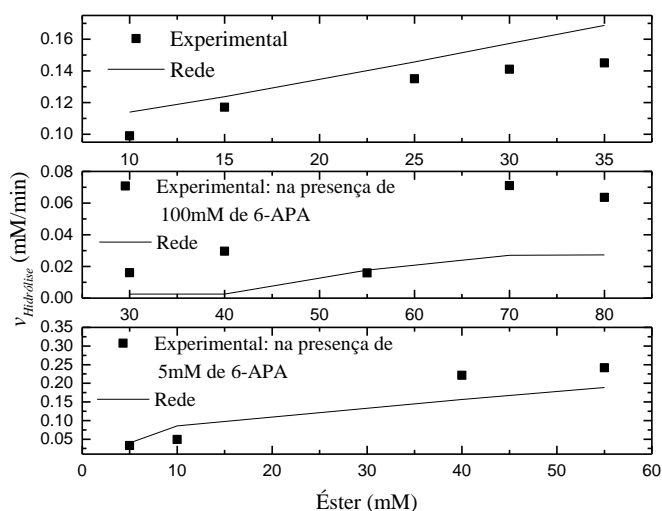


Figura 5.71 – Velocidades iniciais de hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina a pH 6,5 e 25°C: validação da rede.

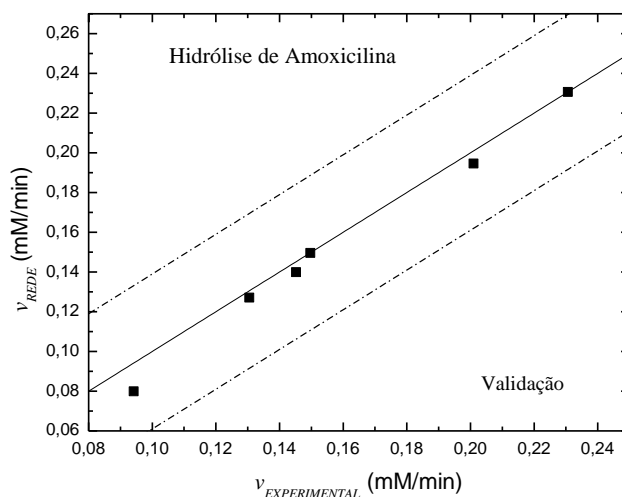


Figura 5.72 –Validação da rede com velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,039$ mM/min).

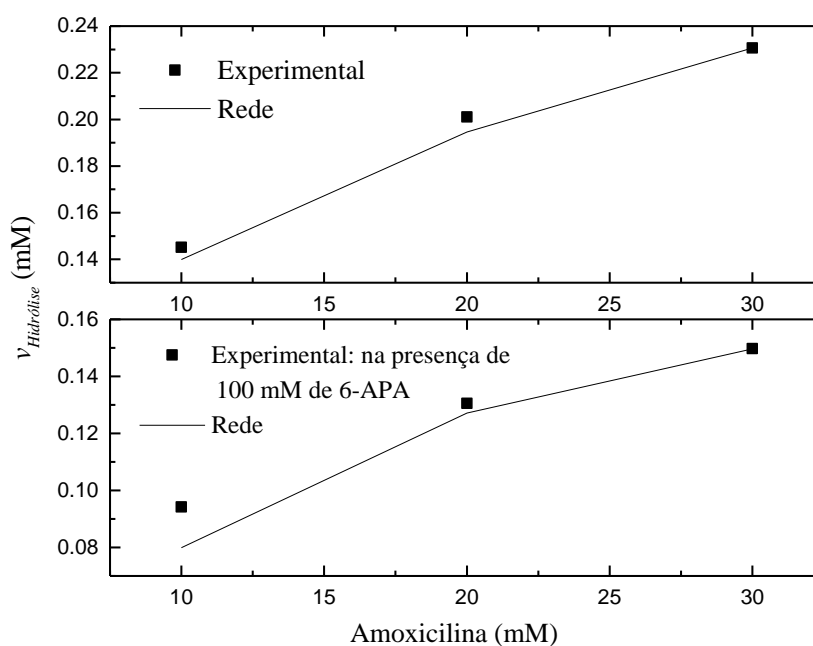


Figura 5.73 – Velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: validação da rede.

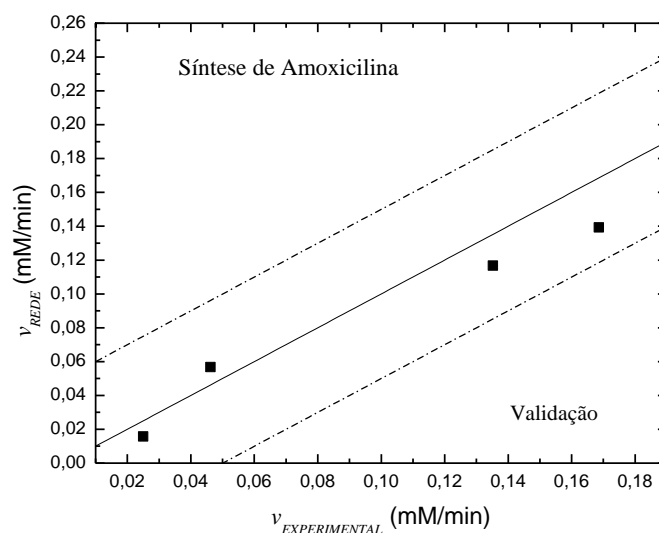


Figura 5.74 –Validação da rede com velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, as linhas pontilhadas representam o desvio padrão na medida de velocidade ($\sigma = 0,05 \text{mM/min}$).

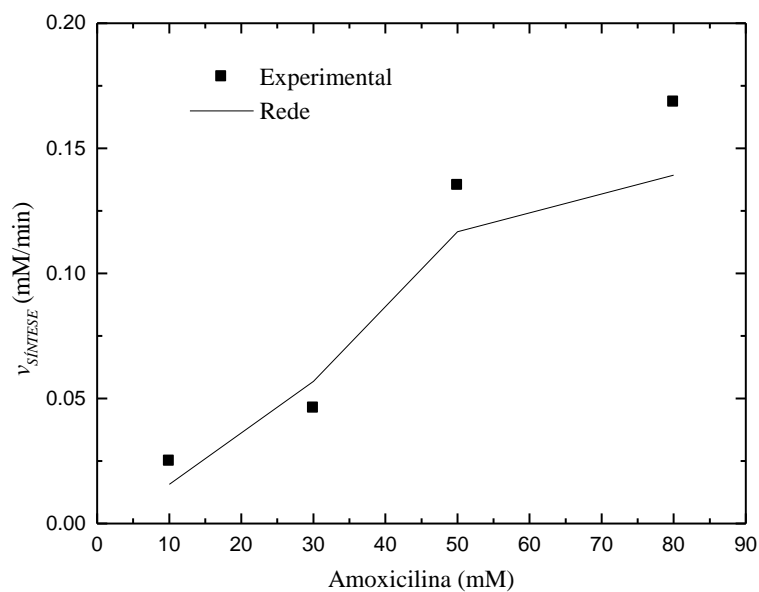


Figura 5.75 – Velocidades iniciais de síntese amoxicilina a pH 6,5 e 25°C: validação da rede.

5.10.3 - Validação do Modelo Híbrido 1 com Dados de Síntese de Amoxicilina em Batelada

Face aos resultados obtidos, tentou-se usar a rede treinada no item 5.10.1 para representar dados de síntese de amoxicilina em batelada, a pH 6,5 e 25°C. O modelo híbrido 1, descrito no item 4.5.2, foi utilizado nas simulações. Neste modelo, três velocidades são usadas para representar o sistema:

- a) velocidade de síntese de amoxicilina;
- b) velocidade de hidrólise de éster e
- c) velocidade de hidrólise de amoxicilina.

As figuras 5.76 a 5.82 mostram os resultados obtidos. Como se pode observar, a rede consegue prever algumas situações (figuras 5.76 a 5.79) mas falha para outras (5.80 a 5.82). Este comportamento já era esperado uma vez que a rede foi treinada apenas para velocidades iniciais de síntese e, portanto, não leva em consideração o efeito, nas velocidades de reação, dos produtos formados durante o processo de síntese enzimática. Note que, no início de cada ensaio (velocidades iniciais), o modelo é capaz de prever todas as condições testadas.

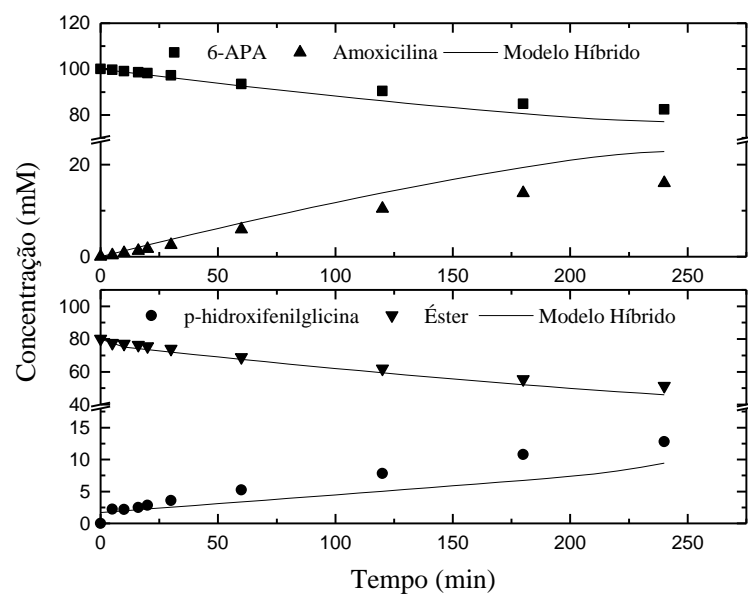


Figura 5.76 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 100 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 80\text{mM}$: validação da rede. 0,7 ml de Derivado 30UI/ml para 30ml totais.

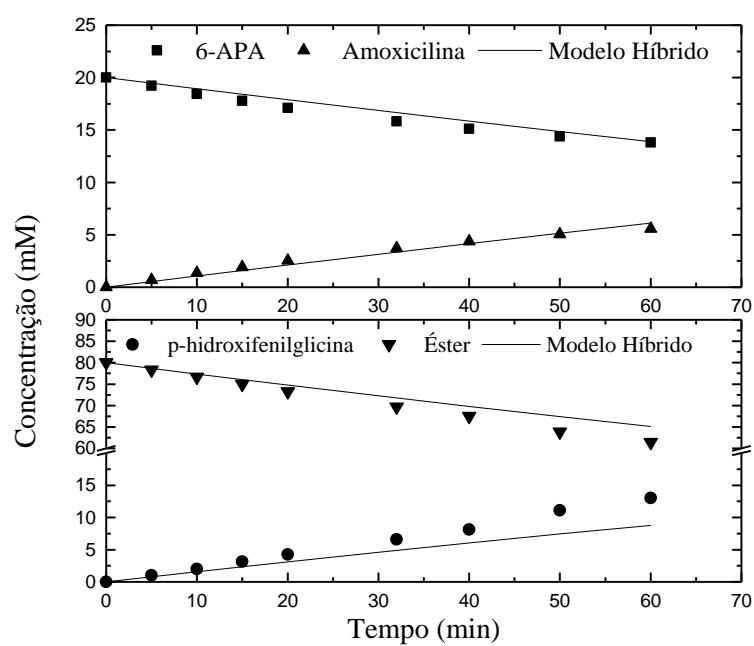


Figura 5.77 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 20 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 80 \text{ mM}$: validação da rede. 0,7 ml de Derivado 30UI/ml para 30ml totais.

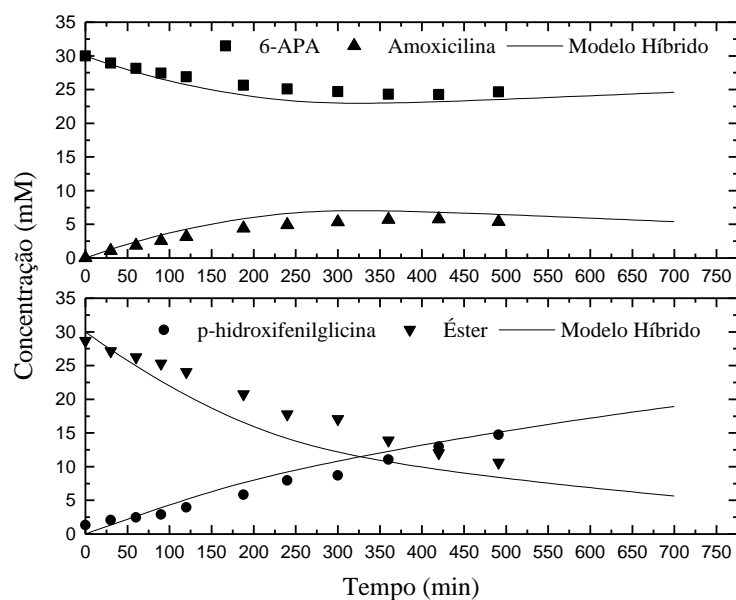


Figura 5.78 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 30 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 30 \text{ mM}$: validação da rede. 0,7 ml de Derivado 30UI/ml para 30ml totais.

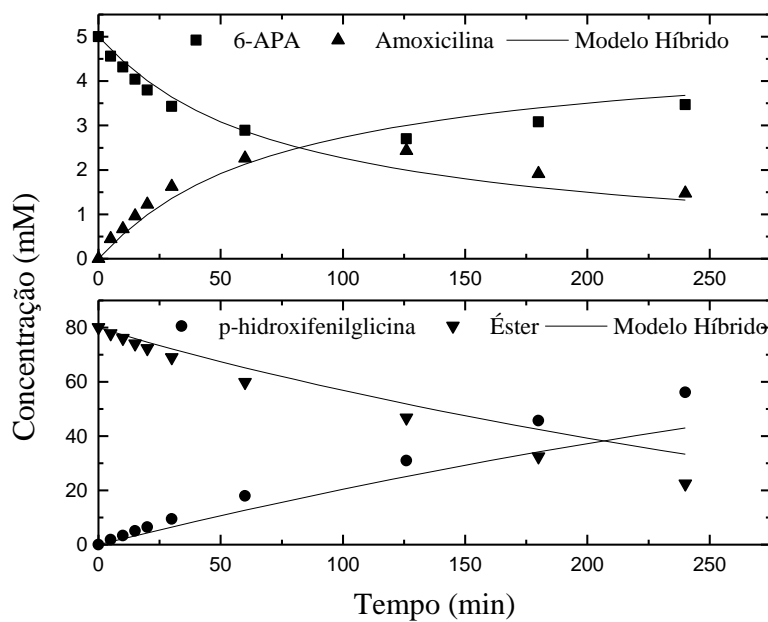


Figura 5.79 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 5 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 80 \text{ mM}$: validação da rede. 0,7 ml de Derivado 30UI/ml para 30ml totais.

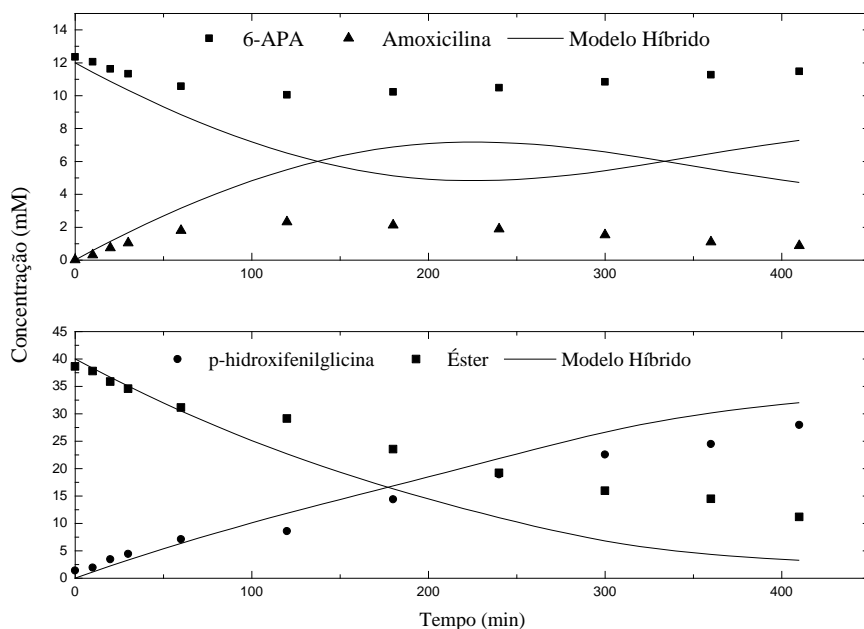


Figura 5.80 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 12 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 40 \text{ mM}$: validação da rede. 0,7 ml de Derivado 30UI/ml para 30ml totais.

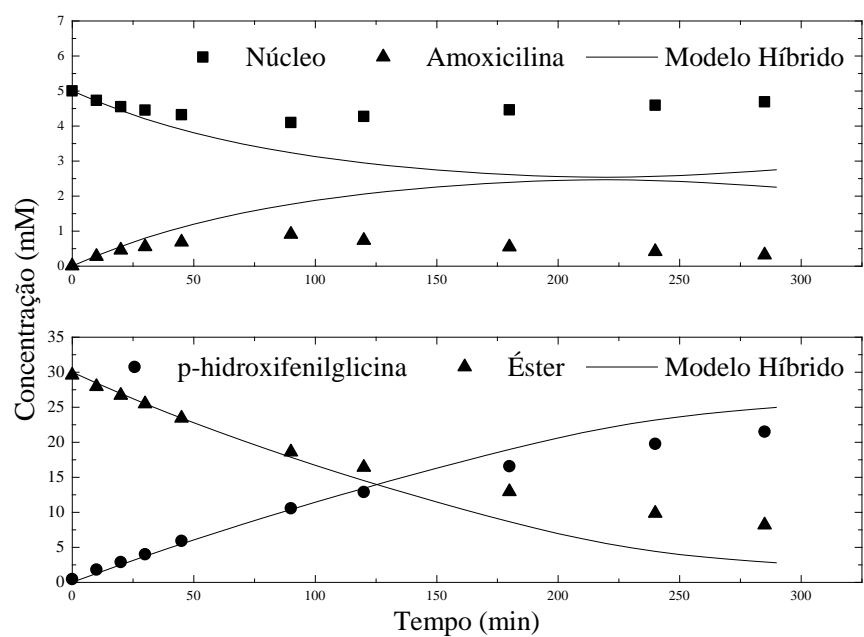


Figura 5.81 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 5 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 30\text{mM}$: validação da rede. 0,7 ml de Derivado 30UI/ml para 30ml totais.

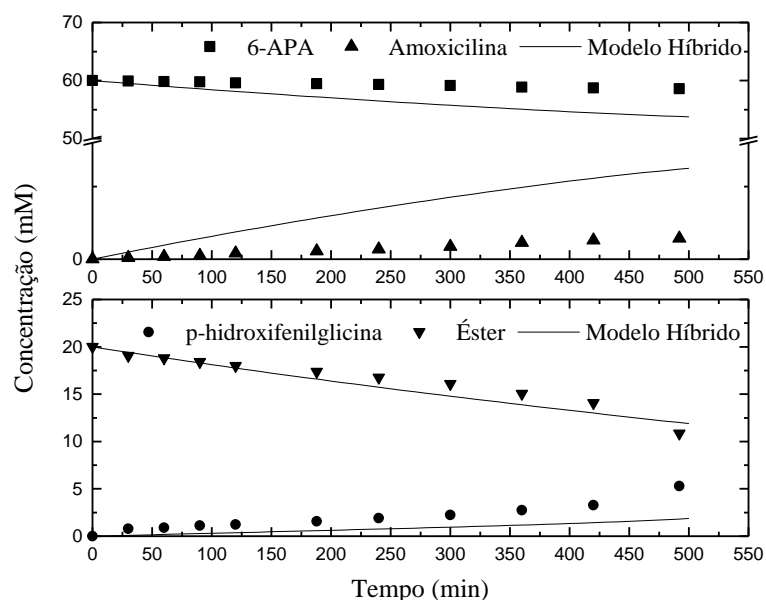


Figura 5.82 – Síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C com $C_{6\text{-APA}} = 60 \text{ mM}$ e $C_{\text{Éster}} = 20\text{mM}$: validação da rede. 0,7 ml de Derivado 30UI/ml para 30ml totais.

5.11 - Rede Neural: Treinamento usando Dados em Batelada –

Modelo Híbrido 2

5.11.1 – Escolha dos Conjuntos de Dados de Síntese de Amoxicilina em Batelada utilizados no Treinamento da Rede Neural

Os conjuntos de dados usados no treinamento da rede, tanto a pH 7,5 quanto a pH 6,5, foram escolhidos de maneira a cercar uma região de trabalho. As Figuras 5.83 e 5.84 mostram a região demarcada para o treinamento da rede e as tabelas 5.22 e 5.23 mostram os conjuntos de dados usados para pH 7,5 e 6,5, respectivamente. A concentração adimensional ($X_{\text{adimensional}}$) de núcleo e éster foi calculada segundo a equação:

$$X_{adimensional} = \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}$$

onde X_{\min} e X_{\max} são, respectivamente, a mínima e a máxima concentração da espécie usadas no treinamento.

Tabela 5.22 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C; concentrações iniciais para ensaio em batelada usados no treinamento das redes do modelo híbrido 2

Núcleo (mM)	Éster (mM)	Núcleo (adimensional)	Éster (adimensional)
66,0	35,0	1,00	1,00
66,0	4,6	1,00	0,00
30,0	27,0	0,40	0,70
5,0	4,6	0,00	0,00
4,0	35,0	0,00	1,00

Tabela 5.23 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C; concentrações iniciais para ensaio em batelada usados no treinamento das redes do modelo híbrido 2

Núcleo (mM)	Éster (mM)	Núcleo (adimensional)	Éster (adimensional)
5	30	0,00	0,00
40	80	0,37	1,00
5	80	0,00	1,00
20	40	0,16	0,20
40	30	0,37	0,00
30	30	0,26	0,00
100	80	1,00	1,00

100	40	1,00	0,20
55	55	0,53	0,50

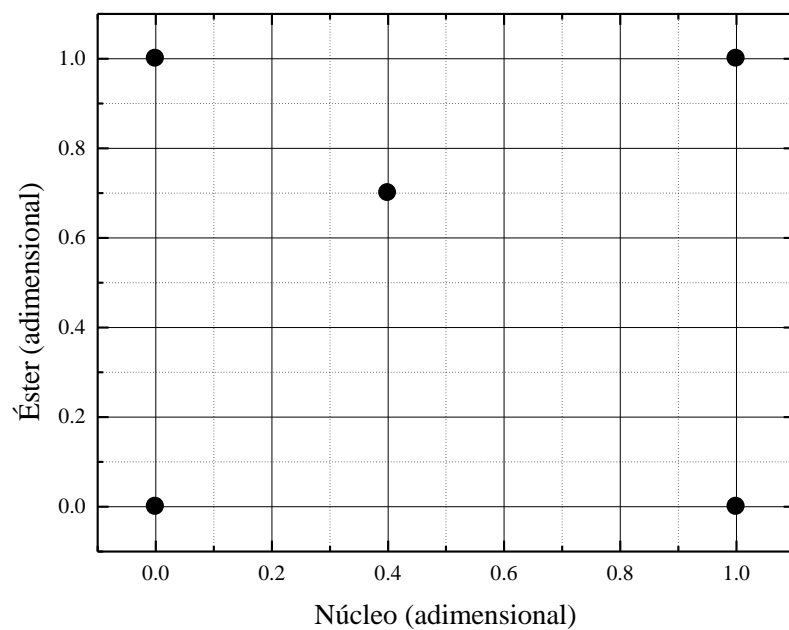


Figura 5.83 – Região delimitada para o treinamento da rede para a síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C

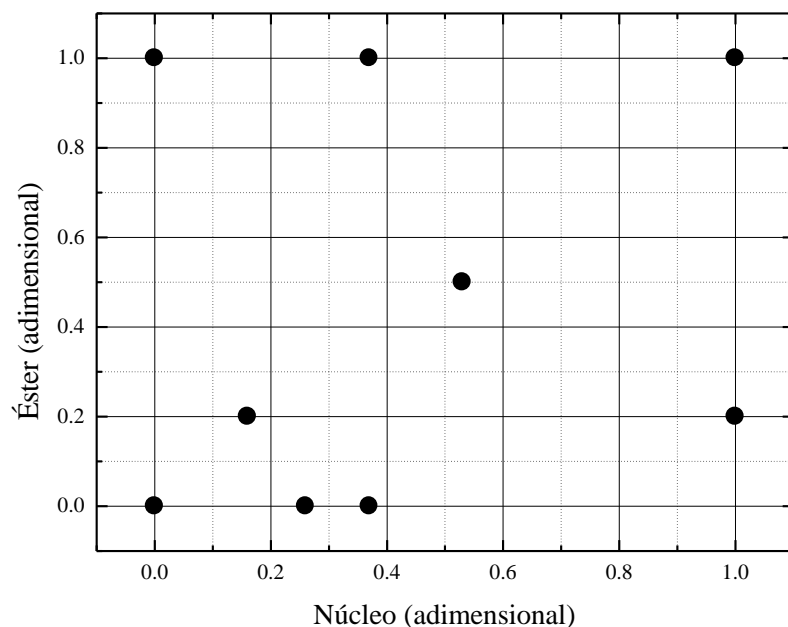


Figura 5.84 – Região delimitada para o treinamento da rede para a síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C

5.11.2 –Conjuntos de Dados de Síntese de Amoxicilina em Batelada utilizados na Validação da Rede Neural: Modelo Híbrido 2

Os conjuntos de dados usados na validação da rede, tanto a pH 7,5 quanto a pH 6,5, foram escolhidos dentro da região de delimitada no treinamento. As Figuras 5.85 e 5.86 mostram a região demarcada para o treinamento da rede e as tabelas 5.24 e 5.25 mostram os conjuntos de dados usados para pH 7,5 e 6,5, respectivamente.

Tabela 5.24 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C usados na validação das redes neurais (modelo híbrido 2); concentrações iniciais de substrato em ensaios em batelada.

Núcleo (mM)	Éster (mM)	Núcleo (adimensional)	Éster (adimensional)
66	20	1,00	0,50
5	15	0,00	0,30
5	30	0,00	0,80

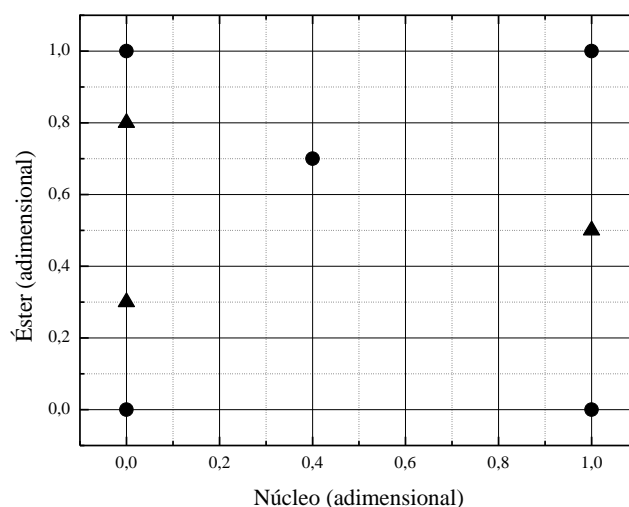


Figura 5.85 – Localização dos Dados usados na validação da rede dentro da região delimitada no treinamento: síntese de amoxicilina em batelada a pH 7,5 e 25°C: ● dados usados no treinamento das redes e ▲ dados usados na validação.

Tabela 5.25 – Conjuntos de dados de síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C usados na validação das redes neurais (modelo híbrido 2); concentrações iniciais de substrato em ensaios em batelada.

Núcleo (mM)	Éster (mM)	Núcleo (adimensional)	Éster (adimensional)
12	40	0,07	0,20
5	55	0,00	0,50
10	55	0,05	0,50
20	80	0,16	1,00
78	35	0,77	0,10

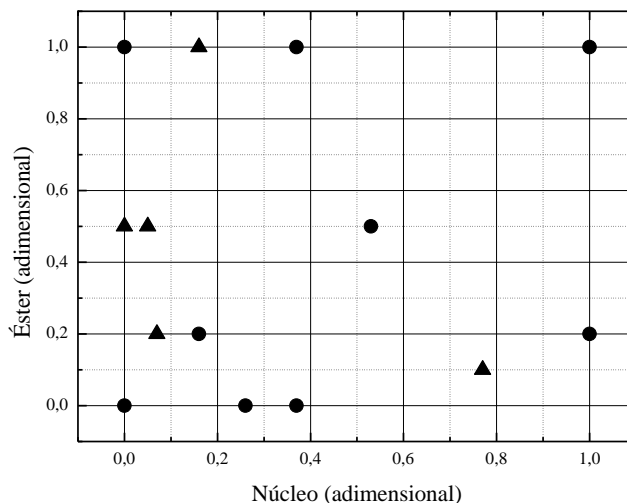


Figura 5.86 – Localização dos Dados usados na validação da rede dentro da região delimitada no treinamento: síntese de amoxicilina em batelada a pH 6,5 e 25°C: ● dados usados no treinamento das redes e ▲ dados usados na validação.

5.11.3 – Treinamento da Rede – Modelo Híbrido 2

Como a rede treinada com dados de velocidades iniciais não foi capaz de prever algumas condições operacionais testadas, optou-se por fazer novo treinamento, agora com dados de ensaios em batelada. O primeiro problema enfrentado foi a necessidade de se trabalhar com velocidades negativas. Isto porque se trabalhou com duas velocidades de reação:

- velocidade de formação/consumo de amoxicilina e
- velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina.

Como a concentração de amoxicilina, durante a síntese, atinge um máximo e depois começa a ser consumida, teremos no início velocidades positivas (formação) e, posteriormente ao máximo, velocidades negativas (consumo). As redes, tais quais usadas no item 5.10, não foram capazes de prever velocidades negativas, uma vez que a função sigmoideal usada é sempre positiva. Para resolver este problema, fez-se uma adaptação na rede, trocando a função sigmoideal por função tangente hiperbólica. De fato, conseguiu-se resolver o problema das velocidades negativas. No entanto, não se obteve sucesso com o treinamento desta

nova rede. Como a maior desvantagem deste procedimento de treinamento é que, se a superfície erro tiver um mínimo local, o gradiente descendente pode não ser capaz de encontrar o mínimo global [Rumelhart et al. (1986)], acredita-se que a rede tenha ficado presa em um mínimo local.

Utilizou-se então um programa de treinamento otimizado baseado no algoritmo da retropropagação, descrito no item 4.5.3. Manteve-se a função de transferência sigmoidal, mas neste caso normalizam-se os dados de entrada de tal maneira que velocidades negativas conseguem ser representadas. Também neste caso houve problemas durante o treinamento da rede, mas eles foram resolvidos deixando a taxa de aprendizado fixa em 1. Antes de se utilizar os pesos resultantes do treinamento, verificaram-se dois parâmetros que afetam o desempenho da rede, são eles:

- número de neurônios entre a camada de entrada e a camada escondida e
- número de apresentações dos dados.

5.11.4 – Influência do número de neurônios entre a camada de entrada e a camada escondida na capacidade preditiva da rede

Sabe-se que o número de neurônios da camada escondida é um parâmetros importante no desempenho e não há nenhum método universal para determinar o número ótimo. O uso de poucos neurônios limita a habilidade da rede para modelar o processo desejado. Já o uso de um número excessivo de neurônios permite maior liberdade para o ajuste de pesos, o que pode levar ao aprendizado do ruído [Linko et al. (1997)]. Desta forma, realizou-se o treinamento da rede para diferentes números de neurônios na camada escondida. As figuras 5.87 e 5.88 mostram a variação do erro de predição da rede (calculado para os ensaios de validação) em função do número de neurônios para síntese de amoxicilina a 25°C e a pH 7,5 e 6,5, respectivamente.

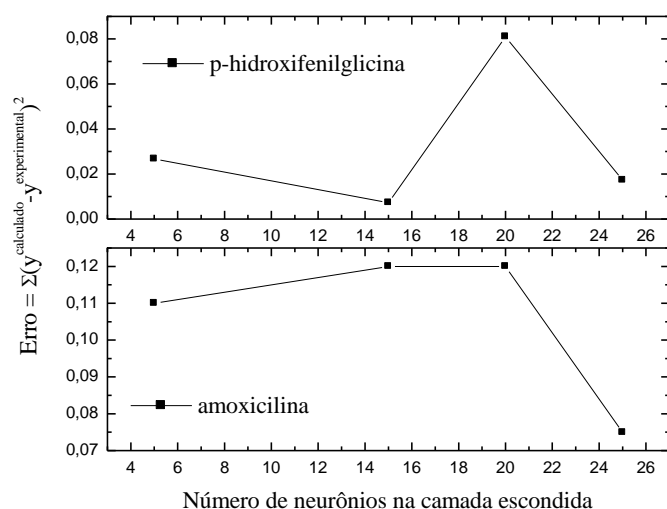


Figura 5.87 – Erro de predição da rede ($\text{Erro} = \sum (y^{\text{calculado}} - y^{\text{experimental}})^2$) em função do número de neurônios para os n conjuntos de dados utilizados para a validação a pH 7,5 e 25°C.

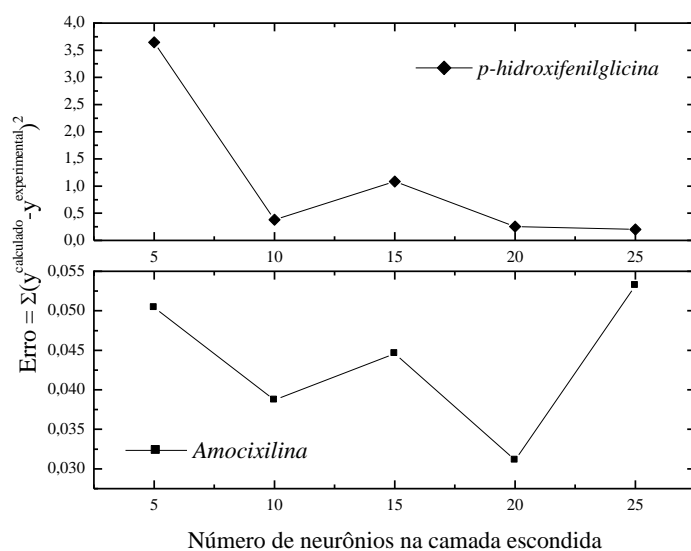


Figura 5.88 – Erro de predição da rede ($\text{Erro} = \sum (y^{\text{calculado}} - y^{\text{experimental}})^2$) em função do número de neurônios para os n conjuntos de dados utilizados para a validação a pH 6,5 e 25°C

Para a rede representando a formação de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5, podemos observar que o aumento do número de neurônios não refletiu

necessariamente em uma melhora do erro na validação. Houve um momento que o excesso de neurônios atrapalhou a capacidade preditiva da rede (erro maior). O mesmo fenômeno pode ser observado a pH 6,5 para a velocidade de formação/consumo de amoxicilina. Desta forma, a definição da quantidade de neurônios a ser utilizada no treinamento da rede foi uma solução de compromisso entre as melhores condições levando em conta ambas as velocidades de reação, uma vez que se desejava utilizar uma mesma quantidade de neurônios para as duas redes no modelo híbrido. No caso da rede para pH 7,5 pode se observar (figura 5.87) que o número ótimo de neurônios, levando em consideração ambas as velocidades (formação/consumo de amoxicilina e formação de p-hidroxifenilglicina), é 25. Já no caso da rede para pH 6,5, este número ótimo é de 20 neurônios.

4.11.5 – Influência do número de apresentações na capacidade preditiva da rede

Outro parâmetro importante no desempenho das redes neurais é o número de apresentações usadas durante o treinamento. Tampouco há um método universal para determinar esse número ótimo. Desta forma, realizou-se o treinamento da rede para diferentes números de apresentação, para um número fixo de neurônios na camada escondida. As figuras 5.89, 5.90 e 5.91 mostram a variação do erro de predição da rede (calculados nos ensaios de validação) em função do número de apresentações para síntese de amoxicilina a 25°C e a pH 7,5 ou 6,5. Pode-se observar que, no caso velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina, quanto maior o número de apresentações melhor, ou seja, menor o erro de predição, tanto a pH 7,5 quanto a pH 6,5 (ver figuras 5.89 e 5.91, respectivamente). Já para amoxicilina, um aumento no número de apresentações

nem sempre apresentou melhoras na predição, ou seja, um menor erro. Um aumento de 15000 apresentações para 20000 a pH 7,5 levou a um aumento do erro na validação. O mesmo se observa a pH 6,5 quando aumentamos as apresentações de 2000 para 3000. A tabela 5.26 resume as condições utilizadas para o treinamento da rede para amoxicilina e p-hidroxifenilglicina. As figuras 5.92 e 5.93 mostram o gráfico de dispersão para o treinamento da rede para pH 7,5 e 6,5, respectivamente. Pode-se observar que a dispersão dos dados estimados pela rede, durante o treinamento, é muito baixa.

Tabela 5.26 – Número de neurônios na camada escondida e número de apresentações adotadas para o treinamento das redes para velocidade de formação/consumo de amoxicilina e velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina durante síntese do antibiótico a 25°C – Modelo Híbrido 2.

Velocidade de reação	Número de apresentações	Número de neurônios na camada escondida
Formação/consumo de amoxicilina a pH 7,5 e 25°C	15.000	25
Formação/consumo de amoxicilina a pH 6,5 e 25°C	2.000	20
Formação de p-hidroxifenilglicina a pH 7,5 e 25°C	100.000	25
Formação de p-hidroxifenilglicina a pH 6,5 e 25°C	100.000	20

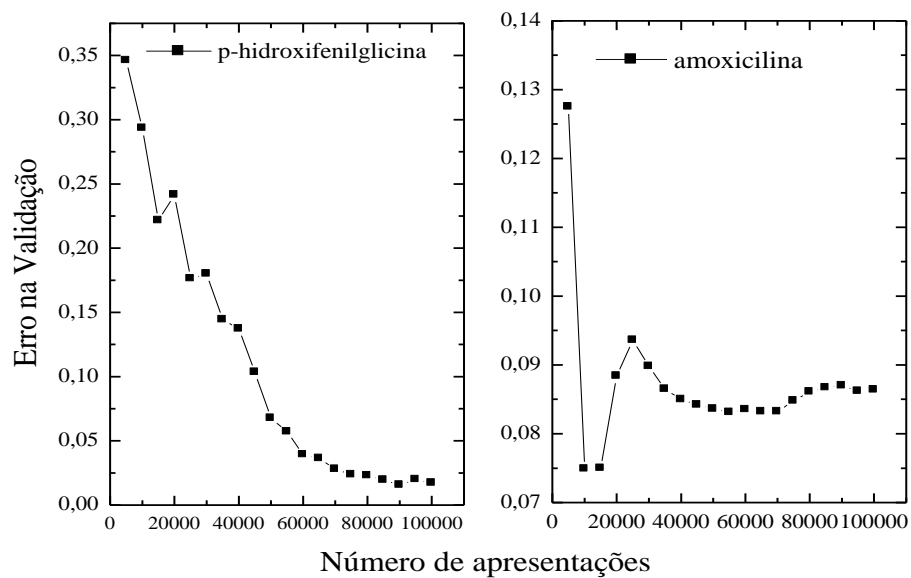


Figura 5.89 – Erro de predição da rede (com 25 neurônios na camada escondida) em função do número de apresentações para síntese de amoxicilina a 25°C e a pH 7,5.

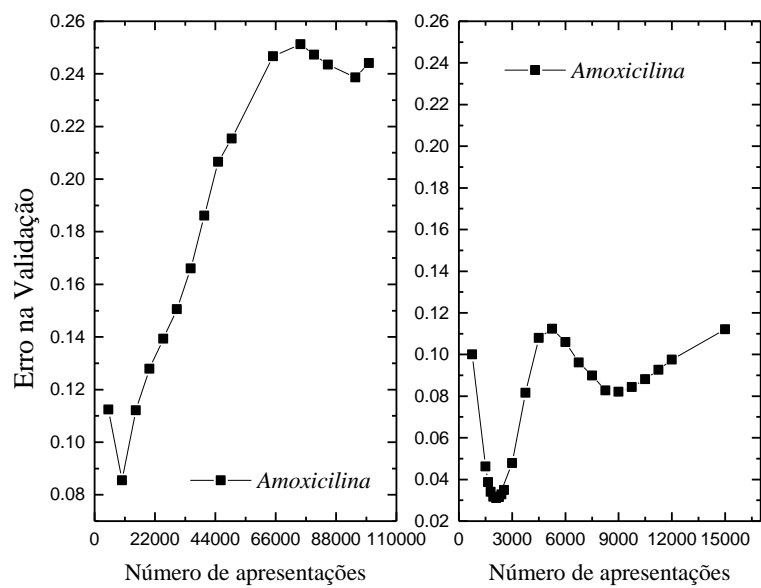


Figura 5.90 – Erro de predição da rede (com 20 neurônios na camada escondida) em função do número de neurônios para velocidade de formação/ consumo de amoxicilina a 25°C e a pH 6,5.

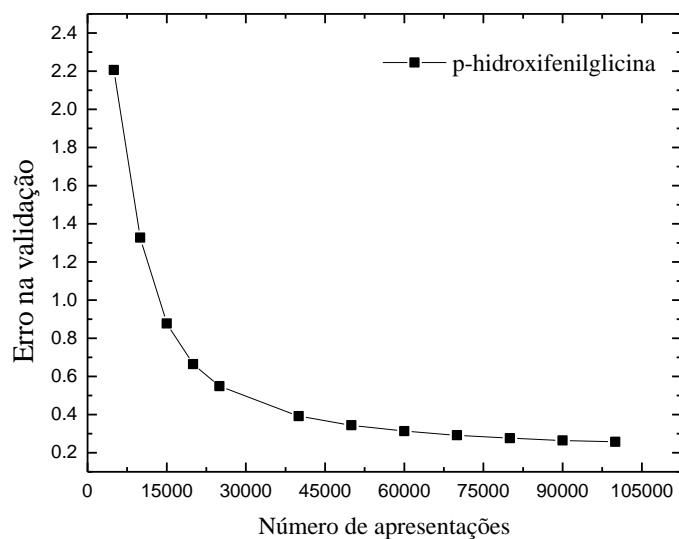


Figura 5.91 – Erro de predição da rede (com 20 neurônios na camada escondida) em função do número de neurônios para velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina durante síntese de amoxicilina a 25°C e a pH 6,5.

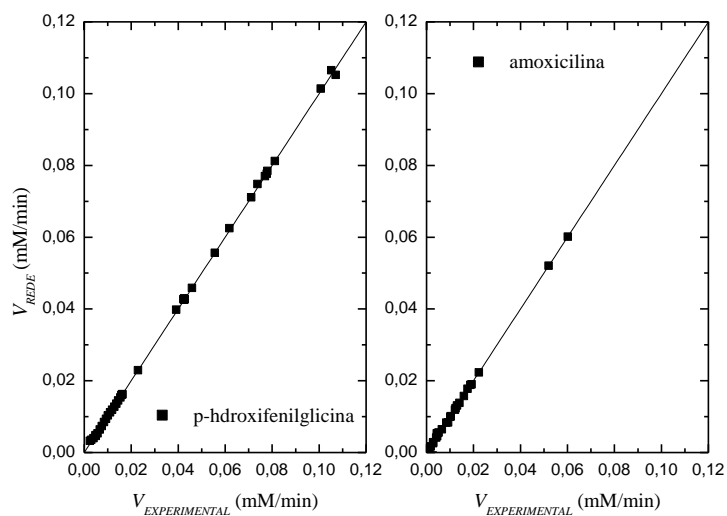


Figura 5.92 – Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, para o treinamento da rede a pH 7,5.

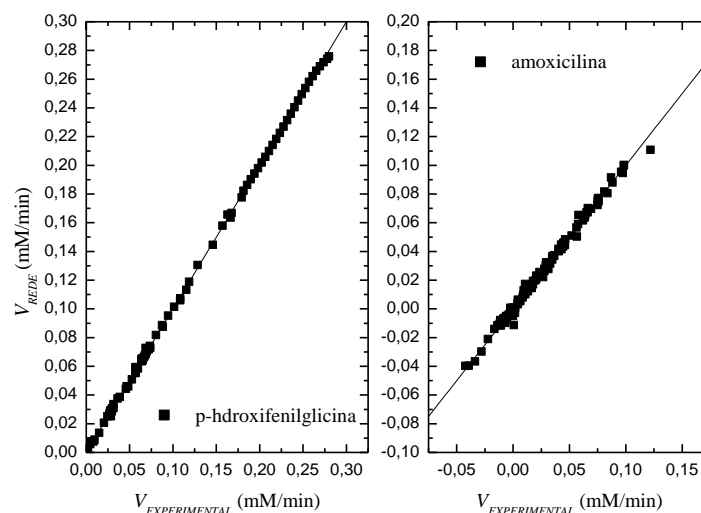


Figura 5.93 – Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pela rede, para o treinamento da rede a pH 6,5.

5.11.6 – Validação da Rede: Resposta do Modelo Híbrido 2 para Reator em Batelada

O modelo híbrido 2 para reator em batelada descrito no item 4.5.3 foi usado para simular as condições experimentais usadas no treinamento da rede para avaliar a qualidade do ajuste. Em todas as situações foram utilizados 1g (0,7ml) de derivado 30UI/ml para um volume total de 30ml. Posteriormente, simularam-se outras condições experimentais (diferentes das usadas no treinamento – ver item 5.11.2) para verificar se a capacidade preditiva da rede. As figuras 5.94 a 5.107 mostram a comparação entre dados experimentais e dados simulados (usando modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede.

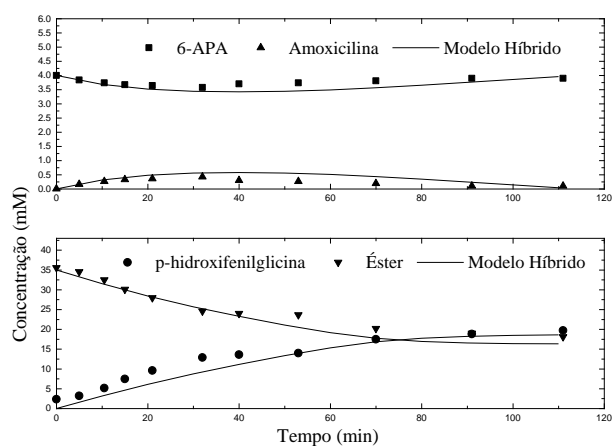


Figura 5.94 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 4 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 35 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 7,5$.

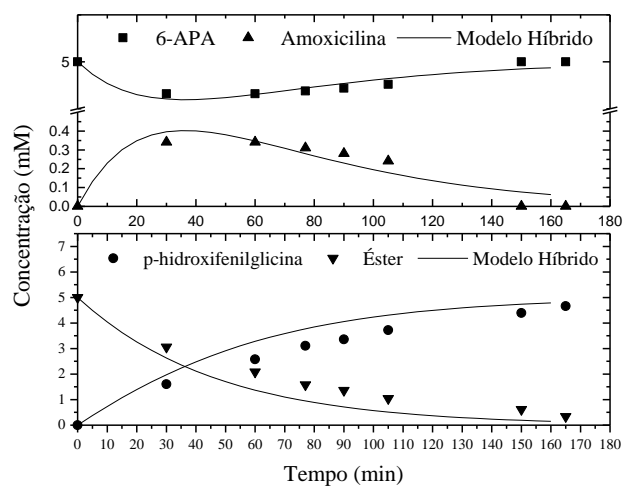


Figura 5.95 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 4,47 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 7,5$.

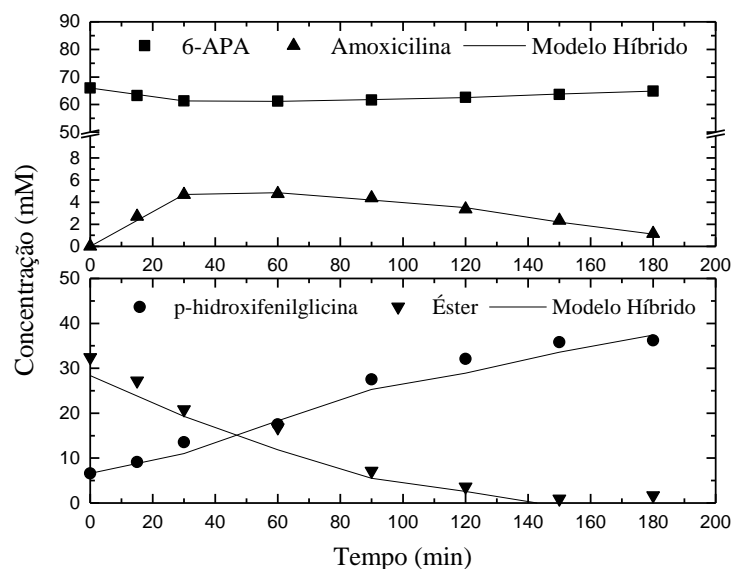


Figura 5.96 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 66 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 35 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 7,5$.

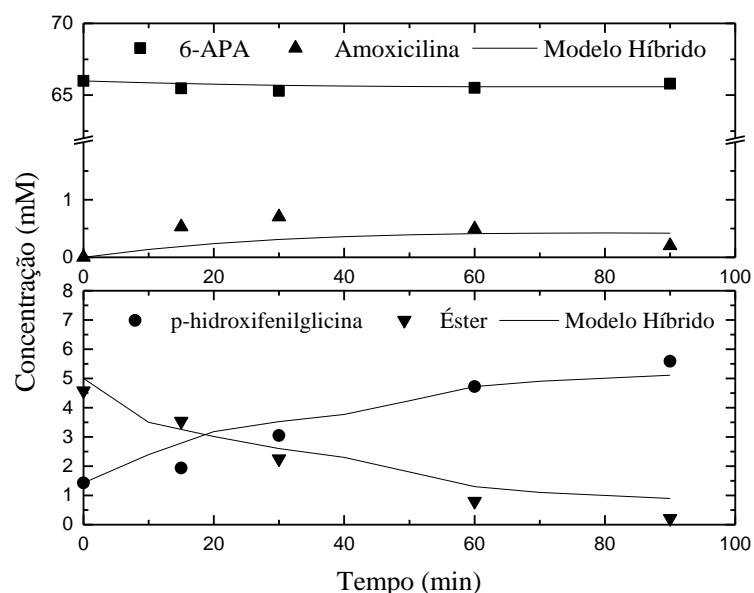


Figura 5.97 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 66 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 5 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 7,5$.

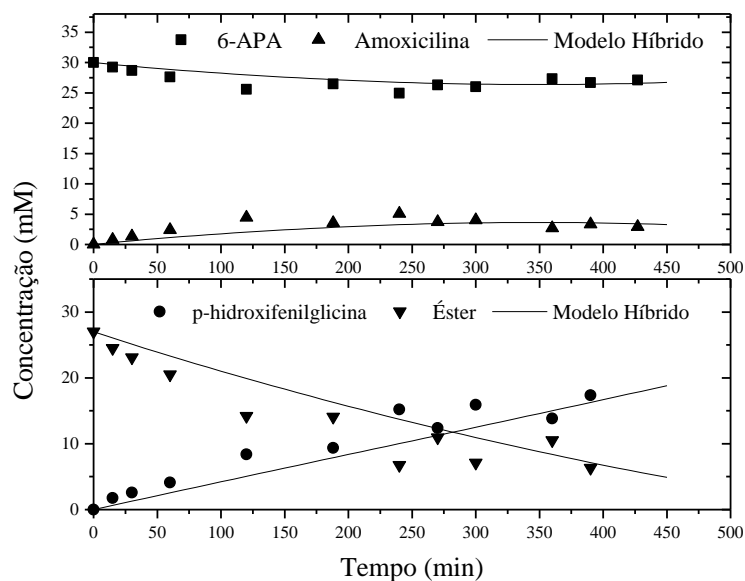


Figura 5.98 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 30 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 26,7 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 7,5$.

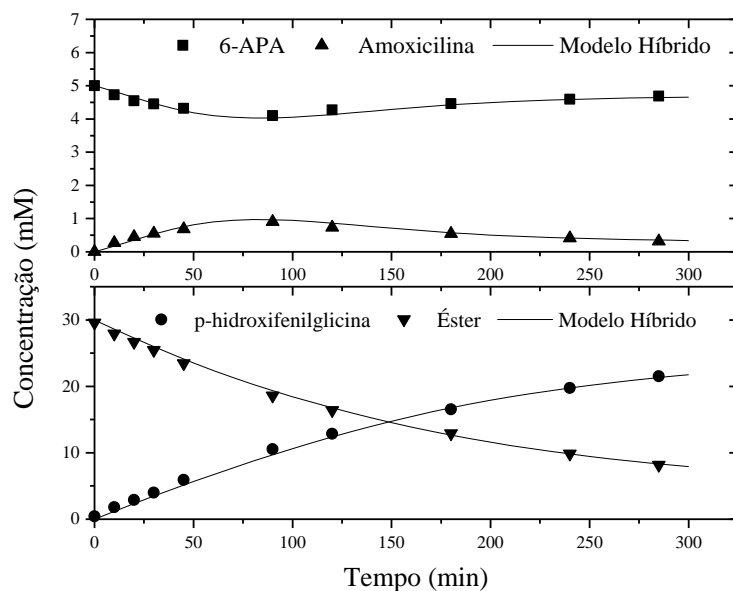


Figura 5.99 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 30 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$.

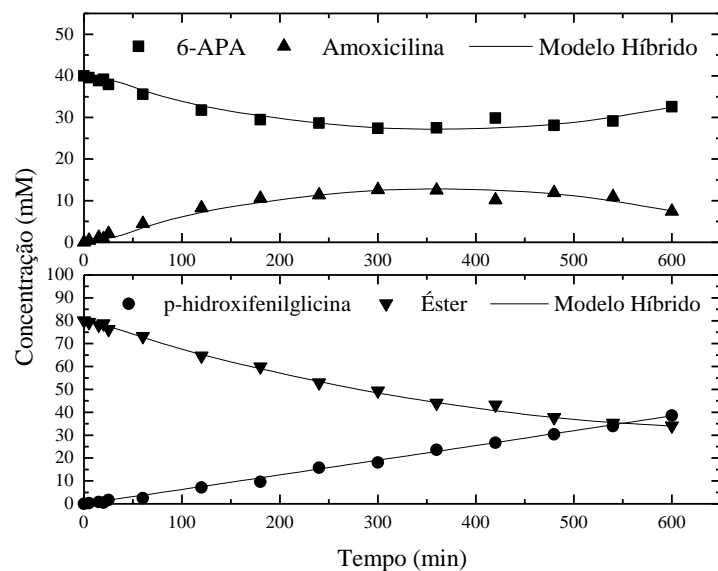


Figura 5.100 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 40 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 80 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$.

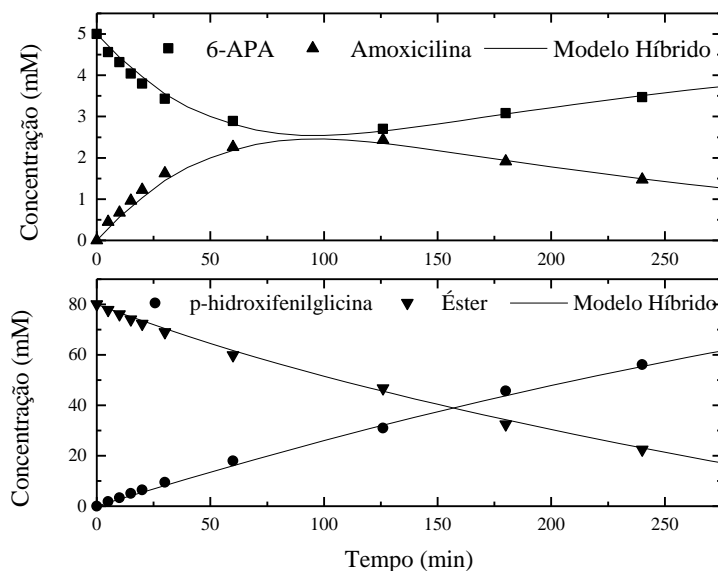


Figura 5.101 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 80 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$.

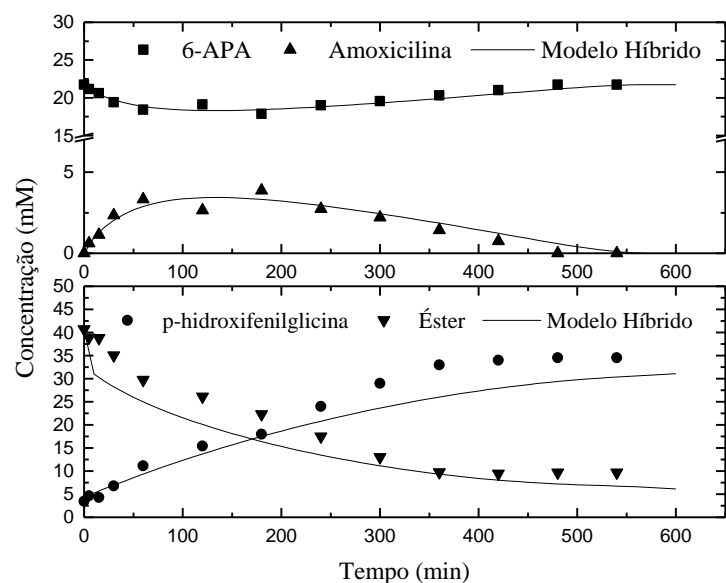


Figura 5.102 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 20 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 40 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$.

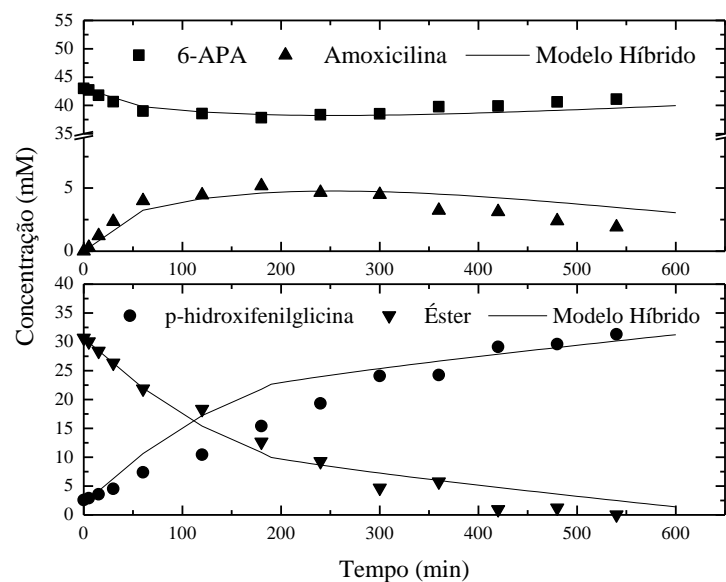


Figura 5.103 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 40 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 30 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$.

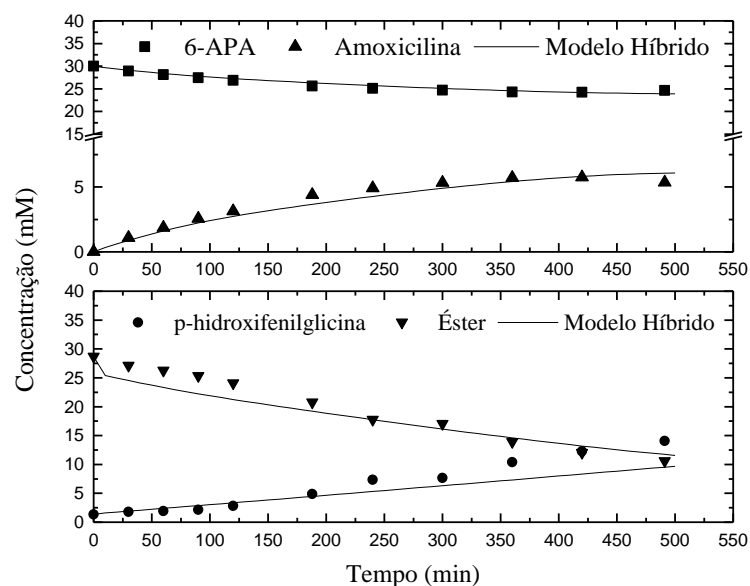


Figura 5.104 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 30 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 30 \text{ mM}$, 25°C e pH 6,5.

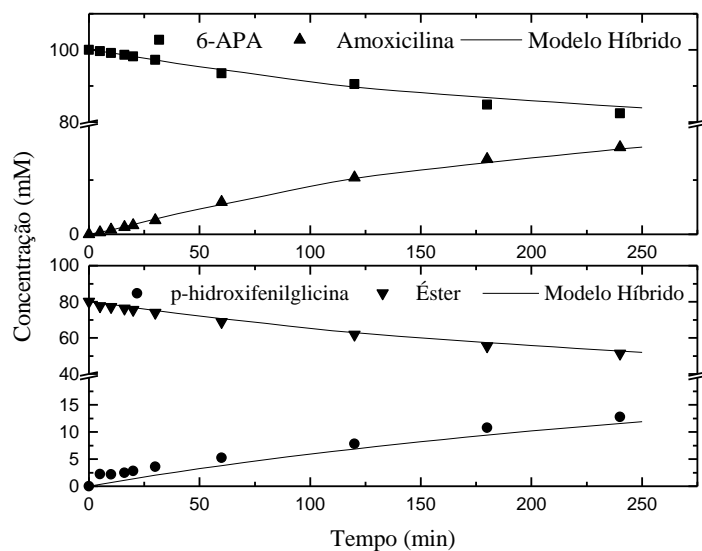


Figura 5.105 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 100 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 80 \text{ mM}$, 25°C e pH 6,5.

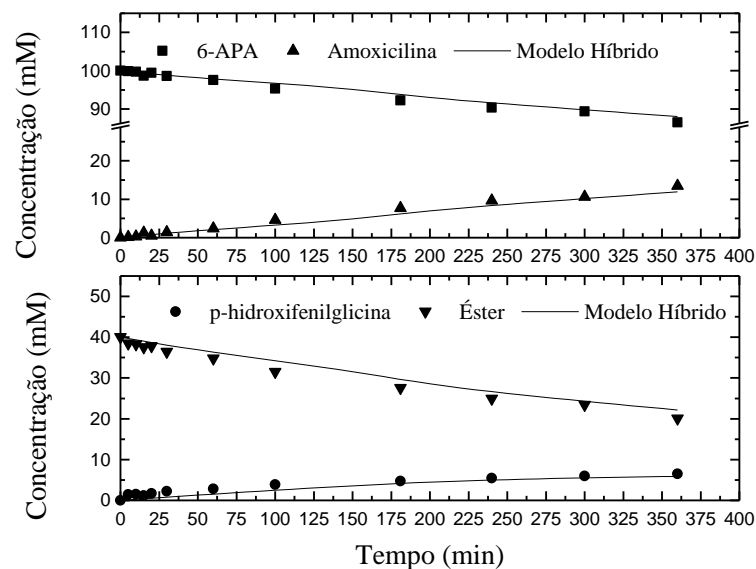


Figura 5.106 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 100 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 40 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$.

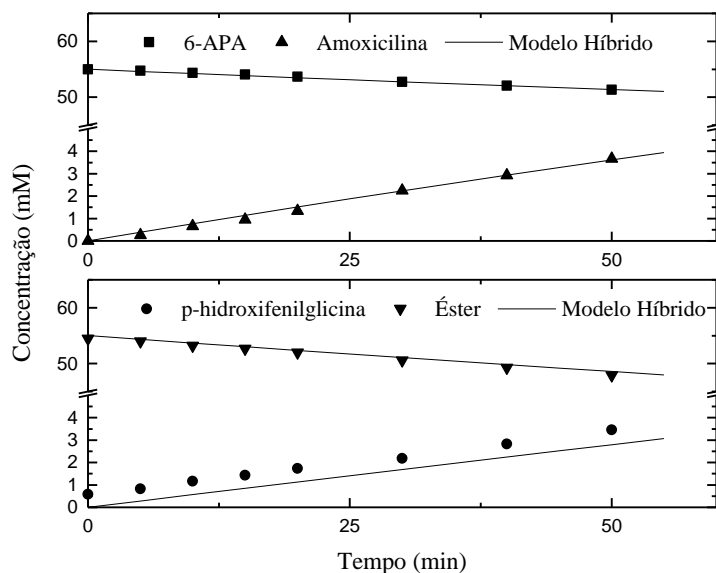


Figura 5.107 - Comparação entre dados experimentais de síntese de amoxicilina e dados simulados (modelo híbrido 2) para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 55 \text{ mM}$, $C_{\text{Éster}0} = 55 \text{ mM}$, 25°C e $\text{pH } 6,5$.

Como se pode observar nas figuras 5.94 a 5.107, o treinamento da rede obtido foi muito bom. No entanto, faz-se necessário validar esse resultados e para isso comparou-se a resposta do modelo híbrido 2 para reator em batelada com dados experimentais não utilizados no treinamento. As figuras 5.108 a 5.115 mostram a validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina a pH 6,5 e 7,5 (ver item 5.11.2). A resposta do modelo híbrido 2 para o reator em batelada apresenta resultados muito bons quando comparados a dados experimentais de síntese, tanto a pH 7, 5 quanto a pH 6,5. Este modelo será utilizado, portanto, para representar o processo de síntese enzimática de amoxicilina.

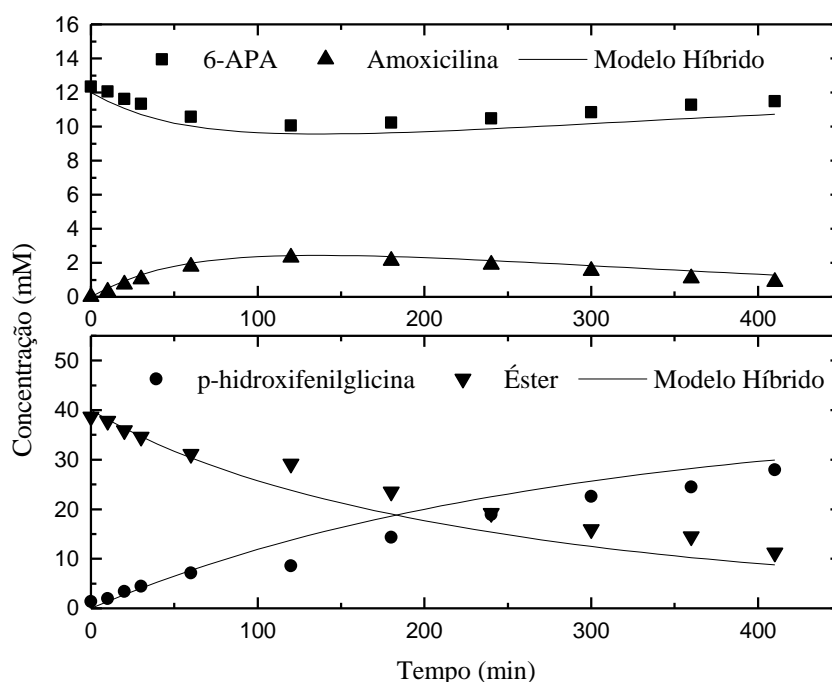


Figura 5.108 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 12$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 40$ mM, 25°C e pH 6,5.

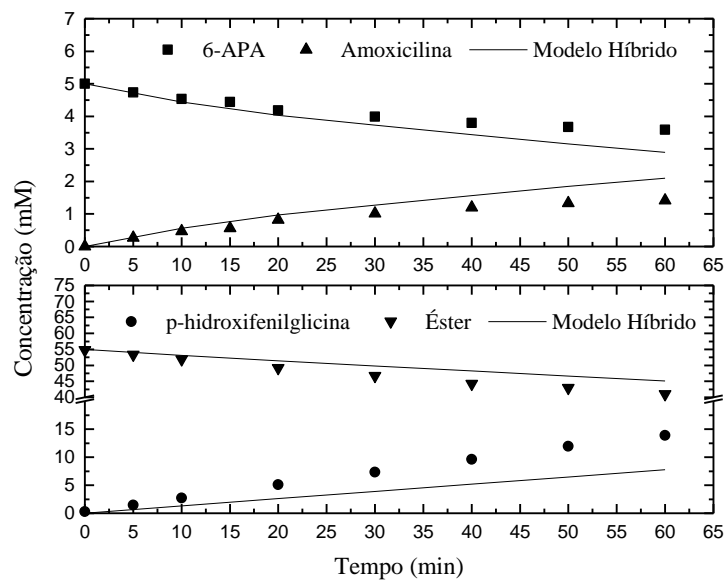


Figura 5.109 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 55$ mM, 25°C e pH 6,5.

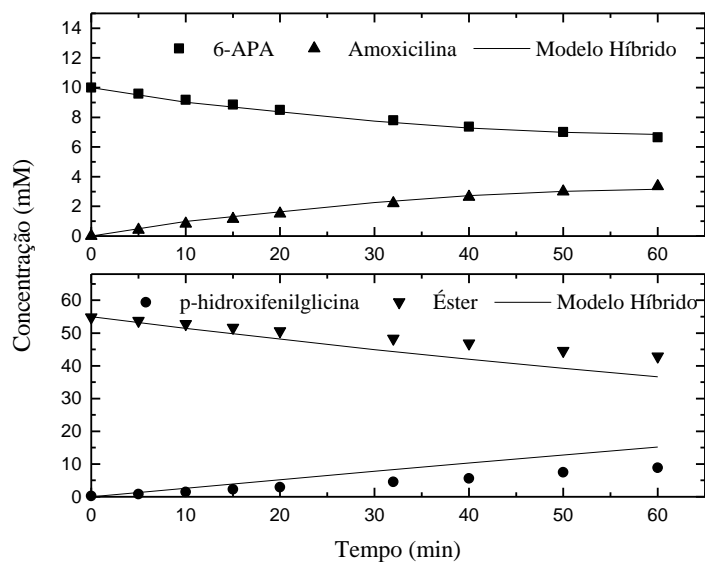


Figura 5.110 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 10$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 55$ mM, 25°C e pH 6,5.

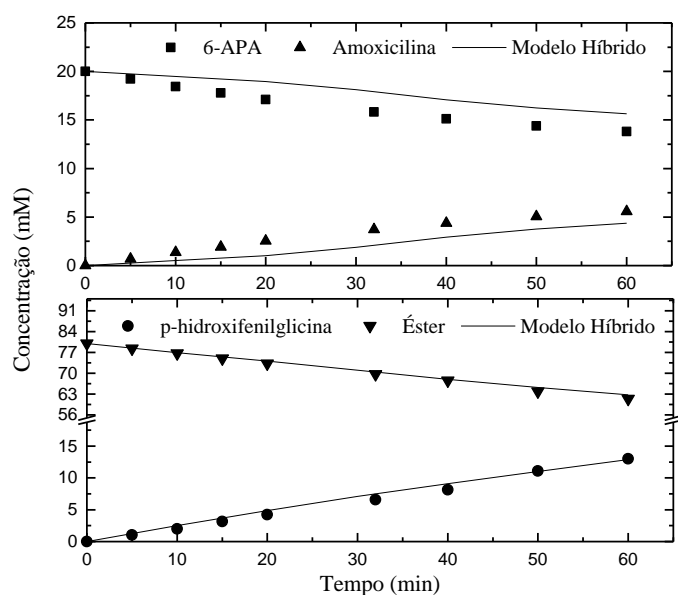


Figura 5.111 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 20$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 80$ mM, 25°C e pH 6,5.

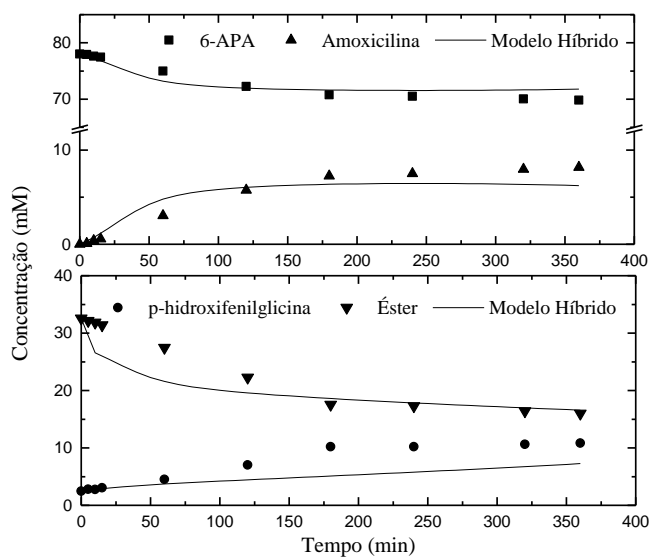


Figura 5.112 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 78$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 35$ mM, 25°C e pH 6,5.

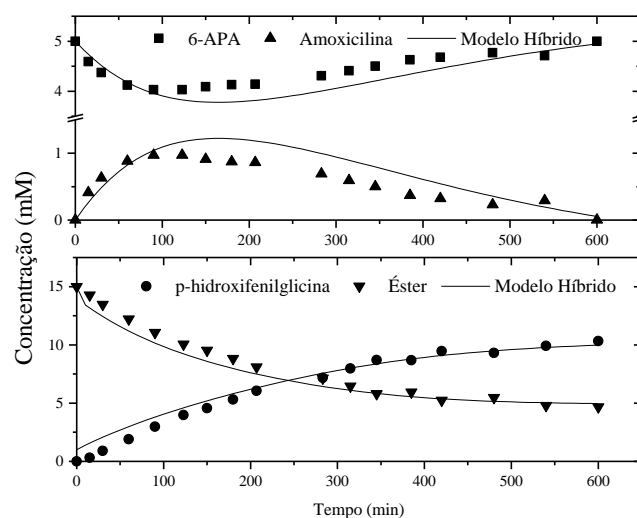


Figura 5.113 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 15$ mM, 25°C e pH 7,5.

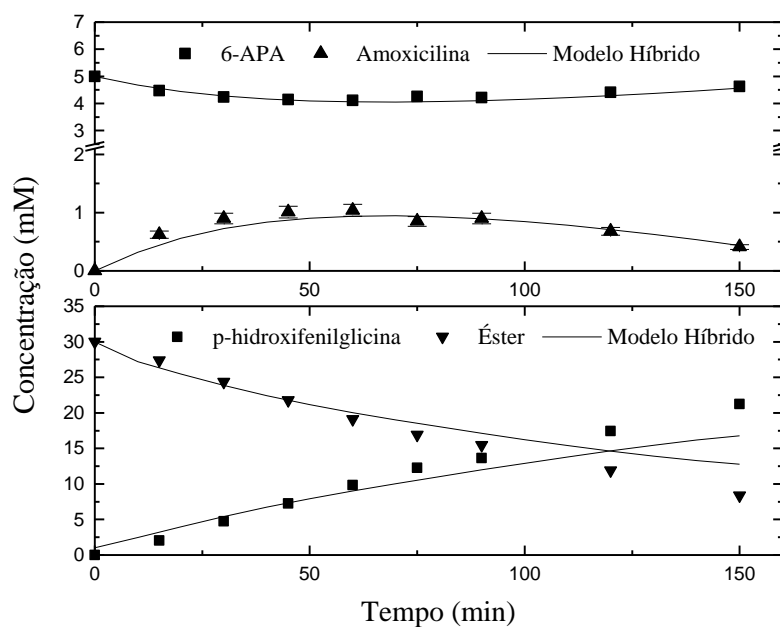


Figura 5.114 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 5$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 30$ mM, 25°C e pH 7,5.

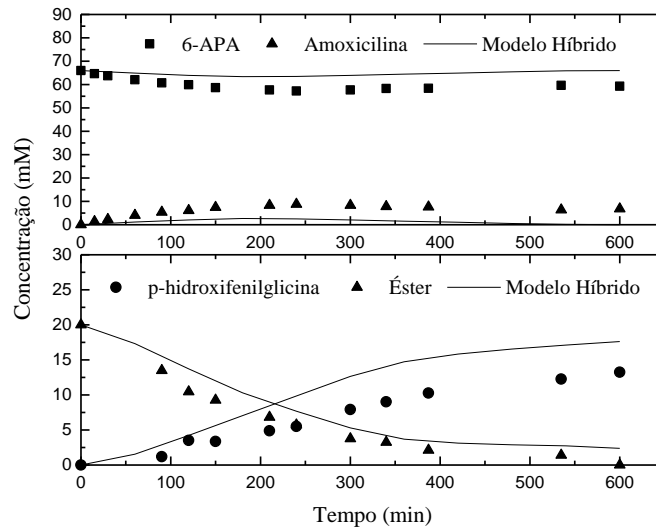


Figura 5.115 – Validação do modelo híbrido 2 para síntese de amoxicilina e dados simulados para as condições experimentais do treinamento da rede: $C_{6\text{-APA}0} = 66$ mM, $C_{\text{Éster}0} = 20$ mM, 25°C e pH 7,5.

5.12 – Otimização das Condições Iniciais de Síntese de Amoxicilina em Reator Batelada: Concentração de Substratos e pH do Meio Reacional.

O modelo híbrido 2 foi utilizado para simular a reação de síntese de amoxicilina para diferentes concentrações de substratos em dois valores de pH (6,5 e 7,5). Definem-se:

- Rendimento em relação ao substrato núcleo (R_{NH}) \Rightarrow

$$R_{NH} = \frac{C_{AN}}{C_{NH0}} * 100;$$
- Rendimento em relação ao substrato éster (R_{AB}) \Rightarrow

$$R_{AB} = \frac{C_{AN}}{C_{AB0}} * 100;$$
- Seletividade (S_{AN}) $\Rightarrow S_{AN} = \frac{C_{AN}}{C_{AB0} - C_{AB}} * 100;$
- Produtividade (P_{AN}) $\Rightarrow P_{AN} = \frac{C_{AN}}{t_{\max}}$, onde t_{\max} é o tempo de reação para atingir a máxima concentração de amoxicilina;

- Δt como sendo o intervalo de tempo que a concentração de amoxicilina é igual ou maior do que 95% da concentração máxima.

As tabelas 5.27 e 5.28 mostram dados obtidos na simulação para a síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5 e 7,5, respectivamente. A tendência dos dados mostrados nessas tabelas se repete para as outras condições iniciais testadas. Pode se observar que os rendimentos de síntese são sempre maiores a pH 6,5. Além disso, a seletividade e a produtividade de amoxicilina também são maiores neste pH. Portanto, concluiu-se que o pH 6,5 é mais favorável, que o pH 7,5, para a síntese de amoxicilina.

Tabela 5.27 - Otimização da concentração inicial de substrato na síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5

C_{NH} (mM)	C_{AB} (mM)	C_{AN} (mM)	t_{max} (min)	Δt (min)	R_{AB} (%)	R_{NH} (%)	S_{AN}	P_{AN} (mM/h)
30	10	1,97	160	120	6,58	19,73	15,76	0,74
30	20	4,00	320	220	13,34	20,01	32,57	0,75
30	30	5,65	340	180	18,83	18,83	36,36	1,00
30	40	6,00	260	160	18,47	13,86	37,85	1,28
30	50	6,70	300	160	22,32	13,39	39,57	1,34

Tabela 5.28 - Otimização da concentração inicial de substrato na síntese de amoxicilina a 25°C e pH 7,5

C_{NH} (mM)	C_{AB} (mM)	C_{AN} (mM)	t_{max} (min)	Δt (min)	R_{AB} (%)	R_{NH} (%)	S_{AN}	P_{AN} (mM/h)
30	10	1,19	210	130	3,96	11,89	8,02	0,34
30	20	2,52	290	180	8,41	12,61	14,81	0,52
30	30	3,75	340	170	12,50	12,50	19,99	0,66
30	40	4,40	290	100	14,67	11,00	25,00	0,91
30	50	4,38	250	80	14,60	8,76	25,70	1,05

A figura 5.116 mostra o gráfico da seletividade da reação de síntese de amoxicilina em função da concentração inicial de núcleo (C_{NH0}) e éster (C_{AB0}), a 25°C e pH 6,5. Observa-se um ponto de máximo para alta concentração de C_{NH0} e baixa concentração de C_{AB0} , ponto esse que seria um provável candidato para operação do reator batelada.

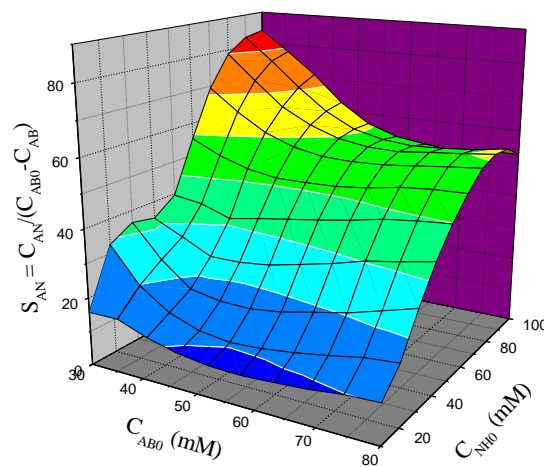


Figura 5.116 - Seletividade da reação de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

A figura 5.117 mostra um gráfico da seletividade da reação de síntese em função da concentração inicial de núcleo (C_{NH0}) para três concentrações iniciais de éster (C_{AB0}).

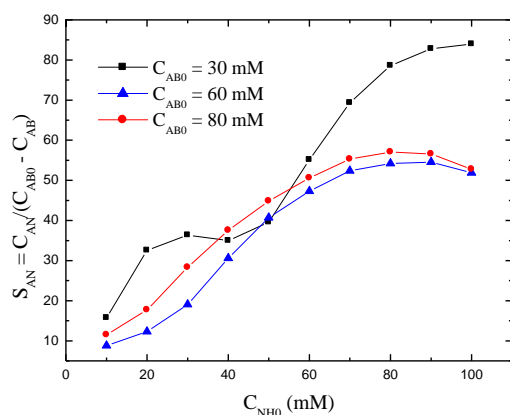


Figura 5.117 - Seletividade da reação de síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5, em função da concentração inicial de núcleo.

Podemos observar que, para valores baixos de C_{NH0} , o aumento da concentração de núcleo melhora a seletividade. Porém, a curva passa por um máximo e altas concentrações de núcleo pioram a seletividade. Pode-se concluir que esse comportamento é causado pela inibição da velocidade de síntese de amoxicilina pelo 6-APA (inibição por excesso de substrato). Efeito inibitório já foi detectado anteriormente durante estudos do efeito desse substrato nas velocidades iniciais do processo de síntese (item 5.7).

A figura 5.118 mostra um gráfico da seletividade da reação de síntese em função da concentração inicial de éster para três concentrações iniciais de núcleo. A figura 5.119 mostra o gráfico de concentração de amoxicilina em função da concentração inicial de núcleo (C_{NH0}) e éster (C_{AB0}), para síntese a 25°C e pH 6,5.

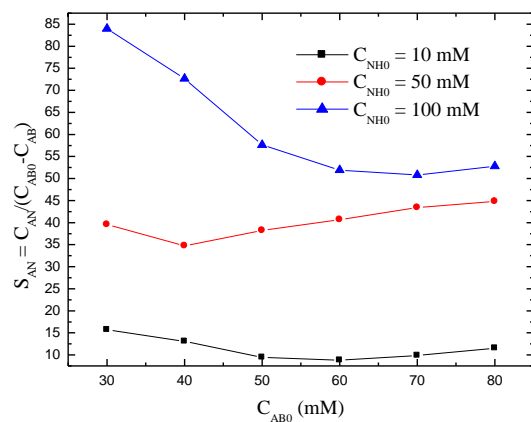


Figura 5.118 - Seletividade (S_{AN}) em função da concentração inicial de éster, síntese de amoxicilina a 25°C e pH 6,5.

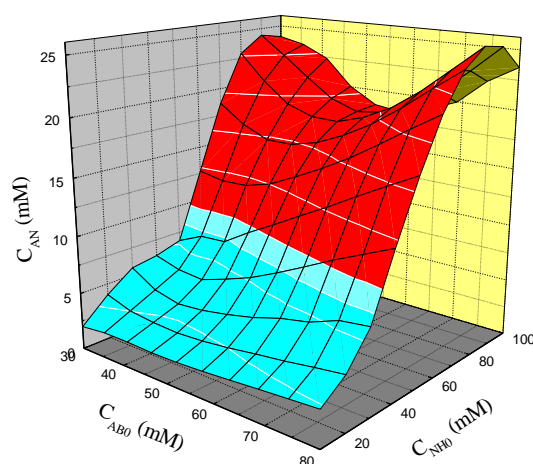


Figura 5.119 - Concentração de máxima de amoxicilina formada na síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.

A região azul (figura 5.119) representa a concentração de amoxicilina solúvel no meio de reação e a região vermelha, o momento que há precipitação e a concentração do produto no líquido fica constante em 8,33 mM. A precipitação de amoxicilina durante a reação de síntese é bastante interessante sob o ponto de vista do rendimento reação. Como este produto sofre hidrólise, sua retirada contínua (precipitação) minimiza esta reação indesejável. Além disso, como a

concentração de antibiótico será sempre baixa no meio reacional, o efeito inibitório do 6-APA na reação de hidrólise será sempre marcante. As figuras 5.120, 5.121 e 5.122 mostram a concentração de éster consumido, ácido formado (p-hidroxifenilglicina) e amoxicilina produzida, respectivamente, no ponto de máxima concentração de antibiótico formado durante a síntese.

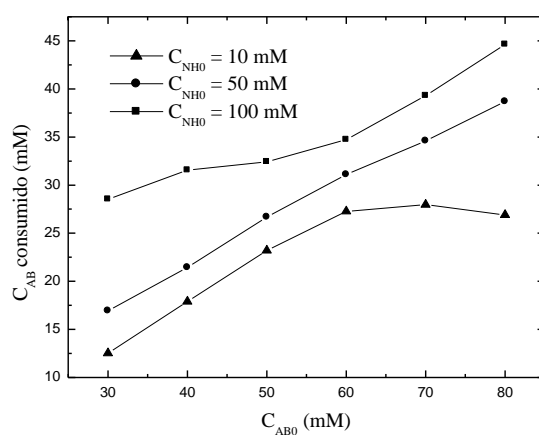


Figura 120 - Concentração de éster consumido no ponto de máxima concentração de amoxicilina durante síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.

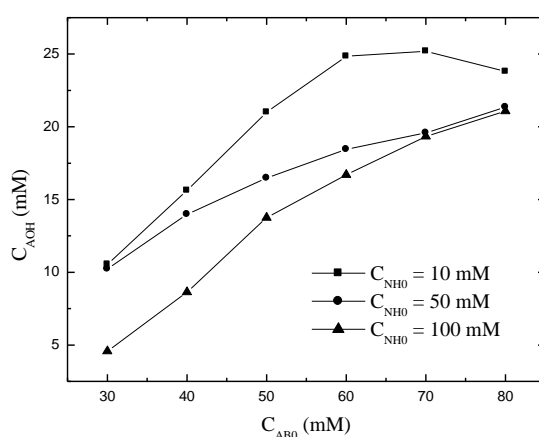


Figura 5.121 - Concentração de ácido formado no ponto de máxima concentração de amoxicilina durante síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.

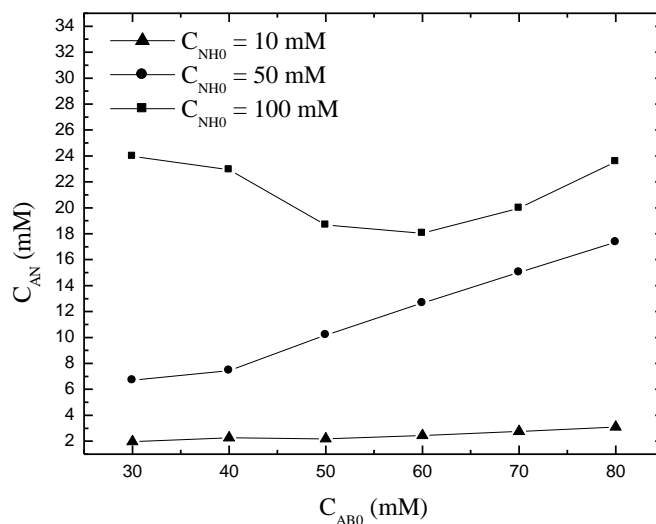


Figura 5.122 - Concentração máxima de amoxicilina durante síntese enzimática a 25°C e pH 6,5.

Pode-se observar que a seletividade e a concentração de amoxicilina em função da concentração inicial de éster (figuras 5.118, 5.119 e 5.122) passam por um ponto de mínimo. Esse comportamento é causado pela adição de diversos efeitos (anteriormente estudados – itens 5.5 e 5.7) que atuam no complexo sistema reacional, tais como: inibição por 6-APA e inibição por p-hidroxifenilglicina. O comportamento das curvas mostradas nas figuras 5.118 e 5.122 para 100 mM de núcleo pode ser causado por:

- inibição da reação de síntese de amoxicilina pelo 6-APA causando a diminuição da velocidade e da produção do antibiótico, resultando em baixa seletividade;
- inibição da hidrólise de éster pela alta produção de p-hidroxifenilglicina levando a diminuição da velocidade desta reação e a um conseqüente aumento na seletividade. A figura 5.121 mostra que há uma alta produção de AOH quando C_{AB0} é alto.

Comparando ainda as figuras 5.120 e 5.121 podemos observar que a velocidade de formação de AOH diminui com o aumento da concentração inicial

de éster enquanto que a velocidade de consumo de éster permanece alta (para $C_{NH0} = 50$ ou 100mM). Neste caso, o AOH formado inibe preferencialmente a reação de hidrólise de éster causando um aumento na seletividade S_{AN} . Quando $C_{NH0} = 10\text{mM}$, a concentração de núcleo no meio é muito baixa e o aumento da concentração inicial não promove um aumento significativo na velocidade de síntese. Neste caso, podemos observar que a alta produção de ácido (AOH) inibe inclusive a velocidade de consumo de éster, uma vez que a reação de hidrólise prevalece sobre a síntese devido à baixa concentração de núcleo no meio reacional, indicando que essas condições iniciais devem ser evitadas. Na figura 5.122 se observa também o efeito inibitório de altas concentrações de núcleo na formação de amoxicilina.

A figura 5.123 mostra o gráfico do rendimento R_{NH} em função da concentração inicial de núcleo (C_{NH0}) e éster (C_{AB0}), para síntese a 25°C e pH 6,5. Também nesta figura pode-se ver que altas concentrações de 6-APA nem sempre são favoráveis ao rendimento de síntese.

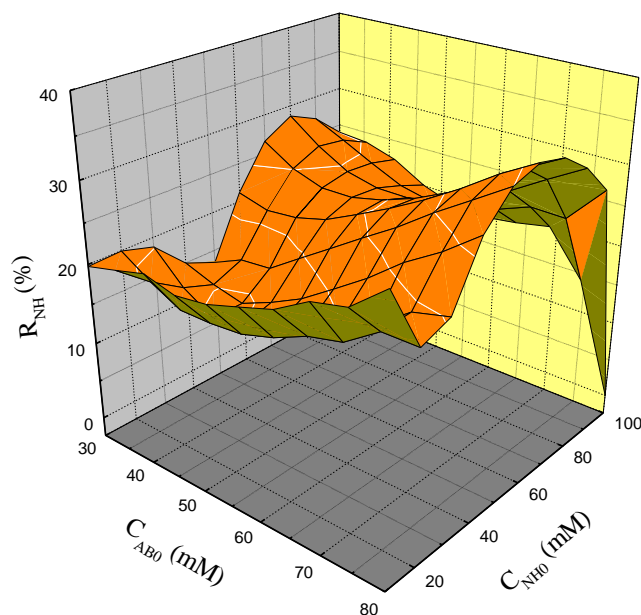


Figura 5.123 - Rendimento de síntese de amoxicilina (R_{NH}) a 25°C e pH 6,5.

O ponto de máxima seletividade é $C_{NH0} = 100\text{mM}$ e $C_{NH0} = 30\text{mM}$. Contudo, evidentemente, deve ser um ponto de baixa produtividade. É possível também que altas concentrações de éster e núcleo possam conduzir a uma recuperação da seletividade S_{AN} , o que já pode ser observado para $C_{NH0} = 100\text{mM}$ e $C_{NH0} = 30\text{mM}$. Cabe ressaltar que a hidrólise do antibiótico sempre sofrerá inibição das altas concentrações de núcleo e ácido. Portanto, novos ensaios devem ser realizados com altas concentrações de substrato (maiores que as aqui utilizadas) pois a operação no ponto de saturação de éster e núcleo provavelmente conduzirá a um melhor desempenho do reator.

Na figura 5.124 vê-se o gráfico da produtividade de amoxicilina em função da concentração inicial de núcleo (C_{NH0}) e éster (C_{AB0}), para síntese a 25°C e pH 6,5. Pode se observar que há um ponto de máximo para altas concentrações de éster e de núcleo. Ou seja, obtém-se a maior quantidade de amoxicilina produzida no menor tempo de reação, quando se alimenta o reator com altas concentrações

de ambos substratos. Este seria outro ponto interessante de se operar o reator batelada, uma vez que se minimiza o tempo de reação. A figura 5.125 mostra um detalhe da figura 5.124, ou seja, a variação da produtividade em função da concentração inicial de núcleo, para três diferentes concentrações iniciais de éster.

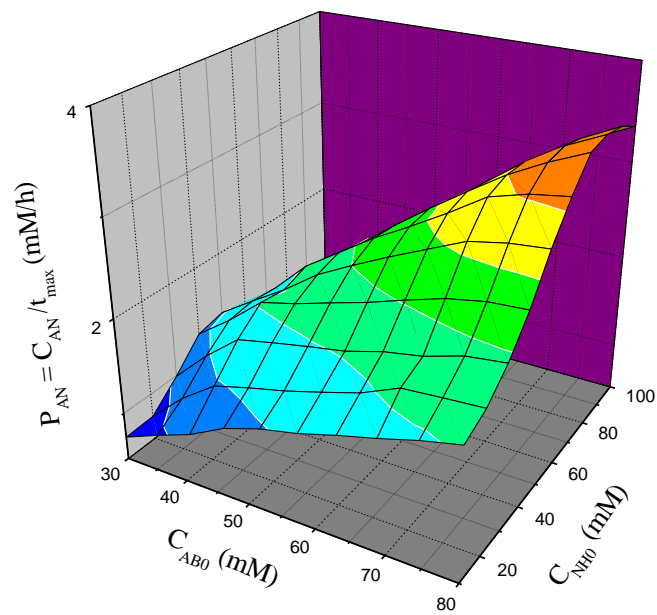


Figura 5.124 - Produtividade de amoxicilina (P_{AN}) durante síntese a 25°C e pH 6,5.

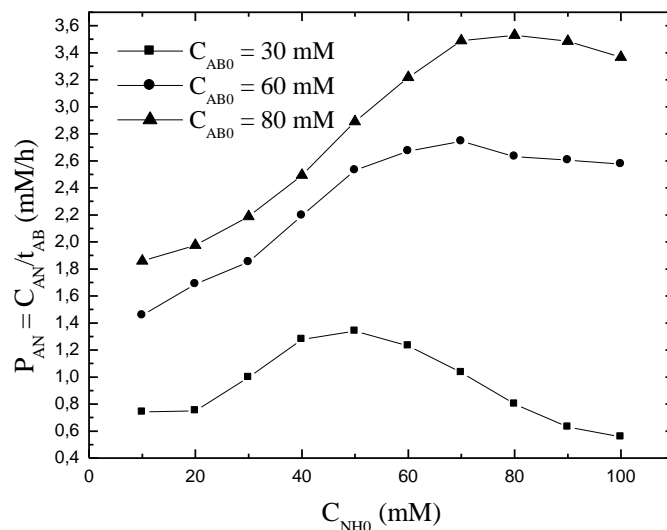


Figura 5.125 - Produtividade de amoxicilina (P_{AN}) em função da concentração de 6-APA, durante síntese a 25°C e pH 6,5.

Se compararmos a seletividade e a produtividade de amoxicilina para escolher as condições iniciais de operação do reator batelada, vemos que há duas alternativas:

- Baixa concentração de éster (30mM) e alta concentração de 6-APA (100mM) \Rightarrow ponto de maior seletividade;
- Alta concentração de éster (80mM) e alta concentração de 6-APA (80mM) \Rightarrow ponto de maior produtividade;

Como se pode ver, o ponto de melhor seletividade não é o de maior produtividade. Pior, o ponto de máxima seletividade é também o de mínima produtividade. Variou-se, então, a concentração de enzima no reator para esses dois casos. O objetivo era avaliar se um aumento na concentração de enzima seria capaz de aproximar os valores de produtividade obtidos para os dois casos (a e b).

Como podemos observar na figura 5.126, não se obteve sucesso com esta estratégia.

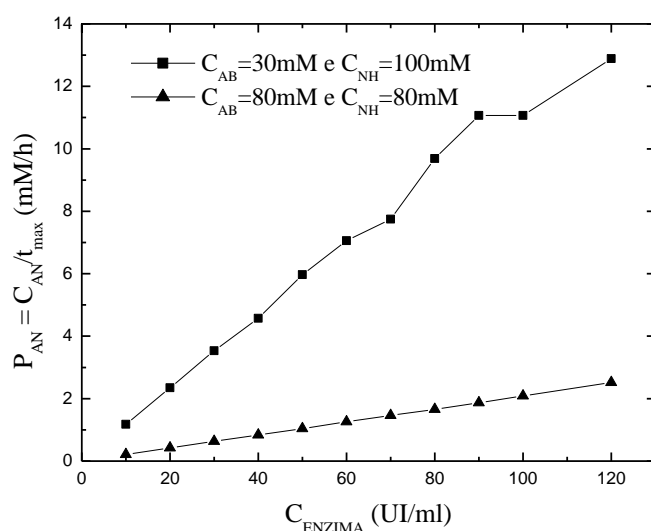


Figura 5.126 - Produtividade de amoxicilina (P_{AN}) em função da concentração de enzima no reator para concentração de éster e 6-APA fixas a 25°C e pH 6,5.

Desta forma, a escolha das condições iniciais para a síntese de amoxicilina em reator batelada estará condicionada a uma análise econômica do processo. É necessário saber o que seria mais vantajoso: operar o reator por um tempo mais longo ou usar excesso de éster. Outro ponto importante é a questão da estabilidade das espécies químicas. É necessário averiguar como é sua cinética de desativação em função do tempo para avaliar a viabilidade de um longo tempo de reação.

Os resultados aqui obtidos sugerem a utilização de um reator semi-batelada, com alimentação de um ou mais substratos. Fogler, 1999 indica este tipo de reator quando há hidrólise indesejada do substrato, o que é o caso desta reação.

Capítulo 6 – Conclusões e Sugestões

6.1 - Conclusões

Os resultados obtidos indicaram que à temperatura de 4°C e pH 6,5 a hidrólise do antibiótico é mais desfavorecida do que a hidrólise do éster. Desta forma, a síntese de amoxicilina deve ser mais favorecida nesta condição uma vez que consideramos que a hidrólise do éster está intimamente relacionada à formação do complexo acil-enzima, que deverá render produto. Note que esta será uma solução de compromisso entre a seletividade e a produtividade da reação pois ambas as reações são afetadas negativamente. A diminuição nas velocidades de hidrólise implica também no aumento do tempo de reação.

O modelo cinético semi-empírico para amoxicilina, elaborado em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Enzimática do ICP/CSIC, Madri, Espanha, mostrou-se satisfatório apenas quando comparado a dados experimentais de síntese a pH 7,5 e 6,5 e T=25°C usando derivado com 10UI/ml de gel, para uma faixa de concentração inicial de substratos. Mas falhou para representar dois outros casos: síntese com altas concentrações de substrato a pH 6,5 e T=25°C usando derivado com 10UI/ml de gel e síntese a pH 6,5 e T=25°C usando derivado com 400UI/ml de gel. Esses resultados indicaram que o modelo cinético semi-empírico deveria ser melhorado. Para o caso do ensaio com derivado 400UI/ml de gel, a causa da má representação é a existência de problemas de transferência de massa, que não foram considerados no modelo. Adaptou-se o modelo cinético semi-empírico de maneira a levar em conta o efeito da difusão intrapartícula. Os resultados obtidos indicam que derivados contendo altas cargas de enzima imobilizada apresentam limitação difusional. A causa mais provável

para essa restrição é a própria molécula de enzima, que constitui uma barreira à difusão dos solutos através dos poros do suporte. Pelos resultados obtidos, acredita-se que essa barreira é mais significativa na entrada dos poros e não varia com a carga enzimática, acima de um certo patamar (90UI/ml de gel). O modelo matemático proposto se mostrou eficiente para representar o sistema reacional e os coeficientes de difusão intrapartícula estimados são coerentes quando comparados com os valores de difusão em água e com valores disponíveis em literatura.

As simulações da síntese de amoxicilina utilizando o modelo cinético semi-empírico indicam que a adsorção do núcleo é fator importante no rendimento de síntese, tornando interessante a busca de um derivado que melhore essa propriedade. Além disso, a extração do antibiótico recém formado também aumenta o rendimento de síntese, o que nos indica que se devem buscar sistemas que tornem essa prática possível. A tentativa de se representar a síntese de amoxicilina em meio bifásico com o modelo semi-empírico foi frustrada devido provavelmente a problemas de transporte de massa, uma vez que se utilizou o derivado com 400UI/ml de gel, e a alterações nos parâmetros cinéticos, já que a enzima é colocada em um meio de sulfato amônio/tampão fosfato, diferente do meio em que os parâmetros foram estimados.

Os estudos feitos sobre a hidrólise de éster metílico de p-hidroxifenilglicina por PGA imobilizada permitiram concluir que esta reação não é reversível, sofre inibição por p-hidroxifenilglicina e por metanol, sendo que este último apenas inibe a hidrólise quando presente em altas concentrações.

A reação de hidrólise de amoxicilina é inibida, de forma competitiva, por seus produtos: p-hidroxifenilglicina e 6-APA. No caso do núcleo antibiótico, a inibição se dá apenas quando altas concentrações estão presentes no meio reacional.

Ensaio com e sem saturação da enzima com o núcleo antibiótico, utilizando enzima livre e imobilizada não permitiram concluir que o núcleo deve se adsorver ao sítio ativo antes da formação do complexo acil-enzima, mas mostrou que a reação de hidrólise pode ocorrer na presença ou na ausência do núcleo adsorvido. O atraso observado na hidrólise de amoxicilina para o caso em que se utilizaram altas concentrações de 6-APA confirma a inibição pelo núcleo detectada nos ensaios de hidrólise. Estes ensaios indicaram que a água pode atacar o complexo acil-enzima estando ou não núcleo adsorvido na enzima, pois pode-se observar que a hidrólise do éster acontece tanto nos ensaios com saturação quanto nos sem saturação com 6-APA.

Estudos de velocidade inicial, para diferentes concentrações iniciais de núcleo, indicaram que este substrato atua como inibidor/ativador da formação do complexo acil-enzima durante a síntese de amoxicilina. Este efeito é mais acentuado a pH 6,5 (quando há maior adsorção do núcleo à enzima) do que a pH 7,5.

A partir de toda a informação levantada experimentalmente e disponível em literatura, propôs-se mecanismo cinético para o processo de síntese e deduziram-se as expressões de velocidade correspondentes. A implementação do modelo cinético mecanístico, no entanto, não foi possível devido à complexidade de suas equações e ao grande número de parâmetros que o compõem. Algumas

simplificações no mecanístico foram feitas, como por exemplo ignorar o efeito inibitório do 6-APA na reação de hidrólise de éster e síntese de amoxicilina, para tentar uma representação do processo de síntese. Esta tentativa, porém, não surtiu o resultado esperado e as equações resultantes não foram capazes de representar o sistema.

A técnica de redes neurais artificiais diretas (“feedforward”) se mostrou muito eficiente na representação do processo de síntese enzimática de amoxicilina. O treinamento de duas redes, com dados de velocidades iniciais de síntese e hidrólise de amoxicilina e de hidrólise de éster, foi bem sucedido. A validação com dados de velocidade inicial foi satisfatória. No entanto, o uso dessas redes para representar dados em batelada de síntese de amoxicilina, modelo híbrido 1, não foi possível pois o modelo só se mostrou capaz de prever o início dos ensaios. Este resultado já era esperado, uma vez que não se forneceram à rede informações sobre os efeitos inibitórios das diversas espécies químicas envolvidas na reação de síntese.

O modelo híbrido foi reestruturado e as velocidades de formação/consumo de amoxicilina e formação de p-hidroxifenilglicina foram utilizadas para representar a reação enzimática. Desta maneira, duas novas redes foram treinadas, agora com dados cinéticos obtidos em ensaios de síntese de amoxicilina em batelada. O número de neurônios na camada oculta e o número de apresentações do conjunto de dados à rede foi escolhido após estudos da influência dessas variáveis na resposta da rede. O número ótimo de neurônios foi de 25, para pH 6,5, e 20, para pH 7,5. O número ótimo de apresentações foi de 2000 e 15000 para a velocidade de formação/consumo de amoxicilina a 25°C e pH 6,5 e 7,5, respectivamente. Para a velocidade de formação de p-hidroxifenilglicina, 100000 apresentações foram usadas para treinar a rede para os dois valores de pH. O modelo híbrido 2, que utilizava as redes treinadas com dados em batelada, se mostrou adequado para

prever o curso de reação de síntese de amoxicilina a 25°C tanto para pH 6,5 quanto para pH 7,5. Nos ensaios de validação, obteve-se uma boa concordância entre a resposta do modelo híbrido 2 e os dados experimentais.

Face aos resultados obtidos, utilizou-se o modelo híbrido 2 para buscar condições ótimas de operação do reator, tais como pH e concentração inicial de substratos. Pode-se concluir que o pH 6,5 seria o mais adequado para a síntese de amoxicilina, uma vez que os rendimento de síntese, a produtividade e a seletividade de amoxicilina são maiores neste pH. No caso das concentrações iniciais de substrato para reator em batelada, há dois possíveis pontos de operação: $C_{AB0} = 80\text{mM}$ e $C_{NH0} = 80\text{mM}$ ou $C_{AB0} = 30\text{mM}$ e $C_{NH0} = 100\text{mM}$, que correspondem, respectivamente, ao ponto de máxima produtividade e máxima seletividade. A escolha final dependerá de uma análise econômica do processo como um todo, levando em consideração não só a operação do reator mas também a purificação dos produtos e a recuperação dos substratos não consumidos na reação.

Os resultados obtidos durante a busca de condições ótimas de operação para o reator batelada mostraram que algumas condições operacionais favorecem a precipitação de amoxicilina no decorrer da reação de síntese. Esta é uma vantagem que deve ser aproveitada uma vez que a retirada contínua de produto do líquido evita a reação indesejável de hidrólise do antibiótico.

6.2 - Sugestões

Como recomendações finais para dar continuidade a este trabalho podemos sugerir:

- Novo treinamento da rede neural para a síntese enzimática de amoxicilina, ampliando a faixa de concentração inicial do 6-APA, de maneira a se permitir simular o comportamento do reator em condições de maior excesso deste substrato.
- Otimização da síntese enzimática de amoxicilina em reator batelada alimentada, uma vez que os resultados obtidos com o reator batelada indicam que alimentação de substratos no decorrer da reação poderia ser vantajosa.
- Estudos difusivos mais detalhados e determinação de difusividades efetivas para todas as espécies químicas envolvidas na síntese enzimática de amoxicilina, para poder avaliar a utilização de derivados enzimáticos com alta carga enzimática.

Referências Bibliográficas

- ABELES, R.H.; FREY, P.A. e JENCKS, W.P. Biochemistry. Jones and Bartlett Publishers, Nova Iorque, 1992. 838p.
- ANDERSSON, E.; MATTIASSON, B. e HAHN-HÄGERDAL, B. Enzymatic conversion in aqueous two-phase systems: deacylation of 6-aminopenicilanic acid with penicillin acylase. Enz. Microb. Technol., vol. 06, 301-306, 1984.
- ANDERSSON, E. e HAHN-HÄGERDAL, B. Enzyme action in polymer and salt solutions. I Stability of penicillin acylase in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate solutions in relation to water activity. Biochim. Biophys. Acta, 912, 317-324, 1987.
- ANDERSSON, E. e HAHN-HÄGERDAL, B. Penicillin acylase activity and stability in PEG solutions. Annals New York Academy of Sciences, 85-87, 1988.
- BALASINGHAM, K.; WARBURTON, D.; DUNNILL, P. e LILLY, M.D. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, vol 276, 250-256, 1972.
- BHARUCHA, K.R.; SCHERENK, H. M. E SLEMON, C. E. US Patent 4.248.780, 1981.

- BLINKOVSKY, A.M.; MARKARYAN A. N. Synthesis of β -lactam antibiotics containing α -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide Amidohydrolase. Enz. Microbiol. Technol., vol. 15, 965-973, 1993.
- BOCCU, E.; EBERT, C.; GARDOSI, L.; GIANFERRARA, T. ZACCHIGNA, M. e LINDA, P. Enzymatic synthesis of ampicillin: a chemometric optimization. Il Farmaco, vol. 46, n°04, 565-577, 1991.
- BÖCK, A.; WIRTH, R.; SCHMID, G.; SHUMACHER, G. LANG, G. e BUCKEL, P. The Penicillin Acylase from Escherichia coli ATCC11105 Consists of Two Dissimilar Subunits. FEMS Microbiol. Letters, vol.20, 135-139, 1983.
- BOESTEN, W. H.J.; MOODY, H. M. E ROOS, E.C. Process for recovering of ampicillin. US Patent 5.916.762, 1999.
- BRANNIGAN, J.A.; DODSON, G.; DUGGLEBY, H.J.; MOODY, P.C.E.; SMITH, J.L.; TOMCHICK, D.R. e MURZIN, A.G. A protein framework with an N-terminal nucleophile is capable of self activation. Nature, vol. 378, 416-419, 1995.
- BRUGGINK, A.; ROOS, E.C. e DE VROOM, E. Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. Organic Process Research & Development, vol. 2, 128-133, 1998.
- BRYJAK, J. e NOWORYTA, W. Kinetic behavior of penicillin acylase immobilized on acrylic carrier. Bioprocess Engineering, vol. 9, 37-42, 1993.

CARDIAS, H. T. C. Estudo da síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos catalisada por diferentes derivados de penicilina G acilase. São Carlos, SP, UFSCar, 2000. (Tese)

CENTELLAS, V.; DIAGO, J.; LUDESCHER, J. US Patent nº 5.998.610, 1999.

CHEETHAM, P.S.J. *What makes a good biocatalyst?* Journal of Biotechnology, vol. 66, 3-10, 1998.

CHIBATA, I. Immobilized Enzymes Research and Development. John Willey and Sons, Nova Iorque, 1978. 283p.

CHOI, W.G.; LEE, S.B.; RYU, D.D.Y. Cephalexin Synthesis by Partially Purified Enzymes. Biotechnology and Bioengineering, vol. 23, 361-371, 1981.

CLAUSEN, K. E DEKKERS, R.M. Process for preparation of β -lactams at constantly high concentration of reactants. US Patent nº 6.048.708, 2000.

CLAUSEN, K.; NIELSEN, A.; PETERSON, N. E NIKOLOV, A. Acylation method for penicillins and cephalosporins. US Patent nº 5.753.458., 1998.

CLAUSEN, K. Method for the preparation of certain β -lactam antibiotics, US Patente nº 5.470.717, 1995.

COLE, M. Penicillins and Other Acylamino Compounds Synthesized by Cell-Bound Penicillin Acylase of *Escherichia coli*. Biochem. Journal, vol. 115, 747-756, 1969a.

COLE, M. Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxypenicillins by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. Biochem. Journal, vol. 115, 757-764, 1969b.

COWLEY, B.R. e MARTIN, D.G. Process for preparing penicillin antibiotics, US Patent nº 3.971.775, 1976.

CROCI, M. E COTTI, G., Manufacture of semi-synthetic penicillins antibiotics, US Patent nº 4.181.656, 1980a.

CROCI, M. E COTTI, G. Manufacture of semi-synthetic penicillins antibiotics, United States Patent nº 4.182.709, 1980b.

CRUZ, A.G. Modelagem fenomenológica e simulação por redes neurais do bioprocesso de produção de Penicilina G. São Carlos, SP, UFSCar, 1996. 150p. (Dissertação)

DAUMY, G.O.; DANLEY, D. e McCOLL, A. Role of Protein Subunits in *Proteus rettigeri* Penicillin G Acylase. Journal of Bacteriology, vol. 163, nº 3, 1279-1281, 1985.

De VROOM, E. US Patent nº 6.060.268, 2000.

DIAGO, J. e LUDESCHER, J. β -lactam production. US Patent nº 5.719.276, 1998a.

DIAGO, J. e LUDESCHER, J. Processes for the production of alpha-aminoacyl-penicillin and 7-alpha. US Patent nº 5.840.885, 1998b.

DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J.; VAN DER DOES, T.; ZOMERDIJK, M. e HEIJNEN, J.J. Course of pH during the formation of amoxicillin by a suspension-to-suspension reaction. Enzyme Microb. Technol., 27, 576- 582, 2000.

DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J.; VAN DER WIELEN, L.A.M.; RAS, C. e HEIJNEN, J.J. Feasibility of the thermodynamic controlled synthesis of

- amoxicillin. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 5, 249- 253, 1998b.
- DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J. e HEIJNEN, J.J. Predicting Enzyme Catalyzed Reaction Equilibria in Cosolvent-Water Mixtures as a Function of pH and Solvent Composition. Biocatalysis and Biotransformation, vol. 16, pp. 275- 289, 1998a.
- DONE, S.H.; BRANNIGAN, J.A.; MOODY, P.C.E. e HUBBARD, R.E. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase. J. Mol. Biol., vol 284, 463-475, 1998.
- DOUGLAS, S.C.; BAILEY, J.E. e DO, D.D. A mathematical model for restricted diffusion effects on macromolecule impregnation in porous supports. Biotechnology and Bioengineering, vol. 27, 208-213, 1995.
- DUGGLEBY, H. J.; TOLLEY, S.P.; HILL, C.P.; DODSON, E.J; DODSON, G.D e MOODY, P.C.E. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. Nature, vol. 373, 264-268, 1995.
- EBERT, C.; GARDOSSI, L. e LINDA, P. Control enzyme hydrolysis in penicillin amidase catalized synthesis of amide bond. Tetrahedron Letters, vol. 52, 9377-9380, 1996.
- FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.; GUISÁN,J.M. The presence of Methanol Exerts a Strong Modulation of the Synthesis of Different Antibiotics by Immobilized Penicillin G Acylase. Enzyme Microbiological Technology, vol. 23, 305-310, 1998.
- FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.;
PIATKOWSKA, B. e GUISÁN,J.M. Synthesis of*

*antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G
acylase: evaluation and optimization of different
synthetic approaches. Enzyme Microbiological
Technology, vol. 19, 9-14, 1996.*

FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.; GUISÁN,J.M. The use of stabilised penicillin acylase derivatives improves the design of kinetically controlled synthesis. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, vol. 101, 91-97, 1995.

FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.; GUISÁN,J.M. Enzyme Reaction Engineering: Synthesis of Antibiotics Catalyzed by Stabilized Penicillin G Acylase in the Presence of Organic Cosolvents. Enzyme Microbiological Technology, vol. 13, 898-905, 1991.

FERNÁNDEZ-SANCHEZ, V. M. Difusão de aminoácidos e proteínas em partículas de gel de agarose. PPG/EQ, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2000. (Dissertação)

FERREIRA, A.L.O. Estudo da síntese enzimática de ampicilina catalisada por penicilina G imobilizada em gel de agarose. PPG/EQ, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1999. (Dissertação)

FOGLER, H.S. Elements of Chemical Reaction Engineering. 3ed. Nova Iorque, Prentice Hall, 1999. 967p.

FORD, J.R.; LAMBERT, A.H.; COHEN, W. e CHAMBERS, R.P. Recirculation reactor system for kinetic studies of immobilized enzymes. Biotechnology & Bioengineering Symposium Series, nº03, 267-284, 1972.

FUGANTI, C.; ROSSEL, C.M.; SERVI, S.; TAGLIANI, A.; TERRENI, M.
Enantioselective Recognition of the Phenacetyl Moiety in the Pen. G Acylase
Catalysed Hydrolysis of Phenylacetate Esters. Tetrahedron Asymmetry, 3/3,
383-388, 1992.

GIORDANO, R.L.C.; SCHMIDELL NETO, W. Estudo Cinético da Hidrólise
Enzimática de Amido: Inibição pela Glicose. Rev. Microbiol., 20(3), 376-81,
1989.

GHOSH, A.C.; BORA, M.M. e DUTTA, N.N. Developments in liquid membrane
separation of beta-lactam antibiotics. Bioseparation, vol. 6, 91-105, 1996.

GROSSMAN, J.H. e HARDCASTLE Jr., G.A., Production of amoxicillin. US
Patent nº 3.980.637, 1976.

*HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O.; FERNÁNDEZ-
LAFUENTE, R.; TERRENI, M. e GUIBAN, J.M. Use
of Aqueous Two-Phase Systems for in Situ Extration
of Water Soluble Antibiotics during their Synthesis
by Enzymes Immobilized on Porous Supports.
Biotechnology and Bioengineering, vol. 59, nº 1, 73-
79, 1998.*

HOU, J.P e POOLE, J.W. The Amino Acid Nature of Ampicillin and Related
Penicillins. Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 58, nº12, 1510-1515,
1969.

HYUN, K.C.; KIM, J.H. e KIM, Y.J. Effect of Water Activity on Enzymatic
Synthesis of Cephalexin. Biotechnology and Bioengineering, vol. 11, nº 8,
537-540, 1989.

- HYUN, K.C.; KIM, J.H. e RYU, D.D. Enhancement Effects of Water Activity on Enzymatic Synthesis of Cephalexin. Biotechnology and Bioengineering, vol. 42, 800-806, 1993.
- ISAKA, K.; SUGA, N. e ISHIMURA, F. Kinetics and mechanism of acyl transfer by penicillin G acylase comparing acyl donors methyl chloroacetate and methyl phenylacetate. Journal of Fermentation and Bioengineering, vol 79, n° 3, 224-228, 1995.
- KAASGAARD, S.G. e VEITLAND, U. Process for preparation of β -lactams utilizing combined concentration of acylating agent plus β -lactam derivative of at least 400mM.. US patent n° 5.525.483, 1996.
- KAASGAARD, S.G. e KARLSEN, L. Processo for separation of two solid components, WO Patente n°92/12782, 1992.
- KARYEKAR, S.K. e HEDGE, M.V. The hydrophobic domain of penicillin acylase is negatively charged. Enzyme Microb. Technol., vol 13, 139-141, 1991.
- KASCHE, V.; HAUFLER, U. e RIECHMANN, L. Equilibrium and kinetically controlled synthesis with enzymes: semisynthesis of penicillins and peptides. Methods in Enzymology. vol. 136, 280-292, 1987.
- KASCHE, V. Mechanism and yields in enzyme catalyzed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. Enzyme Microb. Technol., vol 8, n°4, 4-16, 1986.
- KASCHE, V. Ampicillin and cephalexin synthesis catalysed by *E. coli* penicillin amidase. Yield due to substrate recycling. Biotechnology Letters, 7, 877-882, 1985.

- KASCHE, V.; HAUFLE, U. e ZÖLLNER, R. Kinetic studies on the mechanism of the penicillin amidase-catalysed synthesis of ampicillin and benzylpenicillin. Hoppe-Seyler's Physiol. Chem., 365, 1435-1443, 1984.
- KASCHE, V. Correlation of experimental and theoretical data for artificial and natural systems with immobilized biocatalysts. Enzyme Microb. Technol., vol 5, 2-13, 1983.
- KATO, K. Kinetics of acyl transfer by α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri*. Agric. Biol. Chem., vol 44, n°5, 1083-1088, 1980a.
- KATO, K.; KAWAHARA, K. e TAKAHASHI, T. Enzymatic synthesis of amoxicillin by the cell-bound α -amino acid ester hydrolase de *Xanthomonas citri*. Agric. Biol. Chem., vol 44, n°4, 821-825, 1980b.
- KAWAMORI, M.; HASHIMOTO, Y. e KATSUMATA, R. Enzymatic production of amoxicillin by β -lactamase deficient mutants of *Pseudomonas melagenum* KY 3987. Agric. Biol. Chem., vol. 47, n°11, 2503-2509, 1983.
- KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A.; e MELO, E.H.M. The Immobilization of Enzymes and Cells. Chimicaoggi, 21-29, Maio 1988.
- KHEIROLOMOOM A.; ARDJMAND, M. e KAZEMEIN, M. The stability analysis and modeling of pH and ionic strength inactivation of penicillin G acylase obtained from various species of *Escherichia coli*. Biochemical Engineering Journal, vol. 2, 81-88, 1998.
- KIM, G.M. e LEE, S.B. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of β -lactam antibiotics in water-methanol mixtures: effect of cosolvent content and chemical nature on reaction rates and yields. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 1, 201-211, 1996(a).

- KIM, G.M. e LEE, S.B Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: interaction of organic solvents with enzymes. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 1, 181-190, 1996(b).
- KLIBANOV. A.M. Why are enzymes less active in organic media than in water? Tibtech, vol. 15, 97101, 1997.
- KONECNY, J.; SCHNEIDER, A. e SIEBER, M. Kinetics and mechanism of acyl transfer by penicillin acylases. Biotechnology and Bioengineering, vol. 25, 451-467, 1983.
- KUMAR, R.; SURESH, A. K. e SHANKAR. H.S. Kinetics and reaction of penicillin G hydrolysis. J. Chem. Tech. Biotechnol., vol. 66, 243-250, 1996.
- LINKO, S.; LUOPA, J. e ZHU, Y.-H. Applying neural networks as software sensors for enzyme engineering. Trends in Biotechnology, vol. 17, 155-162, 1999.
- LINKO, S. Expert systems: what can they do for the food industry? Trends in Food Science & Technology, vol. 9, 3-12, 1998.
- LINKO, S.; LUOPA, J. e ZHU, Y.-H. Neural networks as 'software sensors' in enzyme production. Journal of Biotechnology, vol. 52, 257-266, 1997.
- LOUWRIER, A. e KNOWLEST, S.J. The aim of industrial enzymic amoxycillin production: characterization of a novel carboamylase enzyme in the form of a crude cell-free extract. Biotchnol. Appl. Biochem., 25, 143-149, 1997.
- MALADKAR, N.K. Enzymatic production of Cephalexin. Enzyme Microbiological technology, vol. 16, 715-718, 1994.

- MARCONI, W.; BARTOLI, F.; CECERE, F.; GALLI, G. e MORISI, F. Synthesis of Penicillins by Penicillin Acylase Entrapped in Fibres. Agr. Biol. Chem., 39(1), 277-279, 1975.
- MARGOLIN, A. L.; SVEDAS, V.K.S.; BEREZIN, I.V. Substrate Specificity of Penicillin Amidase from *Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta, vol. 616, 283-289, 1980.
- MARTIN, J.; PRIETO, I.; MANCHEÑO, J.M.; BARBERO, J.L. e ARCHE, R. pH studies to elucidate the chemical mechanism of penicillin acylase from *Kluyvera citrophila*. Biotechnol. Appl. Biochem., vol. , 311-325, 1993.
- MARZO, A. e DAL BO, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. Journal of Chromatography A, vol. 812, 17-34, 1998.
- McDOUGALL, B.; DUNNIL, P. e LILLY, M.D. Enzymic acylation of 6-aminopenicillanic acid. Enzyme Microb. Technol., vol. 4, 114-115, 1982.
- McVEY, C.E.; TOLLEY, S.P.; DONE, S.H.; BRANNIGAN, J.A. e WILSON, K.S. A new crystal from penicillin acylase from *Escherichia coli*. Acta Cryst., D53, 777-779, 1997.
- MESSING, R.A. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Londres, Academic Press, 1975.
- MIYAKAWA, H.; NAGASUE, H. e SHIRAISHI, F. A highly accurate numerical method for calculating apparent kinetic parameters of immobilized enzyme reactions: 1. Theory. Biochemical Engineering Journal, vol. 3, 91-101, 1999.
- MORILLAS, M.; GLOBE, M.L. e VIRDEN, R. The kinetics of acylation and deacylation of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105:

- evidence for lowered pka values of groups near the catalytic centre. Biochem. J., vol. 338, 235-239, 1999.
- NAM,D.H.; KIM,C. e RYU,D.D.Y. Reaction Kinetics of Cephalixin Synthesizing Enzyme from *Xanthomonas citri*. Biotechnology and Bioengineering, vol. 27, 953-960, 1985.
- NATHWANI, D. e WOOD, M.J. Penicillins: A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. Drugs, 45(6),866-894, 1993.
- NESCIO, J.J. Processo para a preparação da forma cristalina anidra do ácido D-6(2-amino-2-fenilacteamido)-penicilânico. PI nº 206.028, 1971.
- OSPINA, S. Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. J. Chem. Biotechnol., 53, 205-214, 1992.
- OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O.T. e LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. Enzyme Microb. Technol., vol. 19, 462-469, 1996(a).
- OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O.T. e LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin: a whole cell E. coli recombinant penicillin amidase biocatalyst. Prog. Biotechnol., vol. 11, 464-71, 1996 (b).
- OSPINA, S. Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst. J. Chem. Biotechnol., vol.53, 205-214, 1992.
- PALMER, T. Understanding Enzymes. 4ed. Londres, Prentice Hall, 1995. 398p.
- PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S. e KRIEG, N.R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações, 2ed. Makron Books, São Paulo, 1996.

- PESSINA, A., LÜTHI, P.; LUISI, P.L.; PRENOSIL, J. e ZHANG, Y.S. Amide-bond synthesis catalyzed by penicillin acylase. Helvetica Chimica Acta, vol. 71, 631-641, 1988.
- PETZOLD, L.R. Ddassl code version 1989, Computs and Mathematics Research Division, Lawrence Livermore National Laboratory.
- PLASKIE, A.; ROETS, E. e VANDERHAEGHE, H. Substrate Specificity of Penicillin G Acylase of *Escherichia coli*. Journal of Antibiotics, vol.31, nº8, 783-788, 1978.
- RANSBOTHAM, S.B.; SCHWARZHOFF, J.A. e SOMMERFELD, J.T. Discrete-event simulation of penicillin production. Process Biochemistry, 182-187, December 1988.
- RHEE, D.K.; LEE, S.B.; RYU, D.D.Y. Enzymatic Biosynthesis of Cephalexin. Biotechnology and Bioengineering, vol. 22, 1237-1247, 1980.
- RODRIGUES, S. e LONA, L.M.F. Desenvolvimento de Redes Neurais para determinação de taxas de reação enzimática, adsorção e dessorção de proteínas em processos biotecnológicos. Anais do XIII Cobeq, 2000.
- ROSSEL, C.M. Reacciones de quimica fina catalizadas por derivados immobilizados de penicilina g acilasa. Madri, Universidad Autonoma de Madrid, 1993. (Tese)
- RUCKENSTEIN, E. e SASIDHAR, V. Acid generating immobilized enzymic reactions in porous media-activity control via augmentation of proton diffusion by weak acids. Chemical Engineering Science, vol. 39, Vov. 7/8, 1185-1200, 1984.

- RUDOLPH, E.S.J; ZOMERDIJK, M.; LUYBEN, K.Ch.A.M. e VAN DER WIELEN, L.A.M. Correlating phase behaviour of semi-synthetic antibiotics and their precursor in water + 1-butanol mixtures. Fluid Phase Equilibria, vol. 158-160, 903-912, 1999.
- RUMELHART, D.E.; HINTON, G.E. e WILLIAMS, R.J. Learning representations by back-propagating erros. Nature, vol. 323, 533-536, 1986.
- SAHOO, G.C. e DUTTA, N.N. Studies on emulsion liquid membrane extraction of cephalixin. Journal of Membrane Science, vol. 145, 15-26, 1998.
- SCHROËN, C.G.P.H.; NIERSTRASZ, V.A.; KROON, P.J.; BOSMA, R.; JANSSEN, A.E.M.; BEEFTINK H.H. e TRAMPER, J. Thermodynamically controlled synthesis of β -lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties. Enzyme Microb. Technol., vol 24, 498-506, 1999.
- SAVIDGE, T.A. Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. Biotechnology of Industrial Antibiotics. Nova Iorque, Marcel Dekker Co., 1984.
- SCHULTZ, A.R. Enzyme Kinetics. Nova Iorque, Cambridge University Press, 1994.
- SEGEL, I.H. Cálculos de Bioquímica. 2ed. Madri, Editorial Acribia, 1982. 564p.
- SEGEL, I.H. Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyne Systems. Nova Iorque, John Willey & Soons, 1975.
- SHEWALE, J.G; DESHPANDE, B.S; SUDHAKARAN, V.K. e AMBEDKAR, S.S. Penicillin Acylases: Applications and Potentials. Process Biochemistry International, 97-103, June 1990.

- SJORBERG, B.; NATHORST-WESTFELT, L. e ORTENGREN, B. Enzymatic Hydrolysis of Some Penicillins and Cephalosporins by *Escherichia coli* Acylase. Acta Chem. Scand., vol. 21, 547-551, 1967.
- SPIEß A.; SCHLOTHAUER, R.C.; HINRICHS, J.; SCHEIDAT, B. e KASCHE, V. pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of β -lactam hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, vol. 62, n°03, 267-274, 1999.
- STIRLING, I., BRUTON, G., CALVERT, S.H. e CLARKE, B. P. β -Lactam compounds. US Patent 4.524.073, 1985.
- STAMBOLIEVA, N.; MINCHEVA, Z.; GALUNSKY, B. & KALCHEVA, V. Penicillin Amidase - Catalysed Transfer of Low Specific Acyl Moiety. Synthesis of 7-Benzoxazolonylacetamido Desacetoxycephalosporanic acid. Enzyme Microb. Technol., vol. 14, 496 - 500, 1992.
- STOJANOVIC, O.; CANIC, N.; PERKUCIN, S.; KOBILAROV, N. e KARAPNDZIC, M. Process for production of amoxicillin. British Patent n° 1.594.997, 1981.
- SVEDAS, V.K., MARGOLIN, A.L.; BORISOV, I.L. e BEREZIN, I.V. Kinetics of enzymatic synthesis of benzylpenicillin. Enzyme Microb. Technol., vol. 2, 313-317, 1980a.
- SVEDAS, V.K., MARGOLIN, A.L. e BEREZIN, I.V. Enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics: a thermodynamic background. Enzyme Microb. Technol., vol. 2, 138-144, 1980b.
- TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. Livraria Atheneu Editora, Rio de Janeiro, 1994.

- TAKAHASHI,T.; KATO,K. & YAMAZAKI,Y. Synthesis of Cephalosporins and Penicillins by Enzymatic Acylation. The Japanese Journal of Antibiotics, vol. 30 supl., 230 - 238, 1977.
- TISCHER, W. e KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystal or carriers? Tibtech, vol. 17, 326-335, 1999.
- TREVAN, M. Immobilized Enzymes. Nova Iorque, John Willey and Soons, 1980. 131p.
- TSUJI, A.; NAKASHIMA, E.; HAMANO, S. e YAMANA, T. Physicochemiccal properties of amphoteric β -lactam antibiotics I: stability, solubility and dissociation behavior of amino penicillins as a function of pH. Journal of Pharmaceutical Sciences, 67, nº8, 1059-1066, 1978.
- VALLE, F., BALBÁS, P., MERINO, E., e BOLIVAR, F. The role of penicillin amidases in nature and in industry. TIBS. 16, 36-40, 1991.
- VANDAMME, E.J. Biotechnology of Industrial Antibiotics. 1.Ed. Marcel Dekker,Inc., 1984.
- VAN DER WIELEN, L.A.M.; VAN BUEL, M.J.; STRAATHOF, A.J.J. e LUYBEN, K.Ch.A.M. Modelling the enzymatic deacylation of penicillin G: equilibrium and kinetic considerations. Biocatalysis and Biotransformation, vol. 15. 121-146, 1997.
- VILLADSEN,J.V. e MICHELSEN,M.L. Solution of Differential Equation Models by Polinomial Approximation. Nova Iorque, Prentice Hall, 1978.

WALKER, D. e CHAPMAN, P.H. Improvements in or relating to the manufacture of penicillin and cephalosporin compounds. Patente Britânica, nº 1.482.922, 1977.

WARD, N. β -Lactam antibiotics. Patente Européia, nº 0.244.113.A1, 1987.

WEISZ, P. Molecular diffusion in macroporous materials: formalisms and mechanisms. Ind. Chem. Res., vol. 34, 2692-2699, 1995.

YOUSKO, M.I.; VAN LANGEN, L.M.; VROOM, E.; MOODY, H.M.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A. e SVEDAS, V.K. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in “aqueous solution-precipitate” systems. High substrate concentration and supersaturation effect. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, 10, 509-515, 2000.