



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1004880-4 B1



* B R P I 1 0 0 4 8 8 0 B 1 *

(22) Data do Depósito: 10/11/2010

(45) Data de Concessão: 26/12/2018

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO (6-APA)

(51) Int.Cl.: C12P 17/18.

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; PRODOTTI LABORATÓRIO FARMACÊUTICO LTDA..

(72) Inventor(es): RAQUEL DE LIMA CAMARGO GIORDANO; ANTONIO JOSÉ GONÇALVES DA CRUZ; DASCIANA DE SOUZA RODRIGUES.

(57) Resumo: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO (6-APA). É descrito um processo para obtenção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) através da produção e hidrólise simultânea de penicilina G durante o cultivo de *Penicillium chrysogenum* utilizando penicilina G acilase imobilizada em biocatalisador esfera de agarose contendo partículas magnéticas. Em presença do biocatalisador a penicilina G é hidrolisada, liberando o produto de interesse, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e ácido fenil acético (AFA) que é reciclado para o início do processo. O biocatalisador é recuperado e reutilizado várias vezes.

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO (6-APA)

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo dos processos para obtenção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), mais especificamente a um processo para obtenção de 6-APA a partir da produção e hidrólise simultânea de penicilina G durante o cultivo de *Penicillium chrysogenum* utilizando penicilina G acilase imobilizada em esfera de agarose contendo partículas magnéticas.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O processo de produção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) vem sendo investigado de longa data e, atualmente, envolve várias etapas. A primeira etapa para a obtenção de 6-APA é a produção da penicilina natural pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. Em seguida a penicilina é extraída do caldo fermentativo usando acetato de butila ou acetato de amila, em baixos valores de pH (< 2,5). Para obter a forma cristalizada como sal de potássio, a penicilina é novamente extraída para a fase aquosa em pH entre 7,0-8,0.

A penicilina G (PG) potássica é dissolvida em meio aquoso e submetida à hidrólise enzimática liberando 6-APA e ácido fenilacético (AFA). AFA é extraído com solvente orgânico, enquanto o 6-APA é cristalizado em meio aquoso por ajuste do pH no ponto isoelétrico (pH 3,6), onde a solubilidade deste composto é mínima, conforme o artigo citado por den Hollander, J.L., Zomerdijk, M., Straathof, A.J.J., van der Wielen, L.A.M. Continuous enzymatic penicillin G hydrolysis in countercurrent water-butyl acetate biphasic systems. *Chemical Engineering Science*, v. 57(9), p. 1591 – 1598, 2002; Ferreira, J.S., Straathof, A.J.J., Li, X., Ottens, M., Franco, T.T., van der Wielen, L.A.M.

Solution crystallization kinetics of 6-aminopenicillanic acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 45(20), p. 6740-6744, 2006.

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

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

Alguns exemplos de modificações parciais no processo de produção de 6-APA incluem: extração reativa da penicilina utilizando aminas de elevado peso molecular, uso de sistemas de hidrólise e extração simultânea em meio aquoso, extração de penicilina na presença de campo elétrico, extração de penicilina em três fases líquidas, adsorção de 6-APA nas matrizes Amberlite LA-2, trioctilamina, Aliquat-336, XAD16, XAD1180, XAD1600, resina aniônica IRA 400 e aminas secundárias com peso molecular entre 325 e 395. Vide os artigos por Arnott, I.A., Weatherley, L.R. The stability of penicillin G during recovery by electrically enhanced extraction. *Process Biochemistry*, v. 30(5), p. 447-455, 1995; Hano, T.; Ohtake, T., Matsumoto, M., Ogawa, S., Hori, F. Extraction of penicillin with liquid surfactant membrane. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 23(6), p. 772-775, 1990. van der Does, T., Kuipers, R.H, Kwant, G.J, Kerkhof, P.T, Kerkhof, J.H.P.M.

Recovery of 6-amino-penicillanic acid from a mother liquor, useful as an intermediate in the production of beta-lactam antibiotics.

Vide igualmente as publicações EP950660-A; WO9948895-A; WO9948895-A1; EP950660-A1; AU9930361-A e US2005020685-A.

5 Algumas modificações no processo de produção de 6-APA são encontradas na literatura de patentes, por exemplo:

A patente U.S. 6.110.699 propõe substituir as etapas de extração com solvente orgânico, a qual isola a penicilina como um sal, por etapas de ultrafiltração do caldo fermentativo. A hidrólise enzimática da penicilina é realizada no caldo fermentativo ultrafiltrado e o produto (6-APA) é extraído por cromatografia em coluna de troca aniônica. A patente encontrada difere da presente invenção no seguinte ponto: A hidrólise de penicilina é realizada somente ao final do cultivo, após etapas de filtração e ultrafiltração, enquanto na invenção proposta a hidrólise é realizada durante o cultivo de *P. chrysogenum*.

Na publicação britânica GB892144(A) penicilina amidase (enzima que hidrolisa a penicilina) é produzida e o caldo fermentativo contendo a enzima é pré-tratado usando diferentes procedimentos (para separar a biomassa) e em seguida é utilizado como meio reacional para a hidrólise de penicilina, ou seja, o antibiótico na forma de pó é adicionado ao caldo fermentativo contendo a enzima que catalisará a hidrólise deste, gerando 6-APA e AFA. Nesta publicação o 6-APA é produzido pela adição da penicilina a um meio complexo, entretanto este meio é o utilizado para a produção da penicilina acilase (enzima que hidrolisa a penicilina G). No processo proposto a penicilina é hidrolisada num meio complexo, entretanto este meio é o caldo fermentativo do *P. chrysogenum* para produção do antibiótico.

Na publicação britânica GB1009028 (A) (1965) uma solução de penicilina (sal de potássio) ou a penicilina contida no caldo fermentativo é

hidrolisada por uma preparação de penicilina amidase (caldo fermentativo onde a enzima produzida após tratamento, por exemplo, filtração ou clareamento) produzida por *Achromobacter* sp. Neste documento o 6-APA é produzido pela hidrólise de penicilina utilizando preparação de penicilina amidase produzida por *Achromobacter* sp. No processo proposto a penicilina é hidrolisada num meio complexo, entretanto este meio é o caldo fermentativo do *P. chrysogenum* para produção do antibiótico.

Na patente U.S. 3.260.653 é descrita a hidrólise de penicilina por extratos enzimáticos de caldos fermentativos de *E. coli*. Também há comentários da utilização de penicilina acilase liberada por *P. chrysogenum* Q 176 para hidrólise de PG no mesmo meio em que é produzida. Nesta patente o 6-APA é produzido pela hidrólise de penicilina utilizando preparação de penicilina amidase produzida por *E. coli*. No processo proposto a penicilina é hidrolisada num meio complexo, entretanto este meio é o caldo fermentativo do *P. chrysogenum* para produção do antibiótico.

Na publicação chinesa CN101250247 é descrito um método de preparo de micro-esferas magnéticas para imobilização de penicilina acilase. Esta publicação utiliza compostos vinílicos como monômero funcional para preparo da matriz polimérica e produz micro-esferas, enquanto o invento proposto utiliza agarose e produz esferas com 4 mm de diâmetro. Portanto, não há similaridade entre esta publicação e a presente invenção.

A publicação chinesa CN1209454 descreve o preparo de micropérolas ("microbeads") para imobilização de penicilina acilase. Esta publicação utiliza agar-gelatina como matriz polimérica, enquanto o invento proposto utiliza agarose e produz esferas magnéticas com 4 mm

de diâmetro. Portanto, não há similaridade entre esta publicação e a presente invenção.

5 A Patente espanhola ES2005883 descreve método de imobilização de penicilina acilase utilizando partículas pequenas de agarose. Neste procedimento os grupos aminos da enzima são covalentemente ligados a grupos aldeído na superfície da agarose. A presente invenção faz uso desta metodologia, entretanto etapas adicionais foram incluídas, dispersando a partícula de agarose contendo a PGA imobilizada e partículas magnéticas em uma solução de agarose (pó) a 60 °C, em seguida esta solução é gotejada em vaselina para formar esferas com 4 mm de diâmetro. Além disso, a presente invenção inclui a aplicação dessas esferas magnéticas, contendo PGA imobilizada, para a hidrólise de penicilina G simultânea à sua produção por *P. chrysogenum*. Portanto, a presente invenção difere em muitos aspectos do invento descrito neste documento.

15 A Patente coreana KR860000698 descreve um método de imobilização de "células", as quais contêm penicilina acilase, utilizando como matriz polimérica carragenina, acetato de celulose, agar e outros. O invento proposto descreve a imobilização da "enzima" utilizando agarose. A hidrólise de penicilina no invento proposto é realizada simultânea à produção do antibiótico, ou seja, dentro da dorna de fermentação (biorreator), enquanto na publicação coreana essa hidrólise é realizada em coluna contendo a enzima imobilizada. Portanto, a publicação coreana não antecipa o conceito da presente invenção.

25 A Patente polonesa PL274563 descreve a produção de penicilina acilase por microrganismo mutante de *Escherichia coli*, enquanto o invento proposto descreve o método de imobilização desta enzima e sua aplicação na hidrólise de penicilina em meio complexo (caldo fermentativo de *Penicillium chrysogenum*).

A Patente britânica GB2244711(B0) descreve o processo de hidrólise de penicilina (em solução aquosa) utilizando reator fluidizado, enquanto o invento proposto descreve o processo de hidrólise de penicilina em biorreator tipo tanque agitado durante o cultivo de *Penicillium chrysogenum*. Outras diferenças consistem na técnica de imobilização. No documento encontrado imobilizam-se as “células” por envolvimento em gel, enquanto no invento proposto imobiliza-se a “enzima” através de ligação covalente com a matriz polimérica (partículas de gel de agarose com 400 µm) e posteriormente envolve-se este derivado e partículas magnéticas em uma esfera com diâmetro de 4 mm preparada a partir do pó de agarose. Portanto, esta patente britânica não antecipa a presente invenção.

A patente U.S. 5.679.539 descreve procedimentos de modificação química de polietileno e polipropileno para posterior aplicação como suporte para várias aplicações, entre estas, a imobilização de enzimas. Já a presente invenção utiliza o polímero agarose para realizar a imobilização da enzima de interesse: penicilina G acilase. Portanto, não há similaridade entre a invenção e esta patente norte-americana.

A Patente espanhola ES2005883 descreve o método de imobilização/estabilização de penicilina acilase utilizando partículas pequenas de agarose. Neste método, ocorre ligação covalente entre grupos amino da enzima e grupos aldeídos do polímero. Embora a presente invenção faça uso desta metodologia, etapas adicionais foram incluídas para preparar esferas com 4 mm de diâmetro contendo partículas magnéticas dispersas. Além disso, o presente pedido inclui a aplicação dessas esferas magnéticas, contendo PGA imobilizada, para a hidrólise de penicilina G simultânea à sua produção por *P. chrysogenum*. Portanto, o invento proposto difere em muitos aspectos da publicação espanhola.

A patente GB 1292097 descreve a habilidade da penicilina acilase na resolução ótica de mistura racêmica de aminoácidos. Já a presente invenção descreve o método de imobilização desta enzima e sua aplicação na hidrólise de penicilina em meio complexo (caldo fermentativo de *Penicillium chrysogenum*).

A patente EP1088887 A1 apresenta o método de imobilização através de ligações cruzadas entre proteínas gerando “crosslinked enzyme aggregates” (CLEAS). Já a presente invenção imobiliza a “enzima” através de ligação covalente com a matriz polimérica (partículas de gel de agarose com 400 μm) e posteriormente envolve este derivado e partículas magnéticas em uma esfera com diâmetro de 4 mm preparada a partir do pó de agarose.

A patente GB 1463513 trata de um método de imobilização através de ligações cruzadas entre a enzima e um solvente imiscível em água. Já o processo do presente pedido imobiliza a “enzima” através de ligação covalente com a matriz polimérica (partículas de gel de agarose com 400 μm) e posteriormente envolve este derivado e partículas magnéticas em uma esfera com diâmetro de 4 mm preparada a partir do pó de agarose.

A patente U.S.6.280.983 B1 trata da imobilização de lipase por envolvimento com gel híbrido, contendo 30 a 50 % de gelatina e um dos seguintes polímeros: agarose, Agar, pectina, alginato de sódio ou carragenina. Já a presente invenção trata de um processo onde a “enzima” é imobilizada através de ligação covalente com a matriz polimérica (partículas de gel de agarose com 400 μm) e posteriormente envolve este derivado e partículas magnéticas em uma esfera com diâmetro de 4 mm preparada a partir do pó de agarose.

As publicações apresentadas acima descrevem a utilização de penicilina acilase livre no caldo fermentativo de *P. chrysogenum*, métodos químicos, adição de penicilina em caldos fermentativos onde

penicilina acilase é produzida, e enzima imobilizada em meio aquoso para produção de 6-APA. Estes métodos diferem substancialmente do conceito da presente invenção.

5 Assim, a técnica ainda necessita de um processo de produção de 6-APA que aperfeiçoe o processo utilizado atualmente na indústria e que ainda represente um avanço técnico em relação aos diferentes processos descritos na literatura.

10 A maioria dos processos de produção de 6-APA descritos na literatura propõe uma modificação parcial do processo atualmente utilizado pela indústria. Por exemplo, em alguns processos propostos, somente a etapa de extração de penicilina é modificada, em outros processos somente a etapa de hidrólise de penicilina é modificada (meio aquoso, caldo fermentativo de penicilina acilase), outros ainda modificam somente a preparação de enzima a ser utilizada (enzima livre, enzima
15 imobilizada em diferentes suportes). Estas modificações parciais não permitem reduzir o número de etapas do processo de produção de 6-APA.

A produção e hidrólise simultânea de penicilina, proposta no presente processo, permite reduzir o número de etapas do processo de
20 produção de 6-APA utilizado atualmente. Além disso, a recirculação de AFA durante o cultivo de *P. chrysogenum* reduz o custo do mesmo. O desenvolvimento de um biocatalisador capaz de catalisar a hidrólise de penicilina no meio complexo e conservar sua atividade, mesmo após etapas de esterilização, associado ao aparato desenvolvido para manter
25 a integridade física do biocatalisador tornam o presente processo interessante para a produção de 6-APA sem o uso de solventes orgânicos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De um modo amplo, o processo de produção de ácido 6-aminopenicilânico conforme a invenção compreende as etapas de:

- 5 a) prover biocatalisador com penicilina G acilase (PGA) imobilizada em esfera de agarose contendo partículas magnéticas;
- b) em dorna de fermentação contendo cultivo do fungo *Penicillium chrysogenum* e meio de produção, adicionar, entre 0 e 12 horas, ácido fenil acético na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 % (m/v) para iniciar o processo de produção de penicilina G;
- 10 c) sob condições de fermentação incluindo agitação entre 300-400 rpm, temperatura entre 28 e 23°C, saturação de oxigênio entre 0 e 20% decorrente da vazão de ar entre 1 e 4 L/min, tempo de reação entre 12 e 240 horas e pH próximo à neutralidade, fermentar o caldo reacional para produzir penicilina G;
- 15 d) adicionar ao meio de cultivo de c) o biocatalisador da etapa a) em proporção de 2-3 g por litro de caldo fermentativo, entre 12 e 36 horas, para hidrolisar a penicilina produzida, sendo liberado o produto de interesse, 6-APA e o co-produto ácido fenilacético (AFA), este último consumido pelo fungo *P. chrysogenum* durante o processo;
- 20 e) separar o 6-APA;
- f) separar o AFA remanescente ao final do cultivo e reciclar o mesmo para a dorna de fermentação de forma a iniciar novo ciclo de produção de 6-APA;
- 25 g) recuperar e reciclar o biocatalisador para a etapa d).

O processo pode ser conduzido no modo de batelada ou de modo contínuo.

O processo pode ser conduzido em reatores do tipo tanque agitado ou alternativamente em reatores pneumáticos tipo *air lift*.

Portanto, a presente invenção provê um processo de obtenção de 6-APA em que o AFA é reciclado para ser consumido pelo fungo *P. chrysogenum* durante o processo de produção de penicilina G, com grande economia para o processo.

5 A presente invenção provê igualmente um processo de obtenção de 6-APA isento da utilização de solvente orgânico, com grande vantagem ambiental.

A invenção provê ainda um processo de obtenção de 6-APA que utiliza um biocatalisador imobilizado em esfera de agarose contendo
10 partículas magnéticas que pode ser reutilizado um grande número de vezes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1 anexa é um diagrama de blocos que sumariza o processo da invenção com recirculação do co-produto AFA durante o
15 cultivo do *P. chrysogenum*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção compreende, pois, um processo de produção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) com hidrólise simultânea de penicilina G durante o cultivo de *Penicillium chrysogenum* utilizando
20 penicilina G acilase imobilizada em esfera de agarose contendo partículas magnéticas.

Para realizar o presente processo, foi desenvolvido um biocatalisador, este foi aplicado em cultivos de *P. chrysogenum* em biorreator e o desempenho do biocatalisador sobre a hidrólise de
25 penicilina foi analisado.

O preparo deste biocatalisador é realizado em duas etapas descritas a seguir.

A primeira etapa consiste na imobilização covalente multipontual de penicilina G acilase (PGA) em partículas de agarose com 400 μm de diâmetro.

Um procedimento padrão para imobilização de PGA em partículas de agarose de 400 μm de diâmetro é utilizado. Um grama de agarose glioxil é adicionado a 9 mL de uma solução da enzima preparada em tampão carbonato 100 mM, pH 10, contendo ácido fenilacético 100mM e glicerina 25% v/v. A suspensão é mantida sob agitação até que a atividade do sobrenadante seja zero. Ao final da imobilização adiciona-se borohidreto de sódio numa concentração de 1 mg/mL de suspensão, com o objetivo de reduzir as bases de Schiff formadas entre enzima e suporte e também converter os aldeídos remanescentes em hidroxilas inertes. Em seguida o derivado é lavado primeiramente com tampão fosfato 25 mM, pH 5 e em seguida com água e armazenado a 4°C.

A segunda etapa consiste na dispersão das partículas de 400 μm de diâmetro (contendo PGA imobilizada) em esferas de 4 mm de diâmetro.

Para envolver as partículas pequenas (400 μm), inicialmente, é preparada uma solução aquosa (10 % p/v) de agarose em pó, a qual é dissolvida aquecendo a mistura a 95 °C. Em seguida, 4 mL desta solução são resfriados até atingir 60°C e adiciona-se 1 g de partículas contendo a PGA imobilizada e 0,5 g de limalha de aço inoxidável. Para formar as esferas de 4 mm de diâmetro esta suspensão é gotejada em vaselina. As esferas magnéticas formadas são lavadas com água destilada em abundância e mantidas sob agitação em solução contendo surfactante (Tween, sem estar limitado a este) para remover completamente a vaselina, em seguida são novamente lavadas com água em abundância e armazenadas a 4°C. A enzima imobilizada é corada (azul) com reagente de Bradford para comprovar a dispersão desta em todo o volume da esfera.

A aplicação do biocatalisador na hidrólise de penicilina G durante sua produção por *P. chrysogenum* em biorreator é realizada como segue:

Esterilização do biocatalisador

Antes de ser adicionado ao caldo fermentativo de *P. chrysogenum* o biocatalisador é submetido a um tratamento para esterilização do mesmo. A metodologia estabelecida para esterilizar o biocatalisador utiliza solução de iodo 50 μM (para 1 g de catalisador são adicionados 10 mL da solução de iodo). A mistura é mantida sob agitação mecânica por 30 minutos e em seguida o biocatalisador é lavado com água esterilizada em câmara asséptica. O biocatalisador esterilizado é adicionado a um Erlenmeyer contendo 100 mL do meio de cultivo descrito na Tabela 1 a seguir e mantido sob agitação de 250 rpm por 24 h a 25°C. Em seguida, um teste em placa, para o meio contendo o biocatalisador, é realizado para confirmar a esterilidade deste. Comprovada a ausência de contaminantes, o biocatalisador é transferido para o biorreator, o qual contém *P. chrysogenum* após período entre 12 e 36h de cultivo. Os tempos de cultivo adequados variam desde 12 horas até 240 horas.

Cultivo de *P. chrysogenum*

A primeira etapa para o cultivo de *Penicillium chrysogenum* é o preparo do meio para germinação. A composição deste meio é apresentada na Tabela 1 a seguir.

TABELA 1

Componentes	Concentração
água de maceração de milho	2,0-5,5 % v/v
sulfato de amônio	0,1-1,0 % m/v
fosfato de sódio monobásico	0,1-1,0 % m/v
hidróxido de cálcio	0,1-0,5 % m/v
carbonato de cálcio	0,0-0,4 % m/v
anti-espumante	0,1-1,0 % m/v
sacarose	1,0-5,0 % m/v
água	q.s.p. 100 mL

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

Após 24 h em *shaker* a 250 rpm e 25 °C, 100 mL do inóculo é totalmente transferido para o biorreator contendo aproximadamente 1,6 L de meio de produção (idêntico ao descrito na Tabela 1 acima).

Um esquema do sistema utilizado para realizar o cultivo de *P. chrysogenum* é conforme descrito por Nucci, E.R., Souza, V.R., Silva, R.G., Reis, G.B., Giordano, R.L.C, Giordano, R.C., Cruz, A.J.G. On-line Monitoring of Penicillin G Acylase (PGA) Production Using a Fuzzy Logic Algorithm. *Chemical Product and Process Modeling*, v. 4(4), artigo 12.

Este sistema inclui um biorreator dotado de impelidores para facilitar a homogeneização do caldo fermentativo.

Para evitar a fragmentação das esferas de biocatalisador pela ação dos impelidores contidos no interior do aparelho de cultivo de *P. chrysogenum*. (biorreator) é utilizado um helicóide para impedir o contato entre essas esferas e os impelidores. O helicóide é conectado à tampa do biorreator de cultivo e construído com arame de aço inoxidável. Neste sistema, as esferas contendo a enzima movimentam-se somente no volume externo ao helicóide, evitando a perda do biocatalisador por fragmentação.

O biorreator utilizado no processo da invenção para a fabricação de 6-APA é fabricado pela Applikon Dependable Instruments B.V. (Holanda) com capacidade para 2 L (sem estar limitado a este fabricante ou a esta capacidade) e acoplado a um sistema de aquisição de dados (National Instruments®) de modo que variáveis on-line são armazenadas a cada 10 segundos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, velocidade de agitação, fração molar de dióxido de carbono no gás de exaustão do biorreator).

Em termos de condições reacionais do caldo fermentativo no biorreator, a temperatura é mantida na faixa entre 28-23°C com valor típico de 25°C e pH neutro ou próximo de neutro (7).

A vazão de ar varia de 1,0 a 4,0 L/min.

O meio de cultivo é submetido a agitação entre 300-400 rpm para este sistema. O oxigênio dissolvido (OD) é mantido entre 0 e 20% de saturação.

Para o início do ciclo reacional adiciona-se quantidade de AFA. A recirculação ocorre durante o cultivo: o ácido fenil acético (AFA) é consumido pelo fungo durante a produção da penicilina, que é excretada para o meio reacional. O biocatalisador hidrolisa a penicilina produzida

pelo fungo liberando ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e AFA para o meio reacional.

O ciclo prossegue com o consumo do AFA gerado durante a hidrólise da penicilina pelo fungo *P. chrysogenum*.

5 Ao final do cultivo, o objetivo é remover AFA remanescente por adsorção hidrofóbica e 6-APA por interação iônica, segundo tecnologias do estado da técnica que não constituem objeto da invenção.

A Figura 1 ilustra esquematicamente o processo da invenção.

10 **Análise do desempenho do biocatalisador sobre a hidrólise de penicilina em biorreator**

Para avaliar o desempenho do biocatalisador sobre a hidrólise de penicilina durante o cultivo de *P. chrysogenum* a concentração do substrato (penicilina) e do produto de interesse (ácido 6-aminopenicilânico) são monitoradas.

15 **Quantificação de 6-APA (Método PDAB)**

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

Quantificação de PG (Hidrólise e PDAB)

Durante o cultivo de *P. chrysogenum* a PG é quantificada retirando-se alíquotas de 975 μ L de caldo fermentativo e adicionando-se a estas 25 μ L de solução de PGA livre (500 U/mL). Essa mistura é mantida por
25 15 minutos em banho a 37 °C, para hidrólise total da PG. Considerando a estequiometria da hidrólise de PG, onde cada molécula de 6-APA formada corresponde a uma molécula de PG hidrolisada, utiliza-se o reagente PDAB para quantificar o 6-APA e determina-se indiretamente a concentração de PG.

Ao longo do cultivo a PG é hidrolisada pelo biocatalisador dentro do biorreator, e para determinar a concentração de PG remanescente, em tempos determinados são retiradas amostras com volumes de aproximadamente 5 mL. Cada amostra é filtrada para remoção da massa de fungo e uma alíquota de 25 μ L desta é adicionada a 2,5 mL da solução de PDAB para quantificar o 6-APA (proveniente da hidrólise de PG dentro do biorreator). Em seguida, outra alíquota de 975 μ L da mesma amostra é submetida à hidrólise completa com PGA livre e 25 μ L desta é utilizado para quantificar 6-APA (proveniente da hidrólise de PG dentro do biorreator + proveniente da hidrólise de PG remanescente por PGA livre). A quantidade de 6-APA total (dentro do biorreator + produzido por PGA livre) menos o que havia dentro do biorreator (medido diretamente em PDAB) corresponde à quantidade de PG remanescente dentro do biorreator.

Os resultados obtidos com o processo descrito mostram que é possível obter hidrólise completa de penicilina durante o cultivo de *P. chrysogenum*, e, além disso, que é possível recuperar o biocatalisador ao final do cultivo mantendo a atividade enzimática e a integridade da esfera.

Do exposto anteriormente, conclui-se que a presente invenção se constitui em desenvolvimento tecnológico de interesse para a indústria farmacêutica, pois apresenta vantagens como: a redução no número de etapas para obtenção de 6-APA, a eliminação do uso de solvente orgânico no processo e redução no custo global do processo, principalmente, devido à recirculação de AFA no meio de produção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para obtenção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), caracterizado por dito processo compreender as etapas de:
 - 5 a) prover biocatalisador com penicilina G acilase (PGA) imobilizada em esfera de agarose contendo partículas magnéticas;
 - 10 b) em dorna de fermentação contendo cultivo do fungo *Penicillium chrysogenum* e meio de produção, adicionar, entre 0 e 12 horas, ácido fenil acético (AFA) na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 % (m/v) para iniciar o processo de produção de penicilina G;
 - 15 c) sob condições de fermentação incluindo agitação entre 300-400 rpm, temperatura entre 28 e 23°C, saturação de oxigênio entre 0 e 20% decorrente da vazão de ar entre 1 e 4 L/min, tempo de reação entre 12 e 240 horas e pH próximo à neutralidade, fermentar na dorna de b) o caldo reacional para produzir penicilina G;
 - 20 d) adicionar ao meio de cultivo de c) o biocatalisador da etapa a) em proporção de 2-3 g por litro de caldo fermentativo, entre 12 e 36 horas, para hidrolisar a penicilina obtida, sendo liberado o produto de interesse, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e o co-produto ácido fenilacético (AFA), este último consumido pelo fungo *P. chrysogenum* durante o processo;
 - 25 e) separar o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA);
 - f) separar o AFA remanescente ao final do cultivo e reciclar o mesmo para a dorna de fermentação de forma a iniciar novo ciclo de produção de 6-APA; e

g) recuperar o biocatalisador e reciclar o mesmo para a etapa d.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o dito biocatalisador ser preparado conforme as seguintes etapas:

5 a) imobilizar de modo covalente multipontual a penicilina G acilase (PGA) em partículas de agarose com 400 μm de diâmetro;

10 b) dispersar as partículas de 400 μm de diâmetro contendo PGA imobilizada em esferas de 4 mm de diâmetro utilizando solução aquosa (10 % p/v) de agarose em pó dissolvida aquecendo a 95 °C, resfriar 4 mL desta solução a 60°C e adicionar 1 g de partículas contendo a PGA imobilizada e 0,5 g de limalha de aço inoxidável obtendo
15 uma suspensão e formar as esferas de 4 mm de diâmetro gotejando a dita suspensão em vaselina obtendo esferas magnéticas lavadas com água destilada e mantidas sob agitação em solução contendo surfactante para remover completamente a vaselina, em seguida são novamente lavadas com água e armazenadas a 4°C, e corando (azul)
20 a enzima imobilizada com reagente de Bradford para comprovar a dispersão desta em todo o volume da esfera.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o dito biocatalisador ser esterilizado previamente ao uso.

25 4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizado de modo contínuo.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizado no modo de batelada.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser efetuado em reatores do tipo tanque agitado e aerado.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser efetuado em reatores pneumáticos do tipo *air lift*.
8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a composição do meio de produção contido na dorna de fermentação compreender, em massa por volume, água de maceração de milho 2,0-5,5 % v/v, sulfato de amônio 0,1-1,0 % ,
5 fosfato de sódio monobásico 0,1-1,0 %, hidróxido de cálcio 0,1-0,5 %, carbonato de cálcio 0,0-0,4%, anti-espumante 0,1-1,0 %, sacarose 1,0-5,0 % e água q.s.p. 100 mL.

FIG. 1

