

PRODUÇÃO DE ISONIAZIDA POR BIOCATÁLISE USANDO LIPASE DO TIPO B DE *Candida antarctica* IMOBILIZADA EM NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS

V. M. COSTA¹, M. V. LIMA², P.B.A.FECHINE¹, L.R.B. GONÇALVES² e A.C. de MACEDO

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Analítica e Físico-Química

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: acasimiro@gmail.com

RESUMO – A Isoniazida (INH) ou hidrazida do ácido 4-piridinocarboxílico é um destacado fármaco usado no tratamento da tuberculose. INH é preparado, convencionalmente, partindo da hidrólise da 4-cianopiridina, processo que ocorre com grande dispêndio energético e conduzida com uso de substâncias nocivas como é o caso da 4-cianopiridina, que além de nociva é preparada a partir da 4-picolina, que tem um elevado custo. Recentemente, estudos mostraram que a INH pode ser produzida em processos catalisados por lipases, conduzidos em condições amenas. Neste trabalho, apresentamos a aplicação de lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em sistemas biocatalíticos magnéticos nanoparticulados (CALB-NPM) para a produção de INH. Conversões próximas à 18,0% e atividade de hidrazinólise igual à $0,16 \pm 0,03 \mu\text{Mol/mg.mL.h}$ foram atingidas neste trabalho e apresentam-se como resultados promissores apontando para a viabilidade do uso de CALB-NPM como biocatalisador na produção de INH.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), doença infecciosa transmitida de indivíduo a indivíduo através do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é a principal causa de mortalidade por uma única doença infecciosa. Anualmente no mundo, das 8 milhões de pessoas que desenvolvem esta doença, 3 milhões morrem, dado que torna a TB um grave problema de saúde pública (O'Hara e Hickey, 2000).

Dentre os fármacos usados no primeiro tratamento da tuberculose, a Isoniazida ou hidrazida do ácido 4-piridinocarboxílico destaca-se por sua especificidade para o *M. tuberculosis*, apresentando pouca ou nenhuma atividade sobre outras bactérias e também por sua fácil absorção quando administrada por via oral. Ainda hoje a INH é considerada como fármaco-base da quimioterapia anti-TB, tanto para infecções ativas quanto para aquelas latentes (Alves, 2003; Vilchèze *et al.*, 2006).

Convencionalmente, a Isoniazida é preparada através da hidrólise da 4-cianopiridina para a formação de uma amida intermediária e posterior formação da Isoniazida na reação desta amida com

hidrato de hidrazina. Este processo geralmente ocorre com grande dispêndio energético uma vez que a primeira etapa acontece sob aquecimento (100°C) em condições de refluxo. Toda a reação acontece em 7 horas. Além de ser uma reação química com alto custo, também é conduzida com uso de substâncias nocivas como é o caso da 4-cianopiridina. Além de nociva, a 4-cianopiridina é preparada a partir da 4-picolina, que tem um elevado custo (Yadav *et al.*, 2005; Sitting, 1988; Gogte, 1982).

Recentemente, estudos mostraram que processos catalisados por enzimas como lipases podem ser conduzidos em condições mais amenas para a síntese de moléculas como a isoniazida, tornando-se mais atrativas que os processos convencionais como o descrito para a INH. Os estudos de Yadav e seus colaboradores mostraram que há possibilidades de se produzir INH através de reações heterogêneas catalisadas por lipases através do mecanismo descrito na figura 1.

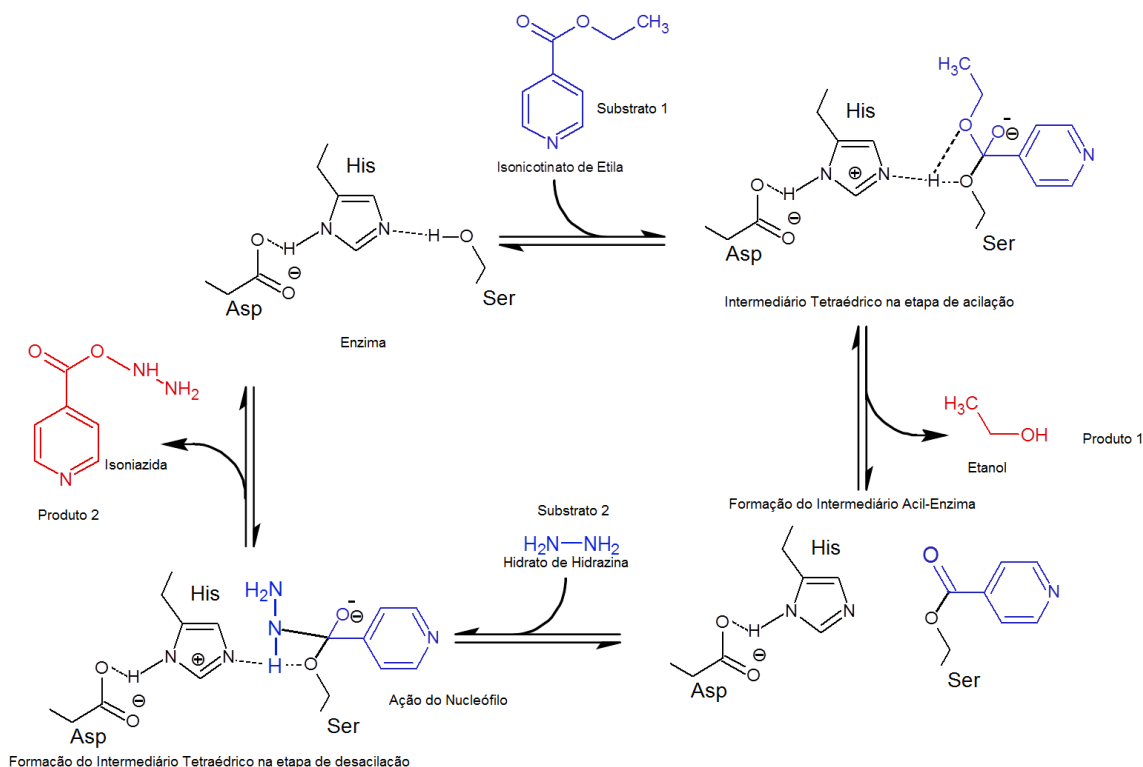


Figura 1- Mecanismo Químico de Síntese da Isoniazida catalisada por lipases (adaptado de HÆFFNER e NORIN, 1999) .

A grande vantagem da utilização de enzimas como catalisadores de reações como a descrita para a isoniazida é a alta seletividade que estas substâncias apresentam frente à processos químicos convencionais. Esta característica permite catalisar especificamente uma única transformação sobre complexos que contenham vários grupos funcionais com reatividade similar. Além da seletividade, a elevada especificidade frente ao substrato faz com que as enzimas possam gerar modificações somente em um tipo de substrato dentro de uma mistura complexa de compostos similares.

Para que estes processos utilizando enzimas como catalisadores sejam eficientes, há necessidade

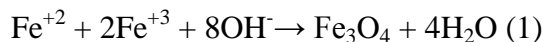
de protegê-las da interação com o solvente e dos danos que este podem causar, sobretudo à atividade da enzima, que impossibilitaria a reação. Frente a este problema, técnicas diversas de imobilização têm sido desenvolvidas com o intuito de aumentar a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização após o processo (Villeneuve *et al.*, 2000, Durán *et al.*, 2002; Dalla-Vecchia, Nascimento, Soldi, 2004). Dentre os vários suportes sólidos estudados para promover a imobilização de enzimas é possível destacar as esferas de agarose microporosas, as resinas epóxi, os polipropilenos, as esferas de sílica, silicatos de alumínio e as nanopartículas óxido de ferro magnético. Nanopartículas magnéticas são atraentes por apresentarem, uma área de superfície específica mais elevada para o carregamento de uma maior quantidade de lipase, por oferecerem menor resistência à transferência de massa durante as reações, não toxicidade, biocompatibilidade, facilidade de separação de uma mistura de reação pela aplicação de um campo magnético. Uma limitação pode ser descrita à estes sistemas nanoestruturados que é a dificuldade de imobilizar diretamente enzimas na superfície de nanopartículas de magnetita e manter elevada atividade catalítica. Deste modo, a modificação de superfícies destas nanopartículas de magnetita torna-se necessária para que as mesmas desempenhem as suas aplicações. (Montero *et al.*, 1993; Arroyo, Sanchez-Montero, Sinisterra, 1999; Huang, Liao, Chen, 2003; Gardimalla *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2007; Yong *et al.*, 2008; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

Os estudos apresentados por Yadav *et al.*(2005), apesar de pioneiros na produção de INH, trazem a limitação da utilização de biocatalisadores comerciais, de custo elevado. Este trabalho propõem o uso se sistemas alternativos ao de Yadav e seus colaboradores, como é o caso das nanopartículas magnéticas com incorporação de lipases do tipo B de *Candida antarctica* (NPMS-CALB). Em comparação aos ensaios com NPMS-CALB são também apresentados resultados obtidos para sistemas comerciais de referência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Síntese de Nanopartículas Magnéticas e Funcionalização com APTES

A metodologia utilizada para a síntese de nanopartículas magnéticas seguiu o protocolo de Barreto e colaboradores. Para o método de co-precipitação, uma solução de sais de metal contendo Fe^{+2} e Fe^{+3} são misturados e diluídos em água Milli-Q numa proporção de 1:2, para formar a fase de espinela (Fe_3O_4). A mistura aquosa foi aquecida até 70°C , sob agitação constante e uma solução de NH_4OH a 30% (pH de 10) para a formação de um precipitado branco (1) adicionado.



O precipitado foi lavado várias vezes com água Milli-Q até a solução residual atingir pH neutro e uma única lavagem com metanol. A amostra de nanopartículas magnéticas foi seca sob vácuo.

Em um balão de fundo foi misturado 100 mg de magnetita numa solução de etanol e de tolueno na proporção de 1:2. A mistura foi adicionada proporções em massa de magnetita e APTES em razões 1:1 sob uma atmosfera inerte e agitação constante por 24 h. O precipitado foi separado e lavado várias vezes com etanol, até a completa remoção de resíduos.

2.2. Reticulação e Imobilização de CALB nas Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas

Após o tratamento com APTES, a ativação foi realizada com uma solução de glutaraldeído 0,6% (v/v) durante 2 h a 25°C. Após esta etapa, as nanopartículas foram lavadas com tampão de carbonato-bicarbonato de sódio, 100 mM, pH 7,0, para remover o excesso de agente ativador. A imobilização da enzima CALB foi realizada com 0,01 g adicional de nanopartículas (tratada com APTES e glutaraldeído reticulado) com 0,5 ml de solução tampão de bicarbonato de sódio, 100 mM, pH 7,0. O sistema foi mantido sob agitação controlada: 20-250 rpm (agitação orbital), o tempo de contato entre a enzima de suporte foi de 1h.

A caracterização das NPMS e do sistema NPMS-CALB apontam que o tamanhos médios próximos à 10nm e 13 nm para os dois sistemas respectivamente. Isto aponta um recobrimento não-magnético sobre a partícula próximo à 3 nm, que equivale à APTES-CALB.

2.3. Atividade Hidrazinolítica do Derivado Nanocatalítico (NPMS-CALB)

A atividade enzimática foi medida através da velocidade inicial e expressa em termos de atividade hidrazinolítica na síntese de Isoniazida.

2.4. Concentração de Isoniazida e Isonicotinato de Etila

As concentrações de INH, bem como do reagente Isonicotinato de Etila foram determinadas através de técnicas cromatográficas em HPLC usando coluna Merck 50938 (250mmx4mm) e fase móvel de metanol/água (70:30) em fluxo de 0.8 mL/min seguindo a metodologia proposta por Yadav *et al.* (2005).

2.5.. Reação utilizando CALB-NPMS

Os ensaios de síntese da INH e foram executadas em batelada em tanque agitado em escala de bancada. Os ensaios tiveram seu ponto de partida baseados no trabalho de Yadav *et al.* (2005), em tanque agitado e com controle de temperatura. No caso da síntese de INH, a reação a ser considerada é a descrita anteriormente. Inicialmente foram feitos testes sem enzima para confirmar a capacidade de ocorrência da reação sem catálise e posteriormente foram feitos os testes com os sistema catalítico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a figura 1, que ilustra o mecanismo químico da síntese da Isoniazida dentro da tríade catalítica das lipases, a etapa de formação do complexo acil-enzima é o passo inicial para a reação que se inicia com a entrada do Isonicotinato de etila numa etapa de acilação para a formação de um intermediário tetraédrico, etapa que precede a formação de etanol e sua posterior liberação do sistema. A formação do complexo acil-enzima acontece quando o etanol é liberado e uma segunda etapa é iniciada com a entrada do segundo substrato, o hidrato de

hidrazina que age como nucleófilo junto ao complexo acil-enzima para a formação de outro intermediário tetraédrico, desta vez numa etapa de desacilação que culmina com a formação de isoniazida e na sua posterior liberação da tríade.

Na prática, a descrição detalhada do protocolo de reação é feito com base neste mecanismo básico de reação. Para tanto, o efeito do contato entre as fases, foi investigado como primeira etapa de desenvolvimento de protocolo de ensaios. Os resultados são apresentados na figura 2.

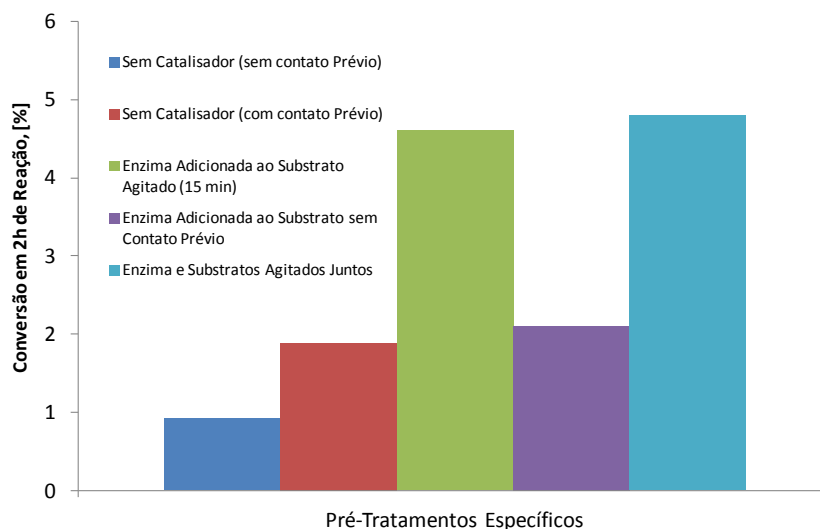


Figura 2- Conversão de isonicotinato de etila em INH nos diversos pré-tratamentos.

Nota-se não haver diferenças claras entre os ensaios 2 e 3 com catalisador, concluindo-se que, inicialmente, a promoção do contato entre os reagentes deve ser uma etapa de fundamental importância e que, no entanto, não é de todo muito trivial, pois não há relato algum da influência deste pré-tratamento em textos na literatura. A mistura entre a hidrazina e o isonicotinato deve ser feita em alguns minutos de agitação vorticial dentro do frasco de reação devidamente fechado. Após a homogeneização dos substratos, adicionou-se o solvente de dispersão, 1-4 dioxano e em uma etapa posterior o catalisador CALB-NPMS.

A figura 3 mostra o perfil de conversão de Isonicotinato de etila em INZ através da reação de hidrazinólise catalisada com derivados de CALB-NMPS. Os resultados mostram que a conversão máxima atingida é próxima à 18%. Em comparação ao desempenho do sistema CALB-NMPS, Lipase comercial CALB L4777-3G® (Sigma), imobilizada em resina acrílica também foi usada na produção de Isoniazida nas mesmas condições. Os resultados mostraram que, naquelas condições, a CALB L4777-3G® atingiu conversão com valores médios próximos a 25 %, em 10 h de ensaio. Yadav *et al.* (2005) ao estudar a síntese de Isoniazida, em condições semelhantes às testadas nestes ensaios, obtiveram valores semelhantes para conversão de Isonicotinato de etila em Isoniazida quando a enzima utilizada foi a Novozym 435, enzima similar à CALB L4777-3G®. A figura 3 apresenta um comparativo entre os resultados de

desempenho da Lipase CALB L4777-3G® (Sigma) e da enzima testada por Yadav *et al.* (2005). Ensaios sem catalisador foram feitos, e valores para a conversão chegou ao máximo (12h) próximo de 3-5 %, compatível com o resultado de Yadav e seus colaboradores.

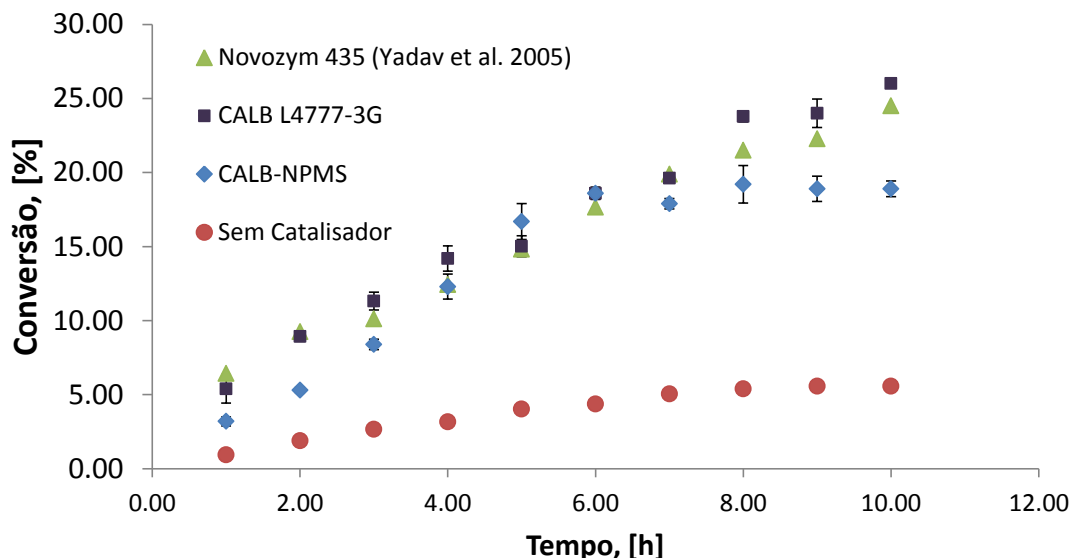


Figura 3. Conversão de isonicotinato de etila em INH em sistemas biocatalíticos.

Conversões próximas a esta são obtidas com suportes hidrofóbicos à base de octil-silano (CALB-OCSIL). Os suportes hidrofóbicos à base de octil-silano foram testados previamente em estudos do grupo de pesquisa que tiveram desempenho próximo à 22 ($\pm 1,21$)%. Comparativamente, outros tipos de suporte testados por Honorato *et al.* (2013) à base de quitosana apresentaram resultados inferiores comparados aos obtidos neste trabalho. Os resultados obtidos por Honorato e seus colaboradores apontam para conversões máximas utilizando lipases de *Rizhomucor miehei* e *Candida antarctica* imobilizadas em quitosana, respectivamente de 10,2% ($\pm 1,30$) e 15,3% ($\pm 0,81$).

Quanto às atividades hidrazinolíticas, os resultados obtidos para CALB-NPMS chegaram à $0,16 \pm 0,03 \mu\text{Mol/mg.mL.h}$. Este valor é bem próximo aos obtidos por Honorato *et al.* (2013) para os sistemas utilizando lipases de *Rizhomucor miehei* ($0,09 \mu\text{Mol/mg.mL.h}$) e *Candida antarctica* ($0,14 \mu\text{Mol/mg.mL.h}$) imobilizadas em quitosana.

É possível de concluir que há semelhanças na atividade de formação de INH para os casos de suportes hidrofóbicos.

4.CONCLUSÃO

É possível se concluir que os biocatalisadores CALB-NPMS podem ser empregados para a síntese de INH com conversões próximas às obtidas com sistemas imobilizados em suportes

convencionais e que tem a mesma característica de hidrofobicidade, bem como apresentam desempenho semelhante aos obtidos com sistemas comerciais podendo ter ampla aplicação em reações de hidrazinólise com menores dispêndios energéticos e menores efeitos tóxicos.

6. REFERÊNCIAS

Alves, G. P., Ampliação de Escala do Processo de Produção de Lipossomas: Estudo de Variáveis e Encapsulamento de Medicamentos de Primeiro Tratamento da Tuberculose, Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

Arroyo, M., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V, Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme Microb Tech* 24: 3–12, (1999).

Bai, S., Guo, Z., Liu, W., Sun, Y., Resolution of (\pm)-menthol by immobilized *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic nanoparticles. *Food Chem* 96: 1–7, 2006.

Barreto, A. C. H. Santiago, V.R., Mazzetto, S. E., Denardin, J. C. , Lavín, R., Giuseppe Mele, Ribeiro, M. E. N. P. , Vieira, I. G. P., Gonçalves, T. , Ricardo, N. M. P. S., Fachine, P. B. A., Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy. *Journal Nanoparticles research*, 2011. 13: p. 8.

Dalla-Vechia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V., Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., Gianfreda, L., Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p. 907-931, 2002.

Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb Technol* 41: 565–569, 2008.

Gardimalla, H.M., Mandal, D., Stevens, P.D, Yen, M., Gao, Y., Superparamagnetic nanoparticle-supported enzymatic resolution of racemic carboxylates. *Chem Commun* 35: 4432–4434, 2005.

Gogte, V.N., Profiles in drug syntheses. Bombay, India: Gokul Publishers;1982.

Haefner, F, Norin, T., Hult, K, Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions, *Biophys J*. 1998 March; 74(3): 1251–1262.

Honorato, T. L., Macedo, A. C., Gonçalves, L. R. B. ., Produção de Isoniazida Utilizando Lipase Imobilizada em Quitosana. In SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS : SINAFERM XIX, Foz do Iguaçu, 2012 - "Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos : SINAFERM 2012" [CD-ROM]. [S.l. : s.n.], 2012.

Huang, S.H., Liao, M.H., Chen, D.H., Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol Prog* 19: 1095–1100, 2003.

Lee DG, Ponvel KM, Kim M, Hwang S, Ahn IS, Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. *J Mol Catal B-Enzym* 57: 62–66, 2009.

Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Tech* 40: 1451–1463, 2007.

Montero, S., Blanco, A., Virto, M.D., Landeta, L.C., Agud, I., Solozabal, R., Lascaray, J.M., de Renobales, M. , Llama, M.J., Serra, J.L., Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme Microb Technol* 15: 239–247, 1993.

O'Hara, P., Hickey, A.J., Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization. *Pharm. Res.* 17, 955–961, 2000.

Sittig, M., *Pharmaceutical manufacturing encyclopedia*. 2nd ed. New Jersey, USA: Noyes Publications; 1988.

Vilchèze, C.; Wang, F.; Arai, M.; Hazbon, M.H.; Colangeli, R.; Kremer, L.; Weisbrod, T.R.; Alland, D.; Sacchettini, J.C.; Jacobs, W.R. Jr. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat. Med.*, v.12, p.1027-1029, 2006.

Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille J., Haas M, Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

Yadav, G. D.; Joshi, S. S.; Lathi, P.S., Enzymatic synthesis of isoniazid in non-aqueous medium. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 36, p. 217–222, 2005.

Yong, Y., Bai, Y.X., Li YF, Lin L, Cui YJ, Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process Biochem* 43: 1179–1185, 2008.