



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Estudos de imobilização em poliuretano com o fungo endofítico *Stemphylium lycopersici* de *Humiria balsamifera* Aubl. na resolução cinética de aminas quirais de interesse farmacêutico

Maria S. R. Queiroz¹, Nádia L. Nyara⁴, Brener de S. Gomes¹ (IC), Eunice Valduga⁴,
Larissa Zambe Pinheiro¹, Rodrigo O. M. A. de Souza², Jamile Zeni⁴, Rogério M.
Dallago⁴, Denise O. Guimarães³, Ivana C. R. Leal¹

¹Laboratório de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos (LaProNEB)-CCS-UFRJ

²Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica (BOSS Group)- IQ- UFRJ

³Laboratório de Produtos Naturais (LaProN)-UFRJ – Polo Macaé

⁴Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI

Email: msandrarq@yahoo.com.br

RESUMO

*Estudos de imobilização com o microrganismo **Stemphylium lycopersici** foram conduzidos para a avaliação de sua capacidade na realização de resolução cinética de aminas quirais. Nesse contexto, obtivemos resultados promissores tanto nos estudos de imobilização por adsorção em poliuretano, quanto para a imobilização in situ no mesmo suporte. Foram alcançados excesso enantiomérico de 99% e taxas de conversão de 49% para rac-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilamina.*

Palavras-chave: Endofítico, aminas quirais, poliuretano, imobilização.

INTRODUÇÃO

Estudos evidenciam a atividade enantiosseletiva em reações de ω -transaminação de microrganismos de ambientes diversos para a produção de blocos de aminas enantiomericamente puras (Clay, 2010). O presente trabalho apresenta como principal objetivo a descoberta de novos biocatalisadores a partir do aparato quimio-enzimático presente na microbiota da Restinga de Jurubatiba. Para tanto, foi realizada a avaliação da capacidade de resolução cinética de aminas quirais de importância farmacêutica com células fúngicas de *Stemphylium lycopersici*, a saber: liofilizadas, imobilizadas e também com o extrato bruto enzimático obtido após ensaios de precipitação do seu cultivo. Destaca-se que o microrganismo foi isolado, como endofítico, da espécie vegetal *Humiria balsamifera* Aubl. coletada no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil (Queiroz, 2015). Entre os suportes adequados para a imobilização de biocatalisadores, os poliuretanos (PU's) vêm se destacando como uma matriz promissora para imobilizar não somente enzimas, mas também biomassa microbiana (células íntegras) (Cadena, 2010). Além disso, o processo de imobilização apresenta a vantagem de dar mais estabilidade ao biocatalisador, facilitando sua separação do meio reacional, acarretando economias operacionais (Carvalho, 2006). No



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

presente trabalho foram abordados dois métodos de imobilização: adsorção ao suporte (PU-ADS) e incorporação ao suporte (PU)

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do liofilizado, extrato bruto enzimático e solução de esporos: Para a obtenção da solução de esporos o microrganismo foi cultivado em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio BDA (batata dextrose ágar). O microrganismo foi crescido por 7 dias, à temperatura de 30 °C. As culturas foram raspadas com pérolas de vidro e os esporos foram contados em câmara de Neubauer (Kasvi). Foi possível obter uma solução de $2,25 \times 10^8$ esporos/mL. 3 ml de solução de esporos foram adicionados em erlenmeyers de 150 mL contendo 6 mL de meio pré-fermentativo (10 g de extrato de malte (Himedia), 10 g de dextrose (Himedia), 5 g de Triptona (Kasvi) e 3 g de extrato de levedura (Himedia) para 1 L de água destilada. O pH foi ajustado para 6,2 com ácido clorídrico. A pré-cultura foi incubada sob agitação de 120 rpm, 30 °C, por 5 dias. As massas miceliais obtidas foram totalmente inoculadas com 10 mL de meio fermentativo Czapek modificado, o qual continha 25 g de sacarose (Vetec), 2 g de nitrato de sódio (NaNO_3) (Vetec), 1 g fosfato de potássio (KH_2PO_4) (Vetec), 0,5 g sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec), 0,5 g cloreto de potássio (KCl) (Vetec), 0,01 g de sulfato de ferro hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec) e água destilada suficiente para completar 1 L. O pH foi ajustado para 5,5 com ácido clorídrico (HCl) (Hilário et al, 1998). Após 48 horas de cultivo, as massas miceliais foram lavadas em tampão fosfato e liofilizadas. Já alguns cultivos foram deixados durante 7 dias para precipitação com sulfato de amônio e a ressuspensão foi feita em tampão fosfato (pH=7).

Imobilização: O procedimento de imobilização de células de *Stemphylium lycopersici in situ* em suporte rígido de poliuretano (PU) foi realizada de acordo com Nyari e colaboradores (2015), adicionando 20 % de solução de esporos e extrato bruto enzimático 10% e 20% (teor de proteínas de $2,17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 20 % (v/v) em tampão fosfato (pH 7,0) ao monômero poliálcool poliéter (6 mL = 60 %). Após homogeneização, adicionou-se o isocianato (tolueno diisocianato - TDI) (4 mL = 40 %) ao recipiente de polietileno (copo plástico), o qual foi agitado com auxílio de um bastão de vidro por cerca de 5 minutos, deixando a espuma expandir por 5 minutos. Após a expansão da espuma e completa solidificação do imobilizado, é deixado em repouso por 24 horas e, a seguir, triturado e, assim, realizada a medida de atividade enzimática. A espuma sem enzima foi feita utilizando apenas a mistura dos monômeros nas mesmas proporções. O método consiste em imobilização por aprisionamento (confinamento) do esporo em uma estrutura porosa (estrutura tridimensional) semipermeável, com porosidade adequada para reter o biocatalisador. Podendo ocorrer ligações covalentes, pelo seu aumento na termoestabilidade (forte interação com o suporte) e da estabilidade operacional (Correia et al., 2011; Adlercreutz, 2013). Além disso, foi realizada a imobilização por adsorção. Nesse contexto, inicialmente 3 mL de solução de esporos foi cultivada juntamente com o meio pré-fermentativo lavados em tampão (pH 7,0) e liofilizados.

Para as reações foram adicionadas ao tampão ou, ao meio fermentativo, os substratos na concentração de 50 mM, a saber: *rac*-metilbenzilamina, *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina, *rac*-metil-3-fenilpropilamina, *rac*-etilbenzilamina, *rac*-ciclohexiltilamina, *rac*-fenilbutilamina e *rac*-sec-butilamina. As mistura reacionais foram agitadas em incubadora refrigerada tipo Shaker a 30 °C e 120 rpm por 120 h (Clay et al, 2010).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise do percentual de conversão a cetonas pró-quirais pode ser observada na Tabela 1, a qual é referente a biotransformação de amins quirais utilizando células de *Stemphylium lycopersici* imobilizadas por adsorção, liofilizadas e, com extrato bruto enzimático, sendo as reações conduzidas em tampão fosfato (pH=5), durante 48 horas, em Shaker a 30°C com rotação de 120 rpm.

Tabela 1: Conversões e resolução cinética de amins de interesse farmacêutico

Substratos	Imobilizado adsorção		Extrato bruto enzimático		Células integras liofilizadas	
	c%	ee%	c%	ee%	c %	ee %
<i>rac</i> -metilbenzilamia	45%	99%	38%	99%	35%	99%
<i>rac</i> -1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina	49%	99%	39%	91%	30%	75%
<i>rac</i> -1-metil-3-fenilpropilamina	46%	91%	28%	60%	25%	48%
<i>rac</i> -fenilbutilamina	45%	95%	40%	89%	28%	60%
<i>rac</i> -etilbenzilamina	43%	97%	40%	81%	26%	73%

C%: Porcentagem de conversão obtida por CG-MS – ee%: Excesso enantiomérico por CLAE-DAD coluna chiral cel O-D - Fase móvel hexano/isopropanol (90:10), vazão (0,8 mL/min) 220 nm. As análises foram realizadas após 48 horas de reação tampão fosfato pH:5,5 .

Observa-se que ao utilizar as células imobilizadas em poliuretano, obtiveram-se os melhores resultados para todas as amins estudadas. Segundo a literatura, as matrizes porosas aumentam as áreas superficiais e também minimizam a limitação por difusão entre substrato e biocatalisador, funcionando também como superfície de adesão e desenvolvimento para fungo (Carvalho, 2006). Dando continuidade ao estudo com suportes de poliuretano, fizemos um estudo de imobilizados *in situ*, abordando a conversão à cetona quiral correspondente. Nesse contexto, obtivemos os seguintes resultados (Tabela 2).

Tabela 2: Conversões de amins de interesse farmacêutico.

Substratos	Imobilizado <i>In situ</i> EBE	Imobilizado <i>In situ</i> Esporos	Imobilizado <i>In situ</i> liofilizadas
	c%	c%	c %
<i>rac</i> -metilbenzilamia	48%	35%	48%
<i>rac</i> -1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina	49%	34%	43%
<i>rac</i> -1-metil-3-fenilpropilamina	40%	27%	47%

C%: Porcentagem de conversão obtida por CG-MS. As análises foram realizadas após 48 horas de reação tampão fosfato pH:5,5 .



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Observou-se que os resultados *in situ* foram promissores principalmente no que se refere ao extrato bruto enzimático e ao liofilizado. Quanto aos esporos, por serem estruturas germinativas, o tempo de cultivo pode ter sido insuficiente e assim o microrganismo pode não ter atingido um estágio metabólico capaz de apresentar a mesma expressão enzimática do liofilizado, apresentando taxas de bioconversão, também, inferiores ao extrato bruto enzimático, onde a enzima já teria sido expressa.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram-se promissores, evidenciando a importância da microbiota da restinga de Jurubatiba para o desenvolvimento de biocatalisadores que atendam as demandas atuais da indústria farmacêutica no que se refere à resolução cinética de amins quirais. Além disso, o trabalho contribuiu para o estudo do poliuretano como um suporte de baixo custo e bastante interessante do ponto de vista de estabilidade química na imobilização de fungos filamentosos promissores para a realização de reações de interesse farmacêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz P. Immobilisation and application of lipases in organic media. 2013. Chemical Society Reviews 42(15): 6406-6436.
- Cadena P. G., Jeronimo R. A. S., Melo J. M., Silva R. A., Lima Filho J. L. e Pimentel M. C. B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. 2010. Bioresource Technology 101(6):1595-1602.
- Carvalho, W.; Canilha, L.; Silva, J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. 2006. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 36:48-57.
- Clay, D.; Koszelewskira, D.; Grischek, B.; Gross J. Efficient asymmetric synthesis of chiral amines by combining transaminase and pyruvate decarboxylase. 2010. ChemBioChem 9 (3): 230-233.
- Correia A. C., Fonseca M. M. R. e Ferreira-Dias S. Produção de Emulsionantes através da Glicerólise de Óleo de Bagaço de Azeitona Catalisada pela Lipase da Candida Rugosa, Imobilizada em Espumas de Poliuretano. 2011. Millennium, 41: 7-15.
- Hilario, V. C. ; Carrao, D. B. ; Barth, T. ; Borges, K. B. ; Furtado, N. A. J. Jansonius, J. N. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. 1998. Biology, 8(6): 759-769.
- Nyari N. L. D., Steffens C., Zeni J. e Dallago R. M. Easy and Fast Method of Candida antarctica B Lipase Immobilization in Polyurethane Foam In situ immobilization of Candida antarctica B lipase in polyurethane foam support, 2015. Indian Journal of Advances in Chemical Science 3(4): 315-322.
- Queiroz, M. S. R. Estudos de biotransformação de *rac*-metilbenzilamina, 2015. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências da UFRJ-Macaé, 60-61.