



BIOCATÁLISE DE CETONAS PRÓ-QUIRAIS UTILIZANDO O FUNGO *Epicoccum sp.*

Gustavo Adriano Egler Souza¹, Renan Moura Garcia¹, Rogério Aparecido Minini dos Santos²

RESUMO: Transformações biológicas de substratos exógenos utilizando cultura de micro-organismos permitem realizar modificações estruturais em moléculas. A biocatálise encontra-se em amplo desenvolvimento com base em pesquisas realizadas em vários ramos da química e biologia possuindo em comum o principal objetivo de desenvolver novos catalisadores para uso industrial. A área de biocatálise emerge como uma ferramenta poderosa para a chamada “química ecologicamente correta” (química verde), a qual levará cada vez mais a processos industriais comprometidos com o controle ambiental. Duas palavras que são utilizadas para o mesmo assunto podem ser a biotransformação e a biocatálise. Essas duas palavras podem parecer termos parecidos, porém, possuem características diferentes. A biotransformação é definida como a reação dos compostos químicos num sistema vivo, e não precisa ser um processo definido pelo metabolismo do organismo. Já a biocatálise, por outro lado, é mais amplamente definida como a mediação de reações químicas por meio de sistemas biológicos, incluindo enzimas isoladas, células inteiras ou extratos livres de células. Desta forma, a biocatálise tornou-se uma ferramenta importante na síntese de compostos orgânicos, principalmente na obtenção de compostos quirais de interesse farmacológico. Neste contexto, a proposta desta pesquisa é avaliar a capacidade de biotransformação de componentes orgânicos utilizando micro-organismos (fungos e bactérias) como biocatalisadores. Para este fim, serão selecionados componentes que apresentem grupos funcionais específicos possíveis de biocatálise. Os fungos utilizados foram cultivados em placas de Petri com seu meio de cultura adequado onde após o tempo de cultivo, foram transferidos para Erlenmeyers contendo uma solução tampão com um substrato conhecido. Após três dias, os metabólitos foram analisados. Tanto os substratos, como os produtos obtidos por biocatálise foram caracterizados por métodos espectroscópicos e cromatográficos com o uso de um cromatógrafo gasoso com uma coluna capilar com fase estacionária quiral acoplado a um espectrômetro de massa. Pode-se concluir que o fungo apresentado em estudo possui a capacidade de realizar a biocatálise dos substratos utilizados. Com a obtenção de produtos através da biotransformação de cetonas à álcoois, os resultados obtidos são satisfatórios na avaliação da síntese de novos compostos a partir de cetonas pró quirais.

PALAVRAS-CHAVE: Química verde; biocatálise; biotransformação; enzimas.

1 INTRODUÇÃO

A biocatálise é definida como o uso de catalisadores naturais enzimáticos com a finalidade de realizar transformações químicas em compostos orgânicos (OMORI; PORTAS; OLIVEIRA, 2011). Biotransformação e biocatálise apesar de serem termos parecidos, possuem características diferentes. A biotransformação pode ser definida como a reação dos compostos químicos num sistema vivo, e não precisa ser um processo definido pelo metabolismo do organismo. Biocatálise, por outro lado, é mais amplamente definida como a mediação de reações químicas por meio de sistemas biológicos, incluindo enzimas isoladas, células inteiras ou extratos livres de células (HUDLICKY; REED, 2009). Em torno disto, é sabido que todos os seres vivos possuem a capacidade de sintetizar enzimas, por isso são considerados fontes de biocatalisadores naturais (enzimas) que são muito úteis e versáteis na indústria (LIESE; SEELBACH; WANDREY, 2006). Segundo Faber (2011), essas enzimas podem ser utilizadas nos mais diversos tipos de reações orgânicas. Além disso, apresentam características que catalisadores sintéticos não apresentam, por exemplo: o uso de condições brandas de reação, pois normalmente o solvente utilizado é a água; o uso de reagentes degradáveis, devido os catalisadores serem enzimas de plantas, animais ou micro-organismos e também a característica de serem decompostos no ambiente após o uso (OMORI; PORTAS; OLIVEIRA, 2011).

Industrialmente, a biocatálise oferece uma grande seletividade do ponto de vista estereoquímico. Um simples exemplo disso é comparar a redução da acetofenona utilizando um agente redutor de cetonas pró-quirais sintético (boro hidreto de sódio - NaBH_4) e um agente redutor natural proveniente da cenoura (enzima desidrogenase). Os agentes pró-quirais são substâncias que levam a produção de moléculas com centros quirais. Uma vez que o sintético produz uma mistura de álcoois racêmicos, com 50% para o enantiômero *S* e 50% para enantiômero *R*, a partir da Acetofenona, a cenoura forma um produto dominante em relação ao outro (Figura 1).

¹Acadêmicos do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – Unicesumar, Maringá – PR. Programa de Iniciação Científica do Cesumar (PICC) – gustavo_adriano13@hotmail.com; renan.mtn@hotmail.com.

²Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá, Paraná. rogeriominini@unicesumar.edu.br



Em alguns casos, pode ser gerado um excesso enantiomérico (ee) de até 99%, em razão disso é considerada como um eficiente biocatalisador (ZUIN, V.G.; CORREA, A.G., 2009 apud OMORI et al., 2011).

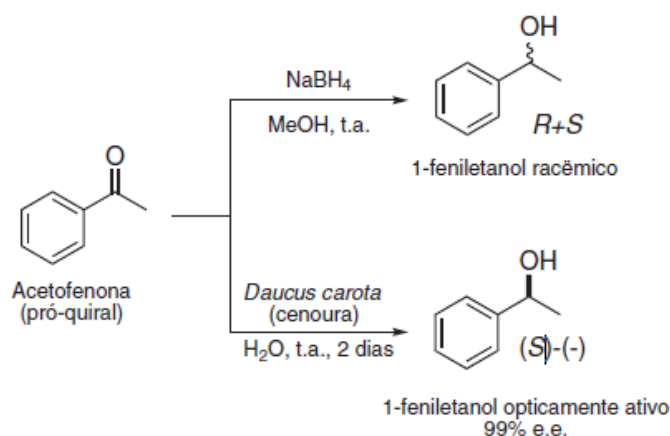


Figura 1: Redução da Acetofenona através de um agente sintético e um agente natural.

Biocatálise com o uso de micro-organismos:

Uma única estirpe microbiana pode produzir uma grande variedade de enzimas intra e/ou extracelulares, a produção de cada uma pode ser dependente de condições de crescimento e de desenvolvimento celular (BODE et al., 2002). As enzimas dentro das células estão em um ambiente protegido e são muitas vezes mais estáveis do que quando isoladas. No entanto, o substrato deve ser capaz de transpor o envoltório celular para atingir as enzimas, o que pode diminuir a velocidade da reação, quando comparados com enzimas isoladas. Uma maneira de contornar essas limitações de transferência de substrato é a permeabilização da parede da célula e das membranas por meios químicos (por exemplo, por adição de detergentes ou solventes) ou físicos (por exemplo, choque térmico) de tratamento (de CARVALHO, 2011).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes, solventes e substratos (Figura 3) foram adquiridos comercialmente. Todos os substratos foram reduzidos quimicamente para obtenção dos padrões racêmicos. Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplaças de alumínio da Merck com sílica gel 60 GF254. A fase móvel utilizada foi hexano:acetato de etila (90:10) utilizando-se de reveladores químicos, como solução ácida de p-anisalaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina. Os produtos de biocatálise foram analisados em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de massas (GC-EM), modelo 5977-A, Agilent Technologies Co., Ltda. cuja a fase estacionária era uma coluna HP-5MS (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) e a fase móvel gás Hélio. Os substratos utilizados nesse estudo estão descritos na **Tabela 1**.

Foi utilizado o fungo do gênero *Epicoccum sp.*, obtido e identificado durante o projeto de doutorado da Dra. Carla Porto da Silva (IQ/Unicamp), sob orientação da Prof. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, aprovado sob avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa / Faculdade de Ciências Médicas (CEP/FCM) da Unicamp (Folha de Rosto 1085/2008) (Anexo I), cujas culturas estão mantidas sob criopreservação no Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos do Departamento de Farmácia da UEM (LABIPROS) e Laboratório de Análises Químicas Aplicadas a Biotecnologia (LABIOTEC). Os consórcios de fungos testados foram cultivados em placa de Petri contendo o meio de cultura adequado. Após o período de cultivo, os micro-organismos foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL, contendo cerca de 50 mL de Extrato de Malte ME, sendo incubados por 48 horas a 28 °C sob agitação (200 RPM). Após esse período, as células microbianas foram centrifugadas a 5000 RPM, por 10 min. ou filtradas em uma unidade de filtragem estéril. Em Erlenmeyers de 125 mL contendo 40 mL de tampão Sørensen (NaH₂PO₄ -KH₂PO₄) pH 7,0, foi adicionado cerca de 2 g de massa celular (peso úmido) do micro-organismo a ser avaliado e 20 mg do substrato. Os frascos reacionais foram mantidos sob agitação de 200 rpm, à 28°C e monitorados por alíquotas de 2 mL a cada 24, 48 e 72 horas. As alíquotas retiradas foram submetidas a processos de extração líquido-líquido com 2 mL de acetato de etila para obter os metabólitos liberados pelos micro-organismos durante o experimento. As fases orgânicas coletadas foram secas com Na₂SO₄ anidro e analisadas por CG-EM. A identificação, as concentrações das cetonas e seus respectivos álcoois foram obtidas por CG/EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas) em aparelho Agilent Technologies 5977-A. Foi utilizado uma coluna HP-5MS (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm), a fase móvel foi gás Hélio (fluxo 1,0 mL/min), razão split 1:20 e temperatura programada: 60 a 90°C (3°C/min.) e 90 a 285°C (50°C/min.). O volume

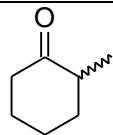
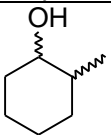
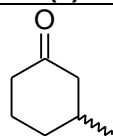
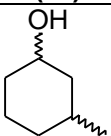
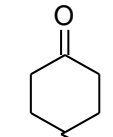
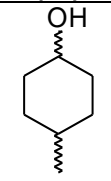
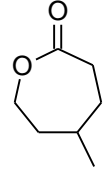
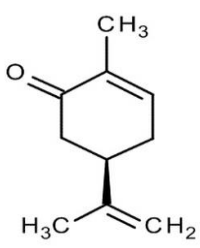
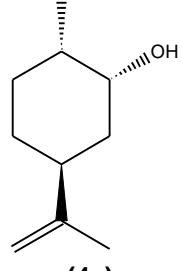
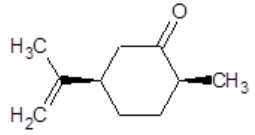


injetado foi de 2 μL , temperatura do injetor de 220°C, temperatura da interface em 240°C, do detector (quadrupolo) a 300°C. A caracterização dos compostos foi feita por comparações com espectros de massas da literatura e as concentrações foram obtidas por análise de área relativa (GÖREN et al, 2002). A análise dos dados foi realizada de forma quantitativa com base nos resultados apresentados na cromatografia gasosa em conjunto com a espectrometria de massa. Os dois equipamentos em conjunto unem suas características para que seja possível observar diferentes substâncias em uma amostra onde através de cromatogramas, pode-se observar a fragmentação de determinado substrato em picos, possibilitando a análise da reação. Neste trabalho não foram utilizados testes estatísticos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da utilização do *Epicoccum sp.* como biocatalisador dos substratos (1) – (5), foram obtidos os produtos observados na Tabela 1. Os percentuais de cada produto foram calculados através das áreas relativas dos cromatogramas. As reações podem gerar produtos isômeros, no entanto, a coluna utilizada no cromatógrafo gasoso não possibilita a obtenção da isomeria dos mesmos.

Tabela 1: Produtos e rendimentos obtidos por reações de biocatálise de cetonas por *Epicoccum sp.*

Nome	Substrato	Produto <i>Epicoccum sp.</i>	Rendimento em %
2-metilciclohexanona	 (1)	 (1a)	62,40%
3-metilciclohexanona	 (2)	 (2a)	29,03%
4-metilciclohexanona	 (3)	 (3a)	23,26%
		 (3b)	72,31%
(+)-(S)-carvona	 (4)	 (4a)	5,31%
			8,81%



		<p>(4b)</p>	63,39%
		<p>(4c)</p>	
(+)-(S)-carvona	<p>(4)</p>	<p>(4d)</p>	2,38%
		<p>(4e)</p>	17,95%
		<p>(4f)</p>	2,13%
(-)-(R)-carvona	<p>(5)</p>	<p>(5a)</p>	89,18%
		<p>(5b)</p>	9,55%
		<p>(5c)</p>	1,28%

Fonte: Dados da pesquisa

O fungo do gênero *Epicoccum* sp demonstrou a capacidade de reduzir o substrato 2-metil ciclohexanona (1) e 3-metil ciclohexanona (2) apresentando uma grande atividade biocatalítica, possivelmente através de uma



enzima redutora, para a obtenção dos álcoois quirais 2-metilciclohexanol (**1a**) e 3-metilciclohexanol (**2a**). O produto (**1a**) obtido no experimento é comparável com a reação observada por Mai Kawamoto et al. (2008) onde o mesmo substrato foi utilizado com espécies diferentes de fungos (*Fusarium sporotrichioides* NFRI-1012 e *Fusarium sp.* AP- 2).

Na reação envolvendo a molécula 4-metilciclohexanona (**3**), pode-se observar a produção do álcool quiral 4-metilciclohexanol (**3a**) com um rendimento final de 23.26% para o *Epicoccum sp.*. Além da produção do álcool, o fungo realizou a oxidação da molécula (**3**) através de um processo denominado oxidação de Baeyer-Villiger, gerando um produto com rendimento final de 72.31%. Essa reação pode ser comparada com o experimento realizado por Piovani et al. (2008), onde o fungo utilizado *Aspergillus terreus* URM 3571 catalisou a mesma reação com rendimento final de 76%.

Utilizando o substrato (+)-(S)-carvona (**4**), foi obtido através do micro-organismo os seguintes resultados: neodiidrocarveol (**4a**), *cis*-diidrocarvona (**4b**), *trans*-diidrocarvona (**4c**), diidrocarveol (**4d**), neo-iso-diidrocarveol (**4e**), *carveol* (**4f**). A reação com a cultura de *Epicoccum sp.* apresentou respectivamente o rendimento de 5.31% para (**4a**), 8.81% para (**4b**), 63.39% para (**4c**), 2.38% para (**4d**), 17.95% para (**4e**) e para (**4f**) com 2.13% de rendimento.

Na utilização do substrato (-)-(R)-carvona (**5**), o *Epicoccum sp* realizou a conversão em três produtos diferentes, sendo eles o neodiidrocarveol (**5a**) com 89.18 % de rendimento, o diidrocarvona (**5b**) com 9.55% de rendimento e o diidrocarveol (**5c**), com 1.28% de rendimento. Na pesquisa realizada por Silva, Souza e Júnior (2011) pode-se observar que as reações envolvendo os mesmos substratos (**4**) e (**5**) com espécies de fungos diferentes apresentaram semelhanças nos resultados obtidos, como por exemplo, os produtos (**4a**), (**4c**) e (**4e**) para o substrato (**4**) e o produto (**5a**) para o substrato (**5**).

Nos substratos 1 e 2, a enzima envolvida no processo apenas reduz a molécula simplesmente removendo a dupla ligação do grupo funcional cetona, adicionando uma molécula de hidrogênio para gerar um novo grupo funcional. A produção de álcoois é de suma importância pois caracteriza a possibilidade do micro-organismo em estudo realizar reações de redução e principalmente a modificação da estrutura funcional da molécula. Na reação do composto (**3**), pode ser observada uma reação de destaque nesta pesquisa pois envolve a ação da enzima Baeyer Villiger monooxigenase. Apenas esse substrato apresentou o resultado satisfatório na produção de uma lactona provavelmente devido ao fato de que a molécula (**3**) diferentemente dos outros substratos, apresentar uma simetria em sua forma estrutural, o que faz com que o grupo funcional fique distante do radical metil, expondo toda a cadeia cíclica onde conseqüentemente, a enzima fica livre para atuar em qualquer local do anel adicionando um átomo de oxigênio gerando, por exemplo, o produto (**3b**).

Na pesquisa realizada por Silva, Souza e Júnior (2011) pode-se observar que as reações envolvendo os mesmos substratos (**4**) e (**5**) com espécies de fungos diferentes apresentaram semelhanças nos resultados obtidos, como por exemplo, os produtos (**4a**), (**4c**) e (**4e**) para o substrato (**4**) e o produto (**5a**) para o substrato (**5**). As enzimas pertencentes aos fungos realizam reações que são fundamentais para a síntese dos produtos observados nessa pesquisa. Primeiramente, a enzima enona redutase ataca a dupla C=C gerando uma nova cetona e após isso, uma enzima redutora age sobre o grupo funcional quebrando a dupla ligação da carbonila cetônica promovendo a formação de um álcool (SILVA; SOUZA; JÚNIOR, 2011). Isso é comprovado pela biocatálise nos substratos (**4**) e (**5**) onde pode ser observada a presença de uma nova cetona (**4b**) e (**4c**) e posteriormente a formação de um álcool (**4a**) (**4d**) (**4e**) e (**4f**). Os produtos gerados nessa reação podem ser divididos em produtos intermediários e produtos finais. Os intermediários são aqueles que sofreram apenas a ação da primeira enzima gerando os produtos (**4b**) e (**4c**) que foram obtidas após a perda da dupla ligação originando compostos diastereoisômeros *cis* e *trans*. As diidrocarvonas geradas sofrem a ação da próxima enzima que reduz novamente a molécula, causando a perda do grupo funcional cetona onde após a remoção da dupla ligação do oxigênio torna-se um álcool.

4 CONCLUSÃO

Pode se concluir que o micro-organismo do gênero *Epicoccum* foi capaz de realizar a redução dos substratos (1) – (5) em diversos produtos. Devido a uma boa estereosseletividade e estereoespecificidade, o fungo promoveu a formação de diferentes monoterpênicos a partir das carvonas (4) e (5) produzindo compostos com aplicações industriais como intermediários sintéticos de produtos naturais que também podem ser utilizados na produção de cosméticos. A atividade enzimática envolvida nos substratos (1) – (3) possibilitou a formação de produtos com grupos funcionais diferentes de seus substratos, gerando álcoois e em um dos casos a produção de uma lactona (3b). O processo de controle de oxigenação poderia gerar resultados mais satisfatórios para a produção de outras lactonas para outras moléculas, uma vez que pode ser observado neste estudo a capacidade do fungo em realizar reações de Baeyer Villiger. Apesar de apresentar resultados importantes, é oportuno o estudo das enzimas para que seja feito seu isolamento e posteriormente sua aplicação em escala industrial.



BIBLIOGRAFIA

BODE, M.L.; van RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A. Crude aminoacylase from *Aspergillus* sp. Is a mixture of hydrolases. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 84, p. 710-713, 2002.

de CARVALHO, C.C.C.R. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. **Biotechnol. Advances**, v. 29 (1), p. 75–83, 2011.

FABER, Kurt. Biotransformations in Organic Chemistry. 6. ed. **Heinrichstr: Springer**, 2011.

HUDLICKY, T., REED, J.W. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. **Chem. Soc. Rev.** v. 38, p. 3117–3132, 2009.

Gören AC, Topçu G, Bilsel G, Bilsel M, Aydogmus Z, Pezzuto JM. The Chemical Constituents and Biological Activity of Essential Oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 2002; 799

KAWAMOTO, Mai et al. Biotransformation of (±)-2-methylcyclohexanone by fungi. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 30, n. 9, p.1655-1660, 22 abr. 2008. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10529-008-9729-y.

LIESE, Andreas; SEELBACH, Karsten; WANDREY, Christian. Industrial Biotransformations. Weinheim: **Wiley-vch**, 2006

OMORI, Álvaro Takeo; PORTAS, Viviane Barbosa; OLIVEIRA, Camila de Souza de. REDUÇÃO ENZIMÁTICA DO 4-(DIMETILAMINO)BENZALDEÍDO COM PEDAÇOS DE CENOURA (*Daucus carota*): UM EXPERIMENTO SIMPLES NA COMPREENSÃO DA BIOCATÁLISE. **Química Nova**, Santo André, v. 35, n. 2, p.435-437, set. 2011.

PIOVAN, Leandro et al. Chemoselective screening for the reduction of a chiral functionalised (±)-2-(phenylthio)cyclohexanone by whole cells of Brazilian micro-organisms. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 19, n. 20, p.2385-2389, out. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.tetasy.2008.10.003.

SILVA, Suéllen Kélcya Gomes da; SOUZA, Wanderson Costa de; LIMA JÚNIOR, Wellington Rosa de. ESTUDOS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE (+) E (-) – CARVONA POR CULTURA DE *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. In: IX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VI JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2011, p. 1 - 6.