BIOCATÁLISE APLICADA A RESOLUÇÃO CINÉTICA DE FÁRMACOS (IBUPROFENO): ENZIMA-NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONAIS

Francisco Diego Martins da Silva [1], José Erick da Silva Souza [2], José Cleiton Sousa dos Santos [3], Maria Cristiane Martins de Souza [4]

RESUMO

O uso de Lipases do tipo B de Candida Antarctica (CALB) têm despertado interesse industrial devido à alta especificidade ao substrato, enantiosseletividade e por gerar menor impacto ambiental se comparado ao uso de catalisadores químicos convencionais. Tais aplicações têm sido reportadas na literatura como uma abordagem em potencial para reações orgânicas como esterificação assimétrica, hidrólise assimétrica e transesterificação assimétrica. Essas reações são importantes do ponto de vista farmacológico, pois os enantiômeros de algumas drogas demonstram diferentes efeitos terapêuticos. Nesse sentido, o (S)-enantiômero do fármaco ibuprofeno-racemato é 160 vezes mais ativo que o (R)-enantiômero exercendo inibição in vitro da síntese de prostalglandina. Consequentemente, a aplicação do (S)-enantiômero com alta pureza ao invés do racemato-ibuprofeno permite a redução do montante total de droga necessária para alcançar o efeito terapêutico esperado. Para que ocorra a separação enatiométrica dos componentes quirais do fármaco ibuprofeno, foi usada Lipase do tio B de Candida Antarctica imobilizada em nanopartículas magnéticas funcionalizadas. A escolha do biocatalisador foi feita com base na sua enantiosseletividade e estabilidade da atividade enzimática em condições brandas de reação. O intuito deste projeto é analisar a resolução cinética do fármaco iburofeno catalisada por CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas. A estratégia de imobilização enzimática usada neste projeto permite a remoção das partículas do meio reacional e, consequentemente, pode reduzir os custos da reação, o qual é um fator determinante para as indústrias química e farmacológica.

Palavras-chave:

Lipase. Candida Antarctica. Nanopartículas Magnéticas. Ibuprofeno racêmico. Enantiômeros.

[1] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Discente, e-mail: die45silva@gmail.com
[2] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Discente, e-mail: erick@aluno.unilab.edu.br
[3] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Docente, e-mail: jcs@unilab.edu.br
[4] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Docente, e-mail: mariacristiane@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

Lipase do tipo B de Candida antarctica (CALB)

A CALB é uma enzima da família das hidrolases, seu sítio ativo consiste em espaço aonde o substrato se "acopla", nesse mesmo espaço o produto é formado e sua evacuação é procedida. O espaço aonde o substrato se acopla é bastante hidrofóbico com o formato de funil, porém a partes do sitio ativo que tem somente pequenas áreas, o que favorece a não formação de camadas sobrepostas (SOUZA, 2013).
A CALB possui uma especificidade muito vasta, com afinidade reacional alta em condições diferentes (pH, entre outros parâmetros), sendo potencial para várias aplicações em setores industriais (MONTEIRO, 2019).

Imobilização enzimática

Para utilização de enzimas como catalisadores industriais, é necessário a mesma está estável. A estabilidade é alcançada através de métodos de imobilização, que facilitam o reuso do biocatalisador (MONTEIRO, 2019). O método é escolhido a partir dos parâmetros da enzima, custo do procedimento de imobilização e dos reagentes a serem usados (SANTOS, 2011).

Nanopartículas magnéticas de ferro (NPM) (Fe3O4)

As Nanopartículas magnéticas de ferro (NPM), como o prefixo ressaltar, são minúsculas unidades da matéria com 10^{-9} de fator, as NPM são especificamente entre 10 a 20 mm exibem propriedades magnéticas (NETTO et al., 2009).
A separação da enzima imobilizada do bioproduto ou produto, é uma das dificuldades dos métodos de imobilização. A "junção" das enzimas com nanopartículas magnéticas (NPMs) de ferro facilidade a retirada do biocatalisador enzimático do bioproduto ou produto por atração eletromagnética, a separação magnética pode ser vista na imagem abaixo, possibilitando reutilização do biocatalisador (SOUZA et al., 2017).

Imagem 1 - Ferrofluido formado por partículas magnéticas diluídas em água.

Fonte: Francisquine et al., 2014.

METODOLOGIA

Materiais

Nanopartículas magnéticas de ferro (NPM) (Fe3O4) foram produzidas pelo método de co-precipitação. Lipase de Candida antarctica do tipo B (CALB) foi adquirida da Codexis (Redwood, USA). A CALB imobilizada em resina acrílica (Novozym® 435), Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Coordenação de Pesquisa polietilenoimina (PEI), solução de glutaraldeído grau II 25% (m/v) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os demais reagentes de grau analítico foram obtidos da Synth (São Paulo,Brasil) e Vetec (São Paulo, Brasil).

Síntese de nanopartículas magnéticas e funcionalização com polietilenoimina

A síntese de nanopartículas magnéticas (NPM) de Fe3O4 e funcionalização com polietilenoimina (PEI) foram formadas em duas etapas, utilizando um banho ultrassônico (Unique Inc., modelo USC 2800A, Brasil) com

frequência de 40 kHz e potência de 220 W. Inicialmente, duas soluções foram preparadas. A primeira foi uma solução de sais de ferro (Solução A) e a segunda, uma solução aquosa de PEI (Solução B). A solução A foi composta por 1,16 g de $FeSO4 \cdot 7H2O$ e 1,85 g de $FeCl3 \cdot 6H2O$ dissolvido em 15 mL de água deionizada, enquanto que B foi constituída por 1,0 g de PEI em 4,0 mL de água deionizada (NETTO et al., 2009). Para remover o excesso de $NH4OH$ e de agente de funcionalização, as NPMs resultantes foram lavados várias vezes com água destilada. Então, as NPMs foram dispersas em água destilada e centrifugados por 10 min e 3000 rpm para remover as NSPMs fracamente funcionalizados. Finalmente, NPM@ PEI foram secas sob vácuo.

Reticulação com glutaraldeído

NPM (0,01g) foram suspendidas em solução 25% (m/v) de glutaraldeído na proporção de 2,5 (solução (mL) /suporte (g)) (BEZERRA et al., 2017). A mistura foi mantida sob agitação (45 rpm) por 2 horas à 25 °C. Finalmente o suporte foi lavado com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,0 para remover o excesso de glutaraldeído (SOUZA et al., 2017).

Imobilização

O processo de imobilização foi realizado pelo contato de 0,01 g de nanopartículas (tratada por EPI e reticulada com solução de glutaraldeído) com 0,5 mL de solução tampão de bicarbonato de sódio, 100 mM, pH 10,0. O sistema foi mantido sob agitação controlada: 20-45rpm (agitação rotacional) e 20-250 rpm (agitação orbital). A enzima CALB imobilizada foi removida da solução por magnetismo (SOUZA et al., 2017).

Condições cromatográficas

A fase móvel foi composta por n-hexano/2-propanol/ácido acético (99,6/0,4/0,15 v/v/v) a uma vazão de 1 mL/min. A coluna cromatográfica do HPLC usada foi a The Lux Cellulose-1 (4.6 mm × 250 mm × 5 µm). O processo cromatográfico foi operado a 25 °C e a detecção por luz UV foi obtida usando um comprimento de onda de 254 nm (SIÓDMIAK et al.,2015).

Esterificação do (R,S)-ibuprofeno catalisada por CALB-NPM

A reação foi performada em tubos plásticos de 2 mL. A mistura de reação foi composta por hexano (700 µL), ibuprofeno racêmico (8,25 mg) e 1-propanol (9 µL). A reação foi iniciada pela adição desta solução nos tubos contendo 0,01g de biocatalisador (CALB-NPM). A suspensão foi incubada a 37 °C, agitada (600 rpm) durante 60 horas em um termomisturador. Amostras (50 µL) foram retiradas nos tempos de 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas. O sobrenadante coletado (25 µL) foi dissolvido em 0,7 mL de fase móvel em HPLC (MARSZAll et al.2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a caracterização das nanopartículas de $Fe3O4$ e do biocatalisador enzima-nanopartículas, foi realizada a esterificação catalisada por lipase-nanopartículas do ibuprofeno (R, S). Como pode ser visto na tabela 1, quando se utiliza Novozym® 435, há conversões acima de 50% nas primeiras 24 horas de reação, mostrando que a lipase comercial é uma interessante catalisadora, capaz de separar a enantiômeros a partir do substrato racêmico. Os resultados obtidos para o catalisador enzima-nanopartícula não foram comparáveis ao biocatalisador comercial, novos ensaios estão sendo realizados. O efeito do tempo de armazenamento do biocatalisador pode ter influenciado no resultado.

Tabela 1 - Resultados para a reação catalisada por enzimas imobilizadas em suporte comercial e nanopartículas.

CONCLUSÕES

O presente trabalho realizou uma análise de biocatalisadores enzimáticos imobilizados em nanopartículas magnéticas, no caso entre CALB imobilizada em resina acrílica (Novozym® 435) e a CALB imobilizados em nanopartículas magnéticas de ferro. A CALB imobilizada em resina acrílica teve conversão em esterificação já considerável em 24 horas. A CALB imobilizados em nanopartículas magnéticas de ferro não foram compatíveis, possível causador dá baixa conversão tenha sido o tempo que a mesma ficou armazenada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro das Agências Brasileiras de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (FUNCAP) (BP3-0139-000005.01.00/18) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq) projetos 422942/2016-2 e 409058/2016-5.

REFERÊNCIAS

BEZERRA, R.M. et al. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. Biochemical Engineering Journal, [s.l.], v. 125, p.104-115, set. 2017.

FRANCISQUINE, E.; SCHOENMAKER, Jeroen; SOUZA, José Antonio. Nanopartículas magnéticas e suas aplicações. Química Supramolecular e Nanotecnologia, p. 269, 2014.

MARSZAll, Michal Piotr et al. Immobilization of Candida rugosa lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (R,S)- ibuprofen. Catalysis Communications. Bydgoszcz, p. 80-84. 05 jul. 2012.

MONTEIRO, R. R. C., Estudo termodinâmico da produção de aromas via nanobiocatalisador enzimático. 2019. 62f. Tcc - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Acarape, 2019.

NETTO, Caterina GCM; ANDRADE, Leandro H.; TOMA, Henrique E. Enantioselective transesterification catalysis by Candida antarctica lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. Tetrahedron: Asymmetry, v. 20, n. 19, p. 2299-2304, 2009.

SANTOS, J. C. S. Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluídos supercríticos. 102 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SIÓDMIAK, Joanna et al. Application of green chemistry in decreasing adverse effect of (R, S)-ibuprofen. Medical Research Journal, v. 3, n. 2, p. 55-61, 2015.

SOUZA M.C.M. Imobilização de Lipase de Candida Antarctica do Tipo B em Nanopartículas Magnéticas Visando a Aplicação na Síntese de Ésteres. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/ Ceará, 2013.

SOUZA, M.C.M. de et al. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from Candida antarctica immobilized on magnetic nanoparticles. Brazilian Journal of Chemical Engineering, [s.l.], v. 34, n. 3, p.681-690, jul. 2017. FapUNIFESP (SciELO).