

## 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 amins quirais de interesse farmacêutico**

**Maria S. R. Queiroz<sup>1</sup>, Nádia L. Nyara<sup>4</sup>, Brener de S. Gomes<sup>1</sup> (IC), Eunice Valduga<sup>4</sup>,  
Larissa Zambe Pinheiro<sup>1</sup>, Rodrigo O. M. A. de Souza<sup>2</sup>, Jamile Zeni<sup>4</sup>, Rogério M.  
Dallago<sup>4</sup>, Denise O. Guimarães<sup>3</sup>, Ivana C. R. Leal<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos (LaProNEB)-CCS-UFRJ

<sup>2</sup>Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica (BOSS Group)- IQ- UFRJ

<sup>3</sup>Laboratório de Produtos Naturais (LaProN)-UFRJ – Polo Macaé

<sup>4</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI

Email: msandrarq@yahoo.com.br

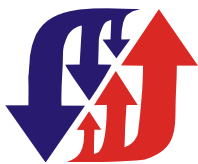
#### **RESUMO**

*Estudos de imobilização com o microrganismo **Stemphylium lycopersici** foram conduzidos para a avaliação de sua capacidade na realização de resolução cinética de amins 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, amins quirais, poliuretano, imobilização.

#### **INTRODUÇÃO**

Estudos evidenciam a atividade enantiosseletiva em reações de  $\omega$ -transaminação de microrganismos de ambientes diversos para a produção de blocos de amins 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 amins 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

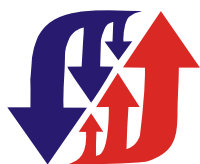
presente trabalho foram abordados dois métodos de imobilização: adsorção ao suporte (PU-ADS) e incorporação ao suporte (PU)

### 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 ( $\text{NaNO}_3$ ) (Vetec), 1 g fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (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-tetrahidro-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%

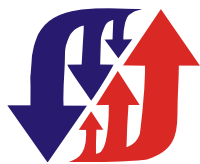
C%: Porcentagem de conversão obtida por CG-MS – ee%: Excesso enantiomérico por CLAE-DAD coluna chiral cel O-D - Fase móvel hexano/isopropanol (90:10), vazão (0,8 mL/min) 220 nm. As análises foram realizadas após 48 horas de reação tampão fosfato pH:5,5 .

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.