

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Fernanda Isii Milesi

Otimização do processo de biotransformação para obtenção do intermediário 15 α -hidroxi-18-metil-estra-4-eno-3,17-diona.

**São Paulo
2011**

Fernanda Isii Milesi

Otimização do processo de biotransformação para obtenção do intermediário 15 α -hidroxi-18-metil-estra-4-eno-3,17-diona.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Data da aprovação ____/____/____

Prof. Dra. Elisabeth F. P. Augusto
(Orientador)
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dra. Elisabeth F. P. Augusto (Orientador)
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Prof. Dra. Luiziana Ferreira da Silva (Membro)
ICB – Instituto de Ciências Biomédicas do Estado de São Paulo

Prof. Dra. Rosane Aparecida Moniz Piccoli (Membro)
LBI – CTPP – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Fernanda Isii Milesi

Otimização do processo de biotransformação para obtenção do intermediário 15 α -hidroxi-18-metil-estra-4-eno-3,17-diona.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Área de Concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais

Orientador: Prof. Dra. Elisabeth F. P. Augusto

São Paulo
Fevereiro/2011

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Departamento de Acervo e Informação Tecnológica – DAIT
do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

M643o

Milesi, Fernanda Isii

Otimização do processo de biotransformação para obtenção do intermediário
15 α -hidroxi-18-metil-estra-4-eno-3, 17-diona. / Fernanda Isii Milesi. São Paulo, 2011.
175 p.

Dissertação (Mestrado em Processos Industriais) - Instituto de Pesquisas
Tecnológicas do Estado de São Paulo. Área de concentração: Desenvolvimento e
Otimização de Processos Industriais.

Orientador: Prof. Dra. Elisabeth F. P. Augusto

1. Biotransformação 2. Fungo 3. *Penicillium raistrickii* 4. Oxigênio 5. Esteróide 6.
Tese I. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Coordenadoria
de Ensino Tecnológico II. Título

11-24

CDU 615.015.4(043)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo a otimização do processo da biotransformação do 18-metil-estra-4-eno-3,17-diona no intermediário 15 α -hidroxi-18-metil-estra-4-eno-3,17-diona, empregando o fungo *Penicillium raistrickii*. Buscou-se o aumento de concentração celular durante a fase de cultivo e a minimização de custos, relacionados à utilização de oxigênio puro, na etapa de bioconversão de esteróide no componente de interesse. O projeto realizou estudos em sistemas de frascos agitados (fernbach de 2800 mL) e biorreator de bancada de 4,5 L, variando-se as concentrações iniciais de glicose (15 a 60 g/L), de água de milho (2,5 a 30 g/L) e de células (0,091 a 2,272 %pcv – *packed cell volume*). Sobre o aumento de concentração celular, durante a fase de cultivo, os resultados apresentados neste trabalho deixam evidente que as alterações nas quantidades de fonte de nitrogênio promoveram um aumento na velocidade específica de crescimento (até 0,114 h⁻¹) e na produtividade em células (até 1,12 %pcv/h) para condição de água de milho a 30 g/L, porém sem um aumento considerável na quantidade de células produzidas ao longo dos ensaios. Já as alterações nas quantidades de fonte de carbono, aplicadas ao sistema, apresentaram tendências inversas, uma vez que à medida que se aumentava a concentração desta fonte notava-se uma diminuição na velocidade específica de crescimento (até 0,096 h⁻¹) e na produtividade em células (até 0,96 %pcv/h) para condição de glicose a 60 g/L. Não foram detectadas variações nas quantidades de células produzidas ao longo dos ensaios, com aumento da fonte de carbono no meio de cultivo. Durante a etapa de biotransformação, a condição que apresentou maior rendimento (94%) foi aquela com máximo enriquecimento do gás de entrada com O₂ puro (0,283 NL/min). Já a conversão de substrato em produto resultou em valores máximos (0,971 g/g) quando se utilizou ar, sem qualquer enriquecimento. A produtividade em produto máxima (0,126 g/L.h) também ocorreu para a mesma condição.

Palavras Chaves: *Penicillium*; meio de cultivo; biotransformação; esteróide; oxigênio dissolvido.

1 INTRODUÇÃO

Os contraceptivos orais atuam como inibidores da fertilidade feminina para determinados fins como controle de natalidade e tratamento de doenças como síndrome dos ovários policísticos e endometriose. Atualmente, o leque de opções existentes, no que se refere a anticoncepcionais, é bastante amplo no mercado brasileiro, envolvendo a combinação ou não de mais de um hormônio com dosagens relativamente baixas, oferecendo ao consumidor final a escolha mais apropriada às suas necessidades.

Devido à diversidade de opções existentes no mercado, além da qualidade do produto final, é relevante considerar na escala de produção fatores como minimização de desperdícios, racionalização e a otimização de recursos, incluindo equipamentos, mão de obra e materiais. Desse modo, pode-se garantir a economicidade do processo, fazendo com que o valor do produto final seja competitivo frente às opções existentes no mercado, sem perder sua qualidade.

A produção de hormônios contraceptivos envolve processos de biotransformação que se resumem a modificações de um componente orgânico em um elemento de interesse, intermediada por reações químicas simples realizadas por microrganismos. São transformações muito comuns em indústrias farmacêuticas para a produção de fármacos. Por se tratar de um fármaco, o produto final obtido durante o processo deve apresentar um alto grau de pureza dentro das especificações exigidas.

No entanto, a produção de hormônios esteróides para obtenção de contraceptivos orais com emprego de microrganismos aeróbios requer uma atenção especial em todos os estágios do processo de fabricação, já que, além de serem manufaturados sob condições assépticas, fatores como composição de nutrientes, viabilidade do microrganismo, potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, agitação e disponibilidade do oxigênio contribuem para a obtenção de um produto final de qualidade e viável economicamente.

O oxigênio, presente em diversos processos fermentativos, é um dos elementos necessários em biotransformações para a produção de hormônios esteroidais que envolvem a utilização de microrganismos aeróbicos.

Dentre os fatores que influem na bioconversão, o oxigênio utilizado no processo, além de puro, precisa estar dissolvido para que os microrganismos possam absorvê-lo. Portanto, o mesmo deve ser injetado constantemente em dosagens adequadas para que a etapa de biotransformação seja eficaz.

Sendo assim, este trabalho visa a otimização do processo de produção do intermediário 15 α -hidroxi-18-metil-estra-4-eno-3,17-diona, conduzido em sistemas de frascos agitado e biorreatores de bancada. Para isso, avaliaram-se os efeitos:

- a) das concentrações de glicose e água de milho sobre o crescimento celular;
- b) de diferentes concentrações de oxigênio puro, utilizado para enriquecer o gás na etapa de biotransformação.

5 CONCLUSÃO

Dos ensaios realizados em incubador rotativo conclui-se que, a concentração inicial de células de 0,568 %pcv é a melhor condição para avaliar comportamento cinético durante o cultivo, especialmente porque permite uma programação de amostragem mais adequada.

O perfil de variação de pH evidencia uma mudança de metabolismo durante o crescimento, marcada inicialmente pela queda de valor de pH (6,0 a 4,5) até aproximadamente o final da fase exponencial e um aumento do pH (4,5 a 6,5) após o final dessa fase. A redução no valor de pH talvez possa ser atribuída à formação de um ácido, mas que até o presente momento isso não está esclarecido. Detectou-se pequena formação de lactato, mas o perfil de sua produção não foi compatível com o perfil de pH observado.

A glicose é consumida e exaure-se em instantes próximos ao final da fase exponencial, sugerindo uma limitação do crescimento em fonte de carbono.

Observou-se a formação de glicerol, com perfis de variação semelhantes nos diferentes ensaios, ou seja, nota-se a formação desse subproduto durante o crescimento, atingindo valores máximos de aproximadamente 2,5 g/L, em momentos próximos ao final da fase exponencial. Seu consumo é observado quando a glicose (fonte de carbono) é exaurida do meio de cultivo.

Quanto maior a concentração da fonte de nitrogênio, medida como concentração de água de milho, maior a velocidade específica de crescimento ($\mu_{X,MAX}$ 0,1139 h⁻¹ para água de milho igual a 30 g/L), porém sem aumento no tempo de fase exponencial.

Observou-se ainda que quanto maior a concentração de fonte de carbono fornecida (glicose igual a 60 g/L), menor a velocidade específica de crescimento ($\mu_{X,MAX}$ de 0,0956 h⁻¹), a conversão de glicose em células ($Y_{X/GLC}$ de 1,553 %mL/mg) e a produtividade em células (π_X de 0,957 %pcv/h), indicando que concentrações elevadas podem ser um fator de inibição durante o cultivo. No entanto, isto não afetou na produção de células, bem como não foi detectada a formação de excedente de subprodutos durante cultivo.

Conclui-se que o O_2 não é fator limitante, já que o aumento da agitação de 150 para 200 rpm não implicou em alterações significativas do crescimento ou das grandezas cinéticas calculadas para o sistema em ensaios em incubador rotativo, nas variações de agitações testadas.

Para os ensaios em biorreator, de um modo geral, glicose é exaurida de maneira semelhante quando comparado aos ensaios realizados em incubador rotativo, ou seja, em momentos próximos ao final da fase exponencial.

O perfil de pH, da mesma forma que para os ensaios em incubador rotativo, indica mudanças no metabolismo celular, com queda de valor nos instantes iniciais do cultivo e aumento do pH após o final da fase exponencial. A redução desse valor, possivelmente, está relacionada à formação de algum ácido, não elucidado até o presente momento.

O glicerol apresenta perfis semelhantes para os ensaios realizados em biorreator ou incubador rotativo, ou seja, sua formação ocorre na fase inicial do cultivo e atinge valores máximo, de aproximadamente 6,0 g/L, em momentos próximo ao final da fase exponencial. Seu consumo é notado quando a glicose é exaurida do meio de cultivo.

A adoção de um valor fixo de k_{La} é indicada para estabelecer uma única condição de transferência de O_2 no interior do biorreator, devido à dificuldade encontrada para monitorar o oxigênio dissolvido.

Em biorreator, a fase de crescimento celular teve os seguintes parâmetros característicos: $0,1110 < \mu_{X,MAX} < 0,2002 \text{ h}^{-1}$; $0,660 < \pi_X < 1,692 \text{ \%pcv/h}$; e $36,4 < \Delta X < 44,0 \text{ \%pcv}$.

Sobre a biotransformação de 18-metil-estra-4-eno-3,17-diona, para 15 α -hidroxi-18-metil-estra-4-eno-3,17diona, conclui-se que o maior rendimento obtido, de 94%, foi para a condição na qual se utilizou a maior vazão de O_2 puro (0,2832 NL/min).

A produtividade em produto foi maior (π_P de 0,131 g/L.h) para os ensaios nos quais não foram utilizados O_2 puro.

Para conversão de esteróide em produto, as variações existentes demonstram que a conversão é melhor ($Y_{P/S}$ de 0,971 g/g) em condições isentas de O_2 puro.