

## AVALIAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DE FUNGO DA PELE HUMANA EM REAÇÕES BIOCATALÍTICAS

Maria Augusta Vilvert de Nigro<sup>1</sup>, Regina Aparecida Correia Gonçalves<sup>2</sup>, Rogério Aparecido Minini dos Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Farmácia, UNICESUMAR, Maringá (PR). Bolsista PIBIC/ICETI-UniCesumar. gutaviln@gmail.com

<sup>2</sup> Coorientadora, Doutora, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM, Maringá (PR). racgoncalves@uem.br

<sup>3</sup> Orientador, Doutor, Professor do Curso de Farmácia, UNICESUMAR, Maringá (PR). rogerio.santos@unicesumar.edu.br

### RESUMO

A biocatálise é considerada uma ferramenta biotecnológica limpa e sustentável na catálise de reações para obtenção de compostos de interesse industrial. As células inteiras são biocatalisadoras bastante viáveis, sendo os fungos importantes aliados nas reações biocatalíticas, pois possuem grande diversidade de metabólitos ativos e enzimas fundamentais para o processo, os quais são capazes de sintetizar compostos economicamente importantes. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo utilizar o fungo *Scolecobasidium sp.*, isolado da pele humana, na biotransformação dos substratos 2-metilcicloexanona, 3-metilcicloexanona e 4-metilcicloexanona e avaliar a seletividade do fungo na produção de compostos quirais. Para tanto, o fungo é cultivado em placa de Petri em meio de cultura apropriado, sendo posteriormente transferidos para Erlenmeyers juntamente com extrato de levedura, na qual ficarão em agitação por 48 horas para sua replicação. Após este período, serão submetidos a um novo repique nas mesmas condições e posteriormente serão filtrados em condição asséptica. A biomassa de fungo (2 g) será transferida para Erlenmeyers contendo 50 mL de solução tampão Sørensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) de pH 7,0 e 10 mg de substrato (2-metilcicloexanona, 3-metilcicloexanona ou 4-metilcicloexanona), sendo mantidos em agitação por 5 dias à 38 °C. Os possíveis produtos das reações serão extraídos com 10 mL de diclorometano e analisados por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM). Espera-se que o fungo *Scolecobasidium sp.* seja capaz de realizar reações de redução da carbonila para álcool quiral dos substratos e possua um satisfatório rendimento reacional, bem como apresente um bom excesso enantiomérico, possibilitando representar uma ferramenta promissora para indústria química e farmacêutica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotransformação; Fungos; Sustentabilidade;

### 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com as altas quantidades de resíduos gerados pela indústria química, gerou a necessidade de criar-se leis. Em 1990, nos EUA, surgiu a Lei de Prevenção da Poluição a qual defendia não só a redução da poluição ambiental como também a prevenção da criação de resíduos nas indústrias. Viu-se que isto seria benéfico tanto na eliminação de custos nos tratamentos dos resíduos como geraria uma competitividade de mercado entre as indústrias, pois aquelas que mais se adequassem as novas mudanças seria melhor vista. Com isso, surge a chamada química verde, que utiliza de forma eficiente as matérias primas, diminui os desperdícios e evita o uso de reagentes tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente na fabricação de novos produtos químicos e farmacêuticos (SHELDON; WOODLEY, 2018).

Segundo os mesmos autores, entre os princípios da química verde, estão, matérias-primas preferencialmente renováveis, síntese mais curta e reagentes catalíticos em vez de estequiométricos. Junto a isso o desenvolvimento sustentável defende que uma tecnologia sustentável deve seguir duas condições, os recursos naturais devem ser utilizados de forma que não se esgotem a longo prazo e os resíduos gerados não ultrapassem taxas que facilmente sejam assimiladas pela natureza. Fundamentado nos princípios da química verde e do desenvolvimento sustentável surge a biocatálise, que é uma tecnologia verde e sustentável.

Além disso, o reconhecimento da importância do estereoisomerismo na determinação da ação de isômeros específicos também foi um fator de ascensão para biocatálise, visto que, este método catalítico possui grande enantioseletividade, que permite

a síntese de enantiômeros únicos e ativos, processo este importante principalmente para a indústria farmacêutica na obtenção de fármacos e insumos farmacêuticos (SHELDON; BRADY, 2018; CARVALHO et al., 2005). Fármacos quirais podem ser encontrados na sua forma racêmica ou enantiômeros puros, na maioria dos casos este último possui maior biodisponibilidade, como é o caso do omeprazol que inicialmente foi comercializado na forma racêmica e depois observou-se que a forma enantiômera possuía maior biodisponibilidade (BONATO et al., 2005).

Os micro-organismo despertam bastante interesse como catalisadores destas reações em virtude da facilidade de reprodução, da gama de processos metabólicos e enzimas envolvidas e da diversidade de micro-organismos que permite inúmeros testes (CARVALHO et al., 2005). Dentre os micro-organismos encontrados na natureza estão os fungos, que além de produzirem vários metabolitos ativos eles também podem ser utilizados na biocatálise, pois apresentam uma rica variedade de enzimas convenientes ao processo biocatalítico (MEDEIROS, 2010).

Os fungos filamentosos são uma fonte importante de genes e caminhos metabólicos utilizados para sintetizar uma ampla gama de compostos economicamente significativos, incluindo peptídeos, enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos, antibióticos e outras substâncias relevantes para geração de produtos farmacêuticos, alimentares, químicos e indústrias biotecnológicas (ANDERSEN, 2014; LANGE, 2014).

Trabalhos como o de Mouad (2014) demonstram a utilização de fungos isolados da alga marinha *Bostrychia radican* na biotransformação de cetonas fluoradas através de reações de redução que resultaram na produção de álcoois com alto índice de pureza enantiomérica (Figura 1).

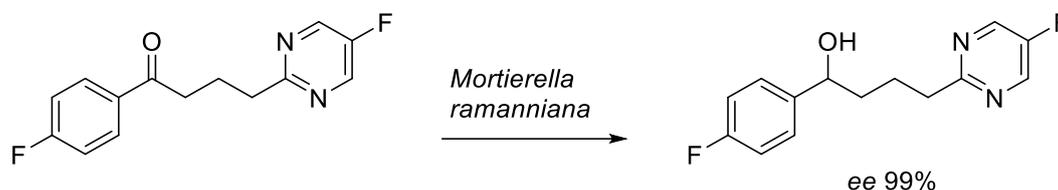


Figura 1: redução enantiosseletiva de uma cetona fluorada por *Mortierella ramanniana*.  
Fonte: Mouad (2014)

## 2 MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 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 90 x 15 mm contendo 15 mL de meio de cultura ágar nutriente (20 g/L) a uma temperatura de 28 °C durante 4 a 7 dias.

### 2.2 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7,0, serão adicionados cerca de 2 g de massa celular (peso úmido) do micro-organismo a ser avaliado e 10 mg do substrato (2-metilciclohexanona ou 3-metilciclohexanona ou 4-metilciclohexanona). Os frascos reacionais serão mantidos sob agitação de 120 rpm à 28°C e monitorados por alíquotas de 2 mL a cada 24 horas por 5 dias, sendo posteriormente submetidas a extração com 1 mL de acetato de etila. Após este período será realizada filtração à vácuo e os sobrenadantes extraídos com duas porções de 10 mL de acetato de etila e secos sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As alíquotas e os extratos resultantes da extração final, serão concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCD e CG/EM.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE BIOCATALISE 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

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

Equação 2

### 2.4 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);
- Injetor split (20:1): 220 °C;
- Modo full scan 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;

- Injetor split (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 µL.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Devido a pandemia e conseqüentemente a dificuldade de acesso aos laboratórios designados para realização da pesquisa, até o momento foram feitas três extrações finais, porém sem resultados conclusivos devido alguns problemas durante o processo como contaminação do fungo e das amostras além da paralisação do agitador devido uma queda de energia no laboratório. Os incidentes já foram corrigidos para prosseguir com a pesquisa.

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa encontra-se em andamento após correção dos incidentes ocorridos e acredita-se que até o final do semestre haverá resultados satisfatórios.

### REFERÊNCIAS

ANDERSEN, M.R. Elucidation of primary metabolic pathways in *Aspergillus* species: orphaned research in characterizing orphan genes. **Brief. Funct. Genomics**, v. 13, n. 6, p. 451–455, 2014.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. de. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; DA SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACOI, R.; MACEDO, G.A.. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

COLLINS, C. H. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2014;

GORETTI, M.; PONZONI, C.; CASELLI, E.; MARCHEGIANI, E.; CRAMAROSSA, M.R.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; FORTI, L. Biotransformation of electron-poor alkenes by yeasts: asymmetric reduction of (4S)-(+)-carvone by yeast enoate reductases. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 45, p. 463-468, 2009;

LANGE, L. The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. **IMA Fungus**, v. 5, n. 2, p. 463–471, 2014.

MEDEIROS, J.B. *Avaliação do potencial biocatalítico de fungos endófitos de espécies vegetais do Cerrado*. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MOUAD, A.M. *Biocatálise na produção de moléculas orgânicas: oxidorreduções de fungos marinhos para a síntese de álcoois quirais e lipase de *Candida antarctica* na produção de amidas fenólicas graxas*. 2014. 230 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SHELDON, R.A.; WOODLEY, J.M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical reviews**, v. 118, n. 2, p. 801-838, 2018.

SHELDON, R.A.; BRADY, D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. **Chemical communications**, v. 54, n. 48, p. 6088-6104, 2018.