

REAÇÕES DE BIOCATALÍSE UTILIZANDO FUNGO DA PELE HUMANA

Daniel Pagano Magalhães¹, Rogério Aparecido Minini dos Santos²

¹Acadêmico do Curso de Farmácia, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, daniel_paraty@outlook.com

²Orientador, Doutor, Professor do curso de Farmácia, UNICESUMAR, Maringá/PR. rogerio.santos@unicesumar.edu.br

RESUMO

A biocatálise é um processo no qual catalisadores naturais são utilizados para modificar uma molécula química, sendo uma alternativa mais ecológica e barata de procedimentos químicos de alto desempenho, com o uso de enzimas ou células inteiras como catalisadores, as reações são enantiosseletivas, quimiosseletivas e regioseletivas. Nesse projeto, será avaliado o uso de fungos que atuarão como possíveis bioconversores de substratos. Serão utilizados os substratos: 2-metilciclohexanona, 3-metilciclohexanona e 4-metilciclohexanona, empregando o fungo de pele humana como biocatalisador. O microrganismo será cultivado em placas de Petri, em meio ágar nutriente, de 4 a 7 dias, após o cultivo os fungos serão remanejados para um Erlenmeyer com extrato de levedura e sob agitação constante, por dois dias. Será feito um repique das células novas, com mesmo processo anterior, num período de 24h, após esses processos o fungo de pele humana será filtrado em funil de Büchner estéril. Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de tampão Sørensen (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH 7,0, serão adicionados cerca de 2 g de massa celular (peso úmido) do microrganismo a ser avaliado e 10 mg do substrato (2-metilciclohexanona ou 3-metilciclohexanona ou 4-metilciclohexanona). Esses frascos serão mantidos sob agitação, e monitoração diária, num período de 5 dias, que então será feita a extração com acetato de etila, filtração á vácuo e concentrados sob pressão para serem analisados por CCD e CG/EM. Espera-se uma seletividade dos isômeros gerados dos substratos. Avaliando-se a capacidade enantiosseletiva do biocatalisador.

PALAVRAS-CHAVE: Química Verde; Biotransformações; Biomassa Celular.

1 INTRODUÇÃO

Biocatálise ou biotransformação é a utilização de enzimas ou células inteiras para catalisar reações químicas. A aplicação da biocatálise cresce na proporção em que profissionais químicos se empenham para tornar mais eficientes e economicamente mais viáveis os processos da “química verde”. Este processo gera oportunidades de sintetizar substâncias de custo elevado, de modo sustentável (GREEN; TURNER, 2016).

O processo de biotransformação pode ser feito a partir da enzima isolada, de células em sua forma íntegra, sejam de origem vegetal ou animal e até mesmo micro-organismos inteiros, como é o caso desse projeto, em que será utilizado um fungo filamentosos. O uso de células íntegras é caracterizado como a utilização da biomassa da fonte enzimática nas reações em questão (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000).

Os procedimentos têm a geração de impurezas, como subprodutos tóxicos, contaminação do ambiente e do ser humano (GRAEDEL, 2010). Nesse sentido, a química verde, ou química sustentável como também é conhecida, com projetos que visam a redução ou total retirada da utilização e formação de produtos com certa toxicidade, tem sido cada vez mais introduzida nos processos industriais (EPA, 2020).

Profissionais têm a preocupação com o uso e descarte adequado das substâncias residuais geradas nos processos químicos. Aqueles que seguem os princípios da química verde, empenham-se em projetar novos compostos com uma visão mais ecológica, tendo em vista produtos originados de matérias primas renováveis, e visam a substituição dos compostos que agredem ou afetam a integridade de quaisquer tipos de vida, prezando por produtos biodegradáveis que preservam a fauna, flora e a vida (EPA, 2020).

Quanto ao setor farmacêutico, a complexa gama de mecanismos de reação atrelados às rotas de síntese e análise de fármacos, o habitual uso de solventes nos

processos de purificação, entre outros, faz com que esse segmento industrial se torne um significativo gerador de resíduos (LINNINGER; CHAKRABORTY, 2001).

Por meio da biocatálise, é possível retirar um produto de substratos sintéticos, sendo este um processo regioseletivo - preferência na formação de um isômero específico; enantioseletivo – geração predominante de um enantiômero, e quimioseletivo – quando há mais de um grupo funcional na molécula, somente um deles participará da reação. As reações podem ser realizadas em temperatura ambiente e sob pressão atmosférica, o que pode evitar a formação de subprodutos provenientes, por exemplo, de processos de isomerização e de rearranjos (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013).

Tornando a biocatálise uma alternativa mais favorável à indústria farmacêutica, permitindo que intermediários quirais sejam obtidos por processos em sintonia com os preceitos da química verde e da biotecnologia branca, diminuindo-se a geração de resíduos e o consumo de energia (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013).

A indústria farmacêutica compreende que os enantiômeros de compostos quirais, têm atividades biológicas diferentes. Apesar de serem distinguidos facilmente no organismo, eles podem ter diferentes propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, biotransformação e excreção) e diferentes efeitos farmacológicos ou toxicológicos, o que aumenta a busca por compostos desse tipo (FERREIRA; MEIRA; ROSSET; PORTO, 2016).

Sendo empregado o uso de células inteiras, é eliminada a necessidade de lise celular e purificação de enzimas, tornando o processo mais barato (WACHTMEISTER; ROTHER, 2016). A biocatálise com células inteiras, mais especificamente com o uso de microorganismos, já é uma realidade, como por exemplo, a síntese de resveratrol, que é um composto inicialmente extraído de algumas plantas, porém é encontrado em baixas concentrações, tendo a suabiossíntese realizada pela primeira vez usando *Saccharomyces cerevisiae* pela empresa dinamarquesa Fluxome em 2009, e o produto foi indicado como seguro e o estudo nessa área vem se abrangendo (MEI, YAN-ZHEN; et al, 2014; FERRER; *et al.*, 2008).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

- Manutenção da cultura dos fungos filamentosos

O fungo filamentoso *Scolecobasidium* sp. pertence à coleção do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LABIPROS) na Universidade Estadual de Maringá (UEM), supervisionado pela Profa. Dra. Regina A. Correia Gonçalves.

Os fungos serão cultivados em placa de Petri lisa em poliestireno descartável 90x15 mm contendo 15 mL de meio de cultura ágar nutriente (20 g/L) a uma temperatura de 28 °C durante 4 a 7 dias.

- Definição dos níveis de biomassa e substrato para as reações biocatalíticas

Três partes de 0,5 cm dos fungos que estarão em placas de Petri serão transferidos para Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de extrato de levedura e malte e mantidos por 48 horas sob agitação (120 rpm) a 28 °C. Após este período, será realizado um novo repique, transferindo as células jovens para novos frascos na mesma condição anterior. Após 24 horas as células microbianas serão filtradas em funil de Büchner estéril.

Desta forma, para todas as reações biocatalíticas será utilizado o protocolo geral: em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de tampão Sørensen (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH 7,0, serão adicionados cerca de 2 g de massa celular (peso úmido) do microrganismo a ser avaliado e 10 mg do substrato (2-metilcicloexanona ou 3-metilcicloexanona ou 4-

metilcicloexanona). Os frascos reacionais serão mantidos sob agitação de 120 rpm a 28°C e monitorados por alíquotas de 2 mL a cada 24 horas por 5 dias, sendo posteriormente submetidos à extração com 1 mL de acetato de etila. Após este período será realizado filtração à vácuo e os sobrenadantes extraídos com duas porções de 10 mL de acetato de etila e secos sobre Na₂SO₄. As alíquotas e os extratos resultantes da extração final, serão concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCD e CG/EM.

- Determinação da conversão e caracterização dos produtos das reações de biocatálise mediada pelos fungos da pele humana

A caracterização química dos substratos e padrões, bem como acompanhamento das reações biocatalíticas serão realizadas por CG/EM. Será utilizado um cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) equipado com coluna capilar de fase estacionária Agilent HP-5MS UI (30 m x 0.250 mm x 0.25 µm), acoplado com espectrômetro de massas Agilent 5977 A. Os espectros de massas serão obtidos a partir de uma faixa de m/z 40-500 fornecida através do modo de varredura de espectros e ionização por impacto de elétrons (70 eV).

A conversão (c) dos substratos em produtos será calculada através da razão entre as áreas dos picos correspondente ao substrato e seus respectivos produtos (Equação 1) e o excesso diastereoisomérico (e.d.) ou enantiomérico (e.e.) através da Equação 2 (GORETTI et al, 2009; COLLINS, 2014).

$$c = \left(\frac{\text{área do produto}}{\text{área do sustrato} + \text{área do produto}} \right) \times 100$$

Equação 1

$$ee = \left(\frac{\text{área do enantiômero maior} - \text{área do enantiômero menor}}{\text{área do enantiômero maior} + \text{área do enantiômero menor}} \right) \times 100$$

Equação 2

- Condições de programação CG/EM e do CG-quiral para análise das reações biocatalíticas.

CG/EM:

- Coluna: Agilent HP-5MS UI (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm);
- Detector quadrupolo: 400 °C;
- Impacto de elétrons: 70 eV;
- Temperatura de fonte de íons: 230 °C;
- Linha de transferência: 250 °C;
- Fluxo do gás de arraste (He): 1,0 mL/min;
- Temperatura do forno: 60 – 90 °C (3 °C/min) e 90 – 285 °C (50 °C/min);
- Injetorsplit (20:1): 220 °C;
- Modo fullscan 40 – 500;
- Volume injetado: 2 µL.

CG-quiral:

- Coluna: CP-Chirasil-DEX CB (25 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm);
- Detector por ionização em chama (FID): 220 °C;
- Injetorsplit (50:1): 220 °C;
- Fluxo do gás de arraste (He): 2,0 mL/min;
- Temperatura do forno: 90 – 130 °C (2 °C/min) e 130 – 180 °C (50 °C/min);

- volume da amostra: 1 μ L.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Nesse projeto, será avaliado o uso do fungo filamentoso *Cladosporium* sp. Como um possível biocatalisador dos substratos 2-metilcicloexanona, 3-metilcicloexanona e 4-metilcicloexanona. Espera-se que o fungo tenha alta capacidade em reação de biorredução das cetonas dos substratos, além de um bom excesso enantiomérico.

Salienta-se que, devido a pandemia, os laboratórios utilizados foram fechados por um período, fazendo com que o projeto fosse congelado, ao retornar tivemos alguns imprevistos, houve contaminação do fungo utilizado, e do material coletado anteriormente impedindo de ter resultados conclusivos e paralisando mais uma vez o projeto para um novo repique do fungo.

REFERÊNCIAS

EPA - United States Environmental Protection Agency. **Green Chemistry**. Disponível em: <https://www.epa.gov/greenchemistry>. Acesso em maio de 2021;

FERREIRA, Irlon M. et al. Chemoselective biohydrogenation of α , β - and α , β , γ , δ -unsaturated ketones by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 59-65, 2015.

FERRER, J.-L. et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2008.

GONÇALVES, Caroline da; MARSAIOLI, Anita J. Fatos e tendências da biocatálise. **Química Nova**, v. 36, p. 1587-1590, 2013.

GRAEDEL, Thomas E.; ALLENBY, Braden R. Industrial Ecology and Sustainable Engineering: International Edition. Pearson, Prentice Hall, 2010.

GREEN, Anthony P.; TURNER, Nicholas J. Biocatalytic retrosynthesis: redesigning synthetic routes to high-value chemicals. **Perspectives in Science**, v. 9, p. 42-48, 2016.

LINNINGER, Andreas A.; CHAKRABORTY, Aninda. Pharmaceutical waste management under uncertainty. **Computers & Chemical Engineering**, v. 25, n. 4-6, p. 675-681, 2001.

MEI, Yan-Zhen et al. Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 1, p. 9-18, 2015.

VILELA, Elke Simone Dias; SGARBIERI, Valdemiro Carlos; ALVIM, Izabela Dutra. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 185-192, 2000.

WACHTMEISTER, Jochen; ROTHER, Dörte. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. **Current opinion in biotechnology**, v. 42, p. 169-177, 2016.