BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS SUPORTADOS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA USO NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DO FÁRMACO IBUPROFENO (OPTICAMENTE ATIVO)

JosÉ Erick da Silva Souza [1], Maria Cristiane Martins de Souza [2]

RESUMO

O uso de Lipases de Candida antarctica do tipo B (CALB) têm despertado interesse industrial devido à sua especificidade ao substrato, sua enantiosseletividade e por gerar menor impacto ambiental se comparado ao uso de catalizadores químicos convencionais. Tais aplicações têm sido reportadas na literatura como uma abordagem em potencial para reações orgâniccas como esterficação 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 racêmico (objeto de estudo deste projeto) é 160 vezes mais ativo que o (R)-enantiômero exercendo inibição in vitro da síntese de prostalglandina. Consequentemente, a aplicação do (S)-enantiômero puro ao invés do ibuprofeno racêmico permite a redução do montante total de droga necessária para alcançar o efeito terpêutico esperado. Para que ocorra a separação enatiométrica dos componentes quirais do fármaco ibuprofeno, foi usada Lipase de *Candida antarctica* do tipo B imobilizada em nanopartículas magnéticas. A escolha do biocatalisador foi feita com base na sua entiosseletividade 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. Nanopartículas magnéticas. Imobilização . Ibuprofeno racêmico . Resolução cinética .

[1] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável , Discente, e-mail: erick@aluno.unilab.edu.br
[2] Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável , Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Docente, e-mail: mariacristiane@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por substâncias opticamente puras das indústrias farmacêutica e química pode ser explicada por dois motivos: (i) a atividade bioquímica e biológica geralmente está associada a apenas um dos enantiômeros; (ii) o enantiômero indesejado é considerado impureza e potencializa os efeitos colaterais no uso da substância racêmica. Considerando o ibuprofeno, apenas o (S)-enantiômero é conhecido por sua atividade biológica. Tabulações anteriores mostraram que o (S)-enantiômero é 160 vezes mais eficaz que o (R)-enantiômero. Nesse sentido, existem muitos métodos pelos quais é possível obter enantiômeros opticamente puros, isto é, cromatografia, síntese assimétrica e cristalização. Mas essas técnicas geralmente são caras e, portanto, é necessário desenvolver outra estratégia. Os processos biotecnológicos oferecem alternativas economicamente e ambientalmente mais interessantes para obter tais compostos opticamente ativos. Uma dessas alternativas é o uso de lipases para a resolução cinética desses compostos. Neste trabalho, foi estudado o desempenho da lipase B covalentemente imobilizada de *Candida antarctica* em nanopartículas magnéticas na resolução enzimática de ésteres racêmicos de ibuprofeno.

Lipases produzidas por *Candida sp*. são enzimas bem estabelecidas para fins de biocatálise, especialmente Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (Dominguez de Maria, *et al*., 2005). A CALB foi estudada para possíveis aplicações nas indústrias alimentícia, detergente, farmacêutica, têxtil, cosmética, de papel e oleoquímica (Hasan, Shah & Hameed, 2006). Essas aplicações são possíveis devido à sua ampla gama de especificidade para substratos, alta atividade sob condições de reação leves, estabilidade contra solventes orgânicos, alta estabilidade térmica e pH e estereoespecificidade (Rodrigues, Mendes, Adriano, Gonçalves e Giordano, 2008; McCabe, Rodger , & Taylor, 2005; Deng, Fang, Liu & Yu, 2011).

Os materiais magnéticos nanoestruturados podem ter um grande interesse como suporte para imobilizar enzimas, pois podem evitar problemas de difusão e permitir a atividade contra substratos insolúveis ou muito grandes e podem ser recuperados mesmo se o substrato for uma suspensão contendo alguns sólidos. Dependendo da metodologia de produção. Como principal desvantagem, a enzima é exposta ao meio e as enzimas podem ser inativadas por processos intermoleculares, necessitando do processo de imobilização para que não seja desnaturada durante a reação na qual se propõe a catalisar. Além disso, as nanopartículas magnéticas exibem o fenômeno do superparamagnetismo, ou seja, não permanecem magnetizadas após a ação do campo magnético, oferecendo a vantagem de menor risco de agregação de partículas e que, ademais, possibilita a separação do complexo enzimático do meio reacional (Ruiz-Hernandez, Lopez-Noriega, Arcos & Vallet-Regì, 2008). As nanopartículas magnéticas, usadas em aplicações biológicas, geralmente são feitas de materiais biocompatíveis, como a magnetita (Shaw, Chen, Ou, & Ho, 2006). Essas propriedades permitem seu uso eficiente como portadores de enzimas (Ashtari et al., 2012; Tran, Chen, & Chang, 2012; Andrade, Rebelo, Netto, & Toma, 2010; Netto, Andrade, & Toma, 2009; Kim, Youn, & Shin, 2006; Bai, Guo, Liu & Sun, 2006). Os biocatalisadores (enzimas nanopartículas) são fáceis de recuperar por um campo magnético, o que pode otimizar o custo operacional e aumentar a pureza dos produtos (Jiang, et al., 2009).

Neste trabalho, foi avaliada a imobilização do CALB em nanopartículas de ferro magnético. Foi abordada a influência das condições operacionais, como velocidade de agitação, carga enzimática, tempo de contato e presença de aditivos durante a imobilização. O biocatalisador foi testado na resolução enzimática de ésteres racêmicos de ibuprofeno. Os resultados obtidos com CALB imobilizado em nanopartículas de ferro magnético foram comparados com resina acrílica lipase de *Candida antartica* tipo B (Novozym® 435).

METODOLOGIA

Materiais

Os reagentes químicos para este estudo são $FeCl_3.6H_2O$ (99% granulado puro), FeSO4.7H2O (99% granulado puro) e solução de amônia a 30%. A lipase da Candida antartica (CALB) referida como Lipozyme CALB L® foi adquirida da Codexis (Redwood, EUA). A resina acrílica lipase de Candida antartica tipo B (Novozym® 435), aminopropiltrietoxissilano (APTS), solução de glutaraldeído Grau II 25% (m/v), butirato de p-nitrofenil (pNPB) e p-nitrofenol (pNP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Todos os outros reagentes (grau

analítico) foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil) e Vetec (São Paulo, Brasil).

Sínese de nanopartículas magnéticas e funcionalização com Polietilenoimina (PEI)

A síntese de nanopartículas magnéticas (NPM) de Fe_3O_4 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 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1,85 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ dissolvido em 15 mL de água deionizada, enquanto que B foi constituída por 1,0 g de PEI em 4,0 mL de água desionizada. Para remover o excesso de NH_4OH 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 NPMs fracamente funcionalizados. Finalmente, NPM@ PEI foram secas sob vácuo.

Reticulação com glutaraldeído

NPM (0,01g) foram suspendidas em solução garu II 25% (m/v) de glutaraldeído na proporção de 2,5 (solução (ml)/suporte (g)). 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.

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.

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.

Esterificação do (R,S)-ibuprofeno catalisado 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 biocatalizador (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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram interpretados por meio de cromatogramas que mostram o excesso enantiomérico do produto, a conversão e a enantioseletividade do biocatalizador. Por hora, foi conseguido os resultados apenas das reações nas quais foram usadas a CALB comercial. A CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas, que já tinha sido utilizada em reações anteriores, usada na esterificação do ibuprofeno apresentou instabilidades e, por consequência, não apresentou resultados satifatórios. Portanto, fez-se necessário repetir a reação, e posterior análise, usando uma enzima recém imobilizada. Contudo, ainda espera-se esses novos resultados para a concluisão da análise.

CONCLUSÕES

Os resultados da pesquisa ainda estão sendo analisados e computados devido a falta do equipamento HPLC (Cromatografia Liquida de Alta Eficiência, traduzindo), necessário à todas as analíses, na Univesidade. Os resultados finais, portanto, ainda estão subjugados ao equipamento da UFC.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro das Agências Brasileiras de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) (BP3-013--000005.01.00/18), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) projetos422942/2016-2 e 409058/2016-5. Assim como ao programa PIBIC/UNILAB.

REFERÊNCIAS

AGOSTINO, Paola Serena D'. Synthesis and bio-functionalization of nanoparticles for biosensing and biorecognition. 2009. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Médico de Pesuisa, Università Degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena e Reggio Emilia, 2009.

CARVALHO, Patrícia de Oliveira; CONTESINI, Fabiano Jares; IKEGAKI, Masaharu. ENZYMATIC RESOLUTION OF (R,S) -IBUPROFEN AND (R,S)-KETOPROFEN BY MICROBIAL LIPASES FROM NATIVE AND COMMERCIAL SOURCES. Brazilian Journal Of Microbiology. São Paulo, p. 329-337. 19 maio 2006.

COSTA, Valentim Emilio Uberti; AMORIM, Hermes Luís Neubauer de. O EMPREGO DE LIPASES COMO AGENTES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ENANTIÔMEROS EM SÍNTESE ORGÂNICA: ASPECTOS GERAIS SOBRE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE. Química Nova, Porto Alegre, v. 6, n. 22, p.863-873, 6 jan. 1999.

FERRAZ, Humberto Gomes. Comprimido de ibuprofeno: formulação e avaliação de perfil de dissolução. 1993. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

HENKE, Erik et al. Lipase-Catalyzed Resolution of Ibuprofen. Monatshefte FuÈ R Chemie. Greifswald, p. 633-638. out. 2000.

IKEDA, Yuko; KUROKAWA, Youichi. Enantioselective Esterification of Racemic Ibuprofen in Isooctane by Immobilized Lipase on Cellulose Acetate-Titanium Iso-Propoxide Gel Fiber. Journal Of Bioscience And Bioengineering. Sendai, p. 98-100. 24 out. 2001.

KIM, Min Gon; LEE, Sun Bok. Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen by Lipase-Catalyzed Esterification Reaction: Effects of Water Content and Solid Supports. Journal Of Fermentation And Bioengineering. Pohang, p. 269-271. 20 dez. 1995.

LEE, Won Hee et al. Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen Esters: Effects of Organic Cosolvents and Temperature. Journal Of Fermentation And Bioengineering. Pohang, p. 613-615. 14 set. 1995.

LIU, Ying; WANG, Fang; TAN, Tianwei. Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from Candida sp. in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Beijing, p. 126-130. 16 mar. 2008.

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.

MUSTRANTA, A. Applied Microbiology Biotechnology Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. p. 61–66, 1992.

RAVELO, Marianela et al. Synthesis and bio-functionalization of nanoparticles for biosensing and biorecognition. The Royal Society Of Chemistry. Madrid, p. 1-13. jul. 2016.

SIÓDMIAK, Tomasz; ZIEGLER-BOROWSKA, Marta; MARSZAll, Michal Piotr. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen. Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Bydgoszcz, p. 7-14. 22 abr. 2013.

YON, Lau Sie et al. Enzymatic Deracemization of (R,S)-Ibuprofen Ester via Lipasecatalyzed Membrane Reactor. Industrial & Engineering Chemistry Research. Sarawak, p. 9941-9453. 13 jun.