

OBTENÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS BIOATIVOS A PARTIR DE BIOCATALÍSE

Juliana Tomasi,¹ Patricia Amaral,² Lais Vaz,³ Gabriel Hahn Hendler,⁴ Eduardo João Agnes⁵

¹Unesc / Bolsista do Laboratório de Plantas Mediciniais – LaPlAM

^{2,3,4,5} Unesc / Laboratório de Plantas Mediciniais – LaPlAM

¹jullyy.tomasi@gmail.com

Palavras-Chave: *Enzimas Lipases, Ibuprofeno, Esterificação.*

INTRODUÇÃO

As enzimas são macromoléculas catalisadoras de sistemas biológicos altamente eficientes e com uma grande diversidade de reações químicas devido a sua capacidade de se ligar especificamente a uma ampla gama de moléculas. Grande parte das enzimas conhecidas é proteína, a qual possui notáveis dispositivos moleculares que determinam o perfil das transformações químicas, uma vez que estas possuem alto poder catalítico e grande especificidade (BERG; TYMOCZKO & STRYER, 2008).

A biocatálise está se tornando uma importante ferramenta com grande crescimento em companhias farmacêuticas e de química fina para obtenção de intermediários farmacêuticos e de ingredientes ativos farmacêuticos, com o objetivo de aperfeiçoar reações para o aumento da estereosseletividade e do rendimento e das condições de reação (ARNUM, 2007).

Com isso, analisando a característica química de determinados fármacos pertencentes à classe dos anti-inflamatórios não esteróides, pode-se perceber que estes são passíveis de sofrerem o processo de esterificação de sua estrutura, bem como o Ibuprofeno, que possui um ácido carboxílico ligado a sua estrutura principal.

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a esterificação do fármaco conhecido comercialmente como Ibuprofeno por meio de catálise enzimática proporcionada por lipase, buscando a obtenção da função éster e por consequência aumentar a lipofilia da estrutura química, buscando aumentar o potencial farmacológico. Vale ainda ressaltar que a síntese via enzimática é considerada uma via reacional limpa, ou seja, pouca produção de resíduos químicos além de bons rendimentos.

METODOLOGIA

Obtenção do éster de Ibuprofeno

A metodologia utilizada segue o método já relatado em literatura no qual consiste na adição de 0,1 mg do fármaco em questão em 4 mL de álcool octílico e 4 mL de tampão pH e 0,125 mg lipase com agitação constante em quantidades a serem testadas durante o desenvolvimento da prática, variando as condições reacionais de acordo com os resultados obtidos

Rendimento e Caracterização

Para análise dos resultados serão utilizados os métodos de titulometria volumétrica e cromatografia em camada delgada, uma vez que a análise titulométrica consiste na análise química quantitativa feita pela determinação do volume de uma solução, cuja concentração é conhecida com exatidão, necessário para reagir quantitativamente com um volume determinado da solução que contém a substância a ser analisada, sendo que as soluções obtidas serão tituladas com Hidróxido de potássio (KOH) 1,0 molar, com o objetivo de verificar o rendimento das

reações realizadas. Os demais reagentes são de grau de analítico.

Cromatografia em camada delgada (CCD)

A molécula obtida será analisada qualitativamente através de cromatografia em camada delgada – CCD, para verificar a conversão em éster. Para isso, a molécula será dissolvida em acetato de etila e aplicada em uma placa cromatográfica contendo sílica como fase estacionária. Os padrões empregados serão o Ibuprofeno e os álcoois alifáticos utilizados, também dissolvidos em acetato de etila. A fase móvel utilizada na cuba cromatográfica será uma mistura de éter de petróleo, éter etílico e ácido acético na proporção de 80:20:1, respectivamente. A placa cromatográfica, após eluição, será revelada com lâmpada UV e vapor de iodo e o R_f das manchas dos padrões e dos componentes das amostras será determinado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi utilizada a enzima lipase na sua forma livre e determinado o seu melhor rendimento. Foram realizados diversos experimentos, variando o pH e a temperatura para a esterificação do fármaco Ibuprofeno com o objetivo de obter o melhor meio de reação.

Os tempos de 5 e 10 minutos foram adotados para determinação da atividade enzimática baseado em pesquisas e trabalhos já realizados por outros pesquisadores como Aguiar e colaboradores (2010). Dessa forma, foi necessário determinar a melhor faixa de temperatura onde a lipase livre expressasse sua melhor atividade catalítica para a esterificação do fármaco.

Portanto, para a determinação da temperatura e pH ótimos para a lipase, variou-se a temperatura entre 25°C e 37°C e o pH entre 6 e 8 nos experimentos que foram utilizados o fármaco, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Determinação da atividade de esterificação da lipase livre, dado em média de Unidade de Atividade (U) Ensaio realizado na temperatura de 25°C

pH	Atividade (U) 5' minutos	Atividade (U) 10' minutos
6	172,8	110,4
7	140,8	35,2
8	57,6	14,4

Ensaio realizado na temperatura de 37°C

pH	Atividade (U) 5' minutos	Atividade (U) 10' minutos
6	0	0
7	0	0
8	0	0

Através dos resultados colocados na tabela acima, pode-se observar que a atividade máxima ocorreu na

temperatura de 25°C no tempo de 5 minutos quando alcançou 172,8 U. Isso pode ter vindo a ocorrer, pois com o aumento da temperatura pode promover aumento da velocidade de desnaturação térmica da lipase reduzindo, portanto, a velocidade de formação de produtos, ou seja, 37°C não é uma temperatura indicada para a atividade da enzima por desnaturar e então perder sua atividade.

Em relação ao pH, a esterificação enzimática está correlacionada com o estado de ionização de resíduos de aminoácidos da enzima que são essenciais à esterificação. Como as enzimas são proteínas e contêm muitos grupos ionizáveis, estes podem estar em diferentes estados de ionização, por isso, a atividade de esterificação é restrita a uma faixa de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido. Onde analisando os dados, pode-se encontrar um pH ótimo mais ácido, ou seja, pH 6.

A CCD é método simples de análise usado na separação dos constituintes de uma mistura. Uma fina camada de adsorvente (sílica) é depositada sobre uma superfície plana, os constituintes da amostra migram de forma diferenciada, envolvendo interações intermoleculares entre os constituintes, o eluente e o adsorvente utilizado e, com isso, ocorre a separação dos constituintes da amostra. A caracterização do comportamento em CCD das amostras foi realizada através da intensidade e valor de R_f (distância percorrida pela amostra/ distância percorrida pelo solvente).

Apesar de ser um método simples de análise, houve dificuldade em aplicar a CCD, não tendo um resultado satisfatório.

CONCLUSÃO

Ao término do trabalho e posterior análise dos resultados pode-se afirmar que a lipase livre possui uma ótima atividade, mas baixa resistência térmica. Observa-se que a enzima trabalhou melhor na temperatura de 25°C que

em condições ideais de temperatura a atividade catalítica da enzima pode aumentar como utilizar um álcool que proporcione melhor atividade para a enzima, bem como aumentar o tempo de atividade da enzima, podendo ter um rendimento maior.

Testes preliminares foram realizados para dar início a uma linha de pesquisa na área de síntese de fármacos quirais por catálise enzimática, pois a utilização de enzimas lipases na esterificação como biocatalisador mostrou-se útil, possibilitando a obtenção de compostos opticamente puros e assim, promovendo desenvolvimento na área de síntese de fármacos.

AGRADECIMENTOS

À professora Patrícia de Amaral, que está me orientando neste trabalho. Bem como ao pessoal que trabalha no Laboratório de Plantas Mediciniais – LaPlaM, que me auxilia no desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ARNUM, Patricia Van. Avanços da biocatálise no desenvolvimento farmacêutico. **Pharmaceutical Technology** (ed. Brasileira), São Paulo, v. 12. n. 2. p. 38-42, abr. 2007.
- BERG, Jeremy Mark; TYMOCZKO, John L; STRYER, Lubert. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. 1114 p.
- AGUIAR O. R.; MONDARDO R. M.; AGNES, E. J.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **Acta Scientiarum. Technology**. Vol. 32, p. 15-19, 2010.