SINTESE DE L-FENIL-ACETIL-CARBINOL (L-PAC) POR PROCESSO FERMENTATIVO

MARIANA MIGUEZ TARDELLI GARCIA

TESE APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

ESCOLA DE QUÍMICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

2015

SINTESE DE L-FENIL-ACETIL-CARBINOL (L-PAC) POR PROCESSO FERMENTATIVO

Mariana Miguez Tardelli Garcia

Tese submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Banca Examinadora

Prof[a]. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Prof[a] Maria Antonieta Peixoto G. Couto, D. Sc.

Prof[a] Verônica Ferreira Melo, D. Sc.

Sérgio Falomir Pedraza Y. Campos, D. Sc.

Prof[a] Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, D. Sc.

Rio de Janeiro, R.J. – Brasil

Julho/2015

FICHA CATALOGRÁFICA

MIGUEZ, MARIANA MIGUEZ TARDELLI GARCIA

Síntese de L-fenil-acetil-carbinol (L-PAC) por processo fermentativo – [Rio de Janeiro] 2015.

xix, 123p. 29,7 cm .

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2015

1.L-fenil-acetil-carbinol (L-PAC); 2. Levedura; 3.Biotransformação; 4. Benzaldeído. 5. Avaliação Econômica

I. EQ/UFRJ.
II. Título (série)

Resumo da tese apresentada à EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.).

SINTESE DE L-FENIL-ACETIL-CARBINOL (L-PAC) POR PROCESSO FERMENTATIVO

Mariana Miguez Tardelli Garcia

Julho/2015

Orientadores: Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, (D.Sc.)

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, (D.Sc.)

Programa: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

L-fenil-acetil-carbinol (L-PAC) é um intermediário na produção de L- efedrina e pseudoefedrina, que são fármacos utilizados como descongestionantes e anti-asmáticos. Várias espécies de leveduras que sintetizam este composto, sendo estes os micro-organismos mais estudados na produção de L-PAC. Este trabalho teve como objetivo selecionar uma levedura produtora de L-PAC e otimizar o meio de cultura e condições de processo para a produção de L-PAC em frascos agitados e em biorreator de bancada. Vinte e duas espécies de leveduras dos generos *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Candida* foram avaliadas. O meio de produção utilizado inicialmente contendo (g/L), glicose: 40, peptona bacteriológica: 5, extrato de levedura: 10; $MgSO_4.7H_2O$: 1; $CaCl_2.2H_2O$: 0,05, $Na_2HPO_4.12H_2O$: 35 , ácido cítrico: 2 e benzaldeído: 1. Entre as vinte e duas espécies estudadas cinco foram selecionados como bons produtores. Os resultados indicaram que adição do benzaldeído no meio de produção deve ser feita durante a fase exponencial de crescimento celular. Dentre estas cinco espécies, uma levedura do gênero *Saccharomyces* foi selecionada. O meio de produção teve sua composição minimizada por intermédio de um planejamento experimental Plaket-Burman (PB-12) e a concentração inicial de células, benzaldeído e glicose foram determinadas atráves de um planejamento fatorial completo 2^3. A concentração máxima de L -PAC obtida em frascos agitados foi de 4,92 g/L em 7 h de cultivo. Já em biorreator com alimentação intermitente de benzaldeido e glicose, a concentração máxima de L-PAC foi de 7,65 g/L após 7 h (Produtividade (Pr) = 1,09 g/Lh) e a alimentação continua foi de 8,91 g/L após 4 h (Pr = 2,22 g/Lh). A ampliação de escala de 1 L para 13 L foi baseada no critério da potência efetiva. A maior produção de L-PAC em biorreator de 13 L foi de 3,15 g/L após 7 h substituindo-se a glicose por sacarose. O processo apresenta um grande potencial de lucro o que justifica a implantação de uma planta nacional.

Abstract of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

BIOTRANSFORMATION OF L-PHENYLACETYLCARBINOL (L-PAC)

Mariana Miguez Tardelli Garcia

July /2015

Supervisors: Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral (D.Sc.)

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho (D.Sc.)

Program: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

L-phenylacetylcarbinol (L-PAC) is an intermediate in the production of L-ephedrine and pseudoephedrine, which are pharmaceutical compounds used as decongestants and anti-asthmatics. There are a large number of yeasts that are able to perform this biotransformation, which is why they are the most studied organisms in the production of L-PAC. Productivity depends on the organism and its metabolic state. This work aims to select the best yeast to produce L-PAC, to improve the culture medium and process conditions for L-PAC productuon in shake flasks and bioreactor. Twenty two species of yeasts of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* and *Candida* were tested. The production medium used initially contained (g/L) glucose: 40, bacteriological peptone: 5, yeast extract: 10; $MgSO_4.7H_2O$: 1; $CaCl_2.2H_2O$ 0.05, $Na_2HPO_4.12H_2O$: 35, Citric Acid: 2 and Benzaldehyde: 1. Among the twenty-two species studied five were selected as good producers. The results indicated that the addition of benzaldehyde must be during the exponential phase of cell growth. Among these five, one specie of the *Saccharomyces* was selected. The production medium was minimized through a Plaket-Burman experimental design (PB-12) and initial concentration cell, benzaldehyde and glucose through a factorial design 2^3. The maximum concentration of L-PAC obtained in shake flasks was 4.92 g/L at 7 h of cultivation. In a 1L-bioreactor with intermittent glucose and benzaldehyde fed maximum concentration of L-PAC was 7,65 g/L at 7 hours (Productivity (Pr) 1.09 g/L.h). Changing to a continous feed, the maximum concentration of L-PAC was 8,91 g/L after 4 h (Pr = 2,22 g/Lh). The scale-up from 1 L for 13 L was based on the effective power criterion. The higher productin in 13 L-bioreactor was 3,15 g/L after 7 h. The process has great profit potential which justifies the implementation of a national plan.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO 1

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

II.1 L-PAC na produção de efedrina 4

II.2 Micro-organismos na produção de L-PAC 6

II.3 Influência do meio de cultivo na produção de L-PAC 7

II.4 Influência das condições de cultivo na produção de L-PAC 11

II.5 Bioquímica do processo de produção de L-PAC 12

II.5.1 Piruvato descarboxilase 14

II.5.2 Álcool desidrogenase 16

II.6 Recuperação de L-PAC 17

II.7 Quantificação de ácido benzóico, álcool benzílico, L-PAC e benzaldeído 18

III. OBJETIVOS 20

III.1 Objetivos específicos 20

IV. METODOLOGIA EXPERIMENTAL 21

IV.1 Equipamentos 21

IV.2 Seleção do micro-organismo produtor 21

IV.2.1 Meios de Cultura 22

IV.2.2 Purificação das cepas 23

IV.2.3 Cultivos 23

IV.3 Produção de L-PAC em frascos agitados 24

IV.4 Produção de L-PAC em biorreator 24

IV.4.1 Produção em biorreator de 1 L 24

IV.4.2 Produção em biorreator de 13 L. 25

IV.5 Aperfeiçoamento do meio de cultivo e das condições de processo para a produção de L-PAC em frascos agitados - Planejamento Experimental....28

IV.6 Estudo da influência de alguns fatores na Produção de L-PAC....31

IV.7 Extração de L-PAC do meio fermentado....31

IV.8 Extrapolação de Escala do Processo de Produção de L-PAC....32

IV.9 Métodos Analíticos....32

IV.9.1 Quantificação do crescimento celular....33

IV.9.2 Massa Seca....33

IV.9.3 Análise da concentração de Glicose....33

IV.9.4 Análise da concentração de sacarose....34

IV.9.5 Análise da concentração de L-PAC....35

IV.10 Avaliação Econômica....36

V. RESULTADOS EM FRASCOS AGITADOS....38

V.1 Seleção das cepas....38

V.2 Estudo do tempo de adição de Benzaldeído....40

V.3 Avaliação de parâmetros do processo de produção de L-PAC....46

V.4 Avaliação de interferentes metabólicos....58

V.5 Estudo da minimização de sais do meio de produção....61

V.6 Estudo da produção de L-PAC em frascos agitados – Efeito da concentração inicial de células....65

V.7 Estudo da influência de cofatores na Produção de L-PAC....67

V.8 Avaliação da ação da betaciclodextrina como proteção ao efeito tóxico do benzaldeído....69

VI. PRODUÇÃO DE L-PAC EM BIORREATOR 1L....70

VI.1 Estudo da aeração do sistema.....70
VI.2 Estudo da alimentação do processo 71
VI.3 Estudo da concentração de biocatalisador.....72
VI.4 Avaliação da Reutilização de Células. 75
VI.5 Estudo da Adição de cofator Tiamina piro fosfato (TPP) e íon magnésio.....76
VI.6 Experimento em biorreator com açúcar cristal e tiamina 78
VI.7 Estudo da alimentação contínua de glicose/sacarose e Benzaldeído. 80
VII. PRODUÇÃO DE L-PAC EM BIORREATOR 13L.....82
VII.1 Avaliação da Extrapolação de Escala da Agitação.....82
VII.2 Estudo da alimentação contínua em biorreator de 13L.....86
VIII. Extração líquido-líquido do L- PAC 93
IX. AVALIAÇÃO ECONÔMICA 96
IX.1 Cálculos dos volumes dos biorreatores.....96
IX.2 Cálculos para a Extrapolação de Escala da Agitação.....100
IX.3 Preços das Matérias-Primas, Insumos, Subprodutos e Produto Final.....104
IX.4 Avaliação Econômica do Processo com Reutilização de Células e Açúcar Cristal.....107
X. CONCLUSÕES.....112
XI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....114
REFERÊNCIAS 115

DEDICATÓRIA

À minha família,

em especial a minha filha Ana Letícia

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de relatar meus sinceros agradecimentos a todos àqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração dessa tese.

Agradeço a Deus sem O qual não conseguiria chegar até aqui, pela força, paciência e fé nele depositada para enfrentar todos os obstáculos os quais tive que enfrentar durante estes quatro anos de estudo e principalmente por todas as graças alcançadas.

À professora Priscilla, minha orientadora, amiga, afilhada, madrinha e maior incentivadora. Pri, obrigada por ter confiado a mim esse projeto, por ter reacendido a chama científica em mim e por acreditar que eu possa vencer no meio acadêmico. Obrigada pelos puxões de orelha, pelas viagens maravilhosas a Itália, pelo apoio durante minha gravidez, pelo apoio no meu novo emprego, pela sua amizade. Enfim, obrigada por não só me orientar, mas me acompanhar durante minha jornada não só desta tese, mas desde que eu entrei no laboratório e tive que “grudar” em você para aprender tudo.

À professora Maria Alice, pelos 12 anos de orientação. Por ter confiado em mim no desenvolvimento deste projeto. Pelos seus conselhos acadêmicos e maternais. Pelos “pulos do gato” dados a cada obstáculo encontrado.

A minha filha Ana Letícia, minha maior obra prima, pela inspiração que me dá em querer ser sempre melhor e a vencer pelo futuro dela.

Ao meu marido Marcello, por fazer parte desse sonho. Por acreditar me dar o incentivo necessário para nunca desistir. Por ser um pai maravilhoso, um grande companheiro e meu melhor amigo.

A minha mãe, pelo seu exemplo de dedicação e empenho. Pela avó presente e babona sempre disposta a me ajudar. Por acreditar e se orgulhar do meu trabalho. Por ter me ensinado a dar valor a tudo àquilo que conquistamos com o nosso esforço e sacrifício.

As minhas famílias Miguez e Tardelli Garcia pela confiança em mim depositada, pelas orações e por sempre torcerem por mim.

Aos meus amigos, pelos seus elogios, broncas, e-mails, telefonemas, apps, festas, visitas e por tornarem cada dia melhor.

Aos amigos do laboratório Biose, pelas ajudas durante minha gravidez, pelos happy hours, seminários, congressos, por tornarem agradáveis a rotina de experimentos e serem exemplos.

A minha amiga Patrícia Nunes, companheira de projeto, pela sua ajuda nas análises de HPLC, confecção de relatórios.

Os meus alunos de iniciação científica, Natália Azeredo, Fabiana Coelho, Vanessa Furtado, Naíra Menezes, Marcella Capella e Rodrigo Lannes pela

companhia durante os experimentos, pela amizade formada. Espero que tenham apreendido um pouco durante este período de convívio e que o meu amor à ciência tenha contagiado cada um de vocês.

À “Galinha Pintadinha”, “Peppa” e “Luna” sem as quais não conseguiria escrever essa tese.

À minha “creche”, a cada uma das minhas “filhas”, que me biotransformam a cada dia, fermentando meus experimentos e produzindo conhecimento.

Cabe ainda agradecer à Nortec química pela confiança ao nosso grupo no desenvolvimento deste projeto. Em especial aos Dr. Sérgio Falomir e Otávio Carvalho pelo apoio dado durante a pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa.

"Obstáculo é aquilo que você enxerga, quando tira os olhos do seu objetivo."

Autor: Henry Ford

"Sucesso não é a chave para a felicidade; felicidade é a chave para o sucesso.

Se você ama o que faz, você será bem sucedido."

Albert Schweitzer

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura I-1 Conversão química de L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC) em L-Efedrina e D-Pseudoefedrina (SHUKLA e KULKARNI, 2000). 1

Figura II-1 Estrutura do L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000). 4

Figura II-2 Obtenção do L-PAC por intermédio de Biotransformação Seguida de Aminação Redutiva para Síntese de Efedrina (ROGER, SHIN e WANG, 1997). 5

Figura II-3 Conversão Química de L-Efedrina em D-Pseudoefedrina (adaptado de Khan, 2010). 5

Figura II-4 Reações bioquímicas comuns na produção de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000). 13

Figura II-5 Estrutura da Tiamina Pirofosfato (TPP) 16

Figura II-6 - Estrutura do cofator NAD(P) (Fonte: Voet, 2002) 16

Figura IV-1 Foto do biorreator *Tecnal*- TEC-BIO-C com capacidade de 1 litro. 25

Figura IV-2 Foto do biorreator de 4 L MICROFERM FERMENTOR (New Brunswick Scientific CO.) 26

Figura IV-3 O biorreator de 13 L (*BIOESTAT E – B Braun*) 27

Figura IV-4 Cromatograma da amostra padrão de Sacarose.....35

Figura IV-5 Cromatograma da amostra padrão de L-PAC a 283 e a 254 nm 36

Figura V-1 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al*. (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído no início do cultivo (0 h).....43

Figura V-2 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al*. (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído após 1,5h. 44

Figura V-3 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al*. (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído após 3h. 44

Figura V-4 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al*. (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído após 4,5h. 45

Figura V-5 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para a cepa *S.pas1* na formação de L-PAC. 48

Figura V-6 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para a cepa *S. cer5* na formação de L-PAC. 50

Figura V-7 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para a cepa *K.mar1* na formação de L-PAC.....52

Figura V-8 Cinética de produção de L-PAC e seus subprodutos em frascos agitados a 200 rpm e 30°C por *S.cer5* (a) e *S.pas1* (b) em concentrações iniciais de 40 g/L de glicose, 3 g/L de células, 4 g/L de Benzaldeído e pH 5. 53

Figura V-9 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^3 do DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*. 57

Figura V-10 Superfície de resposta para as interações concentração de células (g/L) e benzaldeído (g/L). O valor da concentração de glicose foi fixado em 50 g/L do DCCR para análise da concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*.....58

Figura V-11 Batelada com adição de benzaldeído e acetaldeído para produção de L-PAC por *S.cer5* a 30 °C em pH 5,5 em frascos agitados. 61

Figura V-12 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman-12* para produção de L-PAC por *S.cer5*. e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo.....63

Figura V-13 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman-12* para produção de Álcool benzílico por *S.cer5*. e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo. 64

Figura V-14 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman-12* para produção de Ácido benzóico por *S.cer5*. e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo. 65

Figura V-15 Análise dos efeitos das variáveis (concentração de benzaldeído, concentração de biomassa no inóculo e concentração inicial de glicose no meio) do planejamento fatorial completo 2^3 na produção de L-PAC. 67

Figura VI-1Produção de L- PAC em Biorreator 1L meio estipulado após o planejamento PB com concentração inicial de glicose de 80 g/L e alimentações de glicose e benzaldeído. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas a tendência do perfil cinético.....74

Figura VI-2- Produção de L- PAC no Biorreator de 1L por S.cer5 em meio PB com inoculo com 50% de células reutilizadas e 50% de células novas.....76

Figura VI-3 Produção de L- PAC no Biorreator de 1L por S.cer5 em meio PB com adição de Tiamina 1% e $MgSO_4.7H_2O$ 5 g/L. 78

Figura VI-4 Cinética de produção de L-PAC no biorreator de 1 L por *S.cer 5* PB com 5g/L de $MgSO4.7H_2O$ e 80 g/L de açúcar cristal, e batelada alimentada com 2 alimentações de solução de açúcar cristal 48% (m/v) e 3 alimentações de benzaldeído 79

Figura VI-5 Cinética de produção de L-PAC em meio de produção PB por *S.cer5* em biorreator de 1 L com alimentação contínua de glicose 40% e benzaldeído 10%. 81

Figura VI-6 Cinética de produção de L-PAC por *S.cer.5* com alimentação de Açúcar cristal 48%, benzaldeído 2% na vazão de 1,67 mL/min em meio PB com 5 g/L $MgSO4.7H_2O$ suplementado de betaciclodextrina 2%. 82

Figura VII-1 Cinética de produção de L-PAC por *S. cer 5* em biorreator de 13 L com batelada alimentada e 350 rpm.em meio de produção PB com concentração inicial de glicose de 40 g/L 83

Figura VII-2 Cinética de produção de L-PAC por *S.cer.5*em biorreator de 13 L com batelada alimentada e 190 rpm em meio de produção PB com concentração inicial de glicose de 40 g/L 86

Figura VII-3 Cinética de produção de L-PAC em biorreator de 13 L com alimentação contínua de glicose e benzaldeído; 87

Figura VII-4 Cinética de produção de L-PAC em biorretor de 13 L com alimentação contínua de açúcar cristal 48% e benzaldeído 5%; 88

Figura VII-5 Cinética de produção de L-PAC em meio PB por S.cer5 em biorretor de 13L com alimentação contínua de açúcar cristal 48% e benzaldeído 5% e reutilização de células. 89

Figura VIII-1 Teste de extração com solventes (a) Tolueno, (b) Xileno, (c) Éter de Petróleo, (d) Ciclohexano, (e) Clorofórmio e (f) Hexano. 93

Figura VIII-2Concentrado de L-PAC após a rotaevaporação 95

Figura IX-1 - Diagrama de blocos para a produção de 1 kg de L-PAC em batelada alimentada intermitente. 103

LISTAS DE TABELAS

Tabela IV-1- Lista de micro-organismos selecionados a partir dos bancos de cepa: da Fiocruz (INCQS, RJ, Brasil), do Biose – Escola de Química – UFRJ e do Instituto de Microbiologia da UFRJ. 22

Tabela IV-2 Valores reais e codificados das variáveis empregadas no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} 29

Tabela IV-3 Valores reais e codificados das variáveis empregadas no delineamento composto central rotacional. 29

Tabela IV-4Valores reais e codificados das variáveis empregadas no planejamento Plackett-Burman com 12 experimentos (PB-12). 30

Tabela IV-5 Valores reais e codificados das variáveis empregadas no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{3-1} 30

Tabela IV-6 Estudo da Influência da concentração de peptona e sulfato de magnésio, tiamina e nitrato de prata na produção de L-PAC. 31

Tabela V-1 Parâmetros do cultivo das cepas escolhidas 39

Tabela V-2 Produção de L-PAC e subprodutos para as 5 melhores cepas em diferentes tempos de adição do Benzaldeído em meio de produção (Zhang *et al.*, 2008) com inoculo de 3 g cél/L, concentração inicial de glicose de 25 g/L. 41

Tabela V-3 Planejamento experimental: Estudo das influências das variáveis, concentração de glicose, concentração inicial de células, benzaldeído e do pH inicial na produção de PAC por *S.pas1 após 7 h de cultivo com adição de benzaldeído após 3 h de cultivo.* 47

Tabela V-4 Planejamento experimental: Estudo das influências das variáveis, concentração de glicose, concentração inicial de células, benzaldeído e do pH inicial na produção de PAC por *S. cer5* e adição de benzaldeído após 3 h de cultivo 49

Tabela V-5 Planejamento experimental: Estudo das influências das variáveis, concentração de glicose, concentração inicial de células, benzaldeído e do pH inicial na produção de PAC por *K.mar1.e adição de benzaldeído após 1,5 h de cultivo* 51

Tabela V-6 Planejamento DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído após 1,5 h na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*. 55

Tabela V-7 Análise de variância (ANOVA) DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*.Coeficiente de determinação: R^2=0,85; F(0.05;7;9) = 3,29. Valor de F= média quadrática da regressão/ média quadrática do resíduo. 56

Tabela V-8 Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas significativas. L representa os efeitos lineares e Q os quadráticos do DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*. 56

Tabela V-9 Análise comparativa da influência dos interferentes metabólicos..... 59

Tabela V-10 Resultados do planejamento experimental *Plackett-Burman-12*, para produção de L-PAC, álcool benzílico e ácido benzoico por *S.cer5.* com concentração inicial de células de 3 g/L e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo. 62

Tabela V-11 Planejamento fatorial Completo 2^3 para análise da Concentração inicial de células, glicose e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados. 66

Tabela V-12 Estudo das influências das variáveis, concentração de $MgSO_4.7H_2O$, $AgNO_3$, tiamina e peptona na produção de L-PAC, álcool benzílico e ácido benzoico por *S.cer.5* em meio de produção PB com concentração inicial de células de 30 g/L e glicose inicial de 80 g/L. 68

Tabela V-13 Aviação da ação protetora da betaciclodextrina, por *S.cer.5* em meio de produção PB, concentração inicial de céluas de 30 g/L e de glicose de 80 g/L em diferentes concentrações de benzaldeído 69

Tabela VI-1 Estudo da aeração do sistema para produção de L-PAC em biorreator de 1 L por *S.cer5* a 30 ^oC, 350 rpm e pH 5,5, meio de produção de Zhang *et al.* (2008) com adição de benzaldeído após 3 h. 71

Tabela VI-2 Estudo da alimentação de benzaldeído e glicose de forma intermitente do processo para a produção de L-PAC em biorreator de 1 L. por S.cer 5 em 750 mL de meio de produção de Zhang *et al.* 2008. 71

Tabela VI-3 Avaliação da produção de L-PAC em biorreator de 1 L utilizando concentração inicial de células de 30 g/L. e diferentes alimentações de glicose e Benzaldeído durante o processo. 73

Tabela VI-4 Avaliação da adição de Tiamina piro fosfato (TPP) e Mg^{2+} na formação de L-PAC em meio determinado pelo PB por *S.cer.5.* 77

VII-1 Comparação dos resultados de produção de L-PAC em frascos agitadosL por S.cer 5 90

Tabela VII-2 Comparação dos resultados de produção de L-PAC em biorreator de 1 L por S.cer 5 91

Tabela VII-3 Comparação dos resultados de produção de L-PAC em biorreator de 13 L por S.cer 5 92

Tabela VIII-1 Extração líquido-líquido 1;1 com solventes orgânicos Tolueno, éter de petróleo, clorofórmio, hexano, clico hexano e xileno. 94

Tabela VIII-2 Processo de extração líquido-líquido com solventes orgânicos do meio aquoso contendo.7,11 g/L de L-PAC. 94

Tabela VIII-3 Extração líquido-líquido de L-PAC do meio fermentado com tolueno e concentração da fase orgânica. 95

Tabela IX-1 Preços das Matérias-Primas, Insumos e Produto Final 104

Tabela IX-2 Preços FOB das Matérias-Primas, Insumos e Produto Final 105

Tabela IX-3 Lucro bruto inicial para o meio determinado pelo PB. 106

Tabela IX-4 Lucro bruto inicial para o meio determinado pelo PB com reutilização de células e açúcar cristal.....108

Tabela IX-5 Custos da energia elétrica consumida durante o processo de produção de L-PAC em escala industrial 109

Tabela IX-6 Cálculo do custo Funcionário 110

Tabela IX-7 Custos da mão de obra necessária para o processo de produção L-PAC em escala industrial 110

Tabela IX-8 Folha de custos e ganhos para o processo de produção de L-PAC em escala industrial 111

LISTAS DE QUADROS

Quadro I-1 Estatísticas Anuais de Consumo Interno Total (ANVISA, 2014). 2

Quadro II-1 Caracteristicas físico-química da molécula de L-PAC. 4

Quadro II-2 Resultados principais para produção de L-PAC por leveduras. 8

LISTAS DE SIGLAS, ABREVIATURAS ETC.

ADH – Álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1)

ANOVA - Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina trifosfato

CG – Cromatografia Gasosa

CMP – Custo anual de matéria-prima

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPT – Custo total do Produto.

CRC – Código Referente a Cultura.

DCCR - Delineamento composto central rotacional

FOB – Frete será feito pelo comprador (na sigla inglesa para Free on Board)

GYMP – glicose, extrato de lêvedo, maltose e peptona

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC na sigla inglesa para High-Performance Liquid Chromatography).

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LB – Lucro Bruto

LBI – Lucro Bruto Inicial

L-PAC – L-Fenil-acetil-carbinol

NAD – Nicotinamide adenine dinucleotide

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PB-12 – Planejamento experimental Plackett-Burman

PDC – Piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1)

RQ – Coeficiente Respiratório

RV – Retorno anual de vendas

TPP – Tiamina Piro fosfato

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UV – Ultra Violeta

vvm – volume de ar por volume de meio.

YPD – Extrato de Lêvedo, Peptona e Glicose

YMA – Extrato de Lêvedo, extrato de Malte, Agar, glicose e peptona

I. INTRODUÇÃO

L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC), 1-hidroxi-1-fenilpropan-2-ona (IUPAC) também conhecido como 1-hidróxi-1-fenil-2-propanona ou cetona de Neuberg, é utilizado para a síntese de L-efedrina e pseudoefedrina (ELLAIAH e KRISHNA, 1987). Como pode ser observado na Figura I-1.Esses dois últimos compostos são isômeros ópticos, e são geralmente empregados na formulação de diversos medicamentos como descongestionantes e antiasmáticos (SHIN e ROGERS, 1995).

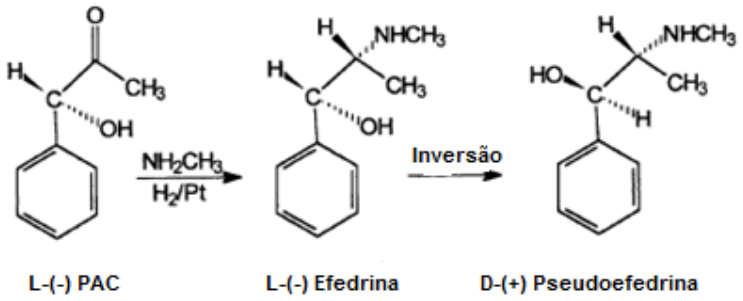


Figura I-1 Conversão química de L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC) em L-Efedrina e D-Pseudoefedrina (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

O L-PAC pode ser sintetizado de duas formas: por síntese química ou por meio da biotransformação. Provavelmente, a vantagem mais importante dos biocatalisadores em relação aos catalisadores químicos é que eles são quimio-, regio- e estereosseletivos. Nas reações catalisadas por agentes químicos pode ocorrer a formação de produtos secundários ou a formação de vários isômeros de um único produto. Neste caso, o uso de biocatalisadores tem o potencial de produzir apenas o produto desejado com elevada seletividade. Tal seletividade elevada é de interesse óbvio para o setor farmacêutico, a partir do ponto de vista da síntese de intermediários quirais ou produtos finais.

A síntese química para a produção de L-PAC ocorre mediante a utilização de cianoidrinas, empregando reagentes de Grignard e boroidreto de sódio ($NaBH_4$) (BRUSSE, ROOS, e VAN DER GEN, 1988). Já a rota bioquímica é mediada pela ação de micro-organismos, em presença de benzaldeído, que é a rota mais

empregada industrialmente. A biotransformação é preferida à síntese química, porque a segunda envolve a utilização de indutores quirais, além de outros agentes, e demanda muito tempo, além de empregar condições extremamente rigorosas, o que torna o processo sintético em escala industrial mais difícil (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

Grande parte do L-PAC produzido no mundo advém de plantas farmoquímicas concentradas na Índia. Contudo, a China também se destaca como produtora desta substância (CHEMICAL INDUSTRY NEWS, 2012).

O Brasil não possui nenhuma planta de síntese de L-PAC. Toda efedrina produzida no país é proveniente do L-PAC importado pelas indústrias farmoquímicas brasileiras. O país se torna, por este motivo, totalmente dependente de importações de L-PAC para produzir a efedrina e pseudoefedrina necessárias para a elaboração de medicamentos.

Além disso, o Brasil já importa uma boa quantidade dessas substâncias diretamente. O consumo anual de efedrina no Brasil é da ordem de uma a duas toneladas, enquanto o de pseudoefedrina é significativamente maior, exibindo valores anuais na faixa de dez a onze toneladas (ANMAT, 2014).

No Quadro I-1 podem ser identificados dados relacionados ao consumo interno de efedrina e pseudoefedrina no Brasil (ANVISA, 2014). De 2006 a 2008, em análises anuais de Consumo Interno Total, notam-se que o consumo de efedrina reduziu em 35,65% de 2006 para 2007 e em 31,31% de 2007 para 2008. Em contrapartida, no que diz respeito à pseudoefedrina, houve um movimento de aumento inicial de 3,01% de 2006 para 2007 seguido de uma redução de 11,37% de 2007 para 2008.

Quadro I-1 Estatísticas Anuais de Consumo Interno Total (ANVISA, 2014).

Consumo em Kg			
Substância	2006	2007	2008
Efedrina	2.395,895	1.541,901	1.059,113
Pseudoefedrina	11.375,933	11.718,361	10.386,402

A biotransformação de benzaldeído em L-PAC foi descrita primeiramente em 1921 utilizando levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*, como micro-organismo produtor (NEUBERG e LIBERMAN, 1921).

Apesar de ser substrato para produção de L-PAC, o benzaldeído acaba sendo tóxico às células, quando em exposições prolongadas. Isso se dá, principalmente, por alterações na permeabilidade da parede celular dos micro-organismos (LONG e WARD, 1989), mas também em parte pela inativação das enzimas da rota metabólica (CHOW *et al.*, 1995).

Portanto, pretende-se no presente trabalho desenvolver um processo fermentativo de síntese de L-PAC a partir de um micro-organismo disponível em coleções de cultura nacionais, propor um mecanismo de ampliação de escala e avaliar a viabilidade econômica do processo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 *L-PAC na produção de efedrina.*

O L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC) é uma substância altamente empregada como intermediário de fármacos. Sua estrutura é mostrada na Figura II-1 e sua caracterização está listada no Quadro II-1. Esta substância age como material de partida para a síntese química de L-efedrina e pseudoefedrina, compostos químicos utilizados na formulação de descongestionantes, antiasmáticos e, segundo a literatura, em aplicações mais recentes, como remédios para controle de obesidade (SHIN E ROGERS, 1995).

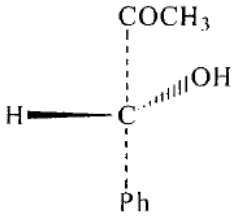


Figura II-1 Estrutura do L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

Quadro II-1 Caracteristicas físico-química da molécula de L-PAC.

L-Fenil-acetil-carbinol	
Nome IUPAC	1-hidroxi-1-fenilpropan-2-ona
Outros Nomes:	L-PAC, R-PAC, cetona de Neuberg
Propriedade	
Fórmula Química	$C_9H_{10}O_2$
Massa Molar	150.16 $g.mol^{-1}$
Aparencia	Pó amarelo
Densidade	1,119 g/cm^3
Ponto de fusão	172°C,445 K, 342°F
Ponto de ebulição	253°C, 526 K, 487°F

A L-efedrina é um alcaloide natural extraído da Efedra (*Ephedra cínica*), uma planta da família Ephedraceae com diversas propriedades farmacológicas interessantes. Os extratos da *Efedra* são comumente conhecidos como Ma Huang na China, aonde tal planta é utilizada há mais de 5.000 anos na constituição de

remédios populares para tratamento de asma e infecções respiratórias (BOHN A, *et al.* 2003).

O ingrediente ativo da *Efedra*, a L-efedrina, foi isolado da planta pela primeira vez em 1855. O interesse por este importante princípio ativo cresceu posteriormente, em decorrência da publicação de trabalhos que tratavam de seus efeitos cardiovasculares e de sua semelhança com a epinefrina (adrenalina) (ROGER, SHIN e WANG, 1997).

A extração química gera uma solução contendo diversas impurezas, o que dificulta a recuperação dos produtos. A biossíntese do L-PAC se dá por intermédio da reação de um dos acetaldeídos ativo proveniente da via metabólica da glicose com o benzaldeído. Contudo, está atrelada à formação de álcool benzílico como subproduto, decorrente da ação da enzima álcool desidrogenase (ADH). A rota bioquímica será detalhada no item II.5 deste capítulo.

A síntese de L-efedrina a partir do L-PAC ocorre então mediante aminação redutiva empregando metilamina e é ilustrada na Figura II-2.

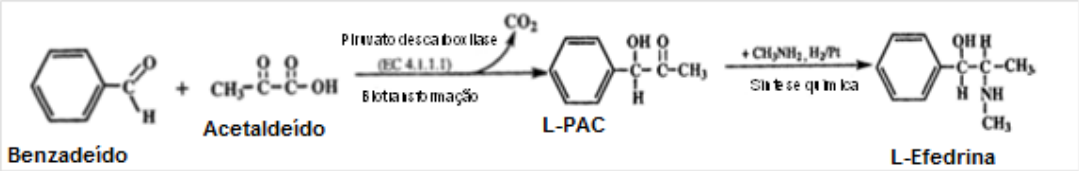


Figura II-2 Obtenção do L-PAC por intermédio de Biotransformação Seguida de Aminação Redutiva para Síntese de Efedrina (ROGER, SHIN e WANG, 1997).

A pseudoefedrina é obtida quimicamente por meio do processo de inversão da efedrina, como pode ser visualizado na Figura II-3.

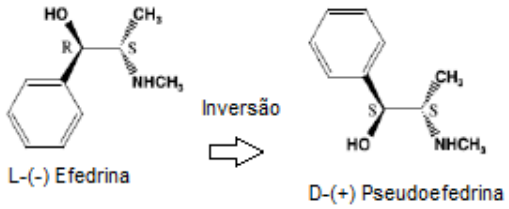


Figura II-3 Conversão Química de L-Efedrina em D-Pseudoefedrina (adaptado de Khan, 2010).

II.2 *Micro-organismos na produção de L-PAC*

Vários micro-organismos são capazes de produzir L-PAC, tanto bactérias, como *Zymomonas mobilis*, quanto fungos filamentosos, como *Aspergillus niger* (BRINGER-MEYER e SAHM, 1988; CARDILLO *et al.,* 1991). Contudo, as bactérias e os fungos filamentosos tem a capacidade de transformar o benzaldeído em álcool benzílico como produto majoritário (SHUKLA & KULKARNI, 2000), sendo assim, a habilidade de produzir L-PAC por intermédio da rota biológica é pequena em comparação com a produção de álcool benzílico.

Também são várias as espécies de leveduras conhecidas por produzir L-PAC, como *Hansenula anomala*, *Brettanomyces vini*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Saccharomyces cerevisae*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Torula utilis*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida utilis, Candida pseudointermedia, Issatchenkia orientials* entre outras, sendo este o grupo microbiano mais estudado para a produção do L-PAC (BECVAROVA *et al.,* 1963*,* VOJTISEK e NETRVAL*,* 1982*,* MAHMOUD *et al*., 1990, SHUKLA *et al.,* 2002, ZHANG *et al.,* 2008, KUMAR *et al*., 2010, KHAN e DAUGULIS, 2010, KHAN *et al*., 2012).

Em uma comparação entre seis espécies de levedura (*Hansenula anomala*, *Brettanomyces vini, Saccharomyces carlsbergensis*, *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus* e *Torula utilis*) na produção de L-PAC com uma única adição de benzaldeído (2 g/L), BECVAROVA *et al.* (1963) mostraram que as maiores produções de L-PAC (0,92 - 1,03 g/L de L-PAC) foram obtidas com *H. anomala*, *S. carlsbergensis* e *S. cerevisiae*, sugerindo que a produtividade de L-PAC depende do organismo e do seu estado metabólico. Com quatro adições de benzaldeído (2 g/L cada), detectou-se 5,6 g/L de L-PAC no cultivo de *S. carlsbergensis*. Essa espécie tem sido considerada uma boa produtora (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

Em cultivos de *S. cerevisiae* em frascos agitados, a maior produção de L-PAC nas primeiras 5 h de fermentação seguida por redução de produtividade em incubação por mais tempo sugere alta atividade de piruvato descarboxilase na fase

inicial e redução na sua atividade devido ao efeito tóxico do produto e do substrato (VOET *et al.*, 1973).

Groeger *et al.* (1966) utilizaram levedura de panificação em meio contendo melaço com adição simultânea de benzaldeído e acetaldeído e mostraram que o acetaldeído estimulou a produção de L-PAC.

II.3 *Influência do meio de cultivo na produção de L-PAC*

Os meios de cultura descritos na literatura para condução do processo de produção de L-PAC apresentam composições semelhantes. É possível observar no Quadro II-2 um resumo dos principais meios de cultivo para a produção de L-PAC encontrados na literatura, em processos conduzidos em batelada alimentada, uma vez que o benzaldeído é toxico, quando em quantidades elevadas**.**

Os meios de cultivo para a produção de L-PAC por *Torulaspora delbrueckii* contêm benzaldeído, glicose, peptona e extrato de levedura, sem adições de sais. Shukla *et al.* (2002) utilizaram menores teores de benzaldeído (substrato) e de tempo de fermentação no cultivo de *T. delbrueckii* em biorreator, mas obtiveram uma produção de L-PAC 70% maior (4,58 g/L) do que Shukla e Kulkami (2001), cuja produção em frascos agitados foi de 2,75 g/L. A mudança de escala de frascos agitados para biorreator favoreceu a aeração, com isso o quociente respiratório (RQ) maior favoreceu o regime fermentativo e consequentemente, a produção de L-PAC. O acetaldeído adicionado por Shukla *et al*. (2002), Zhang *et al.* (2008) e Khan *et al.* (2012) restabelece o equilíbrio redox da glicólise favorecendo a síntese de L-PAC.

Quadro II-2 Resultados principais para produção de L-PAC por leveduras.

	Agente biológico	**Meio de produção**	**Alimentação**	**Tempo**	**Temp./ pH**	**Aeração/ Agitação**	**[L-PAC] g/L**
Shin & Rogers (1995)	*Candida utilis* imobilizada	Glicose 30 g/L; Extrato de lêvedo 10 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/L; KH_2PO_4 3,0 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 2,0 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 1,0 g/L; $CaCl_2$ 0,05 g/L;	Benzaldeído mantido em 2 g/L após inicial em 10,5 g/L por 16 h; glicose reposta a 30 g/L quando perto do esgotamento.	22h	*25°C / 5,0*	0,75 vvm	15,2
Shukla *et al.* (2002)	*Torulaspora delbrueckii*	Glicose 30 g/L; Peptona 20 g/L;	Benzaldeído 6 g/L e 60 mL/L de solução de acetaldeído.	6h	*30°C / 4,5*	0,3 vvm	4,58
Zhang *et al.* (2008)	*S. cerevisiae*	80 g/L PEG 20,000; 75 ml/L Triton X-100, 20 g/L peptona, 25 g/L glicose, 10 g/L extrato de lêvedo, 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 35 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, e 10.7 g/L ácido cítrico	Glicose 30 g/L; benzaldeído 8 mL/L; biomassa 30 g/L; acetaldeído (35%), 6mL/L	6-8h	*30°C / 4,8*	Frascos agitados 200 rpm	8,00
Kumar *et al*. (2010)	*Issatechenkia orientalis*	Caldo de cana 100 g/L uréia 2,5 g/L	Benzaldeído 6 g/L dividido em 6 doses com intervalo de 30 min.	24h	*28°C / 5,5*	Frascos agitados 180 rpm	3,80
Khan *et al*. (2012)	*Candida utilis*	Uréia 10,0 g/L; $MgSO_4$ 10.0 g/L e melaço clarificado (30.0 Brix) 200 g/L (pH 6,0)	6.3 g/L benzaldeído e acetaldeído (50%) em 6 doses (68, 62, 56, 50, 43, 37 µl) com intervalo de 60 min.	8h	*30°C / 6,0*	Frascos agitados 150 rpm	4,15 L

O meio utilizado para a produção de L-PAC por *Candida utilis* contem glicose, extrato de levedura e uma série de sais como $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $Na_2HPO_4.12H_2O$, $CaCl_2$, $FeSO_4.7H_2O$ e $MnSO_4.4H_2O$ (SHIN e ROGERS, 1995). Esse estudo foi realizado com células de *C. utilis* encapsuladas em alginato de cálcio após o crescimento aeróbio (para a obtenção de biomassa microbiana) e aclimatação. A produção de L-PAC foi de 15,2 g/L, um valor elevado em comparação com os cultivos com células livres. A imobilização das células por encapsulamento permitiu criar uma barreira difusional para o substrato, reduzindo seu efeito tóxico sobre as células.

Grande parte dos meios descritos na literatura (SHUKLA *et al*. 2002, ZHANG *et a*l. 2008) contém peptona em sua composição, o que é viável apenas em escala laboratorial, devido à disponibilidade e preço. Por outro lado, os meios sem peptona (SHIN e ROGERS 1995, KUMAR *et al*. 2010, KHAN *et al*. 2012) apresentam extrato de levedura em sua composição, o que ainda assim onera os processos em escala industrial apesar de ter maior disponibilidade comercial. Como alternativas a esses compostos, é possível utilizar resíduos ou subprodutos da indústria. A adição de milhocina e de hidrolisado de levedura no meio de cultivo influenciaram favoravelmente a atividade da piruvato descarboxilase e a produção de L-PAC (VOJTISEK e NETRAVAL,1982).

Vários trabalhos indicam que a adição controlada de benzaldeído ao longo do processo, principalmente por pulsos (LONG e WARD,1989), ajuda a controlar a toxicidade do meio para alcançar teores maiores de L-PAC. Shin e Rogers (1995) estudaram a produção de L-PAC adicionando benzaldeído de forma a manter sua concentração próxima a 2 g/L. Além disso, trabalharam com aeração controlada de modo a manter o RQ entre 5-7, favorecendo assim, o metabolismo fermentativo. Tais estratégias levaram a um aumento significativo na produção de 12,5 g/L de L-PAC.

Acetona, soro de leite e mosto de produção de cerveja estimularam a produção de L-PAC, sendo que no caso da acetona, esta compete como aceptor

de elétrons, deixando o benzaldeído mais disponível para formação de L-PAC (YASHIO, 1952).

Khan *et al.* (2012) otimizaram o número de adições de benzaldeído e a máxima concentração de L-PAC (3,62 g/L) foi obtida com a adição de 6 doses de benzaldeído em volume desigual, em ordem decrescente de concentração de benzaldeído totalizando 6,3 g/L. Long e Ward (1989), Shukla e Kulkami. (2001) e Kumar *et al.* (2010) também relatam a utilização de benzaldeído na concentração de 6,0 g/L para a produção de L-PAC utilizando células livres de diferentes espécies: *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *C. pseudointermedia*, respectivamente. Mas os resultados não foram concordantes com os de Mahmoud *et al.* (1990) que observaram que as células livres poderiam tolerar uma concentração benzaldeído de apenas 4,0 g/L. A diminuição ou aumento desta concentração de benzaldeído gera uma menor produção de L-PAC, devido à formação de produtos secundários e toxicidade.

O intervalo de tempo entre seis adições de benzaldeído foi investigado por Khan *et al.* (2012) para a produção máxima de L-PAC e um intervalo de 60 minutos foi considerado apropriado para a maior produção (3,81 g/L) de L-PAC por *C. utilis*. Intervalos menores que 60 minutos resultara em efeito tóxico sobre as células, enquanto que intervalos maiores que 60 minutos estimularam a produção de derivados de L-PAC como PAC-diol, minimizando assim a produção de L-PAC.

A adição de beta-cliclodextrina resultou na retenção e liberação controlada de benzaldeído e proteção das células de *S. cerevisiae* dos efeitos tóxicos do benzaldeído, aumentando assim a formação de L-PAC (COUGHLIN *et al*., 1991).

Em um fermentador de 5 L com dois impelidores a disco (turbina a disco inclinada) foram produzidos 7,0 g/L de L-PAC por *T. delbrueckii* usando adição semicontínua de benzaldeído e acetaldeído (SKUKLA e KULKARNI, 2000), o que minimizou o efeito tóxico da adição de benzaldeído.

II.4 *Influência das condições de cultivo na produção de L-PAC*

Em relação à temperatura, a literatura (ABREU e OLMO (2014), KHAN *et al*, 2012, ZHANG *et al*., 2008, ROGERS, 1990) reporta que o ideal é manter a temperatura em na faixa de 30°C (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Khan *et al.* (2012) ao avaliarem a influência da temperatura de incubação verificaram que a melhor produção de L-PAC (2,27 g/L) foi encontrada em 30°C para *S. cerevisiae*. Temperaturas inferiores ou superiores (25, 34 e 37°C) promoveram queda na produção de L-PAC (1,03, 1,92 e 1,60 g/L, respectivamente). Este resultado corrobora as conclusões de Rogers (1990), que mostrou que a taxa de produção de L-PAC é 1,5 vezes maior a 30ºC que a 20ºC e nesta temperatura e tem-se ainda que a atividade enzimática e as funções metabólicas são máximas.

O controle do pH em 6,0 é uma das condições que maximiza a produção de L-PAC. Khan *et al.* (2012) ao estudarem a influência do pH inicial na produção de L-PAC obtiveram máxima concentração (3,11 g/L) quando o pH inicial foi 6,0. O mesmo foi também relatado por Leksawasdi *et al.* (2003) e Chen *et al.* (2005). Os trabalhos mencionam que qualquer aumento ou redução do valor de pH de 6,0 pode reduzir a atividade da piruvato descarboxilase (PDC), inibir funções metabólicas ou diminuir a solubilidade dos substratos no meio, resultando em menor produção de L-PAC. Já o pH utilizado na patente tcheca (JAROMIR, 1969) foi inferior (5,2).

Segundo Abreu e Olmo (2014), em valores baixos de pH na faixa ácida (4-5,5) a atividade metabólica dos micro-organismos é menor e os tempos necessárias para conseguir a transformação ideal são maiores.

Aeração reduzida (100 L/min), baixa temperatura (23°C), arseniato (0,156 M), cianeto (0,3 mM) e fluoreto de sódio (0,02 M) inibem a formação de L-PAC por *S. cerevisiae* (ZEEMAN *et al.*, 1992).

II.5 *Bioquímica do processo de produção de L-PAC*

Na produção de L-PAC por via biológica, a piruvato descarboxilase (PDC) exerce um papel primordial. É uma enzima encontrada nos organismos que realizam fermentação alcoólica, sendo responsável pela transformação do piruvato produzido na glicólise em acetaldeído, que juntamente com NADH e um íon H^+ produzirá etanol e NAD^+ (OLIVER, 1997).

Quando há a presença de algum aldeído no meio, como no caso o benzaldeído, a PDC pode catalisar a reação de síntese de carbinóis. Após a saída do CO_2 do complexo enzima-piruvato, encontra-se o que se denomina na literatura de "acetaldeído ativo", que é o acetaldeído ligado pela carbonila a um resíduo de cisteína (Figura II-4). Esse acetaldeído ativo é instável e pode reagir facilmente com outro aldeído, formando assim o carbinol correspondente (RISCH, 2009). A PDC tem como cofatores o íon Mg^{2+} e a tiamina pirofosfato (TPP na sigla inglesa), sem os quais a enzima não é capaz de realizar a reação (FUREY *et al.*,1998). Neste caso, em presença de benzaldeído, o íon H^+ e o NADH sofreram uma reação catalisada pelo álcool desidrogenase (ADH) para restaurar o equilíbrio redox da série de reações da glicólise o que produzirá álcool benzílico e NAD^+

Algumas reações laterais podem acontecer tanto com o benzaldeído quanto com o L-PAC (Figura II-4), devido ao próprio metabolismo do micro-organismo, como a redução do benzaldeído a álcool benzílico e do L-PAC a PAC-diol, ambas catalisadas pela ADH, bem como a oxidação do benzaldeído a ácido benzóico. As reações de redução dos aldeídos são necessárias para restabelecer o equilíbrio redox da glicólise. Uma das estratégias para melhorar a produção de L-PAC é a adição de aceptores de elétrons ao meio, como acetona e acetaldeído, para que estes sejam reduzidos e acabem disponibilizando mais benzaldeído para a síntese de L-PAC, bem como diminuindo a redução do próprio L-PAC a PAC-diol. A adição de extratos celulares também possibilita um aumento da produção de L-PAC, devido ao aumento dos níveis de piruvato, TPP e Mg^{2+} (VOJTISEK e NETRAVAL, 1982).

Todos os micro-organismos utilizados na produção de L-PAC são classificados como aeróbios facultativos. Uma estratégia comum nos experimentos de produção de L-PAC é o controle do coeficiente respiratório (RQ, na sigla inglesa) de modo que se mantenha valores superiores a 1 (com 1 sendo o crescimento aeróbio usando carboidratos), como por exemplo de 4 até 7 no caso de *C. utilis*. Isso é alcançado com uma baixa aeração, embora ela não possa ser nula a fim de não comprometer a viabilidade global das células no meio (SHIN e ROGERS, 1995).

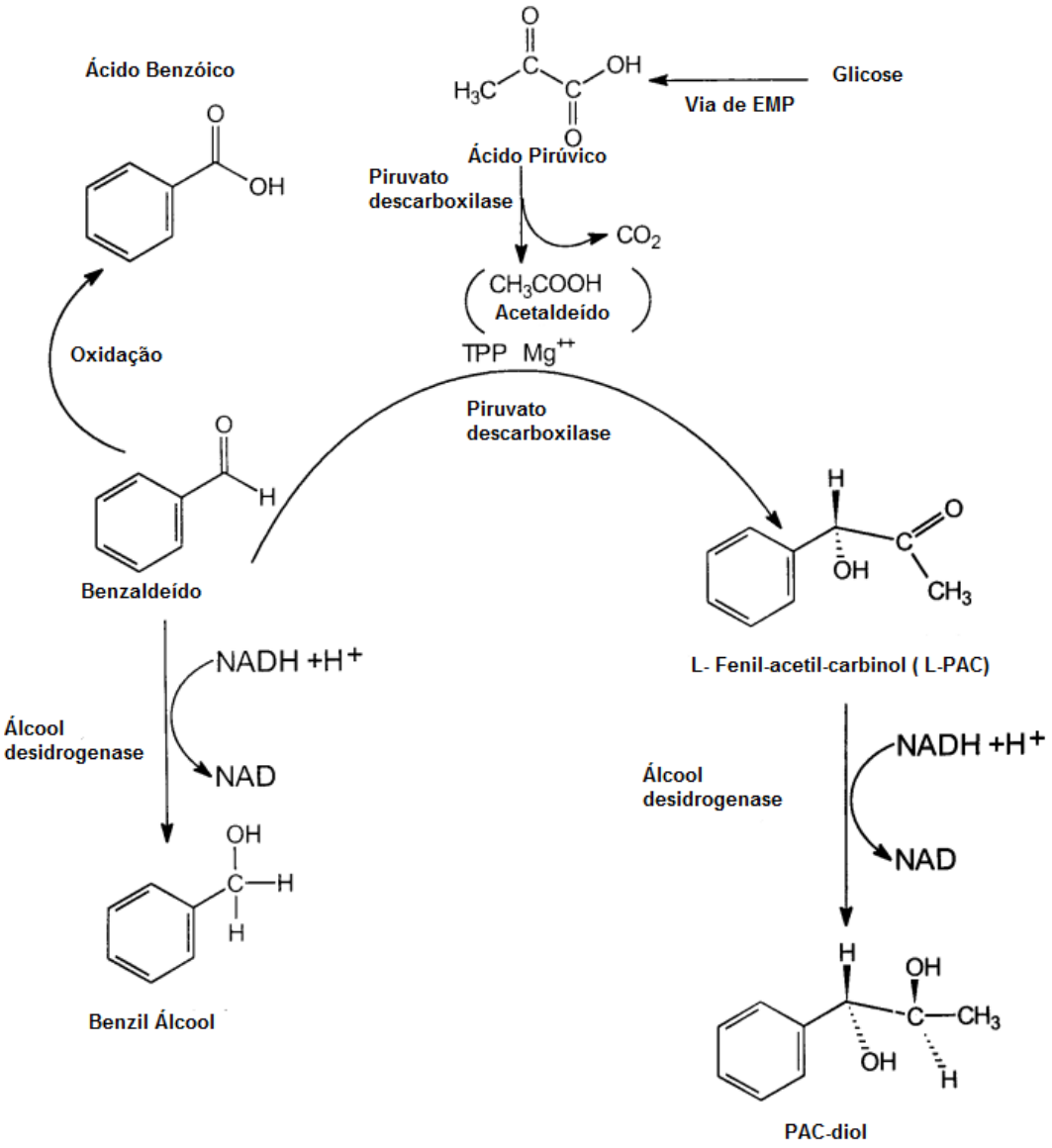


Figura II-4 Reações bioquímicas comuns na produção de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

Como o benzaldeído é substrato tanto para produção de L-PAC como de álcool benzílico, a inibição da redução do aldeído para álcool por diferentes análogos nicotínicos pode aumentar o rendimento de L-PAC devido à inibição da formação de álcool benzílico (SMITH e HENDLIN, 1954).

A adição de acetaldeído foi investigada por Khan *et al.* (2012) que obtiveram uma melhor produção de L-PAC (4,15 g/L) quando foi adicionado acetaldeído juntamente com benzaldeído. Becvarova *et al.* (1963), Groeger *et al.* (1966), Vojtisek e Netrval (1982) e Oliver *et al.* (1997) também verificaram que a adição de benzaldeído, juntamente com acetaldeído no meio aumentou a produção de L-PAC, reduzindo a produção de álcool benzílico, atuando como aceptor de hidrogênio, inibindo o desvio da conversão de benzaldeído a álcool benzílico, garantindo uma maior conversão de benzaldeído para formação de L-PAC. Como os átomos de acetaldeído concorrem com o benzaldeído pelos sítios ativos da álcool desidrogenase, inibindo essa enzima e reduzindo a produção de álcool benzílico.

Reporta-se que a produção de L-PAC é influenciada pela atividade da piruvato descarboxilase e da concentração de piruvato nas células de *S. carlsbergensis*, sendo a concentração de piruvato fator realmente limitante da taxa. Portanto, o micro-organismo para a biotransformação deve ser mantido em um estado metabólico de alta atividade de piruvato descarboxilase, para suprir um nível ótimo de piruvato. A piruvato descarboxilase foi resistente à inativação por benzaldeído até a concentração de 7 g/L (VOJTISEK e NETRAVAL, 1982).

Em sistemas com bactérias ou leveduras, o piruvato é descarboxilado instantaneamente e o hidroxietil difosfato de tiamina resultante se acopla ao benzaldeído para gerar L-PAC (MEYER *et al.*, 2011).

II.5.1 Piruvato descarboxilase

A enzima piruvato descaboxilase (PDC) é uma enzima da classe das liases e possui o número de classificação EC 4.1.1.1. Esta é dependente dos cofatores tiamina pirofosfato (TPP) e do íon magnésio (Mg^{+2}).

A PDC catalisa duas reações praticamente simultâneas: a descarboxilação não oxidativa de α-cetoácidos formando o aldeído correspondente, que é uma reação extremamente rápida e a ligação C-C formando hidroxicetonas, que é significativamente lenta (WARD e SINGH, 2000). A descarboxilação de um α-cetoácido como o piruvato envolve a clivagem da ligação C-C adjacente ao grupo carbonila resultando na formação do “aldeído ativo” (HUBNER, 1998).

Muitas enzimas necessitam de cofatores para catalisar as reações, sendo que estes cofatores podem ser moléculas orgânicas ou íons metálicos. Estas moléculas orgânicas são conhecidas como coenzimas. O complexo enzima-cofator cataliticamente ativo é chamado de holoenzima e a enzima inativa resultante da remoção do cofator é conhecida como apoenzima (VOET, 2002).

A tiamina pirofosfato é a forma biologicamente ativa da vitamina B1 e sua estrutura química está demonstrada na Figura II-5. Esse composto é utilizado como cofator da enzima PDC em várias reações que envolvem a clivagem de ligações C-C adjacente ao grupo carbonila. A ligação das duas extremidades da molécula da TPP na enzima fornece uma conformação adequada do anel tiazólico para realização da catálise (HUBNER, 1998).

Inibidores e ativadores modificam a taxa de uma reação na qual eles não são substrato. São geralmente pequenas moléculas e íons, podendo ser também outras enzimas. A sua ação pode ser reversível ou irreversível. Os ativadores aceleram as taxas da reação enzimática por promoverem o estado ativo do substrato ou da enzima. Diferente dos cofatores, os ativadores não entram na reação como substratos. Íons metálicos que ativam enzimas o fazem estabilizando a conformação do seu sítio ativo. Já os inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem na catalise, reduzindo a velocidade ou paralisando reações enzimáticas. As enzimas catalisam praticamente todos os processos celulares, por isso os inibidores enzimáticos estão entre os mais importantes agentes farmacêuticos conhecidos (SENGER, 2002).

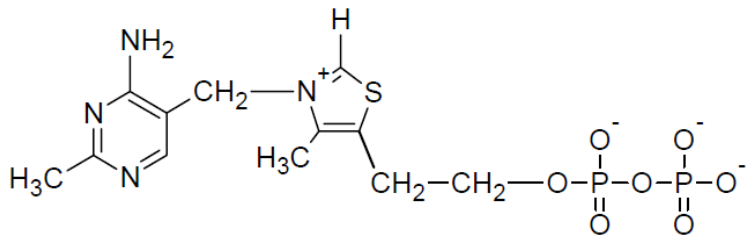
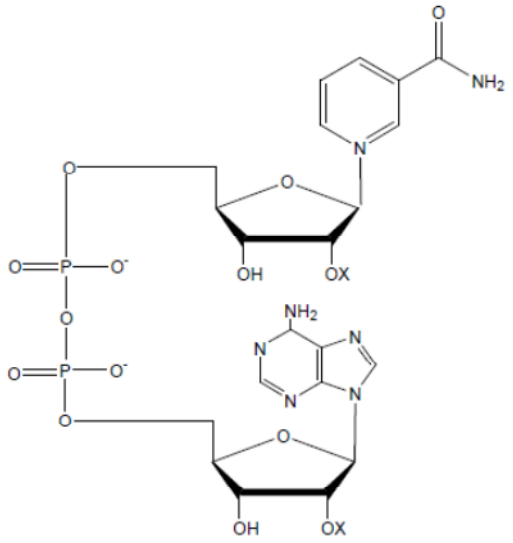


Figura II-5 Estrutura da Tiamina Pirofosfato (TPP)

II.5.2 Álcool desidrogenase

A álcool desidrogenase, abreviadamente ADH, é uma enzima da classe das oxidoredutases, tem número de classificação EC 1.1.1.1 e para ter atividade catalítica utiliza como cofatores as nicotinamidas NAD(P)H (Figura II-6). A ADH catalisa reações de oxidação de álcoois e redução de grupos carbonílicos (NAKAMURA, 2002).



X=H Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+)

X= PO_3^{-2} Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+$)

Figura II-6 - Estrutura do cofator NAD(P) (Fonte: Voet, 2002)

Durante a produção de L-PAC, a ADH-II catalisa reações laterais que podem acontecer tanto com o benzaldeído quanto com o L-PAC, devido ao próprio metabolismo do micro-organismo, como a redução do benzaldeído a álcool

benzílico e do L-PAC a PAC-diol. As reações de redução dos aldeídos são necessárias para restabelecer o equilíbrio redox da glicólise. Uma das estratégias para melhorar a produção de L-PAC é a adição de aceptores de elétrons ao meio, como acetona e acetaldeído, para que estes sejam reduzidos e acabem disponibilizando mais benzaldeído para a síntese de L-PAC, bem como diminuindo a redução do próprio L-PAC a PAC-diol (VOJTISEK e NETRAVAL, 1982).

Snograss *et al*. (1960) verificaram a inibição da ADH por sais de prata e de mercúrio em baixas concentrações. Os íons formados interagem com o grupamento sulfidrila (–SH) da proteína inativando a ação da enzima.

II.6 *Recuperação de L-PAC*

Para a recuperação do L-PAC produzido por fermentação, recomenda-se a utilização de aldeídos aromáticos, como p-anisaldeído, m-tolualdeído e p-hidroxibenzaldeído. Long e Ward (1989) recuperaram o L-PAC mediante uma extração do meio com éter, remoção do ácido com $NaHCO_3$ aquoso, formação do complexo carbinol e aldeído com metabissulfito de sódio; produção de aldeído e carbinol livres pela adição de $NaHCO_3$ sólido e separação em uma coluna de sílica gel. Outro protocolo de purificação de L-PAC envolve a extração com dietil éter seguido de pré-tratamento em resina de troca iônica, preparação de aduto bissulfito em condições frias seguido de separação do aduto e recuperação de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 1999).

Khan *et al.* (2012) extraíram o L-PAC do meio fermentado utilizando tolueno em uma proporção.1:2 em funil de separação. L-PAC foi estimado pelo método polarimétrico (NETRAVAL & VOJTISEK, 1982; BECVAROVA *et al.*, 1963).

A polarimetria é uma técnica que se baseia na medição da rotação óptica produzida sobre um feixe de luz polarizada ao passar por uma substância opticamente ativa. A polarimetria é realizada por intermédio do uso do polarímetro. O polarímetro é um instrumento constituído basicamente por uma fonte de radiação monocromática, um prisma que atua como polarizador da radiação utilizada (prisma de Nicol), um tubo para acondicionamento da solução com a

amostra, um prisma analisador (prisma de Nicol) e um detector que pode ser o olho do analista ou então um detector fotoelétrico. O polarímetro possui ainda escalas que medem o desvio da luz polarizada para o lado esquerdo (substâncias levógiras) ou para a direita (substâncias dextrógiras). A rotação óptica varia em função da temperatura e do comprimento de onda empregado (quanto mais curto, maior o ângulo), da natureza química da substância e da sua concentração (MIRANDA, 2010).

$$gL = RO \times 2\ fator\ de\ diluição \times 1.11\ densidade\ do\ L-PACTabelado$$

Eq. II-1:

$$[L-PAC]_{g/L} = RO \times 2(\ fator\ de\ diluição) \times 1.11\ (densidade\ do\ L-PAC)_{Tabelado}$$

Eq. II-1

II.7 *Quantificação de ácido benzóico, álcool benzílico, L-PAC e* benzaldeído.

A grande maioria dos trabalhos existentes na literatura utiliza como método analítico principal para quantificação dos produtos a cromatografia gasosa (CG), devido à baixa sensibilidade de outros métodos, pelos interferentes presentes no meio (com características físico-químicas semelhantes), pela incapacidade de se analisar mais de um componente do meio e, talvez, pelas raras metodologias descritas na literatura que utilizem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Determinação da concentração de benzaldeído e álcool benzílico em CG (cromatografia gasosa) com hélio como gás carreador e a quantificação colorimétrica de L-PAC têm sido reportadas (LONG e WARD 1989). Shin e Rogers (1996) utilizaram uma coluna de CG empacotada com WHr/Se 30 WTX 10 e uso de nitrogênio como gás carreador para determinar L-PAC e benzaldeído com sucesso. Shukla e Kulkarni (1999) desenvolveram uma análise em CG usando coluna Ohio Valley (5% OV-17) e hidrogênio como gás carreador para análise dos produtos da biotransformação.

Mandwal *et al.* (2004) utilizaram para a análise via CLAE uma coluna C18 300 Å (3,9 x 30 cm) com empacotamento de esferas de 15 µm. As substâncias participantes do processo a serem analisadas eram extraídas do meio bruto com benzeno e concentrados posteriormente. A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila e água numa proporção de 30:70 (base volumétrica), eluindo a uma vazão de 1,5 mL/min. O detector utilizado monitorava o comprimento de onda em 252 nm. De acordo com os autores, nessas condições, os tempos de retenção do ácido benzóico, álcool benzílico, L-PAC e benzaldeído são respectivamente, de 2,3 min, 3,1 min, 3,6 min e 4,9 min.

O trabalho de Tripathi *et al.* (1988) também utiliza HPLC (Varian 5000) como método de análise, com fase móvel composta por 50% de metanol e 50% de uma solução aquosa de 5 mM de fosfato, vazão de eluição de 1 mL/min. O L-PAC foi purificado em uma coluna de separação ODS com uma coluna de guarda MCH-10 onde o pico foi detectado (Detector Varian UV 50) no comprimento de onda de 218 nm.

III. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um processo biotecnológico de produção de L-PAC em escala de bancada a partir de benzaldeído utilizando levedura como biocatalisador.

III.1 *Objetivos específicos*

1 Selecionar o micro-organismo produtor a partir de leveduras produtoras de álcool.

2 Aperfeiçoar o meio de cultivo e as condições de processo para a produção de L-PAC em frascos agitados;

3 Avaliar as condições de produção específicas de L-PAC em biorreator de 1 L;

4 Avaliar diferentes solventes para extração do L-PAC produzido;

5 Realizar um aumento de escala do processo de produção de L-PAC.

6 Realizar cálculos de extrapolação de escala com vistas a uma avaliação econômica preliminar do processo.

IV. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

IV.1 *Equipamentos*

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga - *Eppendorf* 5804R;
2) Centrífuga - *Eppendorf* 5810R;
3) Autoclave - *Prismatec CS;*
4) Espectrofotômetro - Bel Photonic SP 2000-UV;
5) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – *BioFlux II 90 A1, Filtracom*®;
6) Incubador com agitação - *Tecnal TE 420*;
7) Incubador com agitação e refrigeração - *Nova Instrument NI 1713*
8) Balança analítica – Adventurer ™ AR2140-Ohaus;
9) Cromatógrafo líquido (HPLC) – *Waters 1525;*
10) Cromatógrafo líquido (HPLC) – *Shimatz*u
11) Detector IR Water 2414
12) Biorreator de 1 litro -*Tecnal- TEC-BIO-C*;
13) Biorreator de 4 litros - *New Brunswick Scientific CO*.
14) Biorreator de 13 litros - BIOESTAT E – B Braun
15) Bomba Dosadora Peristáltica – *Milan –Tecnopon Equip.Especiais* LTDA.
16) Estufa Bacteriológica – *Nova Técnica NT 521*;
17) pHmetro -*Digimed DM-22;*
18) Evaporador Rotativo – *Tecnal* TE-210

IV.2 *Seleção do micro-organismo produtor*

Vinte e duas cepas de leveduras foram selecionadas com base no tipo de metabolismo. Leveduras produtoras de álcool foram preferencialmente selecionadas uma vez que a atividade da piruvato descarboxilase é necessária no processo*. S.pas1* foi cedida pela Fiocruz (INCQS, RJ, Brasil), *S.cer1* (levedura de panificação) foi adquirida em supermercado local (Indústria *Fleischmann*). *S. cer2* e *S. cer3* fazem parte do banco de cepas do laboratório *Biological System Engineering Group* - *Biose* – Escola de Química - UFRJ. As demais foram obtidas no Instituto de Microbiologia da UFRJ. As cepas (Tabela IV-1) foram cultivadas em meio GYMP (glicose, extrato de lêvedo, extrato de malte e peptona) por 48 h a 28°C, e estocadas a 4°C.

Tabela IV-1- Lista de micro-organismos selecionados a partir dos bancos de cepa: da Fiocruz (INCQS, RJ, Brasil), do Biose – Escola de Química – UFRJ e do Instituto de Microbiologia da UFRJ.

CRC[a]	Espécie de Levedura
C.col1	***Candida colliculosa***
C.gui1	***Candida guilliermondii***
D.yam1	***Debaryomyces yamadae***
K.aes1	***Kluyveromyces aestuarii***
K.mar1	***Kluyveromyces marxianus***
K.mar2	***Kluyveromyces marxianus***
K.the1	***Kluyveromyces thermotolerans***
P.ano1	***Pichia anomala***
P.ano2	***Pichia anomala***
P.ohm1	***Pichia ohmeri –like***
S.car1	***Saccharomyces cariocanus***
S.cer1	***Saccharomyces cerevisiae***
S.cer2	***Saccharomyces cerevisiae***
S.cer3	***Saccharomyces cerevisiae***
S.cer4	***Saccharomyces cerevisiae***
S.cer5	***Saccharomyces cerevisiae***
S.cer6	***Saccharomyces cerevisiae***
S.cer7	***Saccharomyces cerevisiae***
S.cer8	***Saccharomyces cerevisiae***
S.pas1	***Saccharomyces pastorianus***
S.dai1	***Saccharomyces dairensis***
S.spe1	***Saccharomyces spencerorum***

[a]**CRC:** Código referente à cepa

IV.2.1 Meios de Cultura

Para propagação da biomassa, estocagem e produção de L-PAC, os seguintes meios foram utilizados:

YPD (sigla em inglês, *yeast extract, peptone, dextrose*)**:** É um meio líquido de crescimento rápido, contendo 1% de extrato de lêvedo, 2% de peptona bacteriológica e 2% de glicose. Nesse meio, o crescimento celular é limitado pela exaustão da fonte carbono.

YMA (sigla em inglês *yeast extract, malt extract, Agar*)**:** É um meio sólido de estocagem e plaqueamento específico para o crescimento de *S.pas1,* contendo 1% glicose, 0,5% de peptona bacteriológica, 0,3% de extrato de lêvedo, 0,3% de extrato de malte e 2% Agar.

GYMP (sigla em inglês, *glucose, yeast extract, malt extract, peptone, Agar*): É um meio sólido de estocagem e plaqueamento para as demais cepas contendo 2% glicose, 0,5% extrato de lêvedo, 0,3% extrato de malte, 0,5% de fosfato de sódio monobásico e 2% Agar.

Meio de Produção de L-PAC: O meio líquido de produção foi formulado segundo Zhang *et al.* (2008). Composição: Glicose 25 g/L; Peptona bacteriológica 20 g/L; Extrato de Lêvedo 10 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 1 g/L; $CaCl_2.2H_2O$ 0,05 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 35 g/L, Ácido Cítrico 10,7 g/L. Variações desse meio foram propostas e cada modificação é mencionada quando necessário no capítulo dos resultados da presente tese.

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram adquiridos na empresa *Vetec*-R.J., Brasil, com exceção da peptona bacteriológica que foi adquirida junto à *Oxoid* - Hampshire, UK.

IV.2.2 Purificação das cepas

As cepas obtidas do banco de cepas do Instituto de Microbiologia da UFRJ encontravam–se estocadas por um longo período e, por isso, foi necessário ativá-las. Uma das maneiras de se obter uma cultura pura consiste no emprego da técnica de semeadura, na qual são obtidas colônias isoladas de micro-organismos.

A técnica de semeadura por estrias múltiplas consiste em espalhar o material com o auxílio de uma alça bacteriológica sobre o meio GYMP em placa de *Petri* (ou YMA para *S. pas1*), fazendo estrias sucessivas até o esgotamento do material, de modo a obter-se um perfeito isolamento das células existentes na amostra, que após a incubação, formarão as colônias isoladas sobre a superfície do ágar (TORTORA *et al*., 2005).

IV.2.3 Cultivos

A partir dos tubos contendo as culturas preservadas em meio sólido GYMP inoculava-se, de forma estéril com auxílio de uma alça de platina, 100 mL de meio de cultivo YPD em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL. Após cerca de 24 horas em um incubador rotatório a 30ºC, 200 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era determinada e, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 *g* por 7 minutos e ressuspensas em meio de cultivo YPD servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma

concentração inicial de células de, aproximadamente, 3,0 ± 0,1 mg m.s. cel/mL nos meios de cultivo.

Para os experimentos em biorreator, o cultivo do inóculo foi feito em 9 frascos *Erlenmeyers* de 500 mL contendo 220 mL de meio YPD mantidos a 30 °C e 200 rpm por 48h sendo feitas 3 alimentações de glicose após 8, 24 e 36 h. Essas alimentações foram realizadas com uma solução de glicose a 40% com volume necessário para se elevar a concentração de glicose de 0 a 20 g/L.

IV.3 *Produção de L-PAC em frascos agitados.*

Os experimentos preliminares foram realizados em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL com 100 mL ou 200 mL de meio de produção, a 30ºC em incubador rotatório (frascos agitados) com velocidade de agitação de 200 rpm.

Tais experimentos foram realizados visando estabelecer a concentração inicial de células, de glicose, pH, concentração e tempo de adição de benzaldeído e otimização dos sais presentes no meio de produção.

Os cultivos foram realizados por 24 horas com amostragem a cada hora por 7 h e ao final do experimento para análise de crescimento celular, glicose e L-PAC.

IV.4 *Produção de L-PAC em biorreator*

IV.4.1 Produção em biorreator de 1 L

Foi utilizado um biorreator (*Tecnal, TEC-BIO-C*) com capacidade de 1 L (Figura IV-1). O equipamento dotado de sistemas de aeração, agitação e controle de temperatura era provido de sistema contendo uma turbina do tipo Rusthon e outra do tipo Smith. O monitoramento e aquisição de dados de velocidade de rotação, pH, temperatura e oxigênio foi feito com auxílio do *SoftwareTEC-BIO-C*. O suprimento de oxigênio foi realizado com ar atmosférico com auxílio de um sistema de aeração submerso por meio de 14 orifícios na haste de agitação. Antes de entrar no biorreator, o ar atravessava um filtro (*HEPA-VENT, Whatman*) com porosidade de 0,3 µm para evitar a contaminação do meio.

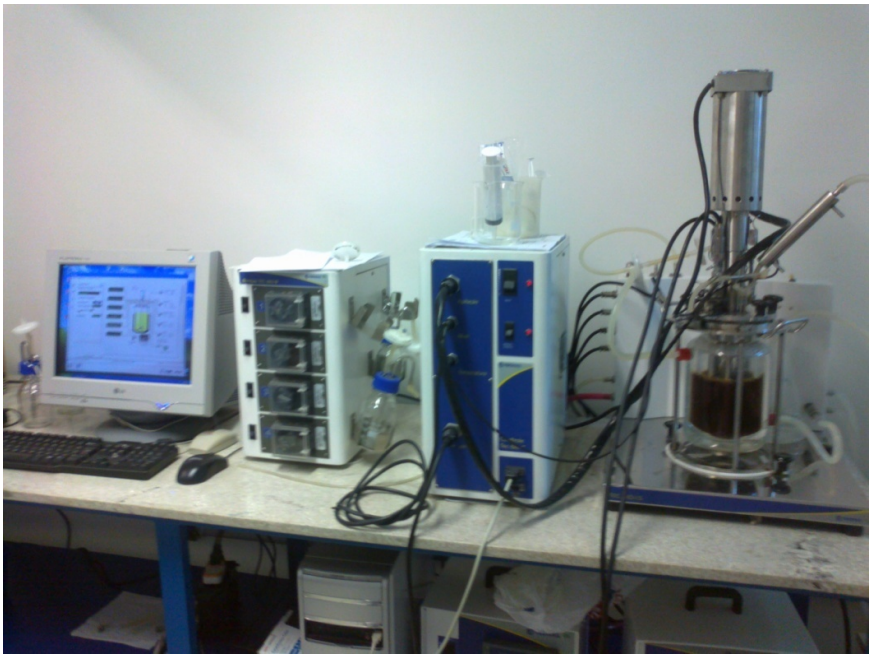


Figura IV-1 Foto do biorreator *Tecnal*- TEC-BIO-C com capacidade de 1 litro.

Para os experimentos de produção de L-PAC no biorreator foram inoculados 750 mL de meio de produção contendo suspensão celular na concentração inicial desejada com 1 mL do anti espumante antifoam 204. Foram avaliadas as condições de aeração (0, 1, 2 e 5 vvm), agitação (250 e 350 rpm), e alimentação de glicose e benzaldeído (monitoradas por intermédio das análises por kit enzimático e cromatografia, respectivamente).

IV.4.2 Produção em biorreator de 13 L.

O inóculo para a produção de L-PAC em biorreator de 13 L foi preparado em duas etapas: Primeiramente um pré inóculo em frascos agitados onde *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200mL de meio YPD foi inoculado com a cultura microbiana estocada a 4°C no meio GYMP sólido. Depois de 24 h de crescimento em um incubador rotatório Certomat BS-1 a 200 rpm e 30°C, 50 mL de cultivo foram transferidos para 4 outros *Erlenmeyers* de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD. Os sistemas foram novamente deixados em crescimento por 24h no incubador a 200 rpm e 30°C. Após 24h de incubação, o conteúdo dos 4 *Erlenmeyers* foi transferido para o biorreator MICROFERM FERMENTOR (*New Brunswick Scientific CO.*) de 4 L equipado com 3 turbinas a disco do tipo Rushton e aspersor de ar submerso (Figura IV-2).

Figura IV-2 Foto do biorreator de 4 L MICROFERM FERMENTOR (New Brunswick Scientific CO.)

Este biorreator foi previamente autoclavado a 1 atm por 30 min e usado para fins de propagação do inóculo do reator de 13 L. Inicialmente o biorreator contendo 1 litro de meio YPD* (40g/L de glicose, 40 g/L de peptona e 20g/L de extrato de lêvedo) foi inoculado com 1 litro do pré inóculo obtido em frascos agitados. A primeira fase de propagação consiste de uma batelada simples de 2h a 600 rpm, à temperatura ambiente (25°C) e aeração de 1 vvm, posteriormente iniciou-se uma batelada alimentada onde 2 litros de meio YPD concentrado (400 g/L de glicose, 40 g/L de peptona e 20 g/L de extrato de lêvedo) foram adicionados ao biorreator com auxílio de uma bomba dosadora peristáltica (*Milan* ®) com vazão de 1,3 mL/min por 18 h.

Amostras de 5 mL foram coletadas a cada hora para acompanhamento do crescimento de biomassa e concentração de glicose. As alíquotas foram submetidas a centrifugação a 18 *g* por 7 minutos para remover a biomassa.

Após as 18 h, todo o volume foi transferido, dentro de capela de segurança biológica (CSB), para frascos de centrífuga estéres de 500 mL e centrifugado em centrífuga *Eppendorf* modelo 5810R, a 18 *g* por 15 min.

O biorreator de 13 L (*BIOESTAT E – B Braun*) é equipado com 3 turbinas a disco do tipo Rushton e aspersor de ar submerso (Figura IV-3). O suprimento de oxigênio foi realizado com ar atmosférico com auxílio de um compressor de ar

marca JUN AIR modelo Minor, o ar atravessava um filtro (*HEPA-VENT, Whatman*) com porosidade de 0,3 µm para evitar a contaminação do meio. Como esse biorreator não tem o sistema de autoclavação em funcionamento, foi realizada uma sanitização do mesmo antes dos experimentos. Para a limpeza e sanitização, o biorreator foi previamente lavado com água e detergente, sanitizado com 250 mL de detergente desinfetante bactericida (*Lysoform* Bruto) por 2 h e lavado com 10 L de água destilada estéril.

Figura IV-3 O biorreator de 13 L (*BIOESTAT E – B Braun*)

O inóculo deste reator foi realizado ressuspendendo a biomassa centrifugada (produzida em biorreator de 4 L, como mencionado anteriormente) em 2 L de meio de produção de L-PAC modificado (composição descrita ao longo dos resultados). Esse inóculo foi adicionado ao biorreator contendo 10 L de meio de produção de L-PAC de forma estéril (com auxílio de um funil e chama de um bico de *Bunsen*). Após inoculação a temperatura foi mantida em 30°C e a agitação em 190 rpm.

Amostras de 5 mL foram coletadas a cada hora para acompanhamento do crescimento celular, concentração de substrato, produto e subprodutos. As alíquotas foram submetidas a centrifugação a 18 *g* por 7 minutos para remover a biomassa. O sobrenadante foi armazenado para as análises posteriores de benzaldeído, L-PAC e glicose ou sacarose.

IV.5 *Aperfeiçoamento do meio de cultivo e das condições de processo para a produção de L-PAC em frascos agitados - Planejamento Experimental*

A escolha do planejamento adequado é uma função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo, da disponibilidade de matéria-prima, da viabilidade do número de ensaios que podem ser realizados e do custo do processo em estudo (RODRIGUES e IEMMA, 2009). No entanto, há um número mínimo de ensaios que devem ser realizados conforme o número de fatores que se deseja estudar, para que a discussão dos resultados e interpretação estatística não fiquem comprometidas.

Para avaliar a influência de algumas variáveis na produção de L-PAC, foi aplicada uma sequência de dois delineamentos fatoriais e os resultados foram analisados utilizando o *software Statistica* 7.0. Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial fracionado em dois níveis com 4 variáveis independentes, 2^{4-1}, totalizando 8 experimentos. De forma a verificar a variabilidade experimental, 3 experimentos nas condições do ponto central foram adicionados ao planejamento. As variáveis independentes selecionadas foram: concentração inicial de glicose, de células, de benzaldeído e pH. Para a escolha dos valores utilizados para cada variável, tomou-se como base alguns resultados preliminares e dados da literatura (SHIN e ROGER, 1995, SHUKLA, 2002, ZHANG *et al.* 2008, KUMAR *et al.*, 2010, KHAN *et al.*, 2012). A Tabela IV-2 apresenta os níveis escolhidos para cada variável. Os resultados foram avaliados em função da concentração de L-PAC (variável de resposta).

Tabela IV-2 Valores reais e codificados das variáveis empregadas no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de Glicose (g/L)	10	25	40
Concentração de células (g/L)	3	6	9
Concentração de benzaldeído (g/L)	1	2,5	4
pH	5	6	7

Com os resultados do planejamento fatorial fracionado, propôs-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para se definir as melhores condições para a produção de L-PAC. No presente trabalho, o planejamento foi realizado com 3 variáveis em dois níveis (2^3) mais 6 ensaios axiais com 3 repetições no ponto central totalizando 17 ensaios. As variáveis independentes selecionadas foram: concentração inicial de glicose, de células e de benzaldeído e os níveis adotados são apresentados na Tabela IV-3.

Tabela IV-3 Valores reais e codificados das variáveis empregadas no delineamento composto central rotacional.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Concentração de Glicose (g/L)	30	38,1	50	61,9	70
Concentração de células (g/L)	1	1,81	3	4,19	5
Concentração de Benzaldeído (g/L)	3	3,81	5	6,19	7

De forma a melhorar a composição do meio de produção de L-PAC adotou-se a metodologia desenvolvida por Plackett-Burman (PLACKETT e BURMAN, 1946), aqui abreviada por PB-12. Esse tipo de planejamento experimental é uma ferramenta muito valiosa para uma seleção prévia de muitas variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Esse delineamento é muito útil para a seleção das variáveis mais importantes e não considera os efeitos de interação entre as variáveis. As variáveis independentes selecionadas foram as concentrações de: peptona, extrato de lêvedo, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, fosfato de sódio e ácido cítrico, como mostra a Tabela IV-4. Os valores dos níveis escolhidos para as variáveis forma baseados na composição do meio de cultivo descrito em

Zhang *et al.* (2008). O *software* Statistica 7.0 (*StatSoft. Inc.,2004*) foi utilizado para analisar os dados experimentais.

Tabela IV-4Valores reais e codificados das variáveis empregadas no planejamento Plackett-Burman com 12 experimentos (PB-12).

Variáveis Independentes	Níveis -1	0	+1
Peptona (g/L)	5	12,5	20
Ext. Lêvedo (g/L)	2	6	10
$MgSO_4.7H_2O$ (g/L)	1	3	5
$CaCl_2.2H_2O$ (g/L)	0,01	0,055	0,1
$Na_2HPO_4.12H_2O$ (g/L)	5	20	35
Ac. Cítrico (g/L)	2	6	10

A literatura indica que uma concentração inicial de células elevada pode elevar significativamente a produção de L-PAC (ZHANG *et al*. 2008, XUE *et al*., 2010). Para aumentar a concentração inicial de células foi necessário aplicar um novo planejamento fatorial fracionado com dois níveis e 3 variáveis (2^{3-1}) visto que o aumento da concentração de células eleva a demanda por substrato. Portanto, utilizou-se o meio determinado por meio do planejamento PB-12 e as variáveis independentes: concentração inicial de glicose, de células e de benzaldeído. A Tabela IV-5 apresenta os limites para cada variável. A variável de resposta utilizada foi a concentração de L-PAC.

Tabela IV-5 Valores reais e codificados das variáveis empregadas no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{3-1}

Variáveis Independentes	Níveis -1	0	+1
Concentração de Glicose (g/L)	40	60	80
Concentração de células (g/L)	30	40	50
Concentração de benzaldeído (g/L)	4	5	6

IV.6 *Estudo da influência de alguns fatores na Produção de L-PAC*

O efeito da adição de tiamina, sulfato de magnésio, nitrato de prata e peptona na produção de L-PAC foi avaliado em frascos agitados. A tiamina e o sulfato de magnésio são indutores da enzima responsável pela obtenção do acetaldeído ativo, a piruvato descarboxilase. O nitrato de prata é relatado como inibidor da enzima álcool desidrogenase. A peptona é um componente caro e sua presença no meio de cultivo pode ser desnecessária. Nesses experimentos utilizou-se frascos *Erlenmey*er de 500 mL contendo 100 mL do meio de produção determinado pelo experimento PB variando as concentrações de peptona e sulfato de magnésio, tiamina e nitrato de prata, como mostra a Tabela IV-6. Após 1,5 h de cultivo o benzaldeído era adicionado. Após inóculação eram retiradas amostras de hora em hora para se analisar o crescimento celular, L-PAC, benzaldeído, álcool benzílico e ácido benzóico.

Tabela IV-6 Estudo da Influência da concentração de peptona e sulfato de magnésio, tiamina e nitrato de prata na produção de L-PAC.

Experimento	Concentração (g/L)			
	$MgSO_4.7H_2O$	Peptona	Tiamina	Nitrato de Prata
A	1	5		
B	5	5		
C	1			
D	1			10^{-5}
E	5			10^{-4}
F	1			10^{-3}
G	5	5	1	
H	5	5	0,5	
I	5	5	2	
J	1		1	10^{-3}

IV.7 *Extração de L-PAC do meio fermentado*

Para o processo de extração de L-PAC do meio fermentado foram testados 7 diferentes solventes: Tolueno, Diclorometano, Éter de Petróleo, Clorofórmio, Hexano, Ciclohexano e Xileno, na proporção de meio fermentado livre de células/solvente 1:1 para definir quais solventes poderiam ser utilizados.

Após a seleção dos solventes, o L-PAC foi extraído utilizando uma modificação dos métodos de Smith e Hendlin (1953) e Long *e* Ward (1989) na proporção de meio fermentado livre de células/solvente 2:1, ou seja, o meio fermentado (45 mL) foi extraído com a metade do volume de solvente orgânico (22,5 mL) sendo a fração do solvente separada. Este processo foi repetido por quatro vezes. As quatro frações de solventes foram misturadas e evaporadas à vácuo a 90°C para um volume menor que dez militros.

IV.8 *Extrapolação de Escala do Processo de Produção de L-PAC*

Para a extrapolação de escala, existem diversos critérios que podem ser utilizados, todos baseados em princípios de similaridade, como a similaridade geométrica, cinemática, dinâmica, térmica e química. A regra geral de extrapolação de escala é manter a similaridade geométrica, sempre que possível (BORZANI, *et al.*, 2001).

O critério utilizado para o cálculo da agitação no aumento de escala (biorreator de 1 L para o biorreator de 13 L) foi o critério da constância da potência efetiva. Pela sua importância, esse critério está entre um dos mais utilizados por indústrias de fermentação (BORZANI *et al.*, 2001).

A $\boldsymbol{N_2} = \boldsymbol{N_1}\left(\frac{\boldsymbol{D_{i1}}}{\boldsymbol{D_{i2}}}\right)^{2/3}$ Eq. IV-1 para o cálculo da agitação, utilizando esse critério é:

$$\boldsymbol{N_2} = \boldsymbol{N_1}\left(\frac{\boldsymbol{D_{i1}}}{\boldsymbol{D_{i2}}}\right)^{2/3} \qquad \textbf{Eq. IV-1}$$

Onde:

- N_2é a velocidade de agitação no biorreator industrial;
- N_1é a velocidade de agitação no biorreator de bancada;
- D_{i1}é o diâmetro do impelidor do biorreator de bancada;
- D_{i2}é o diâmetro do impelidor do biorreator industrial.

IV.9 *Métodos Analíticos*

IV.9.1 Quantificação do crescimento celular

As suspensões celulares foram quantificadas mediante leituras das absorvâncias em espectrofotômetro, a 570 nm, e transformadas em massa de células secas por intermédio de um fator de conversão obtido previamente pelo método de Massa Seca (VITOLO, 1995).

IV.9.2 Massa Seca

A partir de uma suspensão de células em meio de cultivo YPD são retiradas alíquotas, que foram centrifugadas (18 g) e ressuspensas em solução salina 0,9%. Este procedimento foi repetido por duas vezes, de modo a não haver mais resquícios de componentes do meio de cultivo na nova suspensão formada. Desta suspensão foi retirada uma amostra (10 mL, aprox.), que foi filtrada em papel de filtro *Millipore* (porosidade de 0,45 μm), seca em luz infra-vermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada ao décimo de miligrama. O processo de secagem e pesagem foi repetido até peso constante. Da mesma suspensão foram feitas diluições diferentes para se obter diferentes concentrações celulares e então mediue-se a absorvância em espectrofotômetro (*Bel Photonic)* a 570 nm. Por intermédio de uma regressão linear dos valores de concentração celular (massa seca) versus absorvância obteve-se um fator de conversão. Este método foi realizado para cada cepa, pois cada uma tem um fator de conversão diferente e para cada espectrofotômetro (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

IV.9.3 Análise da concentração de Glicose

A concentração de glicose presente no meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase (RAABO e TERKILDSEN,1960). A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose produzindo ácido glucônico e H_2O_2. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio de uma reação oxidativa de acoplamento formando a substância antipirilquinonimina de coloração vermelha.

Neste método, a absorvância da reação

Tomam-se alíquotas de 10 µL de

O padrão de glicose pertencente ao *kit* enzimático (GLICOSE OXIDASE-HUMAN) possui uma concentração de 100 mg/dL ou 5,55 mmol/L e o reagente enzimático contém tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol/L; 4-aminofenazona 0,25 $mmol.L^{-1}$; fenol 0,75 $mmol.L^{-1}$; glicose oxidase 15000 $U.L^{-1}$; peroxidase 1500 $U.L^{-1}$; mutarotase 2000 $U.L^{-1}$.

AaAp Eq. IV-2:

$$C = \frac{A_a}{A_p} \qquad \textbf{Eq. IV-2}$$

onde:

A_a = Absorvância da amostra;

A_p = Absorvância do padrão;

C = concentração de glicose na amostra ($mg.dL^{-1}$).

IV.9.4 Análise da concentração de sacarose

A concentração de sacarose foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, sigla em inglês) com o equipamento da marca *Waters* com o detector de índice de refração em uma coluna aminex HPX87h com fase catiônica. A fase móvel foi ácido sulfúrico 0,005 M. Foi preparada pela adição de 0,25 mL de H_2SO_4 (concentrado) a 1 L de água *milli-q.* O padrão de sacarose de 10 g/L também foi preparado com água *milli-q*. Sob essas condições (Figura IV-4) o tempo de retenção para a sacarose foi de 9,468 minutos.

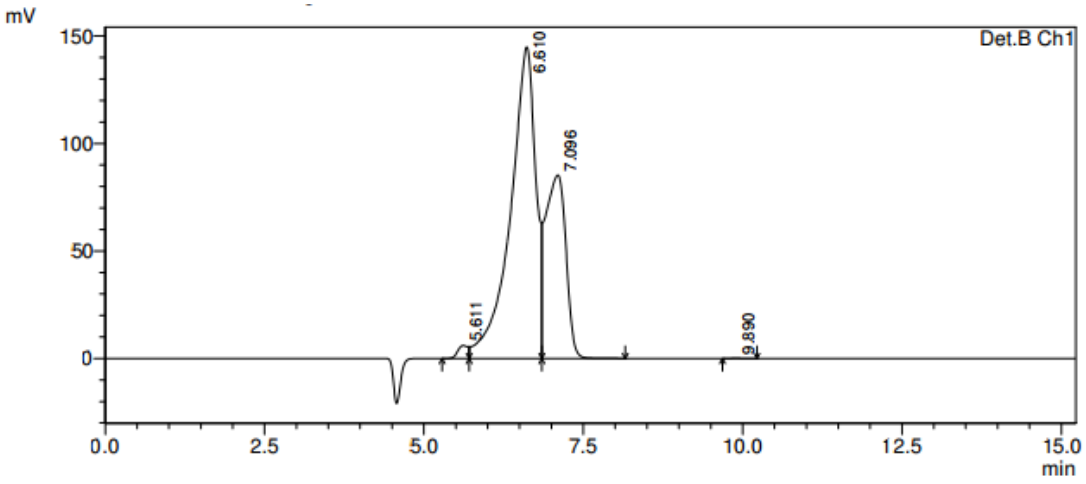


Figura IV-4 Cromatograma da amostra padrão de Sacarose

IV.9.5 Análise da concentração de L-PAC

O substrato (benzaldeído), o produto (L-PAC) e os subprodutos (ácido benzóico e álcool benzílico) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna ODS Hipersil C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm) conforme descrito por Rosche *et al.* (2001). A fase móvel consistia numa mistura de acetonitrila e tampão de fosfato numa proporção de 70:30 (v/v) segundo metodologia descrita por Zhang *et al.* (2008) e desgaseificada durante 20 minutos em ultrassom. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min com detecção UV a 283 nm (o álcool benzílico foi determinado a 254 nm). Sob estas condições, os tempos de retenção do ácido benzóico, álcool benzílico, L-PAC e benzaldeído, são respectivamente, 7,5 min, 6 min, 6,8 min e 11,5 min (Figura IV-5). Em seguida, a concentração de substrato e a concentração de subprodutos foram determinados por comparação comum a amostra padrão.

A validação do método cromatográfico para a quantificação do L-PAC, do benzaldeído e dos subprodutos da reação de biotransformação foi feita por curva padrão de Benzaldeído, L-PAC, Álcool benzílico, e Ácido Benzóico, nas concentrações iniciais de 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L e 1,0 g/L.

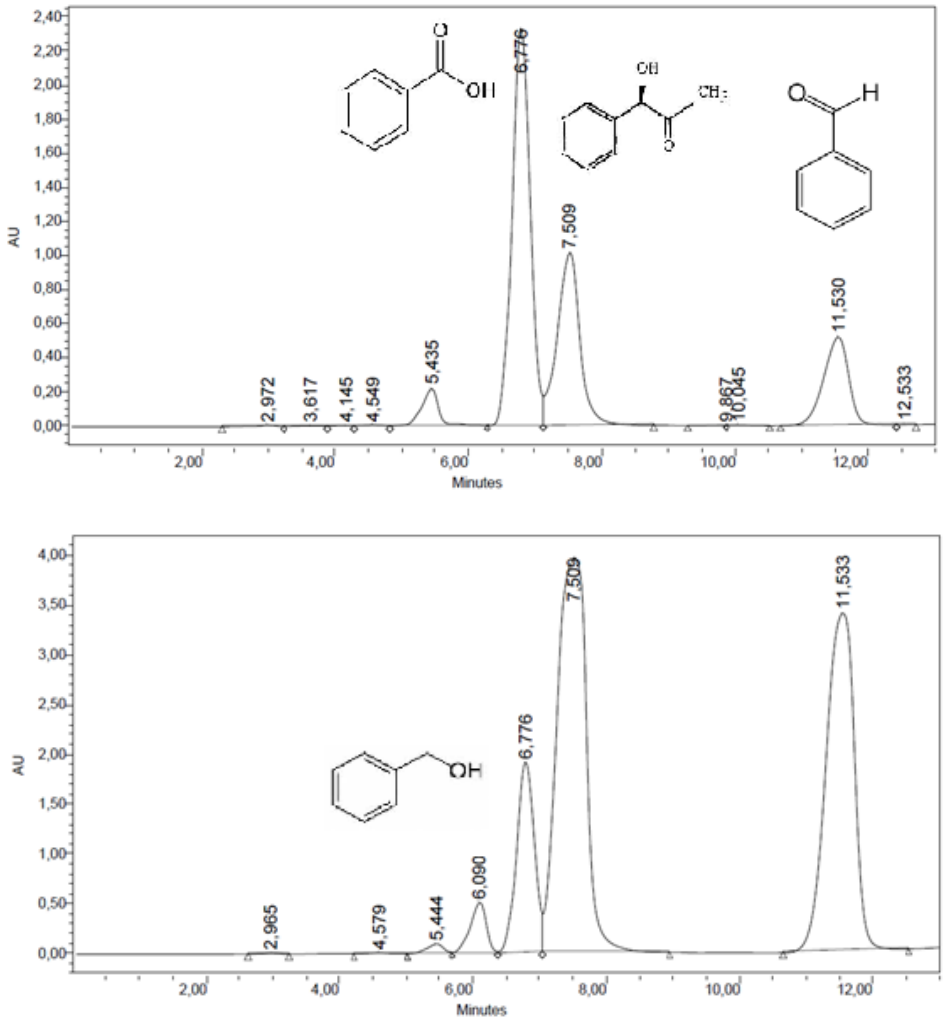


Figura IV-5 Cromatograma da amostra padrão de L-PAC a 283 e a 254 nm

IV.10 *Avaliação Econômica*

Para realização da análise econômica do processo foram levados em conta os preços tanto da matéria prima quanto dos produtos e subprodutos, assim como as quantidades destes geradas em decorrência do processo.

A partir da análise destes produtos e quantidades, é possível avaliar se o que foi proposto no projeto apresenta algum potencial que justifique e suporte sua implantação em escala industrial (AMARAL, 2007).

Uma vez que a análise econômica está intimamente atrelada ao preço das substâncias envolvidas no processo, foi realizada uma busca em uma média de

vinte e cinco sites de empresas produtoras e/ou fornecedoras de reagentes químicos.

Para fundamentar o estudo econômico foram feitos alguns cálculos. O primeiro deles é o retorno de vendas (RV)$\boldsymbol{RV}\left(\frac{US\$}{ano}\right) = \sum_{Produtos} \boldsymbol{Massa}\left(\frac{kg}{batelada}\right) * \boldsymbol{Preço}\left(\frac{US\$}{kg}\right) * \left(\frac{bateladas}{ano}\right)$ Eq. IV-3. Este valor leva em conta o preço do produto por unidade multiplicada pela quantidade disponibilizada pela empresa para venda (PERLINGEIRO, 2005).

$$\boldsymbol{RV}\left(\frac{US\$}{ano}\right) = \sum_{Produtos} \boldsymbol{Massa}\left(\frac{kg}{batelada}\right) * \boldsymbol{Preço}\left(\frac{US\$}{kg}\right) * \left(\frac{bateladas}{ano}\right) \qquad \textbf{Eq. IV-3}$$

O segundo cálculo realizado é o de custo anual de matérias-primas (CMP). Este cálculo fornece quanto a empresa gasta por ano com a aquisição de matérias-primas. Leva-se em conta o preço e quantidade gastos de matéria prima por batelada, assim como o número de bateladas por ano. O CMP pode ser $\boldsymbol{\$ano = Matérias-PrimasMassa\ kgbatelada * Preço\ US\$kg * bateladasano}$ Eq. IV-4 (PERLINGEIRO, 2005):

$$\boldsymbol{CMP}\left(\frac{US\$}{ano}\right) = \sum_{Matérias-Primas} \boldsymbol{Massa}\left(\frac{kg}{batelada}\right) * \boldsymbol{Preço}\left(\frac{US\$}{kg}\right) * \left(\frac{bateladas}{ano}\right) \qquad \textbf{Eq. IV-4}$$

Outro cálculo relevante é o lucro bruto (LB) que é obtido por meio da $\boldsymbol{US\$ano = RV\ US\$ano - CMP\ US\$ano}$ Eq. IV-5). Este cálculo leva em consideração custo de utilidades, taxas, como, por exemplo, impostos governamentais, gastos fixos, entre outros (PERLINGEIRO, 2005).

$$\boldsymbol{LBI}\left(\frac{US\$}{ano}\right) = \boldsymbol{RV}\left(\frac{US\$}{ano}\right) - \boldsymbol{CMP}\left(\frac{US\$}{ano}\right) \qquad \textbf{Eq. IV-5}$$

Esse cálculo serve para dar uma ideia aproximada da viabilidade do processo. Se o RV for menor, próximo ou um pouco maior que o custo despendido com matérias-primas (CMP), pode-se desconsiderar a viabilidade do processo. Caso o RV seja maior que o CMP, o processo pode ser viável, devendo ser realizado um estudo econômico mais detalhado (PERLINGEIRO, 2005).

V. RESULTADOS EM FRASCOS AGITADOS

V.1 *Seleção das cepas*

O interesse econômico em efedrina justifica a necessidade em otimizar a produção biocatalítica de seu precursor (L)–fenil-acetil-carbinol. Nos últimos anos, as estirpes geneticamente modificadas, células imobilizadas, piruvato descarboxilase (PDC) parcialmente purificada ou meio suplementado com piruvato de ter sido utilizado (VOJTISEK e NETRVAL 1982; MAHMOUD *et al* 1990; IWAN *et al* 2001, KOSTRABY *et al* 2002, ROSCHE *et al* 2002. MANDWAL *et al* 2004 e KHAN *et al* 2012). Sem dúvida, no entanto, a possibilidade de utilização de micro-organismos naturalmente ocorrentes sob condições de fermentação é sempre interessante a partir de um ponto de vista prático e econômico.

Cepas da coleção de cultura do Instituto de Microbiologia da UFRJ foram selecionadas em função das características desejadas para esse processo. Como essas cepas estavam estocadas por muito tempo, foi utilizada a técnica de esgotamento e assim foram selecionadas 18 cepas, sendo 2 do gênero *Candida*, 1 do gênero *Debaryomyces*, 4 do gênero *Kluyveromyces*, 3 do gênero *Pichia* e 8 do gênero *Saccharomyces* (As fotos das placas de isolamento de todas elas se encontram no Anexo 1).

As leveduras pré-selecionadas foram aquelas com capacidade de produzir etanol uma vez que é necessário que a enzima piruvato descarboxilase esteja ativa para a produção de L-PAC. Mais 4 cepas da espécie *Saccharomyces* foram utilizadas, dessas 2 existentes no laboratório E-103 do grupo Biose, 1 do INCQS-Fiocruz e 1 da Indústria Fleischman. As 22 cepas foram cultivadas em meio de produção proposto por Zhang *et al.* (2008). O conhecimento da cinética do processo fermentativo é de extrema importância quando da transposição de um experimento de laboratório para escala industrial, além de possibilitar uma comparação quantitativa entre diferentes condições de cultivo, por intermédio de variáveis, obtidas também a partir das curvas de ajuste de X=X(t), P=P(t) e S= S(t). (HISS, 2001). Todas foram capazes de crescer em presença de 1 g/L de benzaldeído, como pode ser observado na Tabela V-1, mas apenas cinco delas eram boas produtoras de L-PAC no meio testado. Também é possível observar na Tabela V-1 que as cepas de *K.mar1*, *S.car1*, *S.cer5*, *S.cer6* e *S.pas1* foram as

que mais produziram L-PAC. Portanto, foram selecionadas para as próximas etapas.

Tabela V-1 Parâmetros do cultivo das cepas escolhidas

CRC[a]	μ (h^{-1})[b]	ΔX (g/L)[c]	L-PAC (g/L)
C.col1	0.283	5.21	0.01
C.gui1	0.167	3.99	0.01
D.yam1	0.181	3.30	0.01
K.aes1	0.311	1.04	0.07
K.mar1	**0.137**	**3.83**	**0.74**
K.mar2	0.141	2.09	0.03
K.the1	0.085	5.87	0.19
P.ano1	0.251	3.17	0.12
P.ano2	0.123	4.20	0.01
P.ohm1	0.330	0.91	0.17
S.car1	**0.141**	**3.59**	**1.75**
S.cer1	0.345	3.89	0.27
S.cer2	0.427	2.06	0.06
S.cer3	0.283	2.42	0.07
S.cer4	0.159	2.16	0.03
S.cer5	**0.256**	**2.22**	**0.79**
S.cer6	**0.245**	**1.54**	**0.97**
S.cer7	0.171	3.52	0.19
S.cer8	0.076	5.21	0.14
S.dai1	0.207	3.99	0.36
S.pas1	**0.338**	**3.30**	**0.39**
S.spe1	0.139	3.89	0.06

[a]CRC: Código referente a cepa
[b]μ: taxa especifica de crescimento durante a fase exponencial do crescimento
[c]ΔX: Concentração de Biomassa máxima menos a concentração de biomassa inicial

V.2 *Estudo do tempo de adição de Benzaldeído*

Vários autores já mostraram que o benzaldeído apresenta elevada toxicidade para a célula (Rogers *et al.*, 1997**;** Zhang *et al.*, 2008) e sugerem a adição desse substrato quando as células já estão com o metabolismo mais ativo pois favorece a formação do produto. Portanto, no presente estudo, o tempo de adição de benzaldeído foi avaliado, a fim de permitir que as células se adaptassem ao meio de produção antes da adição de benzaldeído**.** A adição de 1 g/L de benzaldeído foi realizada em 0, 1,5, 3,0 e 4,5 horas após a inoculação dos micro-organismos no meio de produção proposto por Zhang *et al.* (2008) (sem benzaldeído). Neste estudo, esses 4 tempos de adição foram testados para cada uma das cinco cepas, adicionando-se benzaldeído uma vez durante a fermentação**,** nos momentos mencionados. A Tabela V-2 mostra os resultados para as cinco cepas.

Para o conhecimento da cinética do processo fermentativo foram obtidos os parâmetros estequiométricos e verificados o consumo dos substratos (S1= Glicose, e S2= Benzaldeído), a produção de biomassa (X), a evolução do pH, a produção do L-PAC (P) e dos subprodutos ácido benzoico e álcool benzílico. Os fatores de conversão de substrato em produto $Y_{P/S2}$ (g de L-PAC / g de benzaldeído) e de conversão de substrato em biomassa $Y_{X/S1}$ (g de células / g de glicose, a taxa específica de crescimento (μ) e a taxa de consumo de benzaldeído (-dS2/dt) também foram avaliados.

Avaliando a bioquímica do processo (Figura II-5), é possível obter a estequiometria de produção de L-PAC a partir de glicose e benzaldeído. Partindo-se de 1 mol de glicose, obtém-se 2 mols de ácido pirúvico. Cada mol de ácido pirúvico reage com um mol de benzaldeído formando um mol de L-PAC. Assim o fator de conversão teórico de substrato em produto $Y_{P/S2\ teórico}$ é 1,42 g de L-PAC/g de benzaldeído. Com esse valor, é possível ter uma ideia da eficiência do processo.

Tabela V-2 Produção de L-PAC e subprodutos para as 5 melhores cepas em diferentes tempos de adição do Benzaldeído em meio de produção (Zhang *et al.*, 2008) com inoculo de 3 g cél/L, concentração inicial de glicose de 25 g/L.

Cepa/ Tempo de adição	Tempo de PAC_{max}[a] (h)	PAC_{max}[b] (g/L)	Benzaldeído (g/L)[c]	Glicose (g/L)[c]	Ácido Benzoico (g/L)[c]	Álcool benzílico (g/L)[c]	Biomassa formada (g/L)[c]	μ (h^{-1})	$Y_{X/S1}$ (g de biomassa/ g de Glicose)	$Y_{P/S2}$ (g de L-PAC/ g de Benzaldeído)	$-dS_2/dt$ (g/L.h)
K.mar1											
0 h	4,5	0,35	0,02	5,9	0,15	0,54	4,21	0,08	0,06	0,59	0,13
1,5 h	4,5	0,52	0,00	7,4	0,11	0,53	4,60	0,08	0,12	0,71	0,19
3,0 h	4,5	0,55	0,14	5,5	0,06	0,49	5,29	0,16	0,14	1,07	0,39
4,5 h	24,0	0,11	0,00	3,8	0,19	0,40	6,94	0,17	0,14	0,66	0,03
S.car1											
0 h	7,0	0,47	0,01	10,6	0,13	0,75	3,08	0,02	0	0,69	0,10
1,5 h	7,0	0,36	0,11	17,7	0,26	0,58	3,51	0,04	0.01	0,43	0,15
3,0 h	7,0	0,28	0,03	9,3	0,19	0,71	4,53	0,07	0.06	0,34	0,21
4,5 h	24,0	0,02	0,00	0,0	0,14	0,61	4,60	0,10	0.07	0,03	0,04
S.cer5											
0 h	4,0	0,37	0,00	8,2	0,27	0,61	3,57	0,14	0,06	0,42	0,220
1,5 h	4,0	0,59	0,00	0,2	0,16	0,41	4,75	0,16	0,08	0,70	0,34
3,0 h	5,0	0,61	0,11	0,0	0,13	0,37	7,08	0,34	0,18	0,81	0,37
4,5 h	ND[d]	ND[d]	0,00[e]	0,0[e]	0,22[e]	0,92[e]	9,06[e]	0,30	0,26	ND[d]	ND[d]

[a] Tempo de obtenção de $PAC_{máx}$
[b] $PAC_{máx}$: Máxima concentração de L- PAC produzido
[c] Concentração no tempo de $PAC_{máx}$
[d] ND: Não detectado pelo método.
[e] Concentração em 24 h do processo.

Tabela V-2 - continuação

Cepa/ Tempo de adição	Tempo de PAC_{max}[a] (h)	PAC_{max}[b] (g/L)	Benzaldeído (g/L)[c]	Glicose (g/L)[c]	Ácido Benzoico (g/L)[c]	Álcool benzílico (g/L)[c]	Biomassa formada (g/L)[c]	μ (h^{-1})	$Y_{X/S1}$ (g de biomassa/ g de Glicose)	$Y_{P/S2}$ (g de L-PAC/ g de Benzaldeído)	$-dS_2/dt$ (g/L.h)
S.cer6											
0 h	6,0	0,26	0,00	0,1	0,20	0,63	6,24	0,144	0,140	0,351	0,123
1,5 h	4,5	0,52	0,00	0,1	0,11	0,60	5,57	0,174	0,124	0,732	0,237
3,0 h	4,5	0,20	0,28	0,2	0,10	0,45	7,13	0,297	0,177	0,435	0,307
4,5 h	5,0	0,06	0,45	0,1	0,06	0,30	7,45	0,244	0,202	0,154	0,780
S.pas1											
0 h	6,0	0,24	0,00	0,2	0,31	0,63	3,80	0,033	0,000	0,27	0,148
1,5 h	6,0	0,51	0,00	0,0	0,16	0,55	5,43	0,213	0,095	0,573	0,198
3,0 h	4,5	0,67	0,00	0,1	0,12	0,38	6,25	0,238	0,185	1,155	0,580
4,5 h	6,0	0,09	0,61	0,0	0,13	0,41	7,65	0,264	0,207	0,265	0,227

[a] Tempo de obtenção de PAC_{max}
[b] PAC_{max}: Máxima concentração de L- PAC produzido
[c] Concentração no tempo de PAC_{max}
[d] ND: Não detectado pelo método.
[e] Concentração em 24 h do processo.

É possível observar na Tabela V-2 que as melhores cepas produtoras de L-PAC dentre as 5 escolhidas são *K.mar1*, *S.cer5* e *S.pas1* pois apresentaram os valores mais elevados da concentração de produto, mantendo esse valor por, pelo menos, 1,5 h. Dentre essas 3 cepas, os melhores tempos para a adição de benzaldeído foram 1,5 e 3 h. Para as cepas *S.cer5* e *S.pas1,* quando a adição de benzaldeído foi realizada em 3 h, a glicose foi completamente consumida e para *S.cer5* ainda restou benzaldeído no meio. A adição em 1,5 h apesar de ter favorecido o consumo de toda a glicose e de benzaldeído, favoreceu a produção de álcool benzílico e ácido benzóico. Para a cepa *K.mar1* não houve consumo de toda a glicose. Com a adição de benzaldeído em 1,5 h houve consumo total de benzaldeído, mas este foi convertido a uma concentração inferior de L-PAC em relação à adição em 3 h de processo. Isto se deve a maior conversão do benzaldeído em subprodutos quando este foi adicionado em 1,5h.

Portanto, considerou-se que o melhor tempo para a adição de benzaldeído foi 3 horas, momento em que o crescimento celular está na fase exponencial, como mostram as Figura V-1, Figura V-2, Figura V-3 e Figura V-4. Nessa fase, as células já estão adaptadas ao meio e mais biocatalisador está disponível.

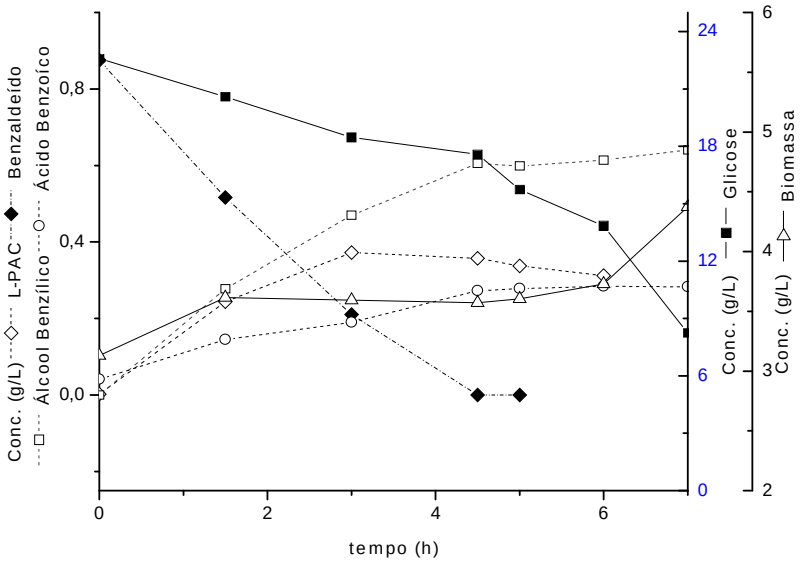


Figura V-1 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al.* (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído no início do cultivo (0 h).

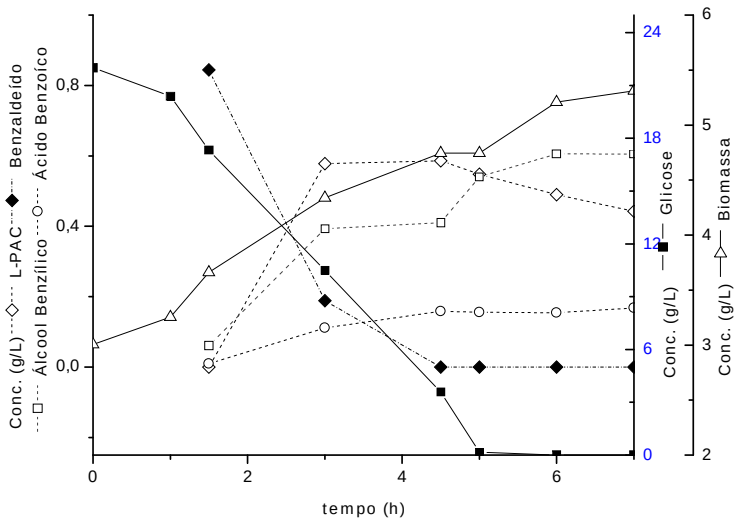


Figura V-2 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al*. (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído após 1,5h.

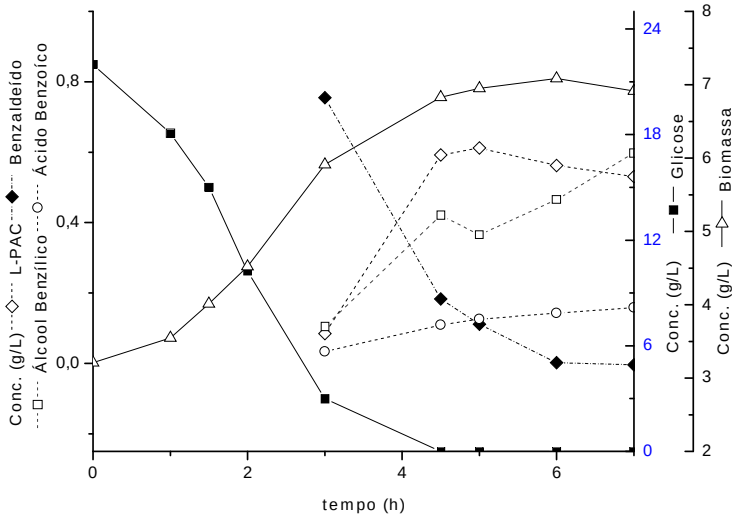


Figura V-3 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al*. (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído após 3h.

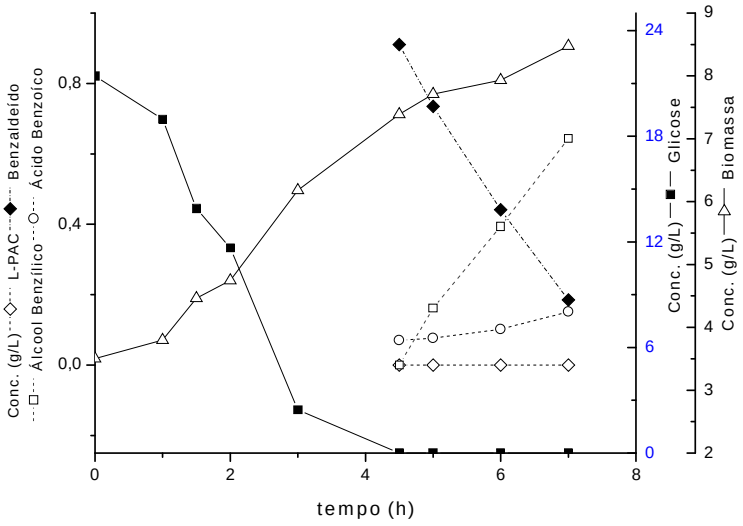


Figura V-4 Cinética do cultivo da cepa *S.cer5* em meio de produção Zhang *et al*. (2008) com inoculo de 3,0 g cél/L e adição de benzaldeído após 4,5h.

É possível verificar pelos resultados da Tabela V-2 e das Figuras V-1, V-2, V-3 e V-4 que o tempo de adição de benzaldeído é um parâmetro de extrema importância para a produção de L-PAC. A adição de benzaldeído logo no início do cultivo (Figura V-1) influencia interfere negativamente no crescimento celular, provavelmente pela inibição de uma ou mais enzimas do metabolismo. Observa-se que não há aumento do crescimento celular, indicando uma tendência de não haver duplicação celular. As Figuras V-2, V-3 e V-4 mostram que antes da adição do benzaldeído as células se adaptam ao meio, iniciando o aumento da concentração de células, o que indica que o fluxo de carbono está ocorrendo, favorecendo as enzimas do metabolismo celular. Com a adição do benzaldeído em 1,5 ou 3 h, a enzima PDC passa a converter o piruvato, que está sendo gerado por esse fluxo de carbono, em L-PAC.

A adição posterior de benzaldeído (4,5 h) não se mostra favorável à produção de L-PAC pois as células já se encontram em fase estacionária de crescimento, momento em que a maior parte da glicose já foi consumida para o crescimento celular. Assim, não há mais piruvato disponível para a bioconversão. Long e Ward (1989) também utilizaram um período de1 hora para a adaptação das células ao novo meio. A fermentação foi iniciada pela adição de aldeído

aromático em frascos agitados por 1 hora e 30 minutos e a concentração de L-PAC formada, a partir de 1 g/L de benzaldeído, foi de 0,1 g/L.

A máxima taxa específica de produção do L-PAC ocorre quando a taxa específica de crescimento do micro-organismo sofre uma redução significativa. No começo da fermentação predominam transformações produtoras de energia com formação de biomassa; após a adição do benzaldeído, a formação de biomassa cessa para que a energia formada seja convertida na formação do produto que é um metabólico secundário, sendo assim não há associação entre taxas.

V.3 *Avaliação de parâmetros do processo de produção de L-PAC.*

Considerando os resultados do tempo de adição de benzaldeído, após 3 h, selecionou-se as cepas, *K.mar1, S.cer5* e *S.pas1* para avaliar a concentração inicial de células, de glicose, de benzaldeído e o pH por intermédio de um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (Tabela IV-2), utilizado 4 variáveis independentes, totalizando 2^{4-1} (8) experimentos e 4 pontos centrais.

Uma forma de disponibilizar mais piruvato para a bioconversão de L-PAC seria submeter às células à repressão catabólica. Ou seja, na presença de elevada concentração de glicose, mesmo na presença de oxigênio, há inibição da síntese de algumas enzimas do metabolismo celular, reduzindo a utilização do oxigênio como aceptor final de elétrons. Para *S. cerevisiae*, que é um micro-organismo facultativo em relação ao oxigênio, a continuidade do fluxo de carbono (glicose) é possível pela utilização do piruvato para gerar etanol (que passa a ser o aceptor final de elétrons) (GANCEDO, 1998). Mas na presença de benzaldeído, a PDC converte o piruvato e o benzaldeído em L-PAC. Portanto, a avaliação da concentração de glicose e de benzaldeído pode permitir um aumento na obtenção desse produto.

Além disso, como a cinética de produção de L-PAC é classificada como semi associada ao crescimento celular, quanto mais células, mais produto pode ser obtido. Assim essa variável foi também avaliada.

O efeito do pH sobre a atividade carboligase da PDC, cujo valor ótimo é em torno de 6,5, é um fator que precisa ser avaliado uma vez que segundo Rosche *et al.* (2002), quando o pH está acima de 7 ocorre uma redução desta atividade

(ROSCHE *et al.*, 2002). A faixa de pH entre 4 e 6 tem sido frequentemente empregada na produção de PAC quando se utiliza células de *Saccharomyces cerevisiae* (LONG e WARD, 1989). Em pH 3 e 3,5 a formação de álcool benzílico é baixa e nota-se uma grande quantidade de benzaldeído residual. Já em pH 4 há um aumento na formação de álcool benzílico e a quantidade de benzaldeído residual cai drasticamente. A máxima produção de L-PAC é observada entre pH 4,5 e 5 (SHUKLA, 2001) e em pH 6,0 por Khan *et al.* (2012), Leksawasdi *et al.* (2003) e Chen *et al.* (2005).

Na Tabela V-3, é possível verificar que para cepa *S.pas1,* a maior concentração de L-PAC (3,12 g/L) foi obtida em altas de glicose (40 g/L) e Benzaldeído (4 g/L), baixas concentrações celulares (3 g/L) e pH 5. A variação da concentração de L-PAC no ponto central é de 0,55 g/L mostrando que os resultados são reprodutíveis sendo a variação máxima entre a maior concentração de L-PAC (3,51 g/L) e a mínima concentração de L-PAC (0,04 g/L) é de 3,47 g/L ou seja, as diferentes concentrações entre cada experimento são inerentes as mudanças das variáveis.

Tabela V-3 Planejamento experimental: Estudo das influências das variáveis, concentração de glicose, concentração inicial de células, benzaldeído e do pH inicial na produção de PAC por *S.pas1 após 7 h de cultivo com adição de benzaldeído após 3 h de cultivo.*

Glicose[a]	$[cel]_i$[a,b]	Benzaldeído[a].	pH	Benzaldeído (ΔS)[a, c]	L-PAC[a]	$Y_{P/S2}$[d]	Álcool benzílico[a]	Ác. Benzóico[a]
-1(10)	-1(3)	-1 (1)	-1 (5,0)	1,00	0,06	0,06	0,59	0,21
+1(40)	-1(3)	-1 (1)	+1 (7,0)	1,00	0,72	0,72	0,32	0,04
-1(10)	+1(9)	-1 (1)	+1 (7,0)	1,00	0,44	0,44	0,56	0,01
+1(40)	+1(9)	-1 (1)	-1 (5,0)	1,00	0,04	0,04	0,76	0,11
-1(10)	-1(3)	+1 (4)	+1 (7,0)	2,36	0,66	0,28	1,15	0,01
+1(40)	**-1(3)**	**+1 (4)**	**-1 (5,0)**	**3,51**	**3,12**	**0,89**	**0,41**	**0,41**
-1(10)	+1(9)	+1 (4)	-1 (5,0)	1,82	0,02	0,01	0,27	0,58
+1(40)	+1(9)	+1 (4)	+1 (7,0)	1,96	0,27	0,14	0,37	0,53
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,99	0,45	0,22	1,13	0,29
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,89	0,65	0,34	1,32	0,25
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,69	0,10	0,01	0,73	0,33
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,70	0,12	0,07	0,67	0,39

[a]unidade: g/L, ; [b]: *[cel]$_i$*: Concentração inicial de células
[c] *Benzadeído. (*ΔS): Benzaldeído consumido.
[d]*Yp/s* Fator de conversão de benzaldeído em produto L-PAC (g de L-PAC/ g de benzaldeído)

Os dados apresentados na Tabela V-3, não podem ser interpretados de forma direta, pois se faz necessária uma avaliação da significância dos parâmetros estudados por bases estatísticas. Na análise de variância (ANOVA) existe um parâmetro estatístico denominado *p-valor*, que permite avaliar quais fatores são estatisticamente relevantes. Quando os valores do *p-valor* para cada um dos fatores e interações são menores ou iguais a 0,05, estes apresentam significância ou relevância estatística com confiabilidade superior a 95% (NETO *et al.*, 1995; MONTGOMERY, 1999).

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável é apresentada no diagrama de Pareto (Figura V-5), que fornece o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a produção de L-PAC, estabelecendo quais desses efeitos encontram-se dentro do grau de confiança determinado para a análise (95%).

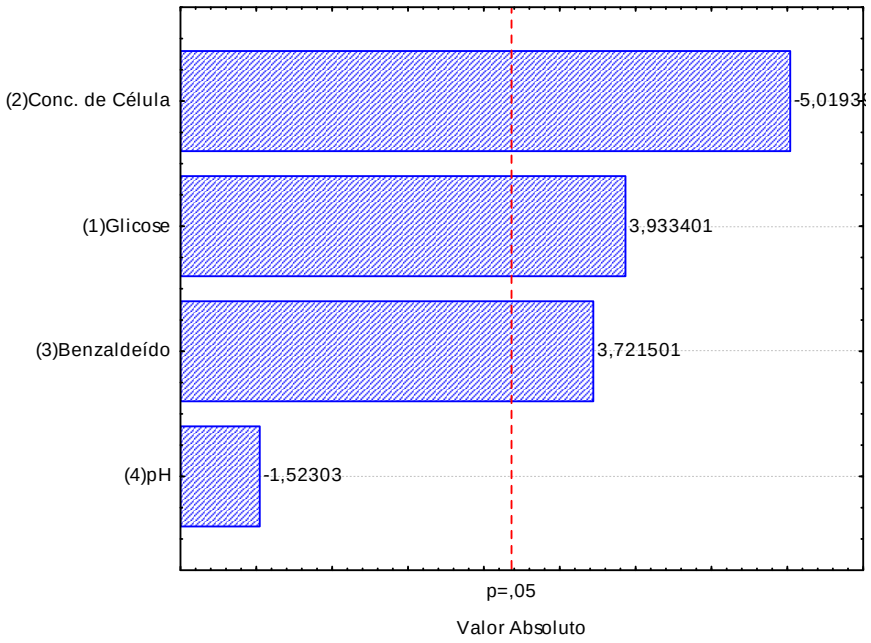


Figura V-5 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para a cepa *S.pas1* na formação de L-PAC.

Nesta condição, a conversão do benzaldeído em subprodutos foi baixa, com percentual de 10% para o álcool benzílico e para o ácido benzóico. A formação de álcool benzílico foi favorecida por altas concentrações de

benzaldeído, o que, provavelmente, ocorreu devido a inibição da piruvato descarboxilase (Resultado não mostrado).

A cepa *S.cer5* também apresentou máximo de produção nas mesmas condições. Na Tabela V-4 é possível verificar que a maior concentração de L-PAC foi de 2,79 g/L. A variação da concentração de L-PAC no ponto central é de 0,37 g/L mostrando que os resultados são reprodutíveis. Além disso, a variação entre a maior concentração de L-PAC (2,79 g/L) e a mínima concentração de L-PAC (0,02 g/L) obtidas é de 2,77 g/L, ou seja, as diferentes concentrações de L-PAC para cada experimento são inerentes às mudanças das variáveis dependentes.

Tabela V-4 Planejamento experimental: Estudo das influências das variáveis, concentração de glicose, concentração inicial de células, benzaldeído e do pH inicial na produção de PAC por *S. cer5* e adição de benzaldeído após 3 h de cultivo

Glicose[a]	$[cel]_i$[a,b]	Benzaldeído[a].	pH	Benzaldeído (ΔS)[a, c]	L-PAC[a]	$Y_{P/S2}$[d]	Álcool benzílico	Ác. Benzóico[a]
-1(10)	-1(3)	-1 (1)	-1 (5,0)	1,00	0,02	0,02	0,68	0,23
+1(40)	-1(3)	-1 (1)	+1 (7,0)	1,00	0,92	0,92	0,42	0,05
-1(10)	+1(9)	-1 (1)	+1 (7,0)	0,04	0,09	2,29	0,92	0,62
+1(40)	+1(9)	-1 (1)	-1 (5,0)	0,97	0,05	0,05	0,63	0,26
-1(10)	-1(3)	+1 (4)	+1 (7,0)	2,45	0,88	0,36	0,70	0,01
+1(40)	**-1(3)**	**+1 (4)**	**-1 (5,0)**	**3,02**	**2,79**	**0,92**	**0,34**	**0,40**
-1(10)	+1(9)	+1 (4)	-1 (5,0)	1,67	0,02	0,01	0,23	0,40
+1(40)	+1(9)	+1 (4)	+1 (7,0)	3,85	1,90	0,49	1,10	0,42
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,87	0,78	0,42	0,88	0,34
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,67	0,59	0,35	0,85	0,34
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,90	0,91	0,97	1,18	0,08
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	2,50	0,96	0,39	1,42	0,70

[a]unidade: g/L,
[b]: $[cel]_i$: Concentração inicial de células
[c] *Benzadeído*. (ΔS): Benzaldeído consumido.
[d]*Yp/s* Fator de conversão de benzaldeído em produto L-PAC (g de L-PAC/ g de benzaldeído)

Na condição de maior produção de L-PAC, a conversão do benzaldeído em álcool benzílico foi de 0,34 g/L ou seja 9,6% dos produtos formados e a conversão a ácido benzóico foi de 0,40 g/L ou 11,3% dos produtos. Na análise de pareto da Figura V-6 podemos concluir que o elevado pH (7,0) favoreceu a formação de álcool benzílico, exceto para a condição de baixa concentração de benzaldeído e baixa concentração celular.

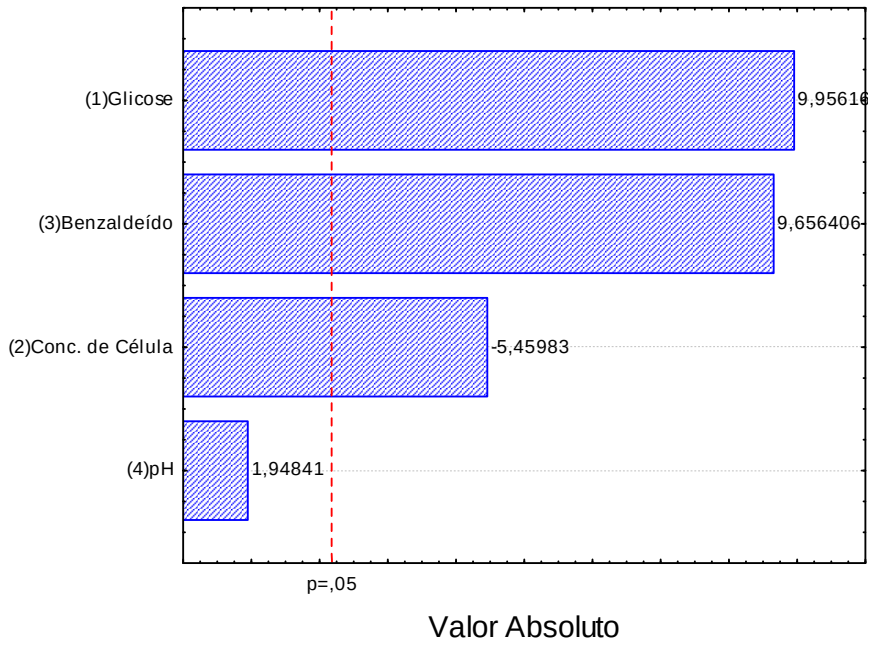


Figura V-6 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para a cepa *S. cer5* na formação de L-PAC.

Além disso, é possível observar na Tabela V-4 que a alta concentração inicial de células favoreceu a formação de ácido benzóico, possivelmente devido a utilização da glicose para manutenção celular, não gerando piruvato suficiente para conversão a L-PAC com o benzaldeído e com isso esse foi oxidado a ácido benzóico.

Para cepa *K.mar1*, verifica-se na Tabela V-5 que a maior concentração de L-PAC (2,61 g/L) foi obtida em altas concentrações de glicose (40 g/L), de benzaldeído (4 g/L) e de células (9 g/L) e pH 7. Nesta condição ocorreu uma elevada formação de álcool benzílico (1,62 g/L) correspondente a 38,1% dos produtos gerados.

Tabela V-5 Planejamento experimental: Estudo das influências das variáveis, concentração de glicose, concentração inicial de células, benzaldeído e do pH inicial na produção de PAC por *K.mar1.e adição de benzaldeído após 1,5 h de cultivo*

Glicose[a]	$[cel]_i$[a,b]	Benzaldeído[a].	pH	Benzaldeído(ΔS) [a, c]	L-PAC[a]	$Y_{P/S2}$[d]	Álcool benzílico[a]	Ác. Benzóico[a]
-1(10)	-1(3)	-1 (1)	-1 (5,0)	0,71	0,12	0,17	0,4	0,14
+1(40)	-1(3)	-1 (1)	+1 (7,0)	1,00	0,77	0,77	0,44	0
-1(10)	+1(9)	-1 (1)	+1 (7,0)	1,00	0,43	0,43	0,64	0,01
+1(40)	+1(9)	-1 (1)	-1 (5,0)	1,00	0,27	0,27	0,66	0,18
-1(10)	-1(3)	+1 (4)	+1 (7,0)	1,59	0,55	0,34	0,26	0,01
+1(40)	-1(3)	+1 (4)	-1 (5,0)	2,31	0,97	0,42	0,14	0,47
-1(10)	+1(9)	+1 (4)	-1 (5,0)	1,72	0,11	0,06	0,1	0,39
+1(40)	**+1(9)**	**+1 (4)**	**+1 (7,0)**	**3,50**	**2,61**	**0,75**	**1,62**	**0,02**
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,73	1,17	0,67	0,93	0,09
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,54	0,82	0,53	0,86	0,11
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	1,68	1,01	0,60	0,78	0,12
0 (25)	0 (6)	0 (2,5)	0 (6,0)	2,33	1,24	0,58	1,05	0,1

[a]unidade: g/L, ; [b]:$[cel]_i$: Concentração inicial de células
[c] *Benzadeído. (*ΔS): Benzaldeído consumido.
[d]*Yp/s* Fator de conversão de benzaldeído em produto L-PAC (g de L-PAC/ g de benzaldeído)

Para as cepas *S.pas1* e *S.cer5,* o pH não foi uma variável com influência significativa. A concentração inicial de células teve um efeito negativo, sendo a variável mais significativa para *S.pas1*. As concentrações de glicose e de benzaldeído tiveram efeito positivo, sendo as mais significativas para *S.cer5*. Já para cepa *K.mar1* (Figura V-7), a variável não significativa foi a concentração de células e as demais tiveram efeito positivo, sendo a concentração de glicose a mais significativa.

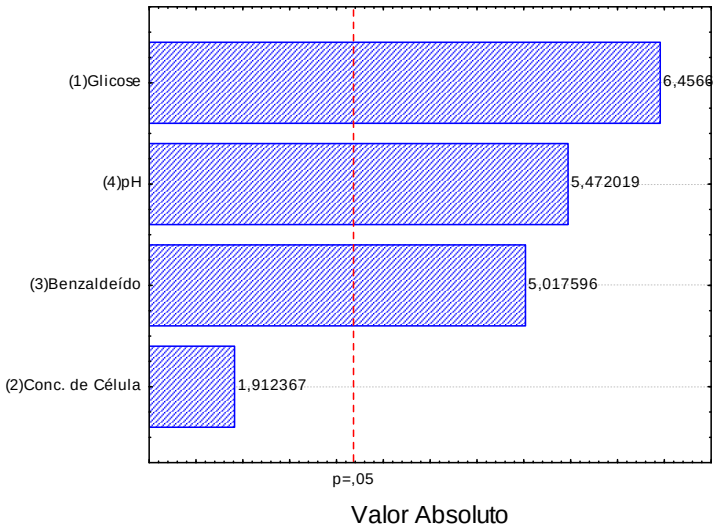


Figura V-7 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} para a cepa *K.mar1* na formação de L-PAC.

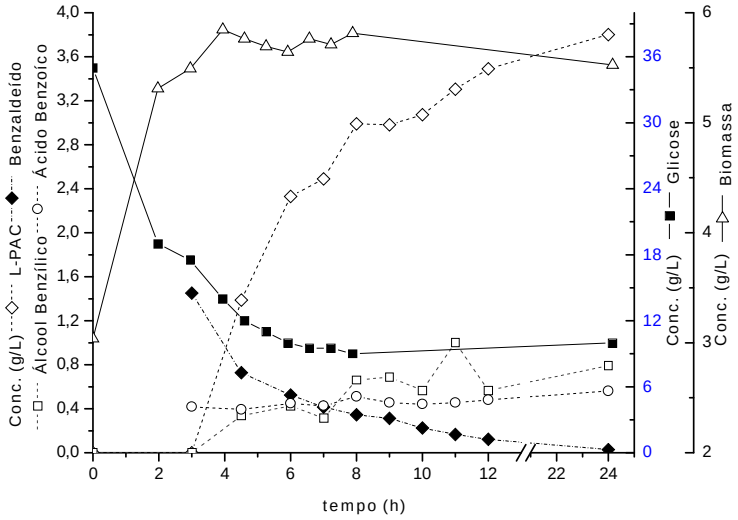
Com base nestes resultados, é possível observar que, a concentração de glicose foi uma variável com elevada influência para a produção de L-PAC independente do micro-organismo. Isso confirma a sugestão inicial de que a condição de repressão catabólica favorece a produção de L-PAC. A concentração inicial de benzaldeído também teve esse efeito, sendo o aumento da concentração positivo para a produção de L-PAC para todos os micro-organismos. Como o benzaldeído é o substrato limitante nesse processo, o aumento da concentração pode aumentar a produção de L-PAC. No entanto, como esse composto é tóxico para as células, percebe-se que a faixa de concentração estudada está abaixo do valor crítico para a toxicidade.

Em relação à concentração de células, o efeito negativo para as cepas *S.pas1* e *S.cer5* pode ser explicado pelo fato de que com maior concentração de células a demanda por glicose é maior, o que favorece a sua redução mais rapidamente, deixando as células em condição de desrepressão.

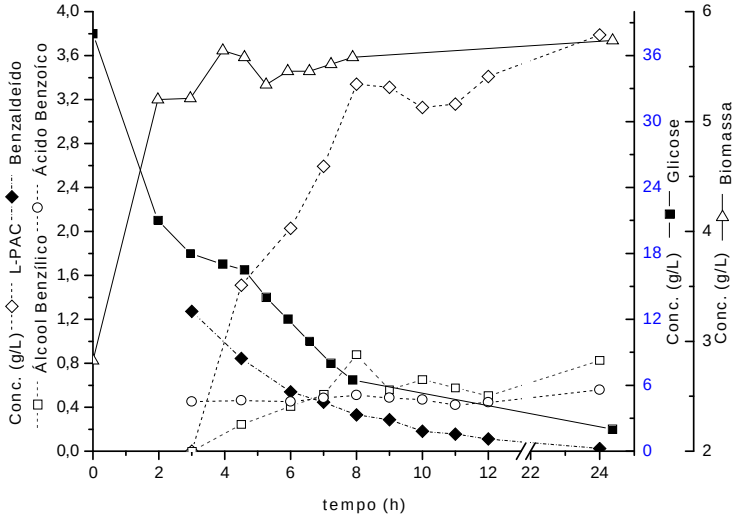
Como a cepa *Kmar1* foi a que apresentou menor produção de L-PAC e maior concentração de subprodutos, esta não foi considerada para os experimentos posteriores.

Na avaliação da cinética das duas melhores cepas na condição de maior produção de L-PAC (concentração inicial de glicose: 40 g/L, células: 3 g/L,

benzaldeído: 4 g/L e pH 5,0) (Figura V-8) é possível perceber que o perfil cinético para ambas as cepas é bastante semelhante.



(a)



(b)

Figura V-8 Cinética de produção de L-PAC e seus subprodutos em frascos agitados a 200 rpm e 30°C por *S.cer5* (a) e *S.pas1* (b) em concentrações iniciais de 40 g/L de glicose, 3 g/L de células, 4 g/L de Benzaldeído e pH 5.

A concentração máxima de L-PAC para *S.cer5* e *S.pas1* foi de 3,80 e 3,79 g/L respectivamente após 24 h de cultivo. Mas as maiores produtividades (0,37 e 0,42 g/L.h) ocorreram após 8 h. Os coeficientes de conversão de benzaldeído em L-PAC ($Y_{P/S}$) após 8 h foram, respectivamente, 0,82 e 0,91 g de L-PAC/g de benzaldeído, aproximando-se do valor teórico (1,41 g de L-PAC/g de benzaldeído).

Mediante a análise do perfil cinético de produção de L-PAC, confirma-se a classificação semi associada ao crescimento, pois o L-PAC só começa a ser produzido quando o cultivo está em fase estacionária. Portanto, a taxa de formação de L-PAC não está relacionada à taxa de formação de células.

Como as duas cepas apresentaram elevada similaridade na produção de L-PAC e devido a necessidade de se estabelecer um micro-organismo para os estudos seguintes, a cepa *S. cer5* foi escolhida por ser pertencente ao banco de cepas da Universidade.

A partir dos resultados do primeiro planejamento experimental para a cepa *S. cer5*, um novo planejamento foi proposto para aumentar a produção de L-PAC. O delineamento central composto rotacional (DCCR) foi utilizado avaliando-se as concentrações de células, benzaldeído e glicose. Os resultados do planejamento experimental anterior (Tabela V-5) sugerem um aumento na concentração de glicose e de benzaldeído. Portanto, os valores dos níveis máximos (40 g/L de glicose e 4 g/L de benzaldeído) foram utilizados como referência para o nível -1 no DCCR. Para a concentração inicial de células, cujo efeito foi negativo o menor valor do planejamento anterior (3 g/L), foi definido como ponto central do DCCR. O pH foi mantido constante em 5,0. A Tabela V-6 apresenta os resultados.

A maior concentração de L-PAC de 3,05 g/L foi obtida em alta concentração de glicose e alta concentração inicial de células e em baixas concentrações de benzaldeído (3,81 g/L), porém o melhor coeficiente de formação de L-PAC a partir de benzaldeído, $Y_{P/S}$ obtido foi em concentrações mínimas de glicose, células e benzaldeído, produzindo 2,76 g/L de L-PAC em 7 h. Concentrações de benzaldeído superiores a 5 g/L inibiram a formação de L-PAC devido a sua alta toxicidade. Não foi possível aumentar a produção de L-PAC em relação ao planejamento experimental anterior. No entanto, com o DCCR é possível realizar uma análise da influência das variáveis mais completa.

Tabela V-6 Planejamento DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído após 1,5 h na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*.

	Glicose[a]	$[cel]_i$[a,b]	Benzaldeído[a]	Benzadeído. (ΔS) [a, c]	L-PAC[a]	Yp/s [d]	Álcool benzílico[a]	Ác. Benzóico[a]
1	**-1 (38,1)**	**-1 (1,81)**	**-1 (3,81)**	**2,59**	**2,76**	**1,07**	**0,47**	**0,10**
2	1 (61,9)	-1 (1,81)	-1 (3,81)	2,72	2,87	1,06	0,52	0,11
3	-1 (38,1)	1 (4,19)	-1 (3,81)	3,54	2,96	0,84	1,42	0,15
4	**1 (61,9)**	**1 (4,19)**	**-1 (3,81)**	**3,81**	**3,05**	**0,80**	**1,41**	**0,15**
5	-1 (38,1)	-1 (1,81)	1 (6,19)	2,51	0,18	0,07	0,08	0,02
6	1 (61,9)	-1 (1,81)	1 (6,19)	2,47	0,08	0,03	0,00	0,76
7	-1 (38,1)	1 (4,19)	1 (6,19)	2,62	0,27	0,10	0,00	0,80
8	1 (61,9)	1 (4,19)	1 (6,19)	2,10	0,42	0,20	0,12	0,03
9	-1,68 (30)	0 (3)	0 (5)	2,64	0,94	0,36	0,16	0,63
10	1,68 (70)	0 (3)	0 (5)	1,34	0,56	0,42	0,21	0,02
11	0 (50)	-1,68 (1)	0 (5)	1,83	0,13	0,07	0,00	0,65
12	0 (50)	1,68 (5)	0 (5)	3,37	1,78	0,53	0,49	0,57
13	0 (50)	0 (3)	-1,68 (3)	2,70	2,32	0,86	0,54	0,40
14	0 (50)	0 (3)	1,68 (7)	3,15	0,25	0,08	0,00	0,87
15	0 (50)	0 (3)	0 (5)	1,44	0,43	0,30	0,20	0,01
16	0 (50)	0 (3)	0 (5)	2,18	0,38	0,17	0,01	0,64
17	0 (50)	0 (3)	0 (5)	3,00	0,40	0,13	0,79	0,04

[a]unidade: g/L, ; [b]: *[cel]$_i$* : Concentração inicial de células
[c] *Benzadeído. (*ΔS): Benzaldeído consumido.
[d]*Yp/s* Fator de conversão de benzaldeído em produto L-PAC (g de L-PAC/ g de benzaldeído)

A Análise de Variância (ANOVA) mostra a validade do modelo pelo teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental (Tabela V-7). O valor de F tabelado (F 0,95, 7, 9, = 3,29) foi menor que o valor de F calculado (7,17), mostrando a validade do modelo experimental. O coeficiente de determinação (R^2 = 0,85) foi significante, mostrando que o modelo não explica apenas 15% da variação. O valor do resíduo (3,24415) foi baixo quando comparado com a regressão, e o baixo valor do erro puro indicou boa reprodutibilidade da análise. Os valores do teste F mostraram ser significativos, uma vez que o F-calculado foi maior que o F – tabelado, levando então a rejeição da hipótese nula.

Tabela V-7 Análise de variância (ANOVA) DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*.Coeficiente de determinação: R^2=0,85; F(0.05;7;9) = 3,29. Valor de F= média quadrática da regressão/ média quadrática do resíduo.

Fonte de Variação	SS	df	MS	F
Regressão	18,09523	7	2,58503	7,171461
Resíduo	3,24415	9	0,36046	
Falta de Ajuste	3,24288	7	0,46327	
Erro Puro	0,00127	2	0,00064	
Total	21,33938	16	1,33371	

SS (soma dos quadrados da variação dos termos),
df (grau de liberdade),
MS (quadrados médios),
MS Erro Puro (quadrado médio devido aos erros de ajuste);
F (parâmetro relacionado à distribuição de *Fisher-Snedecor*).

A Tabela V-8 mostra os coeficientes de regressão para construção do modelo empírico, além da significância dos termos quadráticos e lineares.

Tabela V-8 Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas significativas. L representa os efeitos lineares e Q os quadráticos do DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*.

Variável	Coeficiente de regressão	Erro puro	Teste t	Valor p
Interação	0,36660	0,014499	25,284	0,001561
Glicose (L)	-0,03506	0,006813	-5,146	0,035746
Glicose (Q)	0,24577	0,007506	32,744	0,000931
Conc. de Célula (L)	0,25592	0,006813	37,564	0,000708
Conc. de Célula (Q)	0,31840	0,007506	42,421	0,000555
Benzaldeído (L)	-1,03172	0,006813	-151,436	0,000044
Benzaldeído (Q)	0,43532	0,007506	57,999	0,000297
Glicose (L) x Conc. De Célula (L)	0,04000	0,008898	4,496	0,046086

Com base na análise de variância (ANOVA) (Tabela V-8) e regressão, que avalia as correlações entre variáveis independentes e resposta, tem-se a equação do modelo r e parametrizado a partir das variáveis reais, Eq. V-1:

$$Z= 0,3666 -0,03506*G +0,25592*C -1,03172*B +0,24577*G^2 + 0,31840*C^2 +0,43532*B^2 + 0,04*G*C \quad \text{(V-1)}$$

sendo:

Z= Concentração de L-PAC

G= Variável concentração glicose codificada

C= Variável concentração de célula codificada

B= Variável concentração de benzaldeído codificada

O diagrama de Pareto (Figura V-9) apresenta de forma rápida e clara os fatores que foram estatisticamente importantes. Os termos linear e quadrático para concentração de benzaldeído foram os mais significativos, seguido da concentração inicial de células, quadrático e linear, e do termo quadrático da glicose. As interações e o termo linear da glicose ficaram no limite de significância.

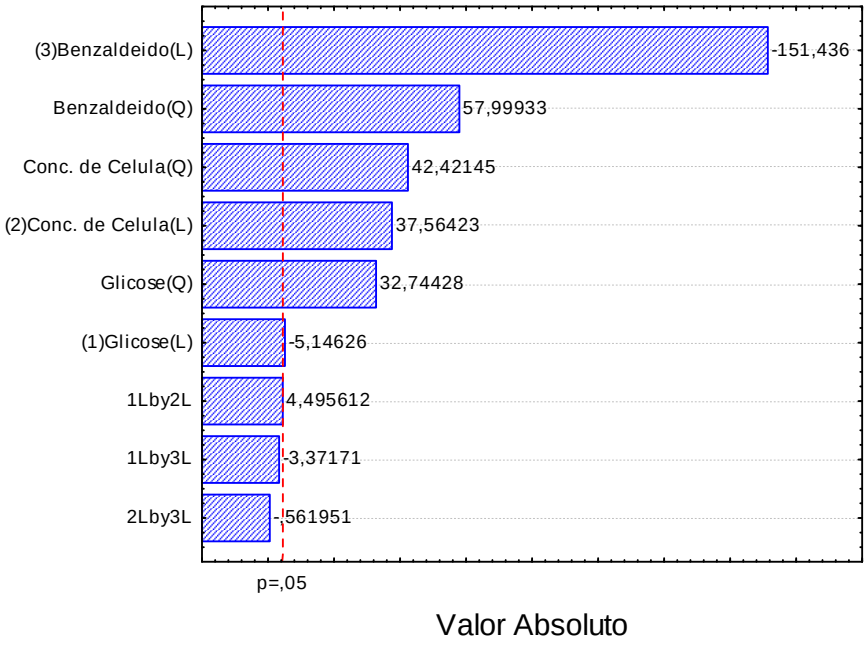


Figura V-9 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^3 do DCCR para análise da Concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*.

Por meio do modelo (Eq. V-1) foi possível obter superfícies de resposta. A Figura V-10 apresenta as superfícies de resposta variando a concentração de

benzaldeído e a concentração de células mantendo a glicose no ponto central. Nesta percebe-se que a maior concentração de L-PAC foi obtida em alta concentração de células e baixa concentração de benzaldeído.

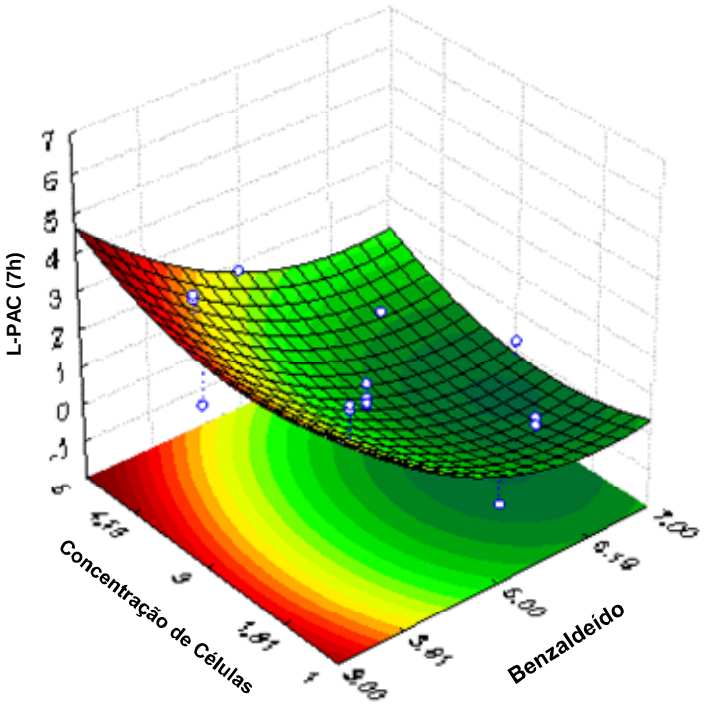


Figura V-10 Superfície de resposta para as interações concentração de células (g/L) e benzaldeído (g/L). O valor da concentração de glicose foi fixado em 50 g/L do DCCR para análise da concentração inicial de glicose, células e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados pela levedura *S.cer5*.

V.4 *Avaliação de interferentes metabólicos*

A partir do melhor resultado do planejamento fatorial (Ensaio E1: 38,1 g/L de glicose, 1,81 g/L de células e 3,81 g/L de benzaldeído) foram testadas, maiores concentrações de benzaldeído, a presença de uma tampa de silicone para reduzir a evaporação do benzaldeído e a substituição da peptona pelo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Os experimentos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL com 100 mL de meio com a seguinte composição: Glicose 38,1 g/L; Peptona 20 g/L (ou Sulfato de Amônio 20 g/L); Extrato de Lêvedo 10 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 1 g/L;

$CaCl_2.2H_2O$ 0,05 g/L; Na_2HPO_4 35 g/L, Ácido Cítrico 10,7 g/L e benzaldeído adicionado após 3 h de cultivo.

Primeiramente se testou um aumento na concentração de benzaldeído. Na Tabela V-9 pode-se verificar que a concentração de 4,8 g/L de benzaldeído foi inibitória obtendo-se uma concentração de L-PAC de apenas 0,42 g/L e que com 4,0 g/L de benzaldeído ocorreu um aumento na concentração de L-PAC de 2,76 para 3,15 g/L de L-PAC. Nos seguintes testes a concentração de benzaldeído foi fixada em 4,0 g/L.

A substituição da peptona por sulfato de amônio também não foi uma boa estratégia atingindo a concentração de 0,95 g/L de L-PAC que corresponde a aproximadamente um terço da concentração obtida com a peptona (3,15 g/L). A redução da presença de ar e o uso de Tiamina Pirofosfato (como cofator) favoreceram a rota metabólica com um acréscimo na concentração de L-PAC para 3,38 e 3,55 g/L, respectivamente.

Tabela V-9 Análise comparativa da influência dos interferentes metabólicos.

	Condições experimentais				Resultado
	Benzaldeído (g/L)	Com tampa	TPP	Sulfato de amônio	L-PAC (g/L)
Ensaio1*	3,8				2,76
Teste 1	4,0				3,15
Teste 2	4,0		X		3,55
Teste 3	4,8				0,42
Teste 4	4,0	X			3,38
Teste 5	4,0			X	0,95

*Dado da Tabela V-6

A biotransformação do benzaldeído para produção do L-PAC é catalisada pela enzima piruvato descarboxilase (PDC). Inicialmente, o piruvato formado durante a fase fermentativa é convertido em acetaldeído por uma reação de descarboxilação não oxidativa. Então o benzaldeído é condensado ao acetaldeído (formação da ligação C-C), para que estas reações ocorram são necessários os cofatores tiamina pirofosfato (TPP) e Mg^{+2} (RISCH, 2009).

Quando realiza-se a biotransformação do benzaldeído utilizando micro-organismos alguns subprodutos também podem ser formados devido à presença de várias enzimas. Uma parte significativa do benzaldeído é convertida em álcool

benzílico devido à presença da enzima álcool desidrogenase. Várias estratégias têm sido utilizadas para reduzir a formação do álcool benzílico, como a adição de acetaldeído que também aumenta o rendimento de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

Para análise da adição de acetaldeído foi feita uma batelada com três alimentações em *Erlenmeyer* de 500 mL com 100 mL de meio de produção, a 30ºC em incubador rotatório com velocidade de agitação de 200 rpm. Após 0,5 h de adaptação foi feita uma 1ª adição contendo 25 g/L de glicose, 1,0 g/L de acetaldeído e 3,5 g/L de benzaldeído. Após 5,5 h de fermentação uma 2ª adição contendo 5 g/L de glicose, 0,75 g/L de acetaldeído e 1,5 g/L de benzaldeído. E após 7,5 h uma 3ª adição contendo 5 g/L de glicose, 0,75 g/L de acetaldeído e 1,0 g/L de benzaldeído.

Na Figura V-11 é possível observar a cinética deste processo. A concentração de L-PAC após 5,5 h de fermentação foi igual a 1,56 g/L. Neste momento foi feita a segunda adição e a concentração chegou a 1,82 g/L após 7,5 h de fermentação. Após a terceira adição, a concentração de L-PAC foi de 1,86 após 10 h. A adição de acetaldeído não aumentou a concentração de L-PAC. Isto provavelmente ocorreu devido à alta volatilidade do acetaldeído e a inibição pelo excesso de benzaldeído.

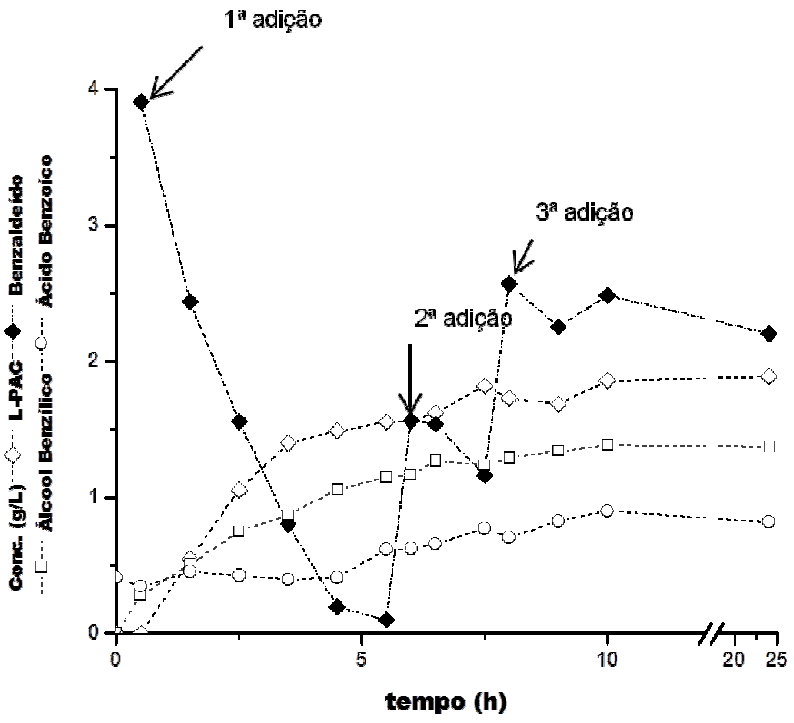


Figura V-11 Batelada com adição de benzaldeído e acetaldeído para produção de L-PAC por *S.cer5* a 30 °C em pH 5,5 em frascos agitados.

V.5 *Estudo da minimização de sais do meio de produção.*

O planejamento Plackett e Burman tem o mesmo objetivo que o planejamento Fracionário, isto é escolha daquelas variáveis que devem ser incluídas nos planejamentos seguintes (RODRIGUES e IEMMA, 2005)

A fim de minimizar os custos de produção, foi realizado um planejamento experimental *Plackett-Burman-12* para minimização dos sais presentes no meio. Estes ensaios foram realizados em imcubador rotatório utilizando frascos de *Erlenmeyer* de 500 mL com 100 mL de meio de produção. Nesses experimentos a concentração inicial de células foi de 3,0 g/L, a concentração de glicose foi de 40 g/L e a concentração de benzaldeído foi de 4,0 g/L, que foi adicionado após 3 h de processo. As variáveis analisadas foram as concentrações de sais do meio de produção, como mostra a Tabela V-10, a partir das concentrações utilizadas até então e indicadas por Zhang *et al* (2008).

Tabela V-10 Resultados do planejamento experimental *Plackett-Burman-12*, para produção de L-PAC, álcool benzílico e ácido benzoico por *S.cer5*. com concentração inicial de células de 3 g/L e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo.

Ensaio	Peptona	Ext. Lêvedo	$MgSO_4.7H_2O$	$CaCl_2.2H_2O$	$Na_2HPO_4.12H_2O$	Ac. Cítrico	L-PAC	Álcool benzílico	Ác. Benzóico
1	+1 (20)	-1 (2)	+1 (5)	-1 (0,01)	-1 (5)	-1 (2)	0,37	0	0,47
2	+1 (20)	+1 (10)	-1 (1)	+1 (0,1)	-1 (5)	-1 (2)	0,65	0,13	0,34
3	-1 (5)	+1 (10)	+1 (5)	-1 (0,01)	+1 (35)	-1 (2)	2,02	0,59	0,07
4	+1 (20)	-1 (2)	+1 (5)	+1 (0,1)	-1 (5)	+ 1 (10)	0,11	0	0,42
5	+1 (20)	+1 (10)	-1 (1)	+1 (0,1)	+1 (35)	-1 (2)	**2,17**	0,47	0,1
6	+1 (20)	+1 (10)	+1 (5)	-1 (0,01)	+1 (35)	+ 1 (10)	0,18	0	0,42
7	-1 (5)	+1 (10)	+1 (5)	+1 (0,1)	-1 (5)	+ 1 (10)	0,09	0	0,4
8	-1 (5)	-1 (2)	+1 (5)	+1 (0,1)	+1 (35)	-1 (2)	1,92	0,54	0,08
9	-1 (5)	-1 (2)	-1 (1)	+1 (0,1)	+1 (35)	+ 1 (10)	0,33	0	0,02
10	+1 (20)	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0,01)	+1 (35)	+ 1 (10)	0,37	0	0,01
11	-1 (5)	+1 (10)	-1 (1)	-1 (0,01)	-1 (5)	+ 1 (10)	0,42	0	0,03
12	-1 (5)	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0,01)	-1 (5)	-1 (2)	1,02	0,26	0,04
13	12,5	0 (6)	0 (3)	0 (0,055)	0 (20)	0 (6)	0,38	0	0,37
14	12,5	0 (6)	0 (3)	0 (0,055)	0 (20)	0 (6)	0,36	0	0,39
15	12,5	0 (6)	0 (3)	0 (0,055)	0 (20)	0 (6)	0,58	0	0,03

Analisando o gráfico de Pareto para concentração de L-PAC (Figura V-12) é possível observar que a concentração de $MgSO_4.7H_2O$ não é estatisticamente significativa na faixa estudada. Porém, ao utilizar 1 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, verifica-se que a concentração de L-PAC é bastante inferior (1,02 g/L) comparando-se com a produção de L-PAC (2,07 g/L) utilizando a maior quantidade desse sal (5 g/L). Apesar de a análise estatística determinar que a concentração de $MgSO_4.7H_2O$, na faixa estudada não influencia na produção de L-PAC, o íon Mg^{2+} é muito importante na rota metabólica, sendo sua presença necessária para que o benzaldeído reaja com o piruvato na formação de L-PAC, evitando formação de álcool benzílico.

As variáveis significativas na análise de pareto foram ácido cítrico, peptona e fosfato de sódio A partir deste resultado (Tabela V-10) foi possível minimizar as concentrações de peptona de 20 para 5 g/L, de $CaCl_2.2H_2O$ de 0,05 para 0,01 g/L e de ácido cítrico de 10,7 para 2 g/L. A composição do meio para maior produção de L-PAC obtida pelo planejamento PB-12 foi Glicose 40 g/L; Peptona 5 g/L; Extrato de Lêvedo 10 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 5 g/L; $CaCl_2.2H_2O$ 0,01 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 35 g/L, Ácido Cítrico 2 g/L e Benzaldeído 4 g/L

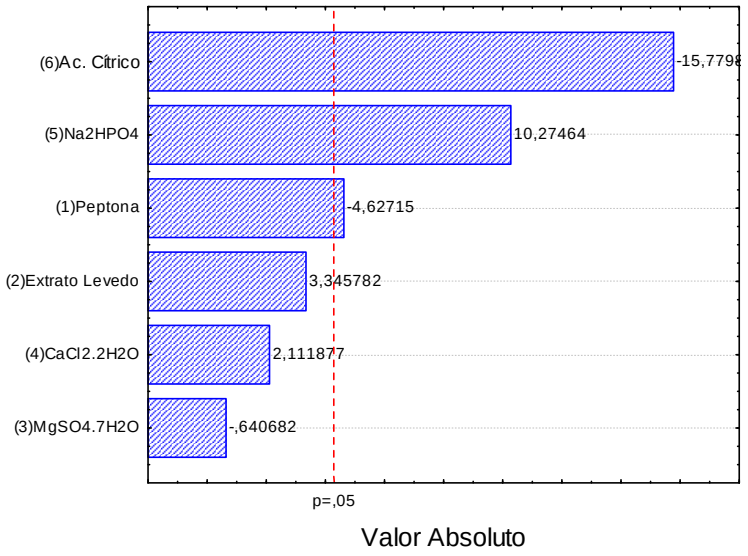


Figura V-12 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman-12* para produção de L-PAC por *S.cer5*. e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo.

Para verificar a influência dos sais na formação dos subprodutos foram gerados os gráficos de pareto para o álcool benzílico (Figura V-13) e para o ácido benzóico (Figura V-14). As variáveis que mais influenciaram a produção de álcool benzílico também foram as concentrações de ácido cítrico com efeito negativo e de fosfato de sódio dodecahidratado com efeito positivo. Para concentração de ácido benzóico foram a peptona e o sulfato de magnésio heptahidratado. Portanto, como o ácido cítrico e o fosfato de sódio exerceram a mesma influência sobre produto e subprodutos, deve-se estimular a formação do produto com esses sais e inibir a formação de subprodutos de outra forma. Para o caso do ácido benzóico pode-se reduzi-lo pela utilização de menor concentração de peptona já que este componente exerce efeito contrário na formação de L-PAC.

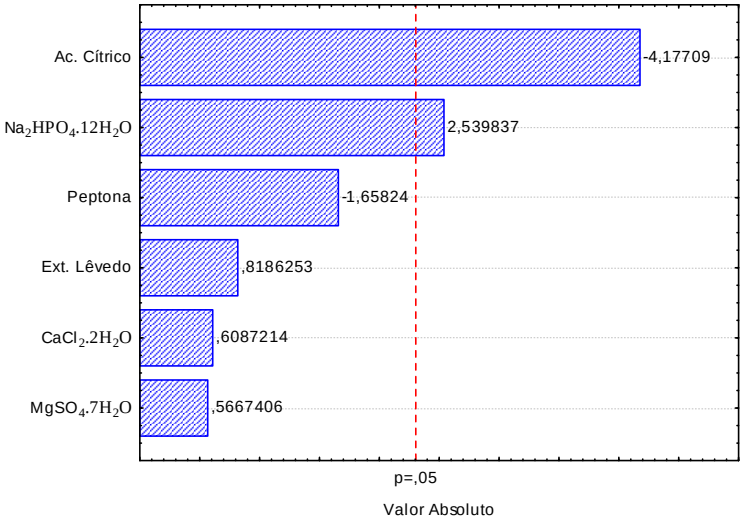


Figura V-13 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman-12* para produção de Álcool benzílico por *S.cer5*. e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo.

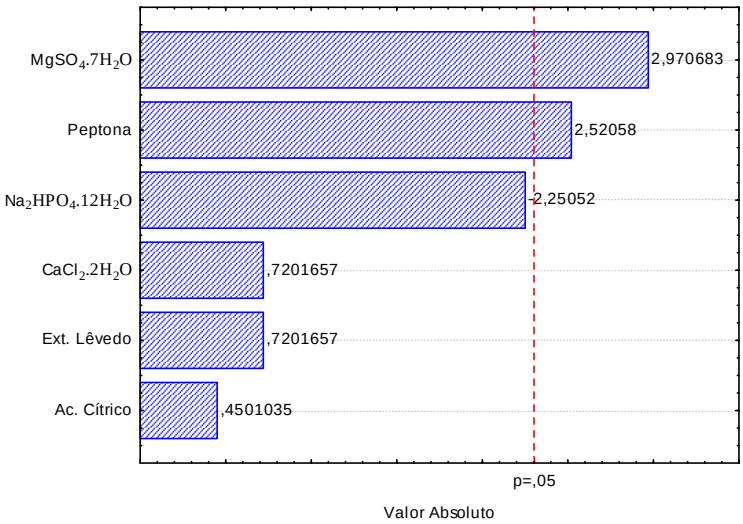


Figura V-14 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman-12* para produção de Ácido benzóico por *S.cer5*. e adição de 4 g/L de benzaldeído após 3 h de cultivo.

V.6 *Estudo da produção de L-PAC em frascos agitados – Efeito da concentração inicial de células*

Utilizando o meio determinado por intermédio do planejamento PB-12, com adição de benzaldeído após 1,5 h de fermentação, foi realizado um planejamento experimental de forma a encontrar a melhor condição de concentração inicial celular, de benzaldeído e de glicose para a produção de L-PAC em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL com 100 mL do novo meio de produção.

Verificou-se que para aumentar a concentração de L-PAC seria necessário um aumento da concentração de biocatalisador. Um estudo com o aumento da concentração de células foi desenvolvido aumentando-se também a concentração de glicose e benzaldeído uma vez que, com o aumento da concentração de células há maior demanda por substratos. A adição de benzaldeído passou a ser feita em 1,5 h para garantir que as células estivessem em fase exponencial de crescimento e que a glicose ainda estivesse presente.

As maiores concentrações de L-PAC foram obtidas quando maiores concentrações de glicose e de benzaldeído foram utilizadas. Além disso, na

Tabela V-11 pode-se verificar que, com a concentração inicial de 30g/L do biocatalisador, a concentração de L-PAC obtida foi de 4,92 g/L enquanto que com 50 g/L a mesma foi reduzida para 2,86 g/L. Isso provavelmente ocorreu pela ausência de glicose para conversão, uma vez que com o aumento da concentração de células houve um aumento no consumo do substrato utilizado.

Mujahid *et al*. (2012) obtiveram um resultado bastante semelhante utilizado *Saccharomyces cerevisiae* GCU-36 com uma concentração máxima de 2,58 g/L de L-PAC e um inóculo de 30 g/L de células, 50 g/L de glicose e 5 adições de 1,2 mL/L de benzaldeído e 1,2 mL/L de acetaldeído com intervalos de 1 hora.

Tabela V-11 Planejamento fatorial Completo 2^3 para análise da Concentração inicial de células, glicose e benzaldeído na produção de L-PAC em frascos agitados.

Ensaio	Glicose (g/L)	Conc. Inicial de Cel. (g/L)	Benzaldeído (g/L)	$PAC_{máx}$ (g/L)
1	-1 (40)	-1 (30)	-1(4)	0,4
2	-1 (40)	-1 (30)	1(6)	1,64
3	-1 (40)	1 (50)	-1 (4)	0,05
4	-1 (40)	1 (50)	1 (6)	1,14
5	1 (80)	-1 (30)	-1 (4)	0,72
6	1 (80)	-1 (30)	1 (6)	4,92
7	1 (80)	1(50)	-1 (4)	0,41
8	1 (80)	1(50)	1 (6)	2,86
9	0 (60)	0(40)	0 (5)	0,23
10	0 (60)	0(40)	0 (5)	0,53
11	0 (60)	0(40)	0 (5)	0,69

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Statistica 6.0 (*StatSoft*, Inc., 2001). Analisando o gráfico de Pareto (Figura V-15), observa-se que as variáveis independentes concentração de benzaldeído e de glicose apresentaram efeito significativo sobre a variável de resposta (L-PAC) com um efeito positivo, ou seja, o aumento da concentração destes componentes conduz a um aumento na produção de L-PAC. Portanto, é importante estudar maiores concentrações de benzaldeído e de glicose.

Em relação à concentração de células, observou-se que esta variável exerceu efeito negativo sobre a produção de PAC. Este resultado não era esperado uma vez que quanto mais biocatalisadores, maior seria a concentração de L-PAC. Porém a alta concentração celular desfavoreceu provavelmente a glicólise, uma vez que o ensaio 8 com alta concentraçõa celular e alta concentração de glicose apresentou uma alta produção de 2,86 g/L de L-PAC. Portando escolhemos aumentar de 3,0 g/L para 30 g/L a concentração inicial de células.

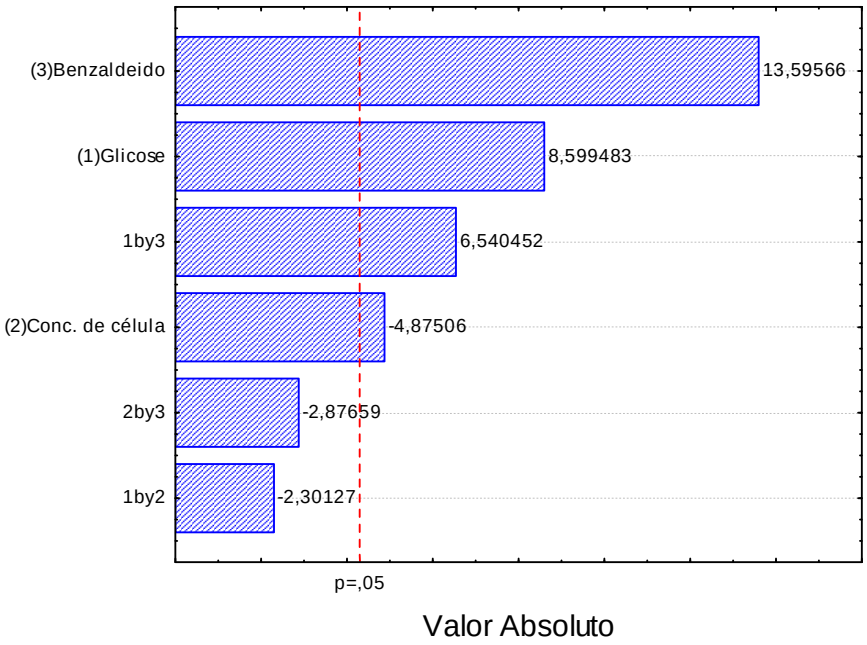


Figura V-15 Análise dos efeitos das variáveis (concentração de benzaldeído, concentração de biomassa no inóculo e concentração inicial de glicose no meio) do planejamento fatorial completo 2^3 na produção de L-PAC.

V.7 *Estudo da influência de cofatores na Produção de L-PAC*

Utilizando o meio escolhido com uso do planejamento PB-12, em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL com 100 mL do meio, inóculo inicial de 30 g/L de S.cer.5 e adição de benzaldeído (6,0 g/L) após 1,5 h de fermentação, foram avaliados a concentração da tiamina (0,5, 1 e 2,0 mM) e de $MgSO_4.7H_2O$ (1 e 5 g/L) na formação do acetaldeído ativo, e além disso a concentração nitrato de prata ($1,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mg/L) na inibição da ação da ADH

minimizando a formação dos sub produtos de forma a encontrar a melhor condição para aumentar a produção de L-PAC. Comparando os experimentos com a adição de Tiamina (Tabela V-12) observa-se que o aumento da concentração de tiamina de 0,5 mM para 2 mM aumentou a produtividade pois a concentração máxima foi atingida em 4,5 h e a concentração de L-PAC foi de 2,85 g/L.

Ao avaliar o efeito inibitório do nitrato de prata sobre a ADH observa-se que a maior concentração de nitrato de 10^{-3} g/L apresentou a maior produtividade (1,54 g/L.h) e a menor concentração de álcool benzílico (1,94 g/L) porém o benzaldeído passou a ser oxidado a ácido benzoico, aumentando a concentração deste sub produto (Tabela V-12).

Portanto, as maiores produtividades foram obtidas nos meios sem adição de peptona e tiamina e na menor concentração de $MgSO_4.7H_2O$.

Tabela V-12 Estudo das influências das variáveis, concentração de $MgSO_4.7H_2O$, $AgNO_3$, tiamina e peptona na produção de L-PAC, álcool benzílico e ácido benzoico por *S.cer.5* em meio de produção PB com concentração inicial de células de 30 g/L e glicose inicial de 80 g/L.

Condições				Resultados				
$MgSO_4.7H_2O$ (g/L)	$AgNO_3$ (mg/L)	Tiamina (mM)	Peptona (g/L)	L-PAC_{max} (g/L)	Tempo PAC_{max} (h)	(Pr) PAC (g/L.h)	Álcool benzílico (g/L)	Ác. benzóico (g/L)
1,0	0,0	0,0	5,0	4,52	7	0,646	2,09	0,02
5,0	0,0	0,0	5,0	4,67	4,5	1,038	2,33	0,01
1,0	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**4,74**	**3**	**1,580**	**2,03**	**0,01**
1,0	1,0E-05	0,0	0,0	4,25	4,5	0,944	4	1,25
5,0	1,0E-04	0,0	0,0	4,7	4,5	1,044	2,5	1,27
1,0	**1,0E-03**	**0,0**	**0,0**	**4,61**	**3**	**1,537**	**1,94**	**1,25**
5,0	0	1,0	5,0	3,42	3	1,140	2,14	0
5,0	0	0,5	5,0	3,39	3	1,130	1,96	0
5,0	0	2,0	5,0	3,68	3	1,227	3,69	0
1,0	1,0E-03	1,0	0,0	2,53	4,5	0,562	1,66	0

V.8 *Avaliação da ação da betaciclodextrina como proteção ao efeito tóxico do benzaldeído*

Utilizando o meio escolhido por intermédio do planejamento PB-12, em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL com 50 mL do meio, concentração inicial de S.cer.5 de 30 g/L e adição de benzaldeído após 1,5 h de fermentação, foram avaliados a concentração de benzaldeído (6,0, 7,0 e 8,0 g/L) com e sem adição de betaciclodextrina 2% (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

Na Tabela V-13 verifica-se que com alta concentração de benzaldeído, foi possível obter mais PAC com betaciclidextrina Shukla e Kulkarni (2002) utilizando 2% de betaciclodextrina aumentaram em 50% a concentração máxima tolerável de benzaldeído pela *Toluraspora delbruekii*. Ciclodextrinas são conhecidas por oferecer efeito protetor mediante a formação de complexos de inclusão (SZETJLI, 1998; UEKAMA *et al.*, 1998) proporcionando uma liberação controlada do benzaldeído.

O aumento da concentração de L-PAC foi alcançado apenas quando utlizou-se a concentração de 8,0 g/L de benzaldeído. Nas concentrações inferiores o efeito da betaciclodextrina foi prejudicial uma vez que nestas concentrações a ação tóxica ainda não foi verificada e possivelmente nem todo o benzaldeído foi liberado ficando complexada pela betaciclodextrina.

Tabela V-13 Aviação da ação protetora da betaciclodextrina, por *S.cer.5* em meio de produção PB, concentração inicial de céluas de 30 g/L e de glicose de 80 g/L em diferentes concentrações de benzaldeído

Condições				Resultados			
Benzaldeído (g/L)	Beta-ciclo-dextrina (%)	$MgSO_4.7H_2O$ (g/L)	Peptona (g/L)	$PAC_{máx}$ (g/L)	Tempo $PAC_{máx}$ (h)	Benzaldeído Final (g/L)	(Pr)PAC (g/L.h)
6,0	0,0	1,0	5,0	4,56	4,5	0,051	1,01
6,0	2,0	1,0	5,0	3,19	4,5	0,053	0,71
7,0	0,0	1,0	5,0	4,00	7,0	0,523	0,57
7,0	2,0	1,0	5,0	3,59	4,5	0,176	0,80
8,0	0,0	1,0	5,0	1,57	7,0	3,024	0,22
8,0	2,0	1,0	5,0	5,13	7,0	0,176	0,73

VI. PRODUÇÃO DE L-PAC EM BIORREATOR 1L

Os experimentos em biorreator ocorreram concomitantes aos planejamentos experimentais realizados em frascos agitados. Para as análises de aeração do sistema e alimentação do processo, o meio utilizado foi proposto por Zhang *et al* (2008), apenas com modificações nas concentrações de glicose e benzaldeído. No estudo da concentração de biocatalisador e experimentos seguintes, o meio escolhido após o planejamento PB-12 foi utilizado.

VI.1 *Estudo da aeração do sistema.*

Para o estudo da aeração do sistema, o bioprocesso foi dividido em duas fases. A primeira fase é a adaptação da levedura ao novo meio e ao biorreator e a segunda fase é a biotransformação após a adição de benzaldeído. Na primeira fase é importante que a levedura esteja crescendo e produzindo a enzima piruvato descarboxilase, sendo este processo aeróbico. Para essa fase foram avaliadas 2 diferentes aerações, 2 e 5 vvm. Já a segunda fase, após 3 h com a adição de 3,4 g/L de benzaldeído, a presença de aeração não é favorável, pois em presença de oxigênio o benzaldeído pode ser oxidado a ácido benzóico e o L-PAC formado pode ser reduzido a PAC-diol. Portanto, foram avaliados dois níveis de aeração, 2 e 0 vvm.

Na Tabela VI-1 é possível observar que as maiores concentrações de L-PAC foram obtidas com agitação de 350 rpm, aeração na fase de adaptação de 2 vvm e aeração na fase de biotransformação de 0 vvm, ou seja, sem fornecimento de ar pelo dispersor. Khan *et al.* (2010) também usaram duas diferentes aerações durante o processo no biorreator sendo 1 vvm para geração de biomassa e 0,1 vvm no processo de biotransformação.

Tabela VI-1 Estudo da aeração do sistema para produção de L-PAC em biorreator de 1 L por *S.cer5* a 30 ^{o}C, 350 rpm e pH 5,5, meio de produção de Zhang *et al.* (2008) com adição de benzaldeído após 3 h.

Aeração Adaptação (vvm)	Aeração Biotransf (vvm)	Glicose (g/L)	$[cel]_i$ (g/L)	L-PAC 7 h (g/L)	Benzaldeído 7 h (g/L)	$Y_{P/X0}$ (g de L-PAC/ g de células inicias)
5	2	25	2,00	1,18	1,74	0,59
5	2	25	4,00	0,25	1,26	0,0625
5	1	25	2,50	1,92	2,14	0,768
5	0	25	2,05	1,98	1,10	0,965
2	0	25	2,05	2,33	1,51	1,130

$[cel]_i$ **:** Concentração inicial de células

VI.2 *Estudo da alimentação do processo*

Tendo sido definidas as condições de aeração do sistema, foi avaliada a alimentação do sistema de forma intermitente com benzaldeído e glicose sendo acrescentados em pulsos. A primeira adição de benzaldeído ocorreu em 3 h de processo. As adições subsequentes foram realizadas em função da determinação da concentração dos substratos. A Tabela VI-2 apresenta as diferentes bateladas realizadas. É possível perceber que, nas condições estudadas, a alimentação apresentou um efeito tóxico, inibindo a produção de L-PAC, uma vez que a concentração final de benzaldeído ficou bastante elevada.

Tabela VI-2 Estudo da alimentação de benzaldeído e glicose de forma intermitente do processo para a produção de L-PAC em biorreator de 1 L. por S.cer 5 em 750 mL de meio de produção de Zhang *et al.* 2008.

Rotação (rpm)	Benzaldeído[a, b] (mL)	Glicose[a,c] (mL)	$[cel]_i$ (g/L)	L-PAC 7h (g/L)	Benzaldeído 7h (g/L)
250	3,321 + 1, 27		1,93	2,40	3,13
350	3,321 + 1,0 + 1,0	9 + 9	1,36	2,02	3,62
350	3,321 + 1,0 + 1,0	9 + 9	2,00	0,85	4,51
350	3,321 + 1,0 + 1,0	9 + 9	2,70	1,35	4,27

[a] concentração da solução de benzaldeído 95% e glicose 40%
[b]: tempo de adição de benzaldeído de 3h, 4,5 h e 6 h .
[c]: tempo de adição de glicose de 4,5 h e 6 h .
$[cel]_i$: Concentração inicial de células

VI.3 *Estudo da concentração de biocatalisador*

Devido ao efeito tóxico da alimentação de benzaldeído, percebeu-se que uma maior quantidade de biocatalisador seria necessária para aumentar a concentração de L-PAC formada. Utilizou-se, portanto, a concentração celular indicada pelo planejamento fatorial completo 2^3 realizado em frascos agitados

Tabela V-11) nos experimentos em biorreator. A Tabela VI-3 apresenta os resultados para as bateladas realizadas com concentração de células mais elevadas, e diferentes concentrações iniciais de glicose. Três experimentos foram realizados com meio proposto por Zhang *et al.* (2008) (chamado de meio de produção) e os outros 3 com meio selecionado no PB-12.

Com o aumento da concentração de células, o consumo de glicose passou a ser mais rápido. Para garantir que o micro-organismo ainda estava em fase exponencial produzindo bastante piruvato o ponto inicial de adição de benzaldeído foi reduzido para 1,5 h. As adições de benzaldeído e glicose foram após 1,5, 3, 5 e 6,5 h de cultivo e monitoradas pela análise quantitativa de modo que a concentração de benzaldeído não ultrapassasse 6,0 g/L e a glicose não ficasse inferior a 40 g/L. Khan *et al.* (2012), utilizando *Candida utilis,* determinaram que o melhor intervalo entre as adições seria de 1 h e que em intervalos inferiores a adição de benzaldeído teria um efeito tóxico e superiores favoreceriam a produção de ADH levando o L-PAC a PAC diol. No presente estudo, o intervalo ideal para cepa *S. cer5* mostrou ser 1,5 h, baseado na taxa de consumo do benzaldeído.

A Tabela VI-3 mostra que as diferentes bateladas realizadas com elevada concentração inicial de células possibilitaram um aumento de aproximadamente 3 vezes na produção de L-PAC, em comparação com as bateladas com 3,0 g/L de concentração inicial de células (Figura VI-1).

Tabela VI-3 Avaliação da produção de L-PAC em biorreator de 1 L utilizando concentração inicial de células de 30 g/L. e diferentes alimentações de glicose e Benzaldeído durante o processo.

Meio	$[Gli]_i$ [a,]	Benzaldeído (mL)	Glicose (mL)	$[cel]_i$ [a,d]	L-PAC 7 h [a]	Benzaldeído 7 h[a]	$Y_{P/X0}$ (g de L-PAC/ g de células inicias)
Produção [e]	25	3,3 + 3,3 + 3,3 + 3,3 +10 + 5 [g]	55+ 55+ 22 + 22+ 45[h]	33,18	6,91	2,53	0,208
Produção [e]	25	3,3 + 3,3 + 2 + 1	57 + 47 + 15 +30 [j]	25,5	5,53	2,42	0,217
Produção [e]	25	3,5 + 2,0 + 1,0 + 1,0 [l]	57 + 47 + 22 + 30 +22,5 [m]	28,1	5,24	0	0,186
PB [f]	40	4,0 + 4,0 + 2,0 [n]	60 + 50 + 15 [o]	28,4	7,50	2,80	0,264
PB [f]	80	4,0 + 4,0 + 2,0 [p]	75 + 93 +56 [q]	38,4	6,16	3,59	0,160
PB [f]	80	4,0 + 4,0 + 2,0 [p]	40 + 40 + 20 [q]	32,7	7,65	0,04	0,234

[a] unidade: g/L,
[b] *$[Gli]_i$*: Concentração inicial de glicose,
[c] Volume adicionado da solução de benzaldeído 95% e da solução de glicose 40% (mL) .
[d] *$[cel]_i$*: Concentração inicial de célula,
[e] *Glicose 25 g/L; Peptona 20 g/L; Extrato de Lêvedo 10 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 1 g/L; $CaCl_2.2H_2O$ 0,05 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 35 g/L, Ácido Cítrico 10,7 g/L,*
[f] *Glicose 40 g/L; Peptona 5 g/L; Extrato de Lêvedo 10 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 1 g/L; $CaCl_2.2H_2O$ 0,01 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 35 g/L, Ácido Cítrico 2 g/L*
[g]: tempo de adição de benzaldeído de 1,5 h, 3 h, 5 h, 6,5 h, 7 h, e 21 h.
[h] tempo de adição de glicose:1,5 h, 3 h, 5 h, 6,5 h e 21 h.
[i] tempo de adição de benzaldeído:1 h, 3 h, 5,5 h, 6,5 h, 7 h,
[j] tempo de adição de glicose:1 h, 3 h, 4,5 h e 8 h .
[m] tempo de adição de glicose:1,5 h, 4,5 h, 6 h e 8,5 h
[n] tempo de adição de benzaldeído:1,5 h, 3 h, 5 h e 8 h .
[o] tempo de adição de glicose:1,5 h, 3 h e 5 h
[p] tempo de adição de benzaldeído:1 h, 3 h e 5 h
[q] tempo de adição de glicose:1 h, 3 h e 5 h

A maior concentração (7,65 g/L) foi obtida quando se utilizou o meio estipulado após o planejamento PB com concentração inicial de glicose de 80 g/L (Figura VI-1). Foram necessárias 3 alimentações, a primeira de 4,0 mL de benzaldeído 96% e 40 mL de solução de glicose 40% após 1h, a segunda de 4,0 mL benzaldeído 96% e 40 mL de solução de glicose 40% após 3h e a terceira de 2,0 mL benzaldeído e 20 mL de solução de glicose 40% após 5h.

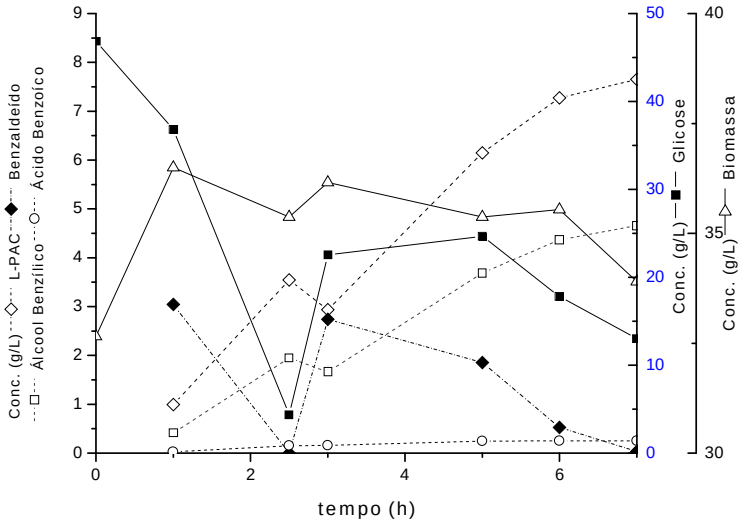


Figura VI-1 Produção de L- PAC em Biorreator 1 L meio estipulado após o planejamento PB com concentração inicial de glicose de 80 g/L e alimentações de glicose e benzaldeído. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas a tendência do perfil cinético.

É possível perceber na Figura VI-1 que com 2,5 h de processo, o benzaldeído e a glicose se esgotaram. Após a segunda alimentação o consumo de benzaldeído foi diretamente proporcional a produção de L-PAC se esgotando novamente após 6h, sendo esse o fator que limitou a formação de L-PAC. A melhor condição experimental apresentou um coeficiente de conversão de produto por substrato consumido ($Y_{P/S}$) igual a 1,09 g de L-PAC/g de benzaldeído com uma eficiência de η= 88,6%.

Abreu e Olmo (2014) conseguiram adicionar 10 g/L de benzaldeído distribuído em 200 mg de doses sucessivas mantendo a concentração de benzaldeído em 2 g/L, obtendo 7,1 g/L de L-PAC.

VI.4 *Avaliação da Reutilização de Células.*

De forma a aproveitar as células após o processo de produção de L-PAC, visto que para um processo industrial a propagação de células torna o processo muito caro, foi realizado um estudo da reutilização das células após uma fermentação em biorreator de 1 L.

Após a batelada alimentada que resultou em uma produção de L-PAC 7,65 g/L que foi realizada segundo a última condição com meio PB, apresentado na Tabela VI-3 realizou-se a análise da viabilidade celular, através da coloração com azul de metileno e constatou-se que apenas 50% das células da batelada anterior encontravam-se viáveis. Portanto, o inóculo foi realizado com 50% de células reutilizadas e 50% de células novas. Deste inóculo, de 35 g/L de células apenas 26 g/L estavam viáveis. A Figura VI-2 apresenta a cinética da batelada.

O consumo de benzaldeído e de glicose foram mais lentos tornando-se necessária a redução da alimentação de benzaldeído na segunda etapa e não sendo necessária a alimentação de glicose na terceira etapa. Com isso, a produção de L-PAC foi menor chegando a 5,6 g/L em 24 h. Nesse momento ainda restavam 2,8 g/L de benzaldeído no meio, mostrando que as células já não estavam mais metabolizando esse substrato.

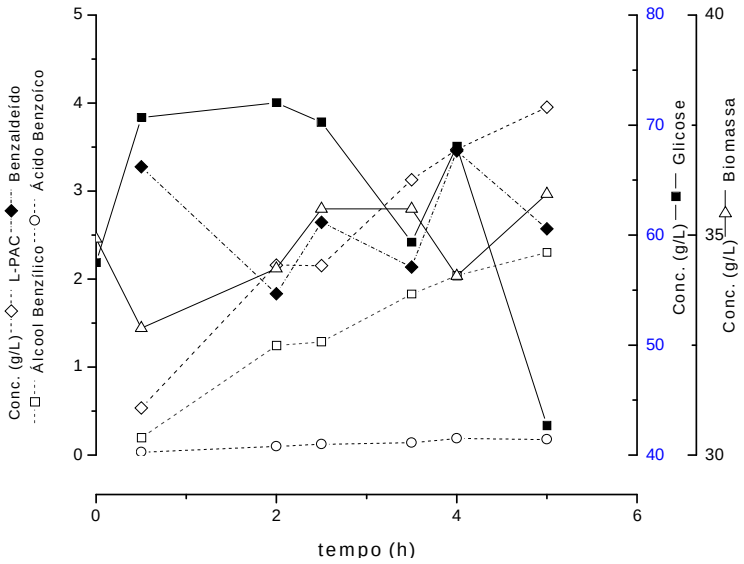


Figura VI-2- Produção de L- PAC no Biorreator de 1L por S.cer5 em meio PB com inoculo com 50% de células reutilizadas e 50% de células novas

VI.5 *Estudo da Adição de cofator Tiamina piro fosfato (TPP) e íon magnésio*

Segundo Uppada *et al.* (2014), a disponibilidade de cofator pode ser uma estratégia importante para aumentar a eficiência biológica dos processos a fim de se obter um rendimento máximo em produto.

A adição de TPP favorece o deslocamento da reação para formação de L-PAC e inibição da formação dos subprodutos. Porém o mesmo não foi verificado experimentalmente, como pode ser observado na Tabela VI-4, uma vez que a concentração de Álcool benzílico foi bastante elevada. O meio PB (Glicose 40 g/L; Peptona 5 g/L; Extrato de Lêvedo 10 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 1 g/L; $CaCl_2.2H_2O$ 0,01 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 35 g/L, Ácido Cítrico 2 g/L) foi acrescido de Tiamina a 1% (mol/L). Avaliou-se o aumento da concentração de $MgSO_4.7H_2O$ para 5 g/L.

Tabela VI-4 Avaliação da adição de Tiamina piro fosfato (TPP) e Mg^{2+} na formação de L-PAC em meio determinado pelo PB por *S.cer.5.*

Exp.	Benzaldeído[a, c]	Glicose[b, c]	$[cel]_i$ [,d,e]	$MgSO_4.7H_2O$ [d]	TPP %	L-PAC (7 h) [d]	Álcool Benzílico [d]	$Y_{L\text{-}PAC/Benzaldeído}$
(1)	6,0 + 4,0 + 2,0	40 + 40 + 20	31,8	1	1	5,92	5,07	1,16
(2)	6,0 + 4,0 + 2,0	40 + 20 + 20	31,1	5		6,50	5,57	1,30
(3)	6,0 + 3,0 + 2,0 + 1,0	40+ 20 +20 +20	36,9	5	1	8,02	7,20	1,11

[a]unidade: ml de benzaldeído 96%[b] mL da solução de glicose 40%,[c]*Tempo de adição: 1 h, 3 h e 5h*; [d] Concentração: g/L; [e]*$[cel]_i$:* Concentração inicial de célula

O efeito da adição da tiamina é comprovado comparando os experimentos 2 e 3, nos quais observa-se que a adição de tiamina aumentou em 26% a concentração de L-PAC produzido.

Apesar do planejamento PB ter indicado uma concentração de 1g/L para o $MgSO_4.7H_2O$ a rota metabólica nos indica que o metabolismo da levedura em presença de magnésio se desloca para formação de L-PAC. Isto pode ser verificado com um aumento de 37% na concentração de L-PAC quando comparamos o experimento 3 com o experimento 1. Na Tabela VI-4 é possível observar que em presença de tiamina 1% (mol/L) e $MgSO_4.7H_2O$ 5g/L a concentração de L-PAC máxima foi de 8,02 g/L. A Figura VI-3 apresenta a cinética de produção de L-PAC e formação dos subprodutos do experimento 3 com 1% (mol/L) de tiamina e $MgSO_4.7H_2O$ .5g/L

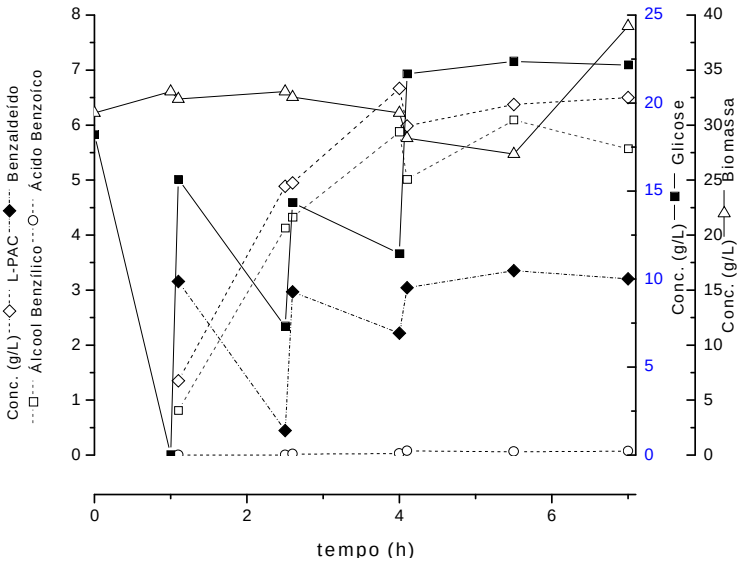


Figura VI-3 Produção de L- PAC no Biorreator de 1L por S.cer5 em meio PB com adição de Tiamina 1% e $MgSO_4.7H_2O$ 5 g/L.

VI.6 *Experimento em biorreator com açúcar cristal e tiamina*

O açúcar cristal é uma fonte de carbono mais barata e necessária para viabilizar economicamente o processo. A substituição da glicose pelo açúcar cristal foi avaliada em biorreator de 1 L. O meio de cultivo era o meio PB-12, com 5 g/L de peptona, 5 g/L de $MgSO_4.7H_2O$ e 80 g/L de açúcar cristal e a concentração inicial de células, 30 g/L. Foram feitas 2 adições de açúcar cristal, sendo 40 mL de solução de açúcar cristal 40% (m/v) em 1,5 h de fermentação e 60 mL de solução de açúcar cristal 40% (m/v) após 3 h de fermentação. As adições de benzaldeído foram de 6 mL de benzaldeído 96% (v/v) em 1,5 h de fermentação, 3 mL de benzaldeído 96% (v/v), após 3 h de fermentação e 1 mL de benzaldeído 96% (v/v), após 4,5 h de fermentação.

A Figura VI-4 apresenta a cinética desse processo, em que é possível perceber que a concentração máxima de L-PAC foi de 4,5 g/L. A concentração de sacarose foi mantida acima de 20 g/L, mantendo as células sob repressão catabólica. O benzaldeído não foi totalmente consumido no final do processo e sua concentração se manteve acima de 1,5 g/L ao longo de todo o processo.

Em comparação com as mesmas condições, mas em meio contendo glicose (experimento 3 da Tabela VI-4, PAC Max = 8,02 g/L), houve redução de 55% na produção de L-PAC.

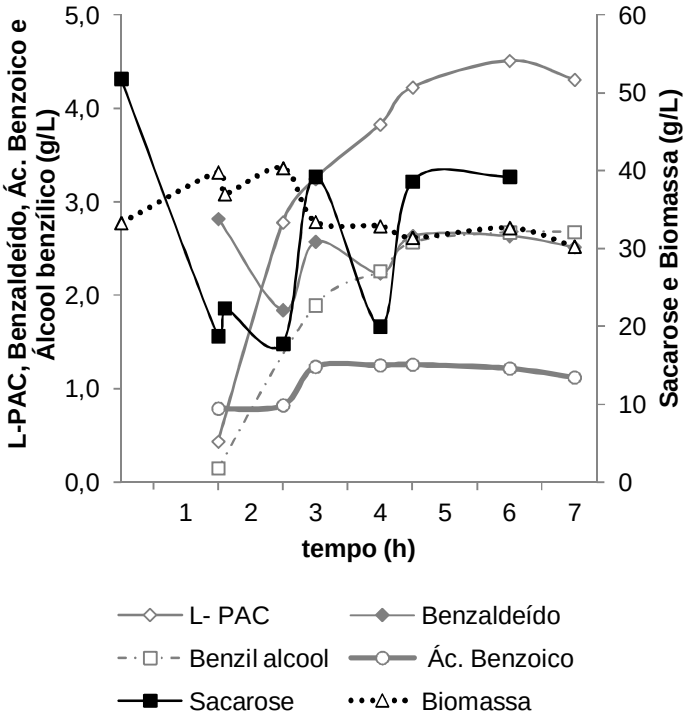


Figura VI-4 Cinética de produção de L-PAC no biorreator de 1 L por *S.cer 5* PB com 5g/L de MgSO4.7H_2O e 80 g/L de açúcar cristal, e batelada alimentada com 2 alimentações de solução de açúcar cristal 48% (m/v) e 3 alimentações de benzaldeído

AGARWAL *et al*. (2013) avaliaram que a atividade em *K. pastoris* é induzida pela presença de substratos glicolíticos, quando cultivadas em diferentes fontes de carbono. A atividade máxima da PDC foi encontrada durante o cultivo em glicose e glicerol, sendo relativamente maior em glicose e nenhuma atividade de PDC foi detectável durante crescimento em etanol e metanol. Assim a troca do substrato pode ter alterado o nível de atividade da PDC.

VI.7 *Estudo da alimentação contínua de glicose/sacarose e Benzaldeído.*

A alimentação contínua de benzaldeído e glicose em uma vazão constante permite que a medida que o substrato é fornecido, este já seja consumido pela levedura o que pode minimizar o efeito tóxico causado quando uma grande concentração de benzaldeído é inserida no meio de uma vez só.

Durante o processo de produção de L-PAC, após 1h de crescimento e adaptação ao mesmo iniciou-se uma alimentação contínua de uma solução contendo glicose 40% (p/v) e benzaldeído 10% (v/v) na vazão de 0,67 mL/min por 5 h. A vazão foi escolhida de modo a atingir o volume máximo do biorreator em 6 h mantendo a concentração de glicose superior a 20 g/L.

A Figura VI-5 apresenta os resultados obtidos. Observa-se, que a concentração de benzaldeído foi aumentando ao longo do tempo, atingindo uma concentração de 9,14 g/L de benzaldeído após 4h de fermentação, chegando a 10,5 g/L após 6h. Portanto, provavelmente a taxa de consumo de benzaldeído não foi suficiente para acompanhar o suprimento de benzaldeído. Neste processo, portanto, a vazão de alimentação de benzaldeído foi muito elevada. Mesmo assim, a concentração máxima de L-PAC obtida foi elevada (8,91 g/L), em comparação com a máxima concentração de L-PAC obtida com alimentação intermitente (7,65 g/L). No entanto, após atingido esse valor em 4 h, como a concentração de benzaldeído já era elevada, não houve mais aumento e a concentração de L-PAC se estabilizou. Destaca-se também que a concentração de álcool benzílico (3,0 g/L) foi inferior ao da batelada com alimentação intermitente de (4,66 g/L).

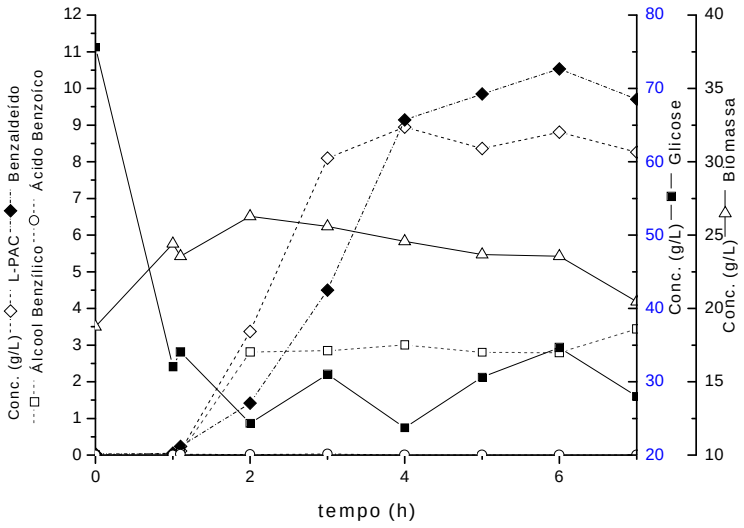


Figura VI-5 Cinética de produção de L-PAC em meio de produção PB por *S.cer5* em biorreator de 1 L com alimentação contínua de glicose 40% e benzaldeído 10%.

Para minimizar o efeito tóxico adicionou-se betaciclodextrina 2% e diminui-se a concentração de benzaldeído na alimentação para 5% (v/v). Segundo Coughlin *et. al*. (1991), a adição de betaciclodextrina promove uma liberação controlada do benzaldeído o que foi comprovado com o aumento de 6,0 g/L para 8,0 g/L de benzaldeído em frascos agitados. Optou-se, nesse momento, por substituir a glicose por açúcar cristal a 48% (m/v). Realizou-se a alimentação dessa solução por duas horas na vazão de 1,67 mL/min (200 mL de solução de açúcar cristal 48% e 10 mL de benzaldeído PA) atingindo o volume máximo do biorreator em duas horas.

A Figura VI-6 apresenta a cinética dessa fermentação. A máxima concentração de L-PAC foi de 4,5 g/L com 4 h de fermentação e a concentração de benzaldeído atingiu o valor máximo de 2,2 g/L, sendo consumido totalmente posteriormente. A mesma concentração foi obtida quando utilizamos sacarose e alimentação intermitente, mas inferior quando comparada à produção com alimentação contínua e glicose (8,91 g/L). A concentração de álcool benzílico (4,07 g/L) foi superior àquela do experimento com glicose (3,0 g/L) e com sacarose intermitente (2,67 g/L).

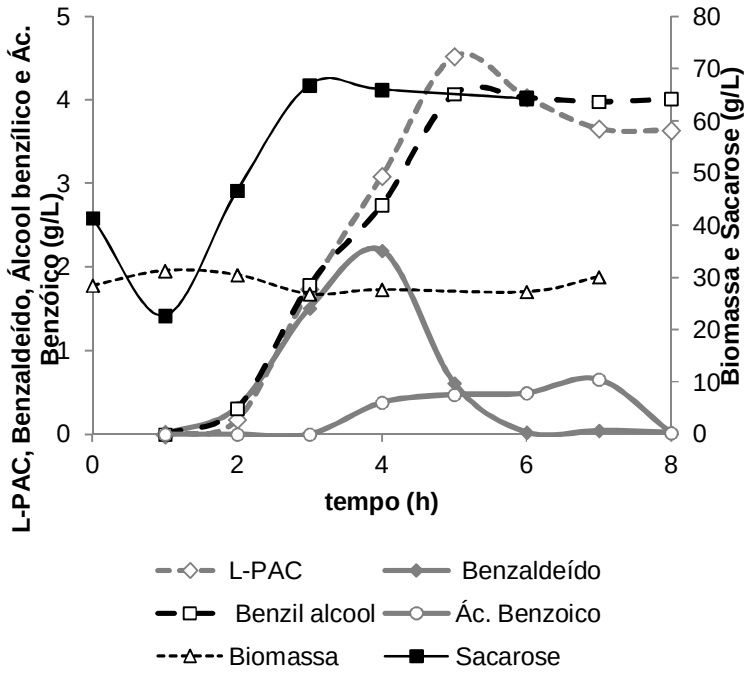


Figura VI-6 Cinética de produção de L-PAC por *S.cer.5* com alimentação de Açúcar cristal 48%, benzaldeído 2% na vazão de 1,67 mL/min em meio PB com 5 g/L $MgSO4.7H_2O$ suplementado de betaciclodextrina 2%.

VII. PRODUÇÃO DE L-PAC EM BIORREATOR 13L

VII.1 *Avaliação da Extrapolação de Escala da Agitação*

Para o processo em biorreator de 13 litros utilizando o mesmo meio determinado pelo PB, e as mesmas condições de temperatura de 30°C, aeração de 1 vvm e adição de benzaldeído avaliou-se as condições a fim de se reproduzir as mesmas concentrações obtidas na escala menor de 1 litro.

Primeiramente, foi avaliado o sistema de batelada alimentada intermitente com 3 alimentações (Figura VII-1) sendo a primeira adição de 40 mL de benzaldeído 95% e 400 mL de solução de glicose 48% (p/v) após 1 h de fermentação, a segunda adição de 15 mL de benzaldeído 95% e 250 mL de solução de glicose 48% (p/v) após 4h de fermentação e a terceira adição de 15 mL de benzaldeído e 250 mL de solução de glicose 48% (p/v) após 6 h de fermentação. A agitação foi mantida igual a do fermentador de 1 L de: 350 rpm.

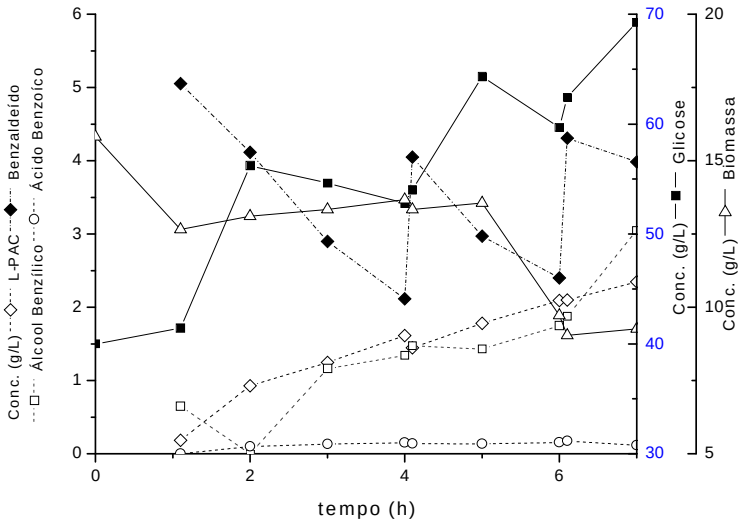


Figura VII-1 Cinética de produção de L-PAC por *S. cer 5* em biorreator de 13 L com batelada alimentada e 350 rpm.em meio de produção PB com concentração inicial de glicose de 40 g/L

Neste caso a concentração máxima de L-PAC obtida foi de 2,35 g/L após 7 h de fermentação, inferior a produção de L-PAC em biorreator de 1 L, que foi de 7,65 g/L Ao compararmos com o fermentador de 1 L (Figura VI-1) observa-se a concentração de biomassa inicial no fermentador de 13 L foi inferior (Figura VII-1). Como é uma cinética não associada ao crescimento, a taxa de formação de produto é proporcional à concentração de células (LUEDEKING e PIRET, 1959). Observa-se na Figura VII-1 que a taxa de formação de L-PAC é lenta em comparação com o processo realizado em biorreator de 1 L. Além disso, a agitação escolhida pode também ter sido muito alta pois não se realizou um estudo de aumento de escala, previamente.

O critério da constância da potência efetiva foi utilizado para a extrapolação de escala da agitação nos biorreatores do processo de produção do L-PAC, em comparação com os biorreatores de produção de bancada. Shukla *et al*. (2001) utilizaram o K_La como critério de extrapolação de escala levando em consideração oxigênio dissolvido em frascos agitados e aplicaram direto em um biorreator de 5 L. Este critério não se mostrou eficiente uma vez que no biorreator de 5 L a massa celular foi 78% maior. Além disso, durante o

processo de biotransformação a aeração é reduzida o que vem a corroborar pela não escolha do K_La como critério de extrapolação de escala.

A velocidade de agitação no biorreator de 1 litro é de 350 rpm. Para esse biorreator, as dimensões são:

H= 22, 5 cm (altura do fermentador);

T= 9 cm (diâmetro do fermentador);

h = 8 cm (distância entre as palhetas);

D = 4 cm (diâmetro da palheta).

Para o biorreator de bancada de 13 litros, as dimensões são:

H= 45 cm (altura do fermentador);

T= 20 cm (diâmetro do fermentador);

h = 11 cm (distância entre as palhetas);

D = 10 cm (diâmetro da palheta).

É possível observar que as relações geométricas não foram mantidas. Para o biorreator de 13 L há uma palheta a mais e as relações entre a altura do fermentador e o diâmetro do fermentador (H/T) é de 2,5 para o biorreator de 1 L e de 2,25 para o de 13 L. A relação entre o diâmetro da palheta e o diâmetro do fermentador (D/T) é de 0,44 para o biorreator de 1 L e 0,5 para o biorreator de 13 L. Mesmo assim, utilizou-se o critério da potência efetiva para calcular a velocidade de agitação do biorreator de 13 L.

Então, segundo a equação VII-1 do critério da potência efetiva:

- $N_2 = N_1 \left(\frac{D_{i1}}{D_{i2}}\right)^{2/3}$ eq VII-1
- $N_2 = 350 \left(\frac{4\ \text{cm}}{11\ \text{cm}}\right)^{2/3}$
- $N_2 = 190$

Então a velocidade de agitação utilizada deve ser de 190 rpm.

Durante a batelada alimentada em biorreator de 13 L a 190 rpm (Figura VII-2) foram feitas 3 alimentações sendo a primeira adição de 40 mL de

benzaldeído 95% e 400 mL de solução de glicose 40% após 1 h, a segunda adição de 15 mL de benzaldeído 95% e 400 mL de solução de glicose 40% após 4 h e a terceira adição de 15 mL de benzaldeído 95% e 400 mL de solução de glicose 40% após 6 h.

Neste caso a concentração máxima de L-PAC foi de 2,89 g/L após 7 h de fermentação, um valor ligeiramente superior ao encontrado com a agitação de 350 rpm (2,35 g/L). A taxa de formação de L-PAC (dP/dt) foi 0,48 g/L.h o que foi ligeiramente superior que à dP/dt para a 350 rpm (0,39 g/L.h), porém bastante inferior à dP/dt obtida no biorreator de 1 litro (1,27 g/L.h). Isto provavelmente se deve ao fato de que a concentração inicial de células no biorreator de 13 L foi de aproximadamente um terço da concentração inicial de células do biorreator de um litro.

Segundo Luedeking e Piret (1959) a cinética de formação de produto segue a equação VII-2:

- $\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$ eq. VII-2

Por ser um processo não associado ao crescimento, a taxa de formação do produto está associada apenas a concentração da biomassa e não a sua taxa de formação.

Comparando os processos temos que:

- $\frac{dP}{dt} = \beta X$
- β = 0,37 $biorreator\ de$ 1 L
- β = 0,59 $biorreator\ de$ 13 L

Onde β é igual a 0,59 no processo em biorreator de 13 L e 0,37 no processo em biorreator de 1 L. Os valores semelhantes mostram que a equação pode ser considerada e, portanto, a menor produção de L-PAC obtida no biorreator de 13 L se deve ao fato de que a concentração de células nesse caso foi inferior.

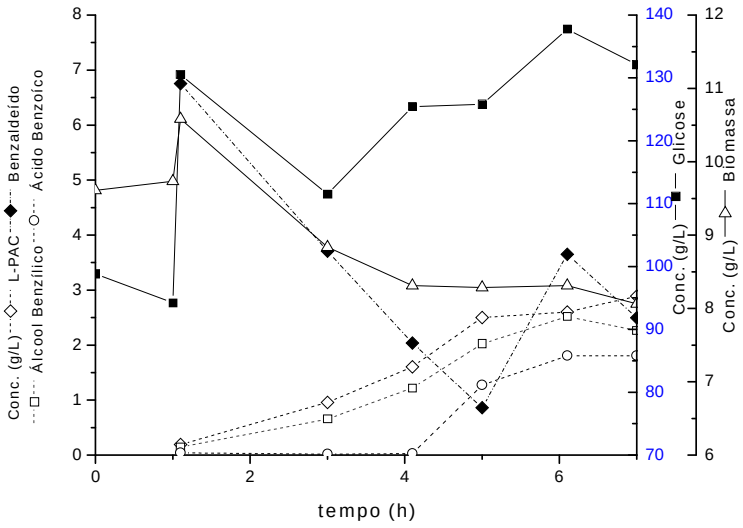


Figura VII-2 Cinética de produção de L-PAC por *S.cer.5*em biorreator de 13 L com batelada alimentada e 190 rpm em meio de produção PB com concentração inicial de glicose de 40 g/L

VII.2 *Estudo da alimentação contínua em biorreator de 13L*

Mantendo a agitação em 190 rpm avaliou-se a substituição da batelada alimentada em pulsos pela batelada com alimentação continua de uma solução contendo glicose 48% (p/v) e benzaldeído 5% (v/v) na vazão de 4,44 mL/min por 4 h (Figura VII-3).

A concentração máxima de L-PAC obtida foi de 0,98 g/L e grande parte do benzaldeído foi convertida a álcool benzílico cuja concentração final foi de 2,07 g/L. A concentração de células inicial foi bastante inferior de apenas 6,8 g/L. A glicose permaneceu em valores elevados favorecendo a formação de álcool benzílico.

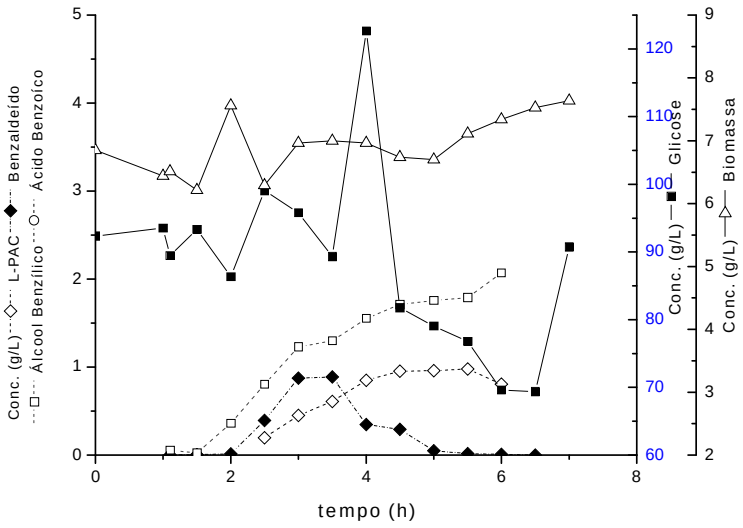


Figura VII-3 Cinética de produção de L-PAC em biorreator de 13 L com alimentação contínua de glicose e benzaldeído;

Ao substituir a glicose por açúcar cristal com alimentação continua na vazão de 4,44 mL/min de uma solução de açúcar cristal 48% (p/v) e benzaldeído 5% (v/v) observa-se na Figura VII-4 que houve um problema na homogeneização da solução de alimentação uma vez que a concentração de benzaldeído e de L-PAC aumentaram drasticamente no final do processo. Neste caso a concentração máxima de L-PAC foi de 3,15 g/L, mas a concentração de álcool benzílico também foi muito alta chegando a 3,29 g/L, o que reduz significativamente o rendimento. Novamente a concentração de glicose foi muito elevada e a concentração celular inicial foi de 8,16 g/L. Essas concentrações favoreceram a atividade da ADH e a rota metabólica se desloca para formação de álcool benzílico.

A ação da PDC e ADH são dependentes, Kunjapur e Prather (2015) conseguiram reduzir a formação de álcool benzílico utilizando cepas recombinantes de uma estirpe de *E. coli* MG1655 com redução aldeído aromático (RARE) que pode servir como uma plataforma para a síntese de aldeídos aromáticos com o mínimo ou nenhuma conversão para os seus álcoois correspondentes sendo capazes de produzir L-PAC utilizando benzaldeído e fornecendo, exogenamente, piruvato metabolizado.

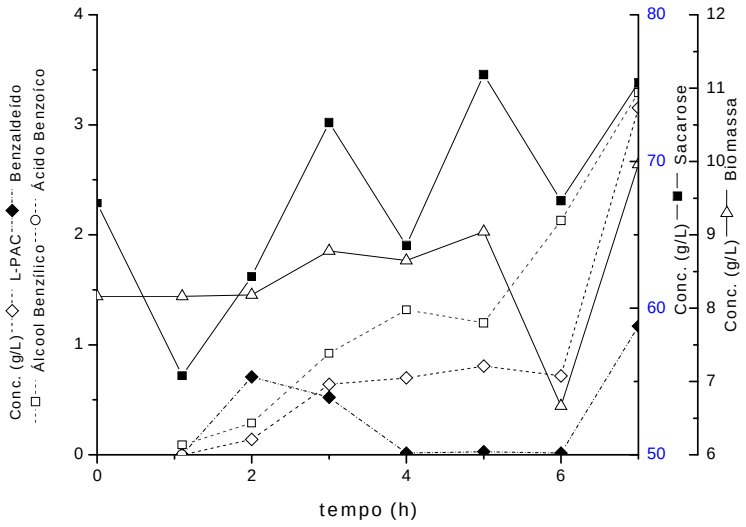


Figura VII-4 Cinética de produção de L-PAC em biorretor de 13 L com alimentação contínua de açúcar cristal 48% e benzaldeído 5%;

A reutilização de células é uma estratégia importante para viabilizar economicamente o processo. As células da batelada anterior foram separadas por centrifugação e armazenadas a 4°C. Durante o processo de propagação da biomassa elas foram ressuspensas em meio YPD no biorreator de 4 L e neste processo elas foram revitalizadas uma vez que não apresentaram células mortas ao serem coradas com azul de metileno segundo o método descrito por Lee; Robinson; Wang (1981) que utiliza azul de metileno como corante seguido de contagem em câmara de Neubauer, usando um microscópio óptico, em aumento de 400X.

O processo foi repetido e desta vez a bomba manteve constante a concentração de benzaldeído (Figura VII-5). A produção de L-PAC foi de 1,96, o que corresponde a 62% da produção sem reutilização de células. Além disso, grande parte do benzaldeído foi convertida a álcool benzílico cuja concentração final foi de 3,7 g/L. A sacarose foi consumida a taxa de conversão de 0,108.

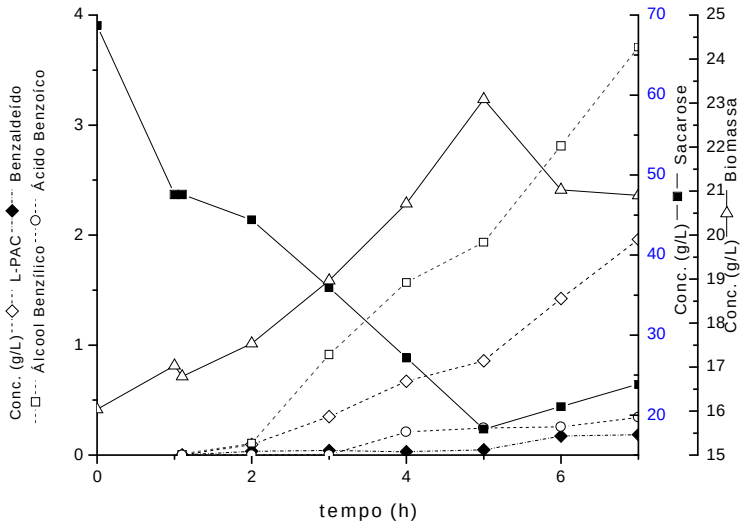


Figura VII-5 Cinética de produção de L-PAC em meio PB por S.cer5 em biorretor de 13L com alimentação contínua de açúcar cristal 48% e benzaldeído 5% e reutilização de células.

O resumo dos resultados obtidos ao longo do trabalho foram sumarizados nas Tabelas Tabela VII-1, Tabela VII-2Tabela VII-3.

Tabela VII-1 Comparação dos resultados de produção de L-PAC em frascos agitados por *S.cer* 5

	Condições				Resultados					
Item	*[cel]*$_i$ (g/L)	Glicose[S_1]i (g/L)	Benzaldeído (S_2) adições (μL ou g/L)	Condição Experimental	PAC$_{máx}$ (P) (g/L)	Tempo PAC$_{máx}$ (h)	(Pr)PAC (g/Lh)	Álcool benzílico (g/L)	Ác. benzóico (g/L)	Benzaldeído final (g/L)
V.2	*3,13*	25	95 μL	Adição 0 h	0,37	4,0	0,09	0,61	0,27	0,00
V.2	*3,00*	25	91,2 μL	Adição 1,5 h	0,59	4,0	0,15	0,41	0,16	0,00
V.2	*3,21*	25	87,4 μL	Adição 3 h	0,61	5,0	0,12	0,37	0,13	0,11
V.3	*3,39*	25	369 μL 3,81 g/L	Planej. 2^{4-1}	2,79	7,0	0,40	0,34	0,40	0,98
V.3	*1,50*	38,1	3,81 g/L	DCCR	3,05	7,0	0,43	1,41	0,15	1,41
V.4	1,44	40	4 g/L	Aumento de Benzaldeído	3,15	24	0,13	0,81	0,17	0,47
V.4	1,07	40	4 g/L	Com tampa	3,38	24	0,14	0,68	0,18	0,55
V.4	1,08	40	4 g/L	TPP	3,55	24	0,15	0,76	0,19	0,38
V.5	2,26	40	4 g/L	PB-12	2,17	7	0,31	0,47	0,1	2,24
V.6	28,7	80	6,0 g/L	*Aumento da [cel]*$_i$	4,92	7	0,70	2,58	0,30	0,10
V.7	33,62	80	6,0 g/L	$AgNO_3$ (1,0E-03 mg/L)	4,61	3	1,54	1,94	1,25	0,28
V.7	16,85	80	6,0 g/L	$MgSO_4.7H_2O$ (1,0 g/L)	4,74	3	1,58	2,03	0,01	0,43
V.8	30,9	80	8 g/L	Beta-ciclodextrina 2%	5,13	7,0	0,80			0,176

[cel]$_i$: Concentração inicial de células; [S_1]i: Concentração inicial de Glicose; $Y_{P/S2:}$ Fator de conversão de benzaldeído em produto L-PAC (g de L-PAC/ g de benzaldeído); (Pr)PAC: Produtividade de L-PAC (g/Lh); d(S_2)/dt: taxa de consume de benzaldeído

Tabela VII-2 Comparação dos resultados de produção de L-PAC em biorreator de 1 L por *S.cer* 5

	Condições					Resultados							
	$[cel]_i$ (g/L)	Fonte de Carbono (S_1)	$[S_1]$i (g/L)	Benzaldeído (S_2) adições (mL)[a]	Fonte de carbono (S_1) adições (mL)[b]	$PAC_{máx}$ (P) (g/L)	Tempo $PAC_{máx}$ (h)	(Pr)PAC (g/Lh)	Álcool benzílico (g/L)	Ác. benzóico (g/L)	Benzaldeído final (g/L)	d(S_2)/ dt	$Y_{P/S2}$
Meio de Zhang *et al.* (2008)	2,00	Glicose	25	3,4 g/L		1,18	7	0,26			1,74		
	4,00		25	3,4 g/L		0,25	7	0,03			1,26		
	2,50		25	3,4 g/L		1,92	7	0,27			2,14		
	2,05		25	3,4 g/L		1,98	7	0,28	0,79	0,37	1,10	0,48	0,86
	2,05		25	3,4 g/L		2,33	7	0,33	0,77	0,41	1,51	0,28	1,19
	1,93		25	3,321 + 1, 27		2,40	7	0,34	1,28	0,16	3,13	0,22	1,54
	1,36		25	3,321 + 1,0 + 1,0	9 + 9	2,02	7	0,29	0,39	0,28	3,62	0,18	1,58
	2,00		25	3,321 + 1,0 + 1,0	9 + 9	0,85	7	0,12	0,54	0	4,51	0,15	0,82
	2,70		25	3,321 + 1,0 + 1,0	9 + 9	1,35	7	0,19	0,66	0,36	4,27	0,17	1,12
	33,2		25	3,321 + 3,321 + 3,321 + 3,321 +10 + 5 [g]	55+ 55+ 22 + 22+ 45[h]	6,91	6,5	1,06	0,18	3,99	2,53	1,29	0,70
	25,5		25	3,321 + 3,321 + 2 + 1	57 + 47 + 15 +30 [j]	5,53	7	0,79	3,34	0,56	2,42	0,80	0,99
	28,1		25	3,5 + 2,0 + 1,0 + 1,0 [l]	57 + 47 + 22 + 30 +22,5 [m]	5,24	8	0,65	3,41	0,37	0	0,82	0,71
Meio PB-12	28,4	Glicose	40	4,0 + 4,0 + 2,0 [n]	60 + 50 + 15 [o]	7,50	7,5	1	5,19	1,15	2,80	1,19	0,84
	38,4		80	4,0 + 4,0 + 2,0 [p]	75 + 93 +56 [q]	6,16	7	0,88	2,94	0,23	3,59	1,17	0,75
	32,7		80	4,0 + 4,0 + 2,0 [p]	40 + 40 + 20 [q]	7,65	7	1,09	4,66	0,25	0,04	1,00	1,09
	31,8		40	6,0 + 4,0 + 2,0	40 + 40 + 20	5,92	6,5	0,91	5,07	0,21	3,39	0,71	1,16
	31,1		40	6,0 + 4,0 + 2,0	40 + 20 + 20	6,50	7	0,93	5,57	0,07	3,20	0,57	1,30
	37,0		40	6,0 + 3,0 + 2,0 + 1,0	40 + 20 + 20 + 20	8,02	7	1,15	7,20	1,74	2,08	0,89	1,11
	18,7		80	12,0	120	8,91	4	2,22	3,00	0	9,14	2,05	1,09
	33,3	Açúcar Cristal	80	6,0 + 3,0 + 1,0	40 + 60	4,51	6	0,75	2,67	1,26	2,51	0,36	0,96
	28,5		80	10	200	4,5	4	1,12	4,07	0,47	0,61		

$[S_1]$i: Concentração inicial da Fonte de Carbono; $Y_{P/S2:}$ Fator de conversão de benzaldeído em produto L-PAC (g de L-PAC/ g de benzaldeído)
(Pr)PAC: Produtividade de L-PAC (g/Lh); d(S_2)/dt: taxa de consume de benzaldeído; [a]benzaldeído 95%, [b] solução de glicose/sacarose 48%,

Tabela VII-3 Comparação dos resultados de produção de L-PAC em biorreator de 13 L por *S.cer* 5

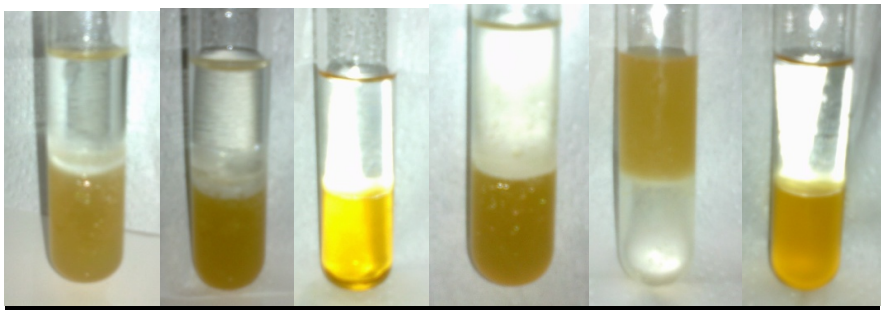
Condições					Resultados							
Figura	Fonte de Carbono (S_1)	[S_1]i	Benzaldeído (S_2) adições (mL)[a]	Fonte de carbono (S_1) adições (mL)[b]	$PAC_{máx}$ (P) (g/L)	Tempo $PAC_{máx}$ (h)	(Pr)PAC (g/Lh)	Álcool benzílico (g/L)	Ác. benzóico (g/L)	Benzaldeído final (g/L)	d(S_2)/dt	$Y_{P/S2}$
Figura VII-1	Glicose	80	40 + 15 + 15 mL	400 + 250 + 250	2,35	7	0,34	3,05	0,11	3,98	0,51	0,65
Figura VII-2	Glicose	80	40 + 15 + 15 mL	400 + 250 + 250	2,89	7	0,41	2,52	1,8	2,49	0,73	0,57
Figura VII-3[c]	Glicose	80,0	50	1000	0,97	5,5	0,18	1,76	0	0,017	0,79	0,22
Figura VII-4[c]	Açúcar Cristal	80,0	100	2000	3,15	7	0,45	3,29	0	1,17	1,03	0,44
Figura VII-5[a,c,db]	Açúcar Cristal	80,0	100	2000	1,96	7	0,28	3,71	0,34	0,185	1,17	0,24

[S_1]i: Concentração inicial da Fonte de Carbono; $Y_{P/S2:}$ Fator de conversão de benzaldeído em produto L-PAC (g de L-PAC/ g de benzaldeído)
(Pr)PAC: Produtividade de L-PAC (g/Lh); d(S_2)/dt: taxa de consume de benzaldeído.
[a]benzaldeído 95%, [b] solução de glicose/sacarose 48%, [c]vazão de alimentação de 4,44 mL/min; [d] Reutilização de células

VIII. Extração líquido-líquido do L- PAC

O L-PAC precisa ser extraído e concentrado do meio para poder ser convertido por meio da síntese química em efedrina, uma vez que os nutrientes presentes no meio interferem no processo e o volume final da produção é muito grande. Com isso é feita primeiro uma extração com solvente orgânico para separar o L-PAC da fase aquosa em seguido o solvente é recuperado e o L-PAC concentrado para síntese química.

O L-PAC possui maior afinidade com solventes orgânicos do que com o meio aquoso Khan *et al.* (2012). Portanto, foram testados 6 solventes (Figura VIII-1para extração do L-PAC obtido após fermentação em meio de produção PB-12 com a cepa *S.cer 5*. A concentração de L-PAC no meio fermentado livre de células era de 3,85 g/L de L-PAC. A extração com tolueno, éter de petróleo e ciclohexano formaram duas fases. Já as extrações com clorofórmio, hexano e xileno formaram uma emulsão, o que dificultou o processo de extração. Todos os solventes foram capazes de extrair o L-PAC, dentre eles o clorofórmio, o xileno e o tolueno foram os que apresentaram melhores remoções de L-PAC do meio (Tabela VIII-1).



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Figura VIII-1 Teste de extração com solventes (a) Tolueno, (b) Xileno, (c) Éter de Petróleo, (d) Ciclohexano, (e) Clorofórmio e (f) Hexano.

Tabela VIII-1 Extração líquido-líquido 1;1 com solventes orgânicos Tolueno, éter de petróleo, clorofórmio, hexano, clico hexano e xileno.

Solvente	L-PAC (g/L)		
	Fase aquosa	Fase orgânica	Emulsão
Tolueno	0,87	1,92	
Éter de petróleo	1,32	2,07	
Clorofórmio	0,24	3,79	3,36
Hexano	2,11	1,26	2,2
Ciclohexano	1,35	1,57	
Xileno	0,62	2,53	0,57

Devido à elevada periculosidade do clorofórmio e do xileno estes foram descartados. Os testes de extração liquido-liquido de L-PAC prosseguiram com dois solventes orgânicos, tolueno e diclorometano. Foram feitas extrações com 45 mL de meio fermentado e 90 mL de solvente orgânico (dividido em 4 frações de 22,5 mL) provenientes do meio fermentado em biorreator de 1 litro com meio de produção PB-12 e concentração de L-PAC de 7,11 g/L. Na Tabela VIII-2verifica-se que com quatro extrações com tolueno, 86% do L-PAC foi obtido e que com 2 extrações com diclorometano 95% do L-PAC foi extraído. Apesar de ter apresentado uma conversão inferior, o tolueno foi escolhido por ser um reagente mais barato e já estar presente no processo de conversão do L-PAC a efedrina.

Tabela VIII-2 Processo de extração líquido-líquido com solventes orgânicos do meio aquoso contendo.7,11 g/L de L-PAC.

Extração	Tolueno		Diclorometano	
	L-PAC (mg)[a]	% de extração	L-PAC (mg)[a]	% de extração
1ª	200	62%	280	89%
2ª	56	80%	18	95%
3ª	17	85%	2	95%
4ª	5	86%	1	95%

[a] massa inicial de 320 mg de L-PAC

O meio fermentado foi divido em 3 partes e extraído com tolueno e posteriormente rota evaporado. Neste processo adaptado de Khan *et al.* (2012), o tolueno é separado dos outros compostos a vácuo sob a temperatura de 90ºC e recuperado. Na Tabela VIII-3 Extração líquido-líquido de L-PAC do meio

fermentado com tolueno e concentração da fase orgânica.podemos observar que o processo de extração foi de 96%. O concentrado apresentou uma coloração amarela característica de L-PAC (Figura VIII-2 com 119 g/L de L-PAC, 3,48 g/L de benzaldeído, 65,11 g/L de ácido benzóico e 2,28 g/L de álcool benzílico.

Tabela VIII-3 Extração líquido-líquido de L-PAC do meio fermentado com tolueno e concentração da fase orgânica.

Extração	L-PAC
Massa inicial	4,56 g
Massa extraída	4,36 g
Volume final	40 mL
Concentração	119 g/L

Figura VIII-2Concentrado de L-PAC após a rotaevaporação

IX. AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Os cultivos realizados em biorreator de 13 L para produção de L-PAC por *S. cer 5* em meio determinado apresentaram resultados bastante promissores para uma possível produção industrial, principalmente quando se substituiu a glicose por açúcar cristal e mostrou-se ser possível a reutilização de células. No entanto, para que se confirme que o processo tem potencial para produção industrial e comercialização do produto final, é necessário que se analise a viabilidade econômica do processo. A avaliação foi feita baseada nos dados obtidos no biorreator de 1 litro, pois foi a condição que foi melhor investigada, resultando em uma produção de L-PAC mais elevada.

Para essa avaliação, considerou ser possível a mesma produção de L-PAC em um biorreator em escala industrial que a obtida em um biorreator de bancada, por intermédio de cálculos de extrapolação de escala. Certamente, para uma avaliação econômica mais precisa, testes em reatores de maior volume seriam necessários. No entanto, a intenção da presente avaliação é fornecer um indicativo para uma possível continuidade da investigação em relação ao processo estudado.

Portanto, inicialmente, avaliou-se o tamanho dos biorreatores necessários para uma determinada produção de L-PAC anual (considerando também os biorreatores para propagação de células), estimada para suprir as necessidades desse produto no Brasil (COSATI *et a*l., 2014)). Em seguida, foi necessário realizar cálculos de extrapolação de escala para as dimensões do equipamento e agitação do sistema. Finalmente, montou-se um diagrama de blocos para o processo, permitindo determinar o balanço de massa das quantidades de reagentes gastos e produtos obtidos. Com esses dados, realizou-se a avaliação econômica. Todos esses passos são descritos a seguir.

IX.1 *Cálculos dos volumes dos biorreatores*

Considerando uma produção anual de L-PAC de 1000 kg (COSATI *et al.*, 2014) e, baseando-se nos resultados encontrados no presente trabalho, foi

possível projetar uma planta industrial para a produção desse intermediário farmacêutico.

Para esse cálculo, foi escolhido como base o processo que apresentou a melhor produção/produtividade de L-PAC (8,91 g/L) por S.cer.5 (resultados apresentados na Figura VI-5). Nesse processo, em meio de produção PB sobre agitação de 350 rpm e aeração de 0,1 vvm o benzaldeído e a glicose foram adicionados após 1 h de crescimento e adaptação ao mesmo iniciou-se uma alimentação contínua de uma solução contendo glicose 40% (p/v) e benzaldeído 10% (v/v) na vazão de 0,67 mL/min por 5 h.

O número de bateladas anuais (B) é calculado levando-se em conta as seguintes considerações:

- A planta funciona 330 dias ao ano (D_f);
- A planta funciona 24 horas por dia (H_f);

O tempo de produção de L-PAC (t_p) é de 4 horas, baseando-se no resultado apresentado na Figura VI-6;

- O tempo de carga, descarga e de limpeza de cada biorreator ($t_{c,d,l}$) é de 6 horas (Adaptado de Borzani *et al* (2001)).

$$\mathbf{B} = \frac{\mathbf{D_f * H_f}}{\mathbf{t_p + t_{c,d,l}}} = \frac{\mathbf{330 * 24}}{\mathbf{4 + 6}} \qquad \textbf{Eq. IX-1}$$

$$\boxed{B = 792 \text{ bateladas/ano}}$$

Então, devem ser realizadas 792 bateladas por ano.

Para encontrar o volume final do meio ($V_{M,1}$) para a produção do L-PAC ($\mathbf{V_{M,1}} = \frac{\mathbf{M_p}}{\mathbf{B * P}} = \frac{\mathbf{1.000.000\ g}}{\mathbf{792 * 8{,}91\ g/L}}$ Eq. IX-2) e o volume do reator ($V_{R,1}$) para essa produção ($\mathbf{V_{R,1}} = \mathbf{V_{M,1}} * \mathbf{1{,}2} = \mathbf{141{,}7} * \mathbf{1{,}2}$ Eq. IX-3). As seguintes considerações foram feitas:

- A massa de L-PAC (M_p) a ser produzida é de 1000 kg por ano;
- Foram consideradas 792 bateladas por ano (B);
- A concentração de L-PAC produzido é de 8,91 g/L (resultado apresentado na Figura VI-5)

$$\mathbf{V_{M,1}} = \frac{\mathbf{M_p}}{\mathbf{B*P}} = \frac{\mathbf{1.000.000\ g}}{\mathbf{792*8{,}91\ g/L}} \qquad \textbf{Eq. IX-2}$$

$$\boxed{V_{M,1} = 141{,}7\ L}$$

Considerando que o volume útil do biorreator corresponde a 80% do volume total do biorreator ($V_{R,1}$), tem-se que:

$$\mathbf{V_{R,1}} = \mathbf{V_{M,1} * 1{,}2 = 141{,}7 * 1{,}2} \qquad \textbf{Eq. IX-3}$$

$$\boxed{V_{R,1} = 170{,}05\ L \approx 180\ L}$$

Portanto, ao final de cada batelada, são obtidos 141,7 litros de meio fermentado contendo L-PAC a 8,91 g/L. O reator para essa produção deveria ter um volume de 170,05 litros, que foi aproximado para um reator de 180 litros.

Para o cálculo do volume do pré-fermentador ($V_{R,2}$), considera-se que o mesmo deve ter 40% do volume de meio do biorreator de produção. Essa consideração é baseada no fato de que a concentração inicial de células para a produção de L-PAC deve ser elevada (30 g/L) e para tal um volume de inóculo maior (em relação ao padrão 10% utilizado nos processos industriais) é $\mathbf{VM,2 = VM,1*40\% = 141{,}7*40\%}$ Eq. **IX-4**) e $V_{R,2}$ $\mathbf{VR,2 = V_{M,2} * 1{,}2 = 56{,}7 * 1{,}2}$ Eq. **IX-5**) da seguinte forma:

$$\mathbf{V_{M,2}} = \mathbf{V_{M,1} * 40\% = 141{,}7 * 40\%} \qquad \text{Eq. IX-4}$$

$$\boxed{V_{M,2} = 56{,}7\ L}$$

$$\mathbf{V_{R,2}} = \mathbf{V_{M,2} * 1{,}2 = 56{,}7 * 1{,}2} \qquad \text{Eq. IX-5}$$

$$\boxed{V_{R,2} = 68{,}02\ L \approx 70\ L}$$

Cada pré-fermentador deve ter capacidade nominal de 70 litros, para o volume de mosto de 56,7 litros.

Para que a planta de produção funcione 24 h por dia, é necessário que a cada 10 horas (4 horas de fermentação e 6 horas para limpeza, carga e descarga) tenha um inóculo pronto para iniciar o processo. No entanto, como a produção de células do pré-inóculo dura 12 h, são necessários mais de um pré-fermentador. Para calcular o número de pré-fermentadores necessários (D),

faz-se as seguintes considerações, baseando-se em dados experimentais ($\mathbf{D} = \frac{\mathbf{t_i + t_{c,d,l,i}}}{\mathbf{t_p + t_{c,d,l}}} = \frac{\mathbf{12+6}}{\mathbf{4+6}}$ Eq. **IX-6**):

- Tempo de preparo do inóculo: t_i = 12 horas;
- Tempo de carga, descarga e limpeza do pré-fermentador: $t_{c,d,l,i}$ = 6 horas;
- Tempo de produção de L-PAC: t_p = 4 horas;
- Tempo de carga, descarga e limpeza do fermentador: $t_{c,d,l}$ = 6 horas;

$$\mathbf{D} = \frac{\mathbf{t_i + t_{c,d,l,i}}}{\mathbf{t_p + t_{c,d,l}}} = \frac{\mathbf{12+6}}{\mathbf{4+6}} \qquad \text{Eq. IX-6}$$

$$\boxed{D = 1{,}8 \text{ dornas}}$$

São necessárias duas dornas de pré-fermentação para que o processo de produção de L-PAC não pare.

Para o cálculo do volume do pré-fermentador ($V_{R,3}$), considera-se que o mesmo deve ter 25% do volume de meio do próximo pré-fermentador ($V_{R,2}$). Essa consideração é baseada no fato de que a concentração inicial de células no pré fermentador deve ser (9 g/L) e para tal um volume de inóculo maior (em relação ao padrão 10% utilizado nos processos industriais) é necessário. $\mathbf{VM,3 = VM,2 * 25\% = 70 * 25\%}$ Eq. **IX-7**) e $V_{R,3}$ (, da seguinte forma:

$$\mathbf{V_{M,3}} = \mathbf{V_{M,2}} * \mathbf{25\%} = \mathbf{70} * \mathbf{25\%} \qquad \text{Eq. IX-7}$$

$$\boxed{V_{M,3} = 14{,}2 \text{ L}}$$

$$\mathbf{V_{R,3}} = \mathbf{V_{M,3}} * \mathbf{1,2} = \mathbf{14,2} * \mathbf{1,2} \qquad \text{Eq. IX-8}$$

$$\boxed{V_{R,3} = 17 \text{ L}}$$

O biorreator anterior ao pré-fermentador deve ter capacidade de 17 litros, para comportar 14,2 litros de meio.

Já o volume do biorreator anterior ao biorreator de capacidade nominal de 17 litros. Para o cálculo do volume do pré-fermentador ($V_{R,4}$). Portanto,

calcula-se $V_{M,4}$ ($\mathbf{V_{M,4}} = \mathbf{V_{M,3}} * \mathbf{10\%} = \mathbf{14,2} * \mathbf{10\%}$ Eq. **IX-9**) e $V_{R,4}$ ($\mathbf{V_{R,4}} = \mathbf{V_{M,4}} * \mathbf{1,2} = \mathbf{1,4} * \mathbf{1,2}$ Eq. **IX-10**) da seguinte forma:

$$\mathbf{V_{M,4}} = \mathbf{V_{M,3}} * \mathbf{10\%} = \mathbf{14,2} * \mathbf{10\%} \qquad \text{Eq. IX-9}$$

$$\boxed{\mathbf{V_{M,4}} = \mathbf{1,4\ L}}$$

$$\mathbf{V_{R,4}} = \mathbf{V_{M,4}} * \mathbf{1,2} = \mathbf{1,4} * \mathbf{1,2} \qquad \text{Eq. IX-10}$$

$$\boxed{V_{R,4} = 1{,}7\ L \approx 2{,}5\ L}$$

Essa etapa da propagação apresentou um volume total de 1,4 litros, podendo ser realizada em dois *Erlenmeyers* de 2 litros. .

Para a etapa de reativação do inóculo, o volume de mosto deve ser de, no máximo, 500 mL. Para encontrar o volume de mosto, tem-se na$V_{M,5} = V_{M,4} * 10\% = 1{,}4 * 10\%$ Eq. IX-11 que:

$$V_{M,5} = V_{M,4} * 10\% = 1{,}4 * 10\% \qquad \text{Eq. IX-11}$$

$$\boxed{V_{M,5} = 0{,}14\ L}$$

Como esse volume é menor do que 500 mL, é possível iniciar a reativação do inóculo em *Erlenmeyer* em incubadora agitada. O volume do *Erlenmeyer* para essa etapa é de 500 mL, como foi realizado nos experimentos dessa tese.

A primeira etapa do processo de produção de L-PAC pode ser iniciada em um *Erlenmeyer* de 500 mL. Essa etapa é denominada reativação do inóculo.

IX.2 *Cálculos para a Extrapolação de Escala da Agitação*

O estudo da variação de escala de processos examina os problemas associados com a transposição de dados obtidos em equipamentos de escalas de laboratório e piloto, para a escala de produção industrial.

Na escala de bancada, tendo em vista sua maior flexibilidade e menor custo de operação, foram selecionados o micro-organismo, o meio de produção e as condições de operação.

Mantendo-se constante grande parte das variáveis, como temperatura a 30°C, pH 5, alimentação continua, meio de produção PB-12 e as relações geométricas escolheu-se por critério de ampliação de escala a constante potência efetiva.

Sendo as dimensões do biorreator de 1L (1) iguais a:

- T1 (diâmetro do fermentador) = 0,09cm
- H1(altura do fermentador) = 0,225m
- D1 (diâmentro das paletas) = 0,04cm
- h1 (distância entre as paletas) = 0,08 cm
- N1 (velocidade de agitação) = 350 rpm

E as relações geométricas $\frac{T2}{T1} = \frac{H2}{H1} = \frac{D2}{D1} = \frac{h2}{h1} = \left(\frac{V2}{V1}\right)^{1/3}$

Eq. **IX-12**:

$$\frac{T2}{T1} = \frac{H2}{H1} = \frac{D2}{D1} = \frac{h2}{h1} = \left(\frac{V2}{V1}\right)^{1/3} \qquad \text{Eq. IX-12}$$

Para o biorreator de produção de L-PAC de 180 litros (2), as dimensões e velocidade de agitação são:

- T2 = 50,8 cm
- H2 = 1,27 m
- D2 = 22,6 cm
- h2 = 45,2 cm
- N2 = 110 rpm

O primeiro passo para a avaliação econômica de um processo é a construção de um diagrama de blocos. A Figura VIII-1 apresenta um diagrama de blocos da produção industrial do processo de produção de L-PAC em biorreator de 180 L, utilizado para obtenção dos resultados do Capítulo VI. As condições de produção utilizadas são as que promoveram maior produtividade

L-PAC (Figura VI-5). Além disso foi considerada a substituição da glicose por açúcar cristal e a reutlização de células, supondo-se que nestas condições a mesma produtividade será obtida.

Tomou-se por base, portanto, o processo descrito no item VI-7, apresentado na Figura VI-5, no qual obteve-se 8,91 g/L de L-PAC. As condições de produção são: temperatura de 30°C, aeração de 1vvm durante a primeira hora. Após 1 h de crescimento e adaptação, iniciou-se uma alimentação contínua de solução de glicose ou sacarose40% e benzaldeído 10% na vazão de 1,67 mL/ min por 3 h. Para a agitação do sistema, utilizou-se o valor 120 rpm obtido a partir da extrapolação de escala, descrito no item VII-1.

O diagrama de blocos (Figura IX-1) apresenta um balanço de massa, onde é calculado as concentrações dos componentes dos meios, das alimentações, a concentração de biomassa, de L-PAC e dos subprodutos. Estes cálculos levaram em consideração que o L-PAC é extraído do meio fermentado por tolueno com uma eficiência de 86% em batelada alimentada intermitente (Anexo -2 diagrama de blocos com reutlização de células e açúcar cristal).

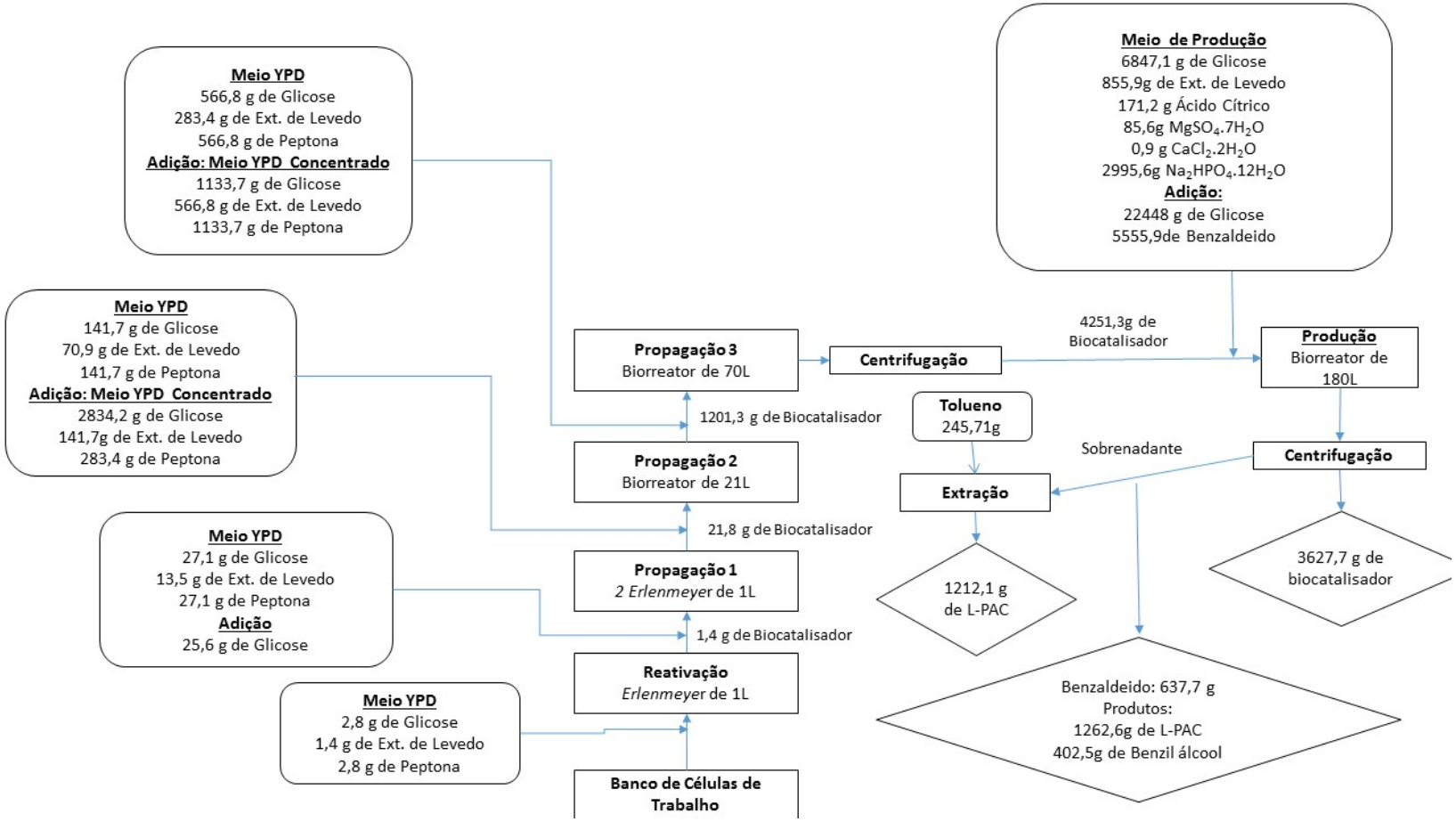


Figura IX-1 - Diagrama de blocos para a produção de 1 kg de L-PAC em batelada alimentada intermitente.

IX.3 *Preços das Matérias-Primas, Insumos, Subprodutos e Produto Final*

Para a elaboração do estudo econômico foi feita uma pesquisa de preços mediante de busca em diversos sites de reagentes químicos. Os resultados dessa busca estão expostos na Tabela IX-1.

Alguns preços foram encontrados em Reais e outros em Dólares Americanos. Para a conversão de todos os preços para dólares americanos, foi feita também uma busca pela cotação do dólar na data de 01/07/2014 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2014). A cotação a ser utilizada para os cálculos da avaliação econômica será a taxa de venda de R$ 2,2054/US$. Porém estes preços são muito elevados para escala industrial.

Tabela IX-1 Preços das Matérias-Primas, Insumos e Produto Final

Produto	Fabricante/ Fornecedor	Preço (US$/Kg)
Glicose	Vetec- (SIGMA- ALDRICH, 2014)	6,35
Açúcar Cristal	Cepea/Esalq (NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2014)	0,55
Peptona de Carne	Shenzhen Ideal Pharmtech Co., Ltd. (IDEAL CHEM GROUP, 2014)	25,00
Ext. de Lêvedo	Affymetrix (AFFYMETRIX, 2014)	39,00
Benzaldeído	Alfa Aesar (ALFA AESAR, 2014)	17,28
$MgSO_4.7H_2O$	Vetec - (SIGMA- ALDRICH, 2014)	11,79
$CaCl_2.2H_2O$	Vetec - (SIGMA- ALDRICH, 2014)	9,98
$Na_2HPO_4.12H_2O$	Sigma-Aldrich (SIGMA- ALDRICH, 2014)	18,65
Ácido Cítrico:	New Directions Aromatics (NEW DIRECTIONS AROMATICS, 2014)	5,63
Antifoam 204	Sigma - Krackeler Scientific (KRACKELER SCIENTIFIC, 2014)	118,00
L-PAC	CMC México – GONG CHANG, 2014)	300

Fonte:https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html, http://www.gongchang.com/Phenylacetylcarbinol_L_Phenyl_Acetyl_Carbinol_L_PAC-dp13517329/

Fazendo um novo levantamento onde levou-se em conta o preço FOB, da sigla em inglês para *Free on Board*, ou seja, quando o frete será feito pelo comprador. Obtivemos os preços expostos na Tabela IX-2.

Tabela IX-2 Preços FOB das Matérias-Primas, Insumos e Produto Final

Produto	Fabricante/ Fornecedor	Preço FOB (US$/Kg)
Glicose	Wuhu Deli Food Co. Ltda	0,5
Açúcar Cristal	BRF S.A.	0,3
Peptona de Carne	Booding Zhongbas Chemical Industry Trading Co	8
Ext. de Lêvedo	Weifang Union Biochemistry Co., Ltd	6
Benzaldeído	ChemFine Intenation Co. Ltd.	3
$MgSO_4.7H_2O$	Dalian CR Science Development Co., Ltd.	0,08
$CaCl_2.2H_2O$	Zibo Hangzheng Chemical Trading Co., Ltd.	0,17
$Na_2HPO_4.12H_2O$	Sichuan Mianzhu Ronghong Chemical Co., Ltd	1,25
Ácido Cítrico:	Weifang Noga Imp And Exp Co., Ltd.	0,76
Antifoam 204	A.M Food Chemical Co.,	5,65
Tolueno	icis	2
L-PAC	CMC México – GONG CHANG	300

Fonte: http://www.alibaba.com
http://www.gongchang.com/Phenylacetylcarbinol_L_Phenyl_Acetyl_Carbinol_L_PAC-dp13517329/
http://www.icis.com/chemicals/channel-info-chemicals-a-z/

Considerando uma planta de produção operando 330 dias por ano (SEIDER *et al.*, 2003), tem-se que o custo anual de matérias-primas (CMP) é US$ 56,636,00 (Tabela IX-4).

Antes de se estimar os custos anuais da produção, é importante estimar o retorno anual de vendas, RV, pois se esse valor não for maior que o custo da matéria-prima, torna-se desnecessário considerar o processo (SEIDER *et al.*, 2003). O RV baseia-se no preço de venda do produto por unidade e na quantidade de produto produzido para venda.

Considerando uma eficiência de extração de 96% tem-se uma produção de 1212,1 g de L-PAC por batelada o retorno anual de vendas (RV) é de US$ 288000,00. Sendo RV maior que o custo anual de matéria-prima (CMP), pode-se considerar que o processo apresenta potencial para ser economicamente viável.

Entretanto ainda é necessário considerar outros custos do processo. O lucro bruto (LB) pode ser calculado pela diferença entre o retorno anual de vendas e o custo anual de produção sem considerar as taxas governamentais (SEIDER *et al.*, 2003). Fazendo-se uma estimativa inicial do lucro bruto, ou seja, calculando o que pode se chamar de lucro bruto inicial (LBI), considerando apenas os custos de matéria-prima, sem levar em consideração os custos de operação da planta, tem-se que a simulação apresentou um LBI de US$ 231363,75 por ano, como pode ser visto na Tabela IX-4.

Tabela IX-3 Lucro bruto inicial para o meio determinado pelo PB.

	Massa (kg/batelada)	**Preço (US$/kg)**	**Custo (US$/batelada)**	**Custo (US$/ano)**
Matérias-Primas				
Glicose	44,230	0,50	22,12	17.515,11
Peptona	2,156	8,00	17,24	13.657,42
Extrato de Lêvedo	1,934	6,00	11,60	9.188,72
Benzaldeído	5,556	3,00	16,67	13.200,77
$MgSO_4.7H_2O$	0,086	0,08	0,01	5,42
$CaCl_2.2H_2O$	0,001	0,17	0,00	0,12
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,996	1,25	3,74	2.965,66
Ácido Cítrico	0,171	0,76	0,13	103,04
Antiespumante Antifoam 204	0,108	5,65	0,61	483,87
Tolueno	0,246	2,80	0,69	545,53
Custo Total de Matérias-Primas			**71,51**	**56.636,25**
Retorno de Vendas				
L-PAC	1,212	300,00	363,64	288.000,00
Lucro Bruto Inicial			**292,13**	**231.363,75**

Considerando que a produção de L-PAC é a mesma substituindo a glicose por açúcar cristal que é uma fonte de carbono mais barata (Custo de 10509,07 U$/ano) o lucro bruto inicial (LBI) é de US$ 238369,79 por ano.

IX.4 *Avaliação Econômica do Processo com Reutilização de Células e Açúcar Cristal*

Para a simulação com reutilização de células, foi considerado que metade das células que saíram do biorreator de produção seriam reutilizadas na fermentação seguinte. O restante das células seria proveniente do mesmo processo de propagação de células. No entanto, para cada etapa (cada biorreator de propagação) utilizou-se metade do volume do projeto de planta original. A partir desse procedimento, seria possível obter a massa inicial de células necessária para o início da produção de L-PAC.

Para o cálculo de massa de matérias-primas e demais insumos, foram somadas as quantidades utilizadas no processo comum e no processo reutilizado as de células. Ou seja, para o processo utilizando 50% das células do processo anterior, considerou-se a metade da massa de matérias-primas utilizada na propagação das células e toda a massa de matérias primas do meio de produção. Por fim, dividiu-se a quantidade por dois. A Tabela IX-2 apresenta os custos das matérias-primas utilizadas no processo.

O retorno anual de vendas (RV) é de US$ 288.000,00, entretanto ainda é necessário considerar outros custos do processo. O lucro bruto (LB) pode ser calculado pela diferença entre o retorno anual de vendas e o custo anual de produção sem considerar as taxas governamentais (SEIDER *et al.*, 2003). Fazendo-se uma estimativa inicial do lucro bruto, ou seja, calculando o que pode se chamar de lucro bruto inicial (LBI), considerando apenas os custos de matéria-prima, sem levar em consideração os custos de operação da planta, tem-se que a simulação apresentou um LBI de US$ 243.706,40 por ano, como pode ser visto na Tabela IX-4.

Tabela IX-4 Lucro bruto inicial para o meio determinado pelo PB com reutilização de células e açúcar cristal.

	Massa (kg/batelada)	Preço (US$/kg)	Custo (US$/batelada)	Custo (US$/ano)
Matérias-Primas				
Açúcar Cristal	39,065	0,30	11,72	9.281,88
Peptona	1,617	8,00	12,93	10.243,07
Extrato de Lêvedo	1,734	6,00	10,41	8.241,69
Benzaldeído	5,556	3,00	16,67	13.200,77
$MgSO_4.7H_2O$	0,093	0,08	0,01	5,87
$CaCl_2.2H_2O$	0,001	0,17	0,00	0,12
$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,241	1,25	4,05	3.208,72
Ácido Cítrico	0,185	0,76	0,14	111,48
Antiespumante Antifoam 204	0,134	5,65	0,76	599,62
Tolueno	2,301	2,80	6,44	5.102,70
Custo Total de Matérias-Primas			**55,93**	**44.293,60**
Retorno de Vendas				
L-PAC	1,212	300,00	363,64	288.000,00
Lucro Bruto Inicial			**307,71**	**243.706,40**

No entanto, é necessário computar os gastos com utilidades, com operadores, etc., para se determinar se o processo é realmente economicamente viável. A Tabela IX-5 apresenta os custos de utilidade do processo descrito no Anexo 2. Utilizou-se apenas eletricidade como utilidade, para um processo em escala industrial seria necessário modificar as operações de forma a reduzir os custos.

Considerando que para cada batelada são necessárias 10 horas e uma planta operando 330 dias por ano, totalizado 792 bateladas por ano é possível calcular o custo anual de utilidades (CUT) US$ 16616,16.

Tabela IX-5 Custos da energia elétrica consumida durante o processo de produção de L-PAC em escala industrial

Operação	Potência do equipamento (kW)	Tempo de utilização do equipamento (h (batelada)-1)	Consumo de energia (kWh)	Custo (US$ (batelada)$^{-1}$)[a]
Esterilização de meios	2,000	0,25	0,5	0,60
Biorreator 1 com aeração	1,773	1	1,8	2,12
Biorreator 1 sem aeração	0,827	2	1,7	1,97
Biorreator 2	0,362	12	4,3	5,19
Biorreator 3	0,145	24	3,5	4,15
Biorreator 4	0,004	12	0,0	0,06
Incubador Agitado	0,650	6	3,9	4,66
Centrifugação	3,730	0,25	0,9	1,11
Centrifugação	3,730	0,25	0,9	1,11
Total- Custo de utilidade por batelada				20,98

a Custo de energia (R$ 0,543 KWh) fornecido pela ANEEL (www.acs.ind.br) no dia 30/12/2014 e convertido para dólar 2,20

Pode-se observar que o CUT para o processo de produção de L-PAC representa, em torno, de 5,76% do RV,

Para estimar os custos de mão de obra, ou seja, os gastos com operadores, pode-se considerar que cada operador de turno trabalha 44 horas por semana e, portanto, são necessários 3,8 turnos por semana (7 dias (semana)-1*24 horas (dia)-1 =168 horas (semana)-1) por operador necessário na planta. Segundo SEIDER *et al*. (2003) devido a licenças, férias, treinamentos, etc. pode-se considerar 4 turnos por semana por operador requerido. Para um processo proposto, pode-se considerar 2 operadores por turno e também um gasto com assistência técnica, baseando-se em um operador por turno (em um turno por semana) com um salário de técnico (R$ 788,00/mês): valor do salário mínimo nacional.

O cálculo do salário completo (salário mais benefícios) de um operador ficou em torno de R$ 1.377,04 por mês (baseando-se nos cálculos da Tabela IX-6), e considerando uma cotação atual para o dólar de R$ 2,20 por US$, na

Tabela IX-7 pode-se calcular que o custo referente aos salários e benefícios anuais (CSB) é US$ 71.004,80 (adaptado de SEIDER *et al*. 2003):

Tabela IX-6 Cálculo do custo Funcionário

Evento	Valor
Salário	R$ 778,00
Vale transporte	R$ 231,00
Desconto vale transporte	(R$ 43,44)
Vale refeição	R$ 0,00
Plano de saúde	R$ 0,00
Outros benefícios	R$ 0,00
Provisão 13º salário	R$ 64,83
Provisão Férias	R$ 64,83
Provisão 1/3 Férias	R$ 21,61
FGTS	R$ 62,24
Provisão FGTS (13º e Férias)	R$ 12,10
INSS (20,00%)	R$ 155,60
Provisão INSS (13º e Férias)	R$ 30,26
Custo Funcionário	R$ 1.377,04

Tabela IX-7 Custos da mão de obra necessária para o processo de produção L-PAC em escala industrial

Mão de obra	N° de operador por turno	N° dos turnos	Tempo de trabalho (horas $(ano)^{-1}$ $(operador)^{-1}$)	Custo por operador (USS h^{-1})	Custo (USS ano^{-1})[a]
Salários e Benefícios	2	4	2112	3,55	59980,80
Assistência Técnica	1	1	2080	1,70	3536,00
Controle de Produção	1	1	2080	3,60	7488,00
Total - Custo anual de mão de obra					**71004,80**

Portanto, é possível obter a folha de custos e ganhos do processo realizado com reutlização de células, como mostra a Tabela IX-8.

Tabela IX-8 Folha de custos e ganhos para o processo de produção de L-PAC em escala industrial

Fator	Custo anual (US$ (ano)-1)
Matéria-prima	44.293,60
Utilidades	166.16,16
Mão de obra	71.004,80
Custo de produção	131.914,56
Gastos gerais	5.760,00
Custo total do produto (CTP)	137.674,56
Vendas (RV)	288.000,00
Lucro Bruto Anual	150.325,44

Com a folha de custos e ganhos é possível observar que o lucro bruto (LB = RV – CTP) é de US$ 150.325,44. Sabe-se que os custos de matéria-prima e utilidades em escala industrial são inferiores aos custos em escala de laboratório, sendo que o custo da importação da matéria-prima, dos insumos e do L-PAC não foram calculados. Os custos com mão de obra também representam um percentual menor do custo total do produto. No entanto, para um processo em escala industrial deve-se considerar outros custos, como custos de manutenção, de depreciação, administrativos, entre outros. Portanto, deve-se considerar uma análise econômica mais precisa em escala industrial para se avaliar o lucro bruto.

X. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

✓ Dentre as vinte duas cepas selecionadas como possíveis produtoras de L-PAC as três melhores foram *S.cer5*, *S.pas1* e *K.mar1*

✓ O benzaldeído deve ser adicionado durante a fase exponencial, para garantir alta concentração de PDC.

✓ Dentre as três melhores cepas, *S.cer5* foi selecionada e apresentou uma produção de L-PAC de 3,05 g/L utilizando concentração inicial de glicose de 61,9 g/L, concentração inicial de células de 4,19 g/L e concentração inicial de benzaldeído de 3,81 g/L. Porém o melhor valor de $Y_{P/S}$ foi obtido em concentrações mínimas de glicose (38,1 g/L), células (1,81g/L) e benzaldeído (3,81 g/L) produzindo 2,76 g/L de L-PAC em 7 h.

✓ Composição do meio determinado por intermédio do planejamento PB-12 foi Glicose 40 g/L; Peptona 5 g/L; Extrato de Lêvedo 10 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 5 g/L; $CaCl_2.2H_2O$ 0,01 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 35 g/L, Ácido Cítrico 2 g/L e Benzaldeído 4 g/L.

✓ O aumento da concentração de L-PAC foi possível aumentando a concentração do biocatalisador para 30 g/L. A maior concentração de L-PAC obtida em frascos agitados foi de 4,92 g/L, utilizando o meio determinado a partir do planejamento PB-12 com 80 g/L de glicose e adição de 6 g/L de benzaldeído após 1,5 h de fermentação.

✓ A produção de L-PAC em biorreator é dividida em duas fases, uma etapa de adaptação onde o sistema é aerado com 1 vvm e 350 rpm e uma fase de biotransformação, na qual ocorreu a adição de benzaldeído e a aeração é cessada a fim de evitar perdas de benzaldeído por evaporação e oxidação. O aumento na concentração inicial de células, ou seja, do biocatalisador de 3,0 g/L para 30 g/L aumentou a produção de L-PAC em aproximadamente 50% (de 3,5 g/L para 5,2 g/L).

- ✓ A utilização do meio determinado por intermédio do PB com o aumento de biocatalisador para 30 g/L aumentou a produção de L-PAC em 100% (de 3,5 g/L para 7,5 g/L).

- ✓ A concentração de nitrato de prata de 10^{-3} g/L apresentou um efeito inibitório sobre ADH aumentando a concentração de L-PAC e inibindo a formação de álcool benzílico;

- ✓ Dentre os solventes testados para extração líquido-líquido, o tolueno apresentou uma extração de 96% do L-PAC e foi selecionado por ser o mais seguro dentre os com boa eficiência de extração.

- ✓ A maior conversão em batelada alimentada intermitente, na qual 7,65 g/L de L-PAC foram produzidos em 7 h de cultivo (Pr)PAC = 1,092g/L.h apresentou um coeficiente de conversão de produto pelo substrato $Y_{P/S}$ igual a 1,086 g de L-PAC/g de benzaldeído com uma eficiência de η= 88,6% sendo a eficiência baseada no $Y_{P/S}$ teórico cujo valor é $Y_{P/S}$ =1,23.

- ✓ A maior conversão em batelada com alimentação continua na vazão de 0,67 mL/min foram produzidos 8,91 g/L de L-PAC em 4 h de cultivo, dS2/dt = 2,67 atingindo o mesmo coeficiente de conversão de $Y_{P/S}$ igual a 1,09 g de L-PAC/g de benzaldeído, mas a produtividade (2,22 g/L.h) foi o dobro da batelada alimentada intermitente.

- ✓ A reutilização de células mostrou ser uma estratégia efetiva uma vez que as células estavam viáveis durante o processo.

- ✓ Com um consumo interno brasileiro de 1 tonelada de efedrina e 10 toneladas de pseudoefedrina por ano, o projeto além de viável possui um grande potencial de lucro o que justifica a implantação de uma planta nacional de produção de L-PAC.

XI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar a minimização do meio de produção retirando a peptona e o ácido cítrico
- ✓ Avaliar o aumento de escala para um volume de 4 litros utilizando dois critério sendo KLa durante a primeira hora e a velocidade periférica da paleta de agitação após a adição de benzaldído.
- ✓ Otimizar a concentração inicial de células, avaliando concentrações entre 3 e 30 g/L.
- ✓ Estudar a ação da betaciclodextrina em concentrações maiores de benzaldeído
- ✓ Determinar a atividade das enzimas álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.; OLMO, M. L. O.; 2014. Potential of some yeast strains in the stereoselective synthesis of (R)-(−)-phenylacetylcarbinol and (S)-(+)-phenylacetylcarbinol and their reduced 1,2-dialcohol derivatives Appl Microbiol Biotechnol v. 98, p. 5901–5913.

AGARWAL, P. K.; UPPADA, V. e NORONHA, S. B.; 2013. Comparison of pyruvate decarboxylases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Komagataella pastoris* (*Pichia pastoris*) Appl Microbiol Biotechnol. v. 97 p. 9439–9449.

AMARAL, P. F. (2007). Produção de Lipase de Yarrowia lipolytica em Biorreator Multifásico. 221. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

ANMAT - Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologia Médica. Controle e Fiscalização de Efedrina e Pseudoefedrina em Especialidades Farmacêuticas. Disponível em: <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/mercosur/agregados/Agreg_IX_Nota_Brasil_Efedrina_Pseudoefedrina.pdf>. Acesso em: Junho de 2014

ANVISA, 2014. dis ANMAT: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/mercosur/agregados/Agreg_IX_Nota_Brasil_Efedrina_Pseudoefedrina.pdf Acesso em Junho de 2014

BECVAROVA, H., HANC, O. e MACEK, K. 1963.Course of transformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae.Folia Microbiologica* v.27, p. 165-169.

BOHN A, KHODAEE M, SCHWENK T, 2003. Ephedrine and Other Stimulants As Ergogenic Aids. Current Sports Medicine Reports v. 2, p. 220–225.

BORZANI, W., SCHIMDELL, W., LIMA, U., & AQUARONE, E. 2001. Biotecnologia Indústria –Engenharia Bioquimica ed. 1, v.2 - . Brasil: Editora Edgard Blucher Ltda.

BRINGER-MEYER, S. e SAHM, H. 1988. Acetoin and phenyl acetyl carbinol formation by pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biocatalysis*, v.4, p. 321-331.

BRUSSE, J., ROOS, E.S. e VAN DER GEN, A., 1988. Bioorganic synthesis of optically active cyanohydrins and acyloins. *Tetrahedron Letters*, v. 29, p.4485-4488.

CARDILLO, R., SERVI, S. e TINTI, C. 1991. Biotransformation of unsaturated aldehydes by microorganisms with pyruvate decarboxylase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 36, p. 300-303.

CHEMICAL INDUSTRY NEWS. (2012). Disponível em: <http://www.39kf.com/my/tag_1_32032a-24892a-24901>. Acesso em: Junho de 2014.

CHEN, A.K., BREUER M., HAUER, B., ROGERS P. L. e ROSCHE, B.2005.pH shift enhancement of *Candida utilis* pyruvate decarboxylase production. *Biotechnology. Bioengineering, v. 92,* n. 2, p.183-188.

CHOW, Y. S., SHIN, H. S. e ADESINA, A. A. 1995 .A kinetic model for the deactivation of pyruvate decarboxilase (PDC) by benzaldehyde. *Biotechnology Letters*. 11, p. 1201-1206.

COSATI, A. C. C. M., GUERRA, R. C. e MAGALHÃES, T. M., 2014. Avaliação econômica e mercadológica preliminar de um bioprocesso para produção de intermediário de fármaco. Projeto Final de Curso - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014.

ELLAIAH, P. e KRISHNA, K.T. 1987 Studies on the production of phenyl acetyl carbinol from benzaldehyde by Saccharomyces cerevisiae. *Indian Drugs v*. 24, p. 192-195.

FUREY, W.; ARJUNAN, P.; CHEN, L.; SAX, M.; GUO, F. e JORDAN, F. 1998 Structure function relationships and flexible tetramer assembly in pyruvate decarboxylase revealed by analysis of crystal structures. *Biochim Biophys Acta*, v. 1385, p.253-270.

GROEGER, D., SCHMAUDER, H.P. e MOTHES, K. 1966 Isolation of L-phenyl acetyl carbinol. *Zeitschrift fuÈr Allgemeine Mikrobiologie*v. 6, p. 275-287.

HISS, H., 2001. Cinética de processos fermentativos. In: SCHIMIDELL,W., LIMA, U. A.; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo. Editora Edgar Blücher Ltda., cap. 6. P. 93-121.

HUBNER, G.; KONIG, S.; SCHELLENBERGER, A. 1998. The functional role of thiol groups of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biomed Biochim Acta*, v.47, p.9-18.

IWAN P, Goetz G, Schmitz S, Hauer B, Breuer M, Pohl M ;2001. Studies on the continuous production of R-(−)-phenylacetylcarbinol in enzyme-membrane reactor. J Mol Cat B Enzymatic v.11, p.387–396.

JACKSON, W.R., JACOB, H.A., MATTHEUS, B.R.,JAYATILAKE, G.S. e WATSON, K.G., 1990, Stereoselective synthesis of ephedrine and related 2-amino alcohols of high optical purity from protected cyanohydrins. *Tetra Lett*, v. 31, n.10, p. 1447-1450.

JAROMIR, C. 1969 L-phenylacetylcarbinol preparation by biochemical methods*. Czech Patent CS*. v. 93, p.627 (C.A.-54: 23180h).

KHAN, T. R. e DAUGULIS, A. J. 2010. Application of Solid–Liquid TPPBs to the Production of L-Phenylacetylcarbinol from Benzaldehyde Using *Candida utilis*, *Biotechnology and Bioengineering*, v.107, n. 4, p. 633-641.

KHAN T. R. e DAUGULIS A. J., 2011. The effects of polymer phase ratio and feeding strategy on solid–liquid TPPBs for the production of L-phenylacetylcarbinol from benzaldehyde using Candida utilis. *Biotechnology Letter*, v. 33, p. 63–70.

KHAN, M. A.; JAVED, M. M. e QADEER, M. A. 2012. Studies on the production of L-phenylacetylcarbinol by *Candida utilis* in shake flask. *Pak. J. Bot*., v. 44, p. 361-364.

KOSTRABY M.M., SMALLRIDGE A.J., TREWHELLA M.A., 2002. Yeast-mediated preparation of L-PAC in an organic media*. Biotech Bioeng* v.77 p. 827–831.

KUMAR, M. R. CHARI, M. A., NARASU, M. L. 2010.Production of L-phenyl Acetyl Carbinol (L-PAC) by different novel strains of yeasts in molasses and sugar cane juice as production medium. *Research Journal of Microbiology*, v.5, n.11, p. 1155-1159.

KUNJAPUR AM e PRATHER KLJ. 2015 Microbial Engineering for Aldehyde Synthesis, Applied and Environmental Microbiology v.81 n. 6, p. 1892 -1901.

LEE, S.S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H.Y., 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, n.11, p.641-649.

LEKSAWASDI, N., BREUER, M., HAUER, B. B. ROSCHE e ROGERS, P.L.2003. Kinetics of pyruvate decarboxylase deactivation by benzaldehyde. *Biocatal. Biotrans*., 21: 315-320

LONG, A. e WARD, O.P. 1989 Biotransformation of benzaldehyde by Saccharomyces cerevisiae: Characterization of fermentation and toxicity of substrate and products. *Biotechnology and Bioengineering* ,v.34, p. 933-941.

LUEDEKING R. e PIRET, E. L., 1959, A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH, Journal of Biochemical and Microbiological Technologyand Engineering v. I, n. 4. p.393–412.

MAHMOUD, W.M., EL SAYED, A.H.M.M. e COUGHLIN R.W. 1990. Production of L-phenyl acetyl carbinol by immobilized yeast cells: I. Batch fermentation*. Biotechnology and Bioengineering*, v.36, p. 47-54.

MANDWAL, A.K., TRIPATHI, C.K.M., TRIVEDI, P.D., JOSHI, A.K., AGARWAL, S.C. BIHARI, V. 2004 Production of L-phenylacetyl carbinol by immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology Letters* v. 26, p. 217–221.

MEYER, D., WALTER, L., KOLTER, G., POHL, M., MÜLLER, M. e TITTMANN, K., 2011. Conversion of pyruvate decarboxylase into an enantio selective carboligase with biosynthetic potential. *J. Am. Chem. Soc.*v. 133, p. 3609–3616.

MIGUEZ, M., NUNES, P., AZEREDO, N., PEDRAZA, S. F., VASCONCELOS, M., VIANA, O., COELHO, M. A. Z. e AMARAL, P., 2012 Selection of yeasts for the production of L-phenyl-acetilcarbinol by biotransformation in shake flasks, *Chemical Engineering Transactions*, v. 27, p. 163-168.

MIRANDA, F. A. A. 2010, Método analítico, análise química, amostragem e estatística. Universidade Estadual do Maranhão disponível em:http://www.ebah.com.br/content/ABAAABcsQAG/metodos-analiticos# acesso em 26/05/2015.

MONTGOMERY, D. C.1999. Design and analysis of experiments. 4th ed. New York: John Wiley e Sons, 704p.

MUJAHID HUSSAIN, IKRAM-UL-HAQ, SIKANDER ALI AND M.A. QADEER, BIOSYNTHESIS OF L-PHENYLACETYLCARBINOL FROM LOCALLY ISOLATED YEASTS Pak. J. Bot., 44(3): 1171-1174, 2012

NAKAMURA, K.; MATSUDA, T. 2002. Reduction Reactions. In: DRAUZ, K.; WALDMANN, H. (Ed). Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, p. 991-1047.

NEUBERG, C. LIBERMANN, L. 1921. Zur kenntnis der carboligase: II. *Mitteilung. Biochemische Zeitschrift*, v. 121, p. 311-325.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I.; BRUNS, R. E. 1995. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora Unicamp, 299p.

OLIVEIRA, A. A. C., SOUSA, T. V. S., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A. Z. EARAUJO, O.Q.F., 2010.Study of morphological and physiological parameters of cultures of *Yarrowia lipolytica* undergone electrochemical stress. *Chemical Engineering Transactions*, v.20, p.133-138.

OLIVER, A. L.; RODDICK, F. A. e ANDRESON, B. N., 1997.Cleaner production of phenylacetylcarbinol by yeast through productivity improvement and waste minimization. *Pure Appl. Chem*. v. 69, p. 2371-2385.

PLACKETT, R.L. e BURMAN, J. P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments.*Biometrika* v. 33, p. 305-325.

PERLINGEIRO, C. A. (2005). *Engenharia de Processos: Análise, Simulação, Otimização e Síntese de Processos Químicos.* São Paulo: Blucher.

RAABO, E. e TERKILDSEN, T.C., 1960. On the enzymatic determination of blood glucose. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 12, p. 402-407.

RISCH, D. H. 2009, Biotransformação do Benzaldeído para produção de L-Fenilacetilcarbinol, Dissertação (Mestrado), Universidade Regional de Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. 2005. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Editora Casa do Pão, Campinas. 325p.

ROGERS, P.L. 1990. ICI Internal Report. Orica Limited, Ascot Vale, Victoria, Australia.

ROGERS, P. L., SHIN, H. S., & WANG, B. (1997). Biotransformation for L-Ephedrine Production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 56*, 33-59.

ROSCHE, B., SANDFORD, V., BREUER, M., HAUER, B., e ROGERS, P. 2001. Biotransformation of benzaldehyde into (R)-phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 309–315.

ROSCHE B, LEKSAWASDI N, SANDFORD V, BREUER M, HAUER B, ROGERS P (2002) Enzymatic (R)-phenylacetylcarbinol production in benzaldehyde emulsions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 94–100.

SEIDER, W.D., SEADER, J.D. e LEWIN, D.R., 2003. Product and process design principles: synthesis, analysis, and evaluation*, John Wiley and Sons*, Inc, 2ª Ed SENGER, C. C. D. 2002, Papel dos minerais como cofatores enzimáticos, Bioquímica do tecido Humano, Pós-graduação em ciências veterinárias da UFRGS, disponível em: http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/minerais.pdf acesso em: 27/05/2015.

SHIN, H. S. e ROGERS, P. L. 1995. Biotransformation of benzeldehyde to L -phenylacetylcarbinol, an intermediate in L -ephedrine production, by immobilized Candida utilis. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 44, p. 7-14.

SHIN, H. S. e ROGERS, P. L. 1996 Production of L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) from Benzaldehyde Using Partially Purified Pyruvate Decarboxylase (PDC). *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 52-62.

SHUKLA, V.B. e KULKARNI, P.R. 1999 Downstream processing of biotransformation broth for recovery and purification of L-phenyl acetyl carbinol (L-PAC). *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 58, p. 591-593.

SHUKLA, V.B. e KULKARNI, P.R. 2000. L -Phenylacetylcarbinol (L -PAC): biosynthesis and industrial applications. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 16, p. 499-506.

SHUKLA, V.B., KULKARNI, P.R. 2001. Process parameters and reusability of the free cell mass of *Torulaspora delbrueckii* for the production of L-phenyl acetyl carbinol (L-PAC). *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 17, p. 301-306.

SHUKLA, V. B., VEERA, U. V., KULKARNI P.R. 2001. Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v.8, p. 19–29.

SHUKLA, V. B., MADYAR, V. R., KHADILKAR, B. M. e KULKARNI, P. R. 2002. Biotransformation of benzaldehyde to L-phenylacetylcarbinol (L-PAC) by *Torulaspora delbrueckii* and conversion to ephedrine by microwave radiation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* v.77, p. 137-140.

SMITH, P.F. e HENDLIN, D. 1953. Mechanism of phenyl acetyl carbinol synthesis by yeast. *Journal of Bacteriology*, v. 65, p. 440-445.

SMITH, P.F. e HENDLIN, D. 1954.Further studies on phenyl acetyl carbinol synthesis by yeast. *Applied Microbiology* v. 2, p. 294-296.SNODGRASS, P.J., VALLEE, B. L., HOCH F. L., 1960. Effects of Silver and Mercurials on Yeast Alcohol Dehydrogenase *The journal of bioloqical chemistry* v. 235, n. 2, p. 504-508

SZEJTLI, J. (1998), Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev*., **98**, 1743-1753

TRIPATHI C.M., AGARWAL S.C., BASU S.K., 1997. Production of L-phenylacetylcarbinol by fermentation. *J Ferment Bioeng* v. 84 p. 487– 492.

TRIPATHI, C.K.M., BASU, S.K., VORA, V.C., MASON, J.R. e PITT, S.J. 1988. Continuous cultivation of yeast strain for biotransformation of L-acetyl phenyl carbinol (L-PAC) from benzaldehyde. *Biotechnology Letters,* v. 10, p. 635-636.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8ª Edição, Editora Artmed, 2005.

UEKAMA, KANETO; HIRAYAMA, FUMITOSHI; IRIE, TETSUMI, 1998, **Cyclodextrin drug carrier systems**In: Chemical Reviews, v. 98, n. 5, p. 2045-2076.

UPPADA, V., BHADURI, S. e NORONHA, S. B., 2014. Cofactor regeneration – an important aspect of biocatalysis*. Current Science*, v. 106, n. 7, p. 946-957.

VITOLO, M. DURANTI, M.A., PELLERGRIM, M. B., 1995. Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact S. cerevisiae cells grows in sugar cane blackskrop molanes. J. Ind. Microbiol, Amsterdam, v. 15

VOET, D.; VOET, J. D. e PRATT, C. W. 2002. Fundamentos de Bioquímica. 1 reimpressão, Porto Alegre: Artmed. 931p.

VOET, J.P., VANDAMNE, E.J. e VLARICK, C. 1973. L-phenyl acetyl carbinol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschrift fuÈr Allgemeine Mikrobiologie,* v. 13, p. 355-365.

VOJTISEK, V. e NETRVAL, J. 1982. Effect of pyruvate decarboxylase activity and pyruvate concentration on the production of 1-hydroxy-1-phenylpropanone in *Saccharomyces carlsbergensis. Folia Microbiologica,* v. 27, p. 173-177.

XUE Y., QIAN C., WANG Z. XU J.H., YANG R. E QI H., 2010. Investigation of extractive microbial transformation in nonionic surfactant micelle aqueous solution using response surface methodology, Appl Microbiol Biotechnol v.85, p. 517–524

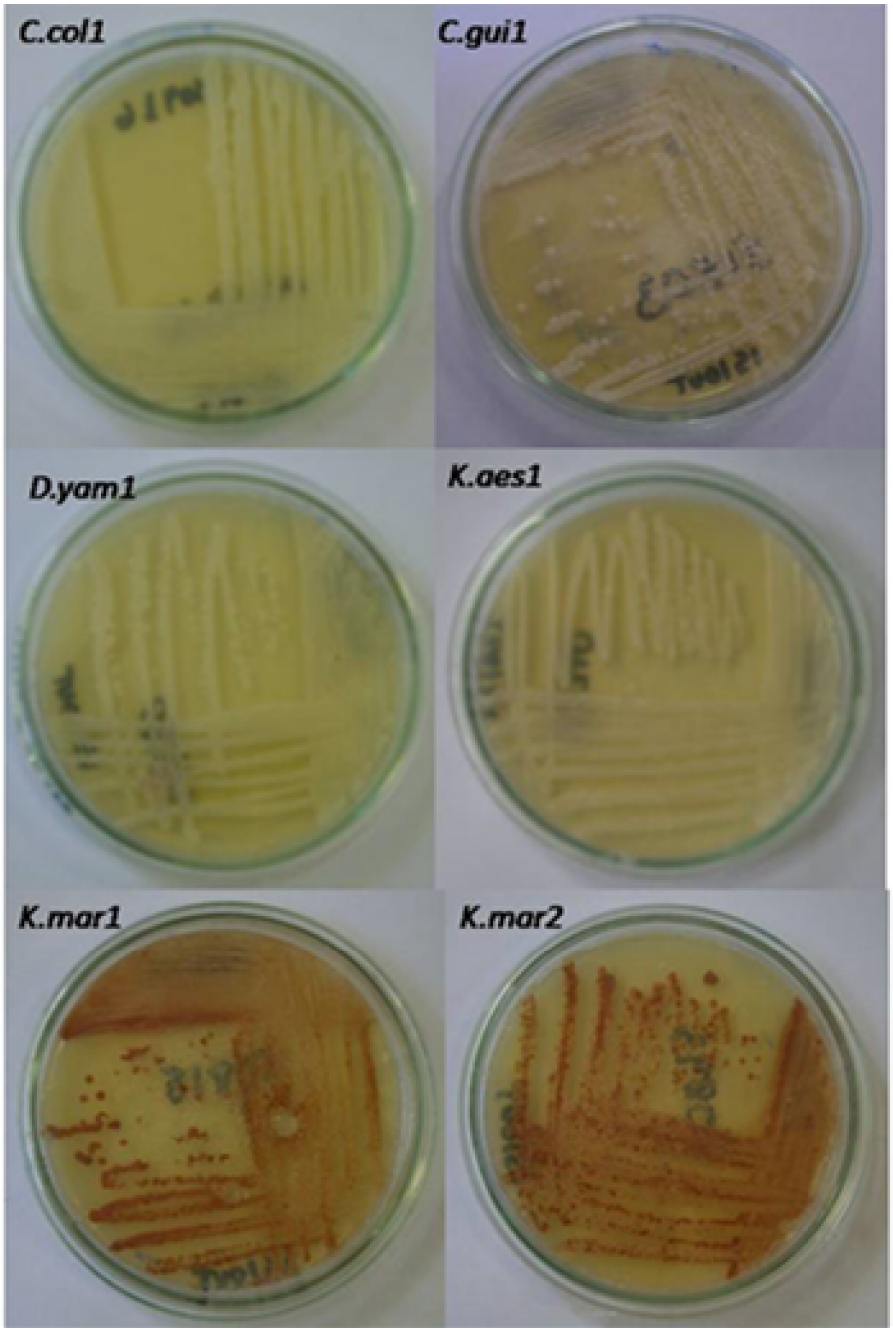
WARD, O. P. e SINGH, A. 2000. Enzymatic asymmetric synthesis by decarboxylases. *Curr Opin Biotech*, v. 11, p. 520-526.

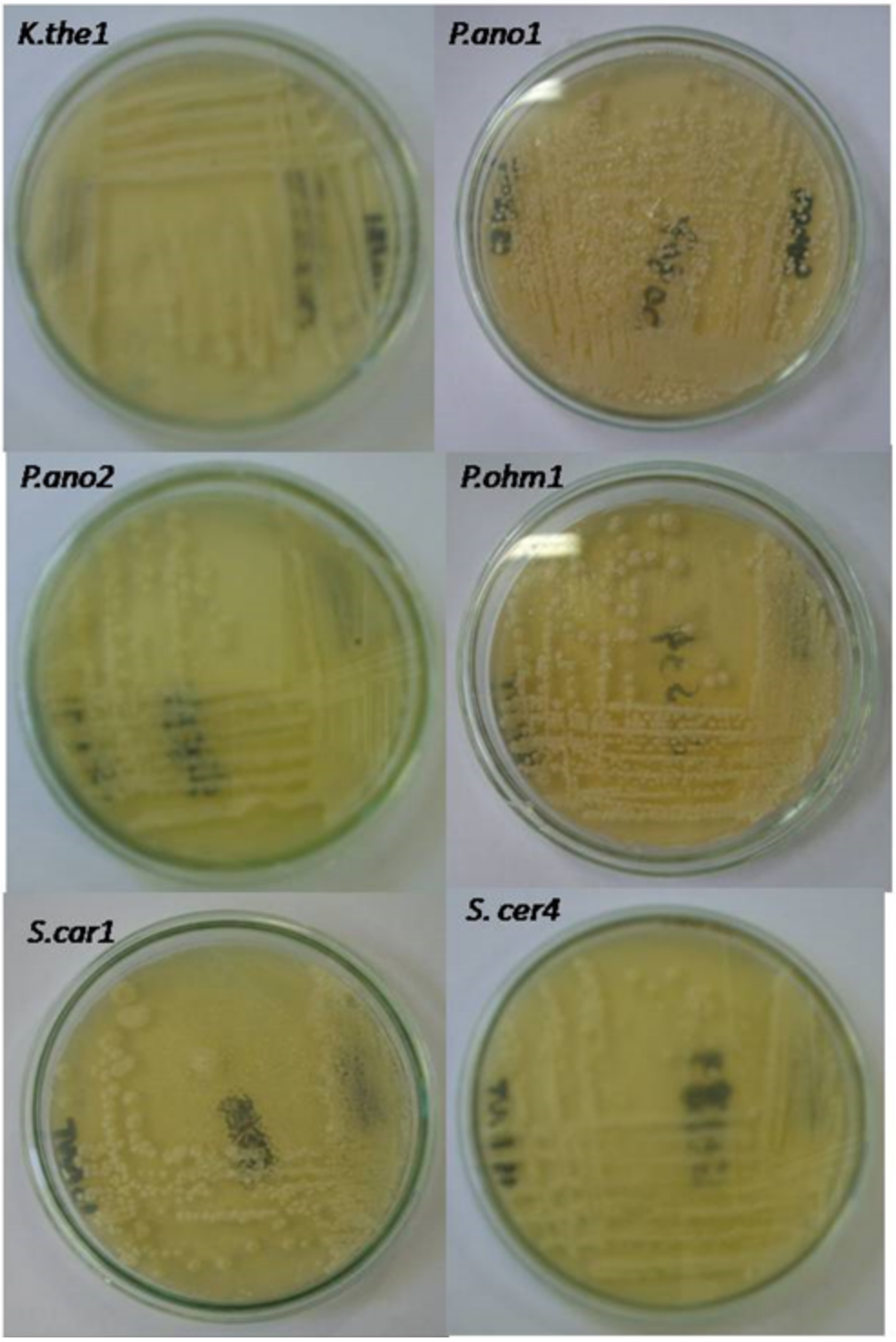
YASHIO, S. 1952.The metabolism of pyruvic acid and carboligatic product. III. The formation and decomposition of phenyl acetyl carbinol by action of yeast. *Journal of the Institute Polytechnic Osaka City University Ser*. v. 2, p. 125-130.

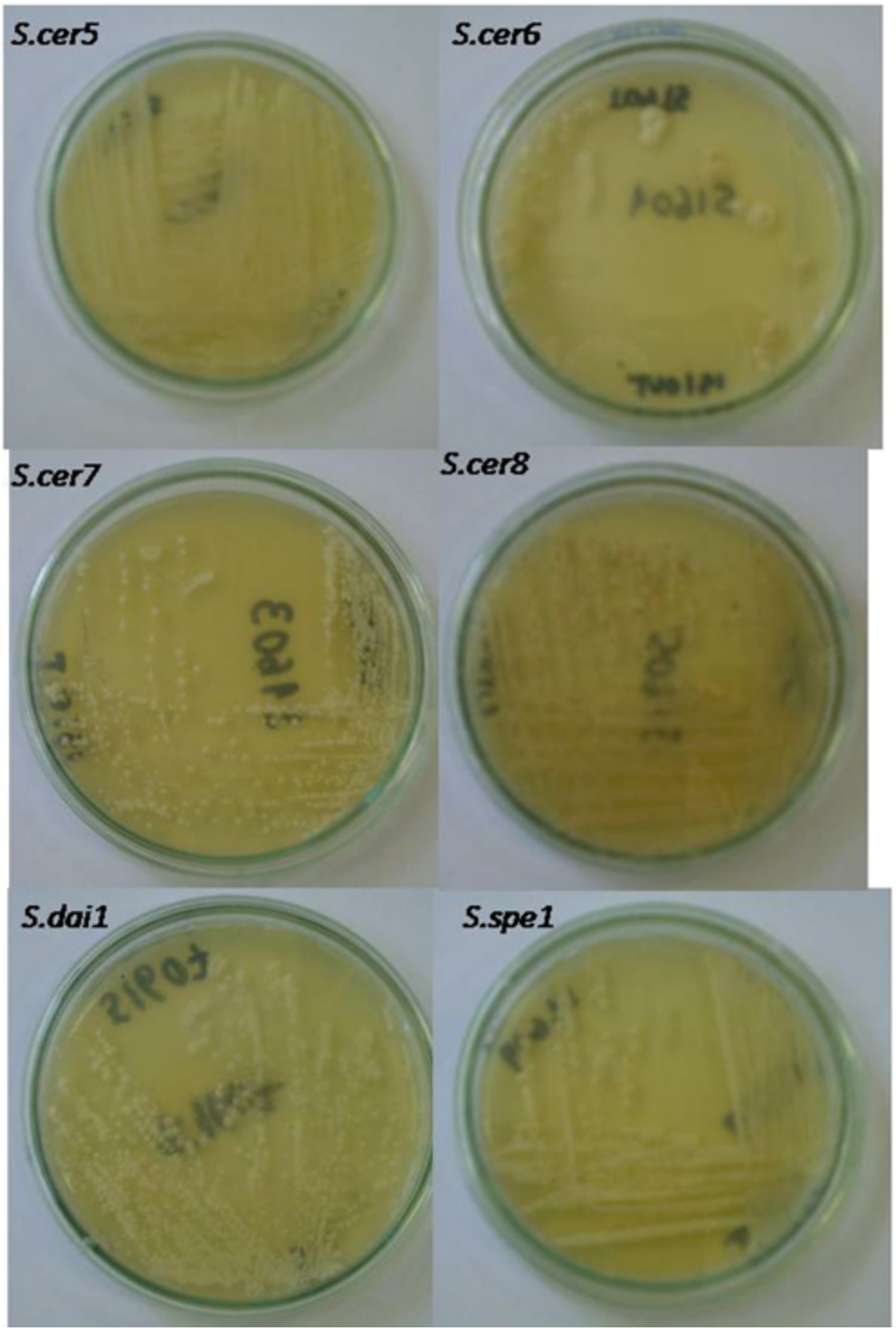
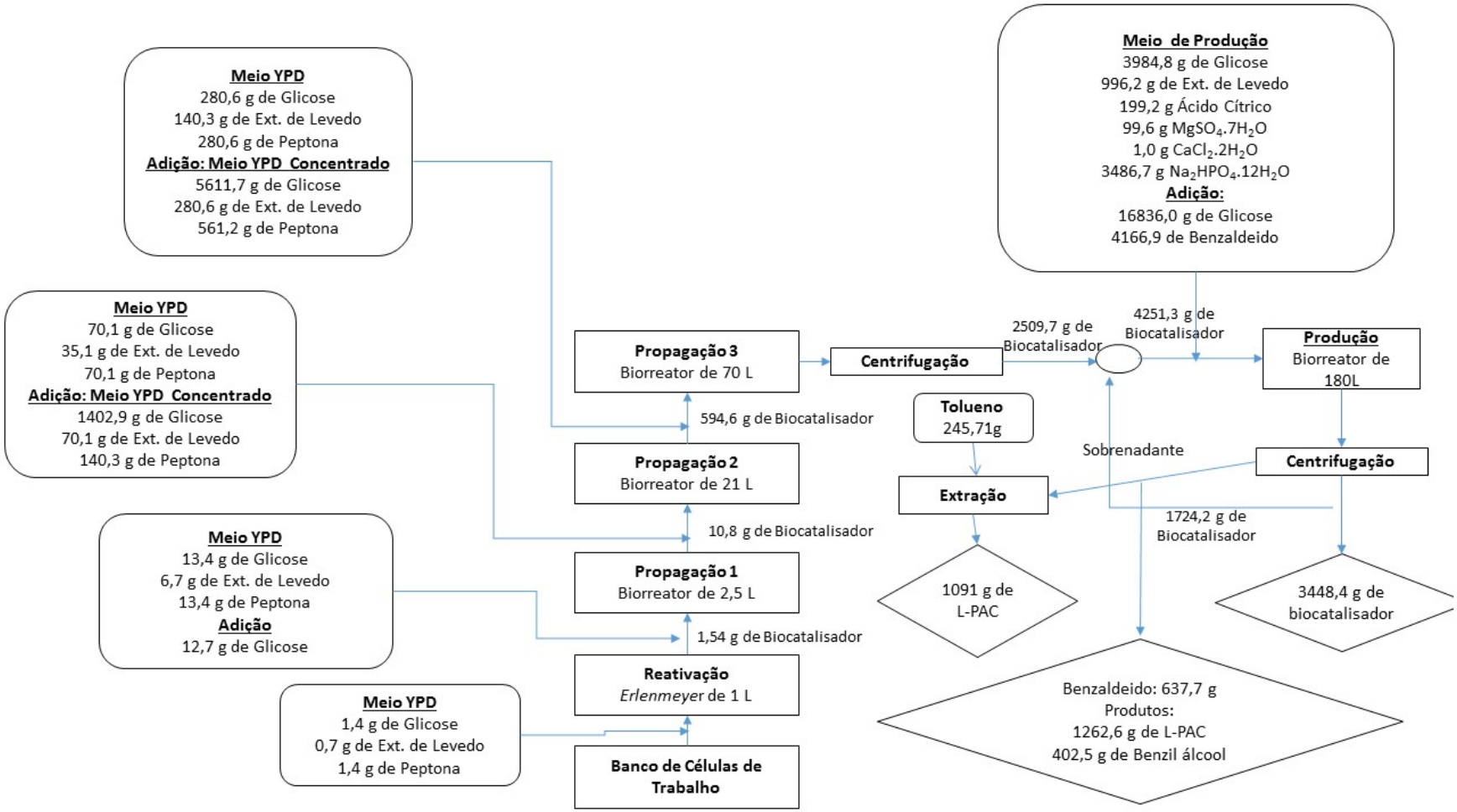
ZHANG W., WANG, Z., WANG, Z., LI, W., ZHUANG, B., QI, H., 2008. Production of L-phenylacetylcarbinol by microbial transformation in polyethylene glycol-induced cloud point system. *Apply Microbiol Biotechnol*, v. 78, p. 233–239.

ZEEMAN, R., NETRVAL, J., BULANTOVA, H. e VODNASKY, M. 1992. Biosynthesis of phenyl acetyl carbinol in yeast *Saccharmyces cerevisiae* fermentation*. Pharmazie* 47, 291-294.

Anexo 1Cepas selecionadas mediante técnica de esgotamento




K.the1
P.ano1
P.ano2
P.ohm1
S.car1
S. cer4


S.cer5
S.cer6
S.cer7
S.cer8
S.dai1
S.spe1

Anexo 2 Fluxograma de produção em batelada alimentada contínua com reutilização de céluas.