



PI02052423
PI02052423

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0205242-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0205242-3

(22) Data do Depósito: 29/11/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 10/06/2003

(51) Classificação Internacional: C12M 1/40

(54) Título: PROCESSO PARA A PROTEÇÃO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS INSOLÚVEIS, BIOCATALISADOR OBTIDO E BIORREATOR COM O BIOCATALISADOR IMOBILIZADO

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, CGC/CPF: 45358058000140.
Endereço: Via Washington Luiz, Km 235 - C.P. 676, São Carlos, São Paulo, Brasil (BR/SP), CEP: 13565-905.;
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP, CGC/CPF: 43828151000145.
Endereço: Rua Pio XI, 1500, Alto da Lapa, São Paulo, São Paulo, Brasil (BR/SP).

(72) Inventor: ROBERTO DE CAMPOS GIORDANO; RAQUEL DE LIMA CAMARGO GIORDANO; ANDREA LOPES DE OLIVEIRA FERREIRA

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 30/06/2015, observadas as condições legais.

Expedida em: 30 de Junho de 2015.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes



**"PROCESSO PARA A PROTEÇÃO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS
INSOLÚVEIS, BIOCATALISADOR OBTIDO E BIORREATOR COM O
BIOCATALISADOR IMOBILIZADO"**

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de biocatalisadores, constituídos por um suporte primário ativado ao qual se ligam enzimas. O suporte primário, por sua vez, é envolvido por uma matriz secundária para sua proteção mecânica e aumento do tamanho da partícula, facilitando especialmente a separação de produtos da reação que se cristalizem durante o processo. A presente invenção refere-se, também, a um reator que promove uma agitação eficiente sem danificar o biocatalisador utilizando vórtices de Taylor-Couette e/ou borbulhamento de gás inerte.

Fundamentos da Invenção

A enorme competição existente em nível mundial no setor da indústria de processos biotecnológicos vem colocando vários desafios às empresas que desejem se manter ativas e com perspectiva de explorar novos nichos de mercado. Um deles se relaciona com as crescentes exigências de agências governamentais, no sentido da redução de impactos ambientais. Logo, a busca por processos ecologicamente sustentáveis que sejam, simultaneamente, economicamente competitivos com rotas químicas convencionais já estabelecidas é uma das forças-motrizes para o desenvolvimento de novos processos bioquímicos industriais.

É nesse contexto que se amplia o emprego industrial de enzimas como biocatalisadores. A catálise enzimática apresenta vantagens, conforme mencionado a seguir, quando comparada aos processos químicos industriais
5 convencionais:

- (i) As reações ocorrem à temperatura ambiente e pressão atmosférica;
- (ii) Uma reação particular (especificidade de reação) ocorre em um sítio particular
10 (especificidade de sítio). Logo, o produto de interesse pode ser obtido com alto rendimento;
- (iii) Como a especificidade de reação do substrato é bastante elevada, apenas o
15 composto de interesse é seletivamente reagido, mesmo que haja vários outros compostos coexistindo no mesmo ambiente.

Entretanto, biocatalisadores enzimáticos apresentam inconvenientes, a saber:

- (i) se a(s) enzima(s) é(são) utilizada(s) em
20 forma livre, seu reaproveitamento em bateladas sucessivas ou seu reciclo em reatores contínuos não é economicamente viável, por serem solúveis em água e
25 estarem presentes em baixas concentrações;
- (ii) por outro lado, se a(s) enzima(s) é(são) imobilizada(s) em suportes insolúveis, de forma a viabilizar seu aproveitamento em

longas jornadas (bateladas repetidas ou processos contínuos), as matrizes-suporte têm, em geral, raios da ordem de micra, para reduzir efeitos difusionais em seus poros. Esses biocatalisadores (aqui entendidos como o conjunto suporte-enzima imobilizada) apresentam muitas vezes baixa resistência ao cisalhamento;

(iii) tais biocatalisadores, de pequenas dimensões, têm sua separação mecânica dos produtos de reação dificultada, quando estes últimos precipitam durante o processo.

Adicionalmente, a atividade catalítica das enzimas é reduzida, muitas vezes de forma irreversível, pelo calor, pelo emprego de solventes orgânicos, de ácidos ou bases, ou mesmo por produtos de reação. Uma adequada engenharia do biocatalisador (enzima-suporte), entretanto, pode aumentar significativamente sua vida útil.

Nesse sentido, a pesquisa sobre biocatalisadores imobilizados tem sido conduzida desde cerca de 1953. Atualmente, os seguintes métodos podem ser empregados para a imobilização de enzimas: (i) método de ligação ao suporte através de ligação covalente, adsorção física, ligação iônica ou semelhante; (ii) método de ligações cruzadas, no qual as moléculas da enzima são ligadas umas às outras por um reagente polifuncional e tornadas insolúveis; (iii) método de encapsulação, por exemplo em um gel polimérico, em microcápsulas ou em membrana líquida de lipídeos e (d)

métodos que seriam a combinação de ao menos dois dos anteriores.

Dentre os métodos citados anteriormente, os de encapsulação usando um gel polimérico são os que apresentam a maior aplicação, na medida em que permite a imobilização de uma pluralidade de biocatalisadores.

A patente US 4,975,375 descreve um método para a preparação de um biocatalisador compreendendo as seguintes etapas: (i) redução da temperatura de um gel polimérico reticulado, o qual possui uma temperatura de transição de fase específica, podendo expandir ou encolher de forma reversível, sofrendo expansão quando submetido a uma temperatura inferior a sua temperatura de transição de fase específica; (ii) adição do gel polimérico no dito estado expandido a um meio líquido contendo a enzima, de forma a permitir que o biocatalisador seja absorvido para o interior do gel polimérico e (iii) aquecimento de ao menos uma porção do dito gel polimérico até sua temperatura de transição de fase ou acima da mesma, de forma a permitir que dita porção do gel polimérico encolha e imobilize o biocatalisador absorvido na dita porção.

Entretanto, cabe ressaltar que os métodos clássicos possuem inconvenientes como, por exemplo: (i) redução da atividade enzimática original em virtude da imobilização, (ii) ausência de estabilidade durante a imobilização, fazendo com que ao menos parte das moléculas de enzima se desnaturem ou alterem sua conformação ainda fora do suporte, (iii) dificuldade de reativação dos biocatalisadores, (iv) complicações relacionadas ao

processo de imobilização, que pode envolver reações de difícil controle ou reagentes tóxicos de difícil manipulação e (v) dificuldades para o posicionamento preciso e orientação espacial correta da molécula da enzima
5 sobre os sítios de interesse do suporte.

A associação de um novo método para a imobilização de enzimas com propostas de novas configurações de biorreatores integrados é essencial para atender às crescentes exigências regulatórias, no sentido
10 de redução de impactos ambientais, ao mesmo tempo em que se permite uma maior eficiência do processo, de forma a viabiliza-lo economicamente. Os biorreatores devem preferencialmente acoplar em um mesmo equipamento a reação bioquímica desejada e etapas de separação e purificação
15 como, por exemplo, a cristalização do produto desejado.

No caso da produção de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos, um dos maiores inconvenientes da rota enzimática é sua baixa seletividade, em virtude da reação competitiva de hidrólise dos precursores (ésteres ou
20 amidas) que devem reagir com o núcleo β -lactâmico e da hidrólise do próprio antibiótico, ambas catalisadas pela mesma enzima que promove a reação de síntese.

O primeiro antibiótico β -lactâmico semi-sintético, derivado da penicilina G a partir da
25 substituição de sua cadeia lateral, foi a ampicilina (patenteada em 1961 pela indústria farmacêutica britânica Beecham), seguida pela amoxicilina (patente Beecham, 1972) e pelas cefalosporinas semi-sintéticas (cefalexina, Lilly, 1970, cefasolin, Fujisawa, 1974, cefadroxil, BMS, 1977,

dentre outras). A evolução do mercado mundial de semi-sintéticos desde então foi expressiva, passando de 1.000 ton/ano em 1970 para 45.000 ton/ano em 2000 (Moody H, Hogenboom A, Lange B, Heemskerk D, Dooren TV, Boesten W, Roos E. Enzymatic Production of Cephadroxyl. Comunicação oral e *Abstract Book of the 10th European Congress on Biotechnology*, CAT 12, Madrid, Spain, 8-11 July, 2001). Esses processos utilizam rotas químicas para síntese das cadeias laterais e para a condensação do antibiótico, ligando tais cadeias aos respectivos núcleos β -lactâmicos (6-APA, hoje obtido enzimaticamente a partir da penicilina G, 7-ACA proveniente da cefalosporina C, e 7-ADCA, proveniente da expansão - também por rota química - do anel tiazolidina do 6-APA). Todos esses processos convencionais já estão consolidados, mas há enorme esforço de pesquisa em andamento na área, tanto na indústria como na academia, objetivando estabelecer uma rota enzimática eficiente.

Para incrementar a seletividade da reação é vantajoso empregar reatores integrados, com enzima imobilizada como biocatalisador. Nesses reatores, a concentração de antibiótico atinge valores acima de seu limite de solubilidade nas condições de processo. Assim, o produto de interesse (neste caso, o antibiótico) irá precipitar antes de ser atacado pela enzima.

Em reatores convencionais, este processo apresenta uma série de inconvenientes. Em um reator de mistura, a agitação é muito agressiva, danificando as partículas com enzima imobilizada. No caso de um reator de leito fluidizado, a velocidade axial necessária à

fluidização demanda alta razão de reciclo. Um reator tubular de leito fixo pode apresentar sérias limitações ao transporte de massa extra-partícula, reduzindo a velocidade aparente de reação e, conseqüentemente, a produtividade do processo.

Portanto, faz-se premente o desenvolvimento de processos para a preparação de enzimas imobilizadas associadas a biorreatores integrados que superem as desvantagens e as dificuldades até aqui descritas.

10 Sumário da Invenção

O objetivo da presente invenção é o de prover um processo para a proteção de biocatalisadores enzimáticos, constituídos por um suporte primário, o qual é envolvido por uma matriz secundária.

15 A presente invenção é concretizada na forma de uma composição para a proteção de biocatalisadores enzimáticos com raios variando entre 1 a 4 mm.

Mais particularmente, a invenção é concretizada na forma de um biorreator cuja configuração preserva a integridade física e a atividade catalítica do biocatalisador após longas jornadas, ao mesmo tempo em que permite uma fácil separação do biocatalisador convenientemente protegido do sólido precipitado durante a reação.

25 Ainda mais particularmente, a invenção refere-se ao uso do biorreator aqui descrito para a síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos compreendendo catalisadores enzimáticos insolúveis, cuja matriz primária de imobilização é envolvida por uma matriz secundária,

capaz de permitir cerca de 100% de integridade física e cerca de 100% de atividade catalítica do catalisador.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1: Mostra o esquema do reator de escoamento em vórtices.

Figura 2: Mostra o esquema do reator tipo "air lift".

Figura 3: Ilustra a síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP, 25°C, pH 6.5. Carga enzimática = 10000 UI/Lreator. Alimentação contínua de um substrato (EMFG) durante cada carga do reator.

Figura 4: Mostra a síntese de ampicilina com cristalização de FG e AMP, 25°C, pH 6.5. Carga enzimática = 10000 UI/Lreator. Alimentação contínua de dois substratos (EMFG e 6-APA) durante cada carga do reator.

Descrição Detalhada da Invenção

A invenção aqui descrita visa definir um novo procedimento para encapsular o biocatalisador ativo, de forma a preservar sua integridade por longos períodos, ao mesmo tempo em que descreve uma configuração de reator que permite uma agitação suave (preservando as partículas biocatalíticas) e ao mesmo tempo eficiente (homogeneizando a suspensão de partículas e reduzindo resistências ao transporte de massa no filme externo).

Uma alternativa para os problemas anteriormente mencionados é a escolha do reator de escoamento em vórtices de Taylor-Couette, que tem como característica a presença de vórtices toroidais no espaço anular entre dois cilindros, obtidos pela rotação do cilindro interno acima

de uma velocidade crítica. Este tipo de escoamento apresenta algumas vantagens. Pode-se alterar o regime de um reator contínuo entre um fluxo quase pistonado e uma mistura quase perfeita, sem mudar os tempos de residência.

5 A agitação é suave, embora eficiente, tornando-o ideal para aplicações em que baixas tensões de cisalhamento sejam uma exigência do processo (como é o caso quando o suporte da enzima é, por exemplo, sílica ou um gel). A velocidade de rotação do cilindro interno fornece um grau de liberdade a
10 mais na operação do reator, permitindo fluidizar partículas sem necessidade de alterar velocidades de escoamento axial.

Outro aspecto importante no reator integrado é a proteção dos suportes que carregam a enzima. Quando ocorre precipitação do produto de interesse, o suporte deve ter
15 tamanho tal que permita sua fácil separação dos cristais de produto. Por outro lado, deve ter flexibilidade, de forma a suportar o surgimento de cristais sem se deteriorar ao longo do tempo. A combinação de características mecânicas e físico-químicas adequadas é passo crucial do processo.

20 A aplicação do escoamento de Taylor-Couette-Poiseuille para reatores químicos e bioquímicos surgiu na literatura a partir dos trabalhos de Kataoka et al. (Kataoka K, Doi HE, Hongo T. Ideal plug-flow properties of Taylor vortex flow, *Journal of Chemical Engineering Japan*,
25 8, 472-476, 1977). Vórtices de Taylor são um padrão secundário de escoamento que surge no espaço anular entre dois cilindros concêntricos, sendo o interno rotatório e o externo, em geral, estacionário (Taylor GI. Stability of a Viscous Liquid Contained between Two Rotating Cylinders,

Philosophy Transactions of the Royal Society A, 223, 289-343, 1923 e Koschmieder EL. Bénard cells and Taylor vortices. New York: Cambridge University Press, 1993).

Quando a esse fluxo se sobrepõe um escoamento axial de Poiseuille, pode-se trabalhar em operação contínua.

A partir de uma rotação crítica, inicia-se a formação de vórtices toroidais sobrepostos sobre o fluxo principal de Couette.

O uso de reatores de escoamento em vórtices (REVs) em escala de bancada tem sido reportado na literatura (Cohen S, Maron DM. Analysis of a Rotating Annular Reactor in the Vortex Flow Regime. *Chemical Engineering Science*, 46, 123-134, 1991; Kataoka K, Ohmura N, Kouzu M, Simamura YE, Okubo M. Emulsion Polymerization of Styrene in a Continuous Taylor Vortex Flow Reactor. *Chemical Engineering Science*, 50, 1409-1416, 1995, Sczechowski JG, Koval CAE, Noble RDF. A Taylor Vortex Reactor for Heterogeneous Photocatalysis. *Chemical Engineering Science*, 50, 3163-3173, 1995 Leitner NKV, Le Bras E, Foulcault E, Bousgarbiès J-L. A New Photochemical Reactor Design for the Treatment of Absorbing Solutions. *Water Science and Technology*, 35, 215-222, 1997 Ameer GA, Harmon W, Sasisekharan R, Langer, R. Investigation of a whole blood fluidized bed Taylor-Couette flow device for enzymatic heparin neutralization. *Biotechnology and Bioengineering*, 62, 602-608, 1999). Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C.; Prazeres, D.M.F.; Cooney, C.L.- Analysis of a Taylor-Poiseuille Flow Reactor-II: Reactor Modelling and Performance Assessment Using Glucose-Fructose Isomerization

as Test Reaction". Chem. Eng. Science, V.55, F18, p.3611-26, 2000 e Giordano, R.L.C.; Giordano, R.C.; Cooney, C.L. "Performance of a Continuous Taylor-Couette-Poiseuille Vortex Flow Enzymatic Reactor with Suspended Particles" -
 5 Process Biochemistry, v.35, F10, p.1093-1011, 2000

Entretanto, sua aplicação a processos industriais ainda não é usual.

Uma característica peculiar ao REV incentiva sua aplicação como biorreator: a alta flexibilidade que
 10 apresenta com respeito ao regime de escoamento. Variando a rotação do cilindro interno, o mesmo equipamento apresenta desempenho que vai desde um reator de mistura ideal ao de um tubular, o que o torna muito apropriado para utilização em plantas multipropósito.

15 Quando se estuda um sistema heterogêneo (por exemplo, com enzimas imobilizadas em gel ou células de tecido ancoradas em partículas), a rotação do cilindro interno é uma variável de operação adicional que pode facilitar sua fluidização (Moore CMV. Characterization of a
 20 Taylor-Couette Vortex-Flow Reactor, Ph. D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, EUA, 1994). Por outro lado, a baixa tensão de cisalhamento no escoamento de Taylor é particularmente interessante para aplicações em bioprocessos.

25 Na presente invenção, utiliza-se gel de pectina cítrica, de alginato, de carrageenam entre outros para envolver outra matriz que pode ser selecionada entre agarose, quitosana, sílica, um microrganismo - inativado ou não, dentre outros. Por exemplo, pode-se conformar

partículas esféricas de gel de pectina, que envolvam outras, menores, de gel de agarose, por sua vez ativado de forma a imobilizar uma determinada enzima. Com isso, pretende-se proteger a integridade do suporte de imobilização. Ao mesmo tempo, são obtidas partículas de maior diâmetro que:

- (i) não acarretem limitações difusionais significativas;
- (ii) tenham resistência às tensões de cisalhamento geradas pela agitação mecânica;
- (iii) mantenham sua integridade quando ocorra a precipitação de um ou mais produtos da biorreação, permitindo assim a integração das etapas de reação e de separação por cristalização no mesmo equipamento;
- (iv) sejam de tamanho adequado, de forma a serem facilmente separadas de um produto da reação que tenha se cristalizado no meio.

Essas partículas, por sua vez, serão mantidas suspensas no interior do reator por meio de um sistema de agitação adequado como, por exemplo, por meio de vórtices de Taylor-Couette ou por aspersão de gás inerte. Com isso, pretende-se:

- (i) obter fluidização homogênea das partículas sem submetê-las a tensões de cisalhamento excessivas, mantendo sua integridade após longos períodos de operação;
- (ii) reduzir atrasos difusionais no filme extra-partícula; e

(iii) permitir a operação flexível do reator, que pode ser utilizado em regime batelada, batelada alimentada ou contínuo, de acordo com as necessidades do processo.

5 A enzima de interesse é previamente imobilizada em suporte insolúvel ativado para permitir ligação covalente com seus grupos reativos. A imobilização pode se dar, por exemplo, pela ligação de grupos aldeído, que são gerados no suporte através da ativação prévia deste, com
10 grupos amino da enzima; ou de grupos epóxido do suporte com diferentes grupos reativos da enzima, como grupos amino, hidroxila, carboxil e tiol; ou de grupos iminocarbonatocíclicos do suporte (gerados por ativação com CNBr) com grupos amino da enzima, dentre outras
15 possibilidades de imobilização. Suportes ativados podem ser: sílica de porosidade controlada ativada com glicidoxietiltrimetoxisilano ou com glutaraldeído; gel de agarose ativado com grupos glioxil ou glutaraldeído; gel de quitosana ativado com glutaraldeído; suportes epóxi, dentre
20 outros. O conjunto (suporte ativado-reagido-com-enzima) será aqui chamado de matriz primária.

 Por exemplo, a matriz primária pode ser gel de agarose variando entre 6% e 10% (em massa), com ligações cruzadas, previamente ativado com grupos glioxil que
25 promovem ligações covalentes multipontuais com os grupos amino dos resíduos lisina da PGA. O diâmetro das partículas pode variar entre 60 μm e 300 μm . A carga enzimática pode variar entre 250 UI/(g de gel de agarose) e 600 UI/(g de gel de agarose), onde 1 UI corresponde à quantidade de

enzima que hidrolisa 1 μ mol de penicilina G por minuto a pH 8 e 37°C.

De acordo com a presente invenção a matriz primária, previamente preparada, é envolvida por um segundo
5 gel, como pectina cítrica entrecruzada com cálcio, alginato de cálcio ou de outro cátion bivalente, como zinco ou magnésio, ou de metais de transição como ferro, dentre outros (matriz secundária). Prepara-se solução de pectina ou alginato de sódio em água (relação massa de
10 polímero/massa final pode variar, estando entre 0,5 a 3% para alginato e entre 2 a 6% para pectina). Essa solução é misturada à matriz primária em proporções variáveis, conforme a atividade enzimática final desejada por grama de biocatalisador. Valores típicos dessa proporção estão entre
15 1:5 e 1:20 (massa de matriz primária/massa de matriz secundária). A suspensão obtida com essa mistura é extrudada em forma de esferas com auxílio de bomba peristáltica. O diâmetro das esferas é função da vazão de extrusão, do diâmetro interno de saída na agulha ou tubo
20 utilizados para gotejar a suspensão, e da vazão de ar paralela a esse tubo ou agulha, que se produz com a finalidade de acelerar a queda da gota formada na ponta da extrusora. Assim, é possível controlar o diâmetro final da partícula de biocatalisador. Diâmetros típicos variam entre
25 cerca de 0,5 $\pm$ 0,1 mm e 2,0 $\pm$ 0,1 mm. A gota da suspensão formada pela solução de polímero e pela matriz primária é colocada em contato com solução de sal contendo cátion bivalente como cálcio, magnésio ou zinco ou de metais de transição, como ferro. As cadeias de polímeros de pectina

ou alginato dissolvidas na água são aproximadas através das ligações cruzadas com o cátion, formando o gel insolúvel em água. No início, somente a área externa da esfera torna-se rígida. A velocidade de reação de endurecimento interno do gel (cura) e o número final de ligações entre cátion e polímero dependerão das concentrações de cátion e do polímero, do tempo de cura e da temperatura da reação. Por exemplo, pode-se utilizar solução de CaCl_2 0,2 M, com 2% (massa) de alginato ou 6% (massa) de pectina, curando-se por período de tempo mínimo de cerca de 2 horas à temperatura ambiente. Manutenção da integridade do gel de pectina ou alginato requer a presença de cátion durante o uso ou ciclos de reativação entre bateladas de reação. Nos exemplos citados a seguir é feita recomposição do teor de cálcio após jornadas de 24 h de operação. O biocatalisador fica imerso em solução 0,2 M de CaCl_2 por 2 h, entre duas jornadas do reator. A densidade final do biocatalisador pode variar bastante, dependendo do suporte usado para imobilizar a enzima e da proporção derivado enzimático/solução de polímero. Pode-se ter partículas mais ou menos densas que o meio reacional. Nos exemplos aqui apresentados, a densidade aparente das partículas, em meio aquoso, é de 1,01 g/mL.

No que se refere ao reator, deve-se utilizar reatores que promovam agitação adequada, suficiente para homogeneizar o meio e eliminar ou reduzir resistências extra-partícula ao transporte de massa. Esquema do reator de escoamento em vórtices (REV) está representado na figura 1. O reator pode ser operado continuamente, em regime semi-

contínuo ou em batelada. No caso de operação contínua, a alimentação ocorre pelo fundo e a retirada pelo topo.

De acordo com a presente invenção, as partículas não são afetadas pelas forças de cisalhamento, para rotações do cilindro interno desde 200 rpm até 2000 rpm. Um ponto importante é manter-se o cilindro interno em balanço, disposto em posição vertical. O apoio em mancal da extremidade inferior do cilindro iria pressupor o uso de um selo de vedação - próximo ao cilindro interno, se o fundo do reator fosse imóvel, ou ao cilindro externo, caso se optasse por um fundo rotatório. Em ambos os casos, entretanto, o sentido de rotação do vórtice próximo ao fundo do aparato iria dirigir as partículas na direção selo, facilitando seu esmagamento por atrito mecânico.

Assim, é utilizado na presente invenção um cilindro interno mantido em balanço, apoiado unicamente na sua extremidade superior. Para se evitar o contato das partículas com o selo do mancal superior, utiliza-se pequeno colchão de ar (ou de um gás inerte, caso o processo o exija) preenchendo o espaço sobre o líquido no topo do reator (overhead). As partículas ficam retidas no espaço anular entre o cilindro interno girante e o cilindro externo imóvel onde a razão entre o Raio interno e o Raio externo varia entre 0,20 e 0,60, aproximadamente. Outras geometrias podem ser usadas no lugar do cilindro rotatório interno. Por exemplo, troncos de cone ou outras superfícies de revolução podem facilitar a segregação dos cristais formados no reator integrado (onde ocorre precipitação do produto), separando-os das partículas de biocatalisador.

Aspersão de pequena vazão de gás (ar, por exemplo) na base do reator pode, ainda, ser utilizada para auxiliar na homogeneização das partículas.

Diferentes alternativas podem ser usadas para
5 separar o catalisador dos cristais. Uma delas é esgotar o reator por seu fundo, através de peneira de malha grossa (0,2-1,0 mm, por exemplo). Como os biocatalisadores propostos neste invento têm diâmetro da ordem de milímetro, enquanto o tamanho do sólido precipitado é menor que 100
10 μm , o precipitado passa facilmente pela peneira, evitando problemas de entupimento, típicos em outras configurações de reatores integrados. Outra alternativa de remoção do precipitado é aproveitar essa diferença de tamanho para segregá-los do biocatalisador, impondo-se fluxo axial
15 ascendente no REV, com uma baixa velocidade de rotação do cilindro interno (ou tronco de cone, dentre outras geometrias). O reator é lavado utilizando-se solução supersaturada de produto - como, por exemplo, o antibiótico - removendo-se os cristais pelo topo. Uma peneira de malha
20 grossa colocada na saída de topo do reator também pode ser empregada, para retenção do biocatalisador e remoção do precipitado, inclusive em operação contínua.

A flexibilidade desse reator pode ser amplamente explorada. Dependendo da densidade do suporte usado no
25 biocatalisador, do tamanho dos cristais produzidos, da viscosidade do meio reacional, dentre outros fatores, utiliza-se a solução mais adequada. Vários regimes de operação podem, também, ser empregados, em função das necessidades do processo específico: batelada, semi-

contínuo ou contínuo.

Outra opção para o reator da presente invenção relaciona-se ao uso de homogeneização por aspersão a gás (reator tipo "air lift"), conforme a figura 2.

5 Neste caso, a mistura é promovida por aspersor colocado no fundo do reator. Um cilindro interno pode ser acrescentado ao aparato, aumentando o grau de ordem do movimento das partículas (reator tipo "air lift"). O biocatalisador utilizado, com duas matrizes-suporte e com a
10 enzima imobilizada, reduz possibilidade de desativação em virtude da hidrofobicidade do gás aspergido. O gás utilizado pode ser ar, nitrogênio, CO₂ ou qualquer outro que seja de conhecimento daqueles versados na matéria e que sejam adequados ao processo específico. Também neste caso,
15 com a adequada injeção de gás promove-se a homogeneização do meio, sem afetar o biocatalisador descrito anteriormente. O produto, em fase sólida, é recolhido pelo fundo do reator e separado do biocatalisador, através de peneira idêntica à descrita na outra configuração (REV). No
20 caso de operação contínua, peneira no topo, junto à saída do reator, permite remoção dos cristais com retenção do biocatalisador.

Os seguintes exemplos são ilustrativos da invenção e representam concretizações preferidas. Aqueles
25 devidamente qualificados com relação ao estado da técnica saberão ou estarão aptos a encontrar não mais do que experimentação de rotina para empregar outros materiais, técnicas configurações apropriadas.

Exemplo 1: Definições e Métodos de Análise Empregados

Suporte- matriz primária: Agarose 10% (m/m), com ligações cruzadas, Hispanagar S/A. (Espanha).

5 Suporte- matriz secundária: Pectina cítrica de baixa metoxilação, tipo 8002, Braspectina do Brasil.

Enzima: Penicilina G acilase de *Escherichia coli* [EC 3.5.1.11], Antibióticos S/A, Leon, Espanha.

Substratos: éster metílico de fenilglicina, EMFG (Aldrich
10 Chemical Co.); ácido 6-aminopenicilânico, 6-APA (Winlab, obtido pela hidrólise enzimática de penicilina G), ampicilina (Winlab) e fenilglicina (Aldrich Chemical Co.).

Imobilização da PGA: de acordo com procedimentos descritos na patente ES 2.005.883-A6.

15 Atividade enzimática: 1 UI (unidade internacional) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de penicilina G por minuto a pH 8 e 37°C.

Análises: Concentrações de EMFG, 6-APA, ampicilina e FG
20 obtidas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Coluna Waters C18: Nova-Pak, 60Å, 4 μ m de diâmetro, 3,9x150mm. Fase móvel: 35% acetonitrila, 2% SDS (sulfato de laurilo e sódio), 10mM de H₃PO₄, 5mM de K₂H₂PO₄, pH 4,6 e 25°C. Comprimento de onda 225nm, vazão de 1 mL/min.

25 Experimentos de síntese: 25°C, pH 6,5 controlado pela adição automática de NaOH. Reator encamisado de escoamento em vórtices, de vidro, com cilindro interno de aço inox 316. Volume reacional, 50 mL. Diâmetro interno do reator, 36 mm. Diâmetro do cilindro girante, 10 mm (razão de raios
30 0,28). Volume de biocatalisador, 20 mL. Carga enzimática,

10 UI/(mL de reator).

Exemplo 2:

Reator de escoamento em vórtices, 25° C, pH 6,5,
5 carga enzimática 10000 UI/L_{reator}. Concentrações iniciais: 6-APA = 300 mM; EMFG = 25 mM. Operação em batelada alimentada repetida, com alimentação de EMFG. Tempo de cada etapa = 10h. A figura 3 mostra resultados típicos, de três etapas sucessivas. O tempo de descarga não está indicado.

10 Neste exemplo, obteve-se produtividade específica de cerca de $4,5 \times 10^{-5}$ mmol/(UI.min) e produtividade absoluta de 0,45 mM/min. Seletividade ao final de cada carga de cerca de 3,6 mol antibiótico/mol de FG. A seletividade instantânea variou entre 3 e 6 durante cada etapa de
15 operação do reator. Atividade enzimática e integridade física do biocatalisador mantiveram-se inalteradas.

Exemplo 3

Reator de escoamento em vórtices, 25° C, pH 6,5,
20 carga enzimática 10000 UI/L_{reator}. Concentrações iniciais: 6-APA = 300 mM; EMFG = 25 mM. Operação em batelada alimentada repetida, com alimentação de EMFG e de 6-APA. Tempo de cada etapa = 10h. A figura 4 mostra resultados típicos de uma etapa.

25 Neste exemplo, obteve-se produtividade específica de cerca de $3,5 \times 10^{-5}$ mmol/(UI.min) e produtividade absoluta de 0,435 mM/min. Seletividade ao final de cada carga de cerca de 2,4 mol antibiótico/mol de FG. A seletividade local variou entre 2 e 6 durante cada etapa de operação do

reator. Atividade enzimática e integridade física do biocatalisador mantiveram-se inalteradas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a proteção de biocatalisadores insolúveis constituídos por um suporte primário que possa ser ativado para a imobilização covalente de uma enzima
5 caracterizado pelo fato do suporte primário ser envolvido por uma matriz secundária formada por uma solução polimérica, sendo que a proporção entre a matriz primária e a secundária varia conforma a atividade enzimática final desejada por grama de biocatalisador.

10 2. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da matriz secundária ser selecionada do grupo consistindo de pectina cítrica, de alginato, de carrageenam, dentre outros.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1
15 caracterizado pelo fato da relação entre a massa de matriz primária e a massa de matriz secundária variar entre 1:5 e 1:20.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da razão massa de matriz primária /
20 massa de matriz secundária ser, preferencialmente, de 1:10.

5. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 4 caracterizado pelo fato da suspensão obtida ser extrudada em forma de esferas com um diâmetro final de partícula variando entre $0,5 \pm 0,1$ mm e $2,0 \pm 0,1$ mm.

25 6. Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato da gota de suspensão formada entre a matriz primária e pela suspensão de polímero ser colocada em contato com uma solução de sal contendo ao menos um cátion bivalente.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato do cátion bivalente ser selecionado entre cálcio, magnésio, zinco ou metais de transição.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7
5 caracterizado pelo fato da solução ser de CaCl_2 0,2M e o tempo de cura ser de 2 horas.

9. Biocatalisador caracterizado por compreender uma enzima covalentemente imobilizada em um suporte primário e encapsulado por uma segunda matriz feita com um
10 gel polimérico.

10. Biorreator com biocatalisador imobilizado caracterizado pelo fato de possuir uma configuração que promova agitação adequada, suficiente para homogeneizar o meio e eliminar ou reduzir resistências extra-partícula ao
15 transporte de massa.

11. Biorreator de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato da agitação ser promovida por meio de vórtices de Taylor-Couette e/ou por borbulhamento de gás inerte.

20 12. Biorreator de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato da agitação ser promovida por meio de vórtices de Taylor-Couette.

13. Biorreator de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato de possuir um cilindro interno
25 mantido em balanço, apoiado unicamente na sua extremidade superior.

14. Biorreator de acordo com a reivindicação 13 caracterizada pelo fato de utilizar pequeno colchão de ar

ou de um gás inerte preenchendo o espaço sobre o líquido no topo do reator.

15 15. Biorreator de acordo com a reivindicação 13 caracterizada pelo fato da rotação do cilindro interno variar entre 200 e 2000 rpm.

10 16. Biorreator de acordo com a reivindicação 13 caracterizada pelo fato das partículas ficarem retidas no espaço anular entre o cilindro interno girante e o cilindro externo imóvel, onde a razão entre o Raio interno e o Raio externo varia entre 0,20 e 0,60 aproximadamente.

15 17. Biorreator de acordo com a reivindicação 12 caracterizada pelo fato de que outras geometrias podem ser usadas no lugar do cilindro rotatório interno as quais são selecionadas entre troncos de cone ou outras superfícies de revolução.

18. Biorreator de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato da agitação ser promovida por meio de borbulhamento de gás inerte.

20 19. Biorreator de acordo com a reivindicação 18 caracterizado pelo fato da mistura ser promovida por aspersor colocado no fundo do reator e, opcionalmente, pela adição de um cilindro interno acrescentado ao equipamento.

25 20. Uso do biorreator descrito nas reivindicações 10 a 19 para a síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos caracterizado pelo fato de compreender: catalisadores enzimáticos insolúveis, cuja matriz primária de imobilização é envolvida por uma matriz secundária, capaz de permitir 100% de integridade física e 100% de atividade catalítica do catalisador.

21. Uso do biorreator de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pelo fato dos antibióticos β -lactâmicos serem selecionados entre aqueles obtidos pela reação de um composto éster ou amina com um núcleo β -lactâmico como 6-APA, 7-ADCA, 7-ACA, gerando antibióticos como ampicilina, amoxilina, cefalexina, cefadroxil, dentre outros.

22. Uso do biorreator de acordo com a reivindicação 21 caracterizado pelo fato dos produtos, em fase sólida, serem retirados pelo fundo, topo ou lateral do reator, opcionalmente com reciclo parcial ou total da fase líquida.

23. Uso do biorreator de acordo com a reivindicação 21 caracterizado pelo fato do biocatalisador manter 100% de sua atividade e total integridade física após 100 h de operação.

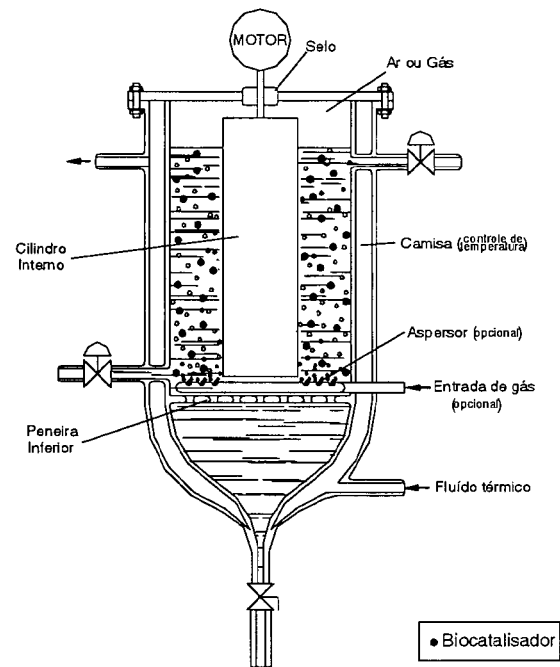


Figura 1

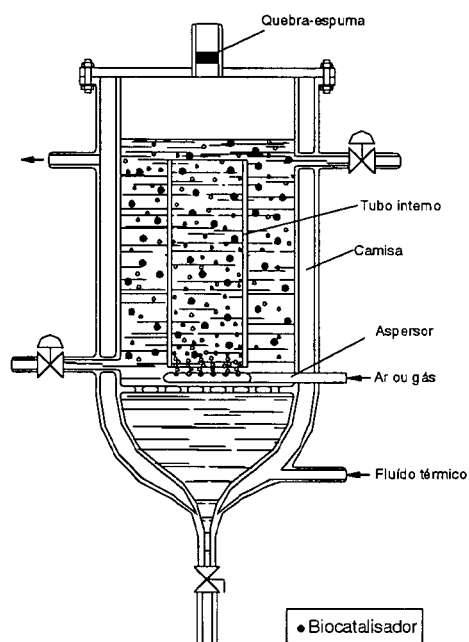


Figura 2

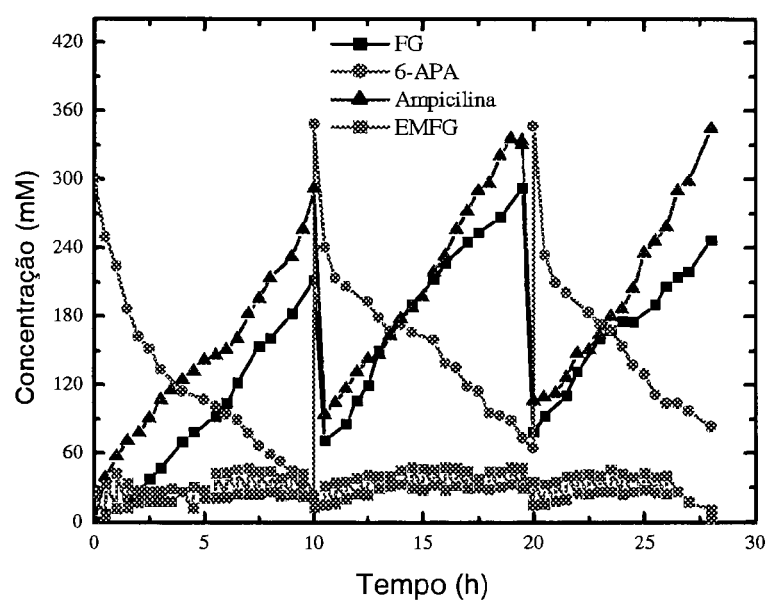


Figura 3

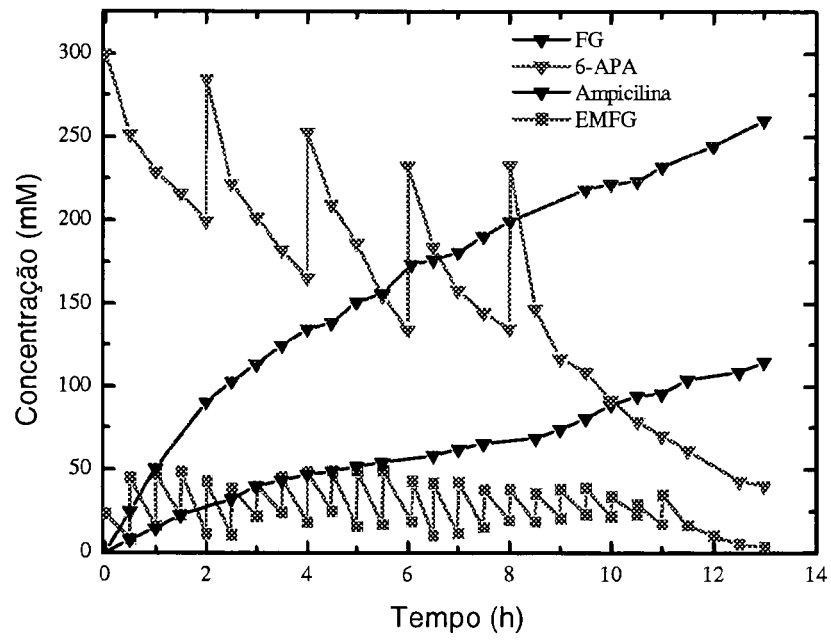


Figura 4

RESUMO

**"PROCESSO PARA A PROTEÇÃO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS
INSOLÚVEIS, BIOCATALISADOR OBTIDO E BIORREATOR COM O
BIOCATALISADOR IMOBILIZADO"**

5 A presente invenção refere-se a um processo para a proteção de biocatalisadores enzimáticos, constituídos por um suporte primário, o qual é envolvido por uma matriz secundária.

10 Mais particularmente, a invenção é concretizada na forma de um biorreator cuja configuração preserva a integridade física e a atividade catalítica do biocatalisador após longas jornadas, ao mesmo tempo em que permite uma fácil separação do biocatalisador convenientemente protegido do sólido precipitado durante a
15 reação.

 Ainda mais particularmente, a invenção refere-se ao uso do biorreator aqui descrito para a síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos compreendendo catalisadores enzimáticos insolúveis, cuja matriz primária
20 de imobilização é envolvida por uma matriz secundária, capaz de permitir cerca de 100% de integridade física e cerca de 100% de atividade catalítica do catalisador.