



## **BIOCATÁLISE DE ÉSTERES DE FRAGRÂNCIA MONITORADAS POR CLAE-EM/EM, UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS DA PELE.**

Matheus Devanir Custódio<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/Uem), Patrícia Daniele Silva dos Santos<sup>1</sup> (IC), Carla Porto<sup>1</sup> (PQ), Arildo José Braz de Oliveira<sup>2</sup> (PQ), Regina Aparecida Correia Gonçalves<sup>2</sup> (PQ), Eduardo Jorge Pilau<sup>1</sup> (Orientador),  
e-mail: epilau@gmail.com.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/ Maringá, PR.

### **Ciências Exatas e da Terra- Química**

**Palavras-chave:** biocatálise, éster, hidrólise.

#### **Resumo:**

O presente trabalho visou desenvolver uma nova metodologia para o estudo de produtos obtidos de reações de biocatálise utilizando insumos de fragrâncias da classe dos ésteres na presença de fungos filamentosos isolados da pele humana. Ésteres são substâncias amplamente utilizadas em aromas e fragrâncias, principalmente para imitar notas de frutas, possuindo características olfativas muito importantes. Essa classe de compostos pode sofrer hidrólise, originando ácidos carboxílicos, os quais possuem muitas vezes odor desagradável.

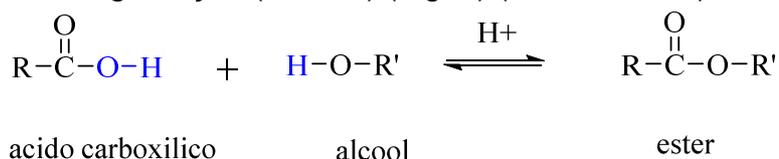
Este projeto propõe o desenvolvimento de um novo método de análise de produtos obtidos das biotransformações de ésteres por fungos filamentosos, baseado em análises de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE EM/EM) e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM/EM).

#### **Introdução**

A biocatálise é uma área de pesquisa multidisciplinar e de suma importância. Trata-se de uma vertente da biotecnologia a qual se caracteriza pela aplicação de moléculas biológicas, normalmente enzimas, capazes de catalisar reações químicas específicas. Atualmente, várias são as aplicações da biocatálise na fabricação de fertilizantes, defensivos agrícolas, fármacos e na indústria alimentícia (ROWE, 2005). Sendo assim, estudos são fundamentais para o melhoramento de processos e também para fabricação



de novos materiais. Os ésteres são hidrolisados por uma base aquosa ou por um ácido aquoso, para produzir um ácido carboxílico mais um álcool ou por uma reação de degradação (inversa) (Fig. 1) (ROWE, 2005).



**Figura 1.** Esquema genérico de uma reação de esterificação/hidrolise.

Entretanto, sua aplicação específica em fragrâncias é limitada, já que os ésteres podem ser pouco estáveis frente às condições da pele humana (por exemplo, pH e transpiração), podendo assim sofrer hidrólise, originando ácidos carboxílicos, os quais possuem, muitas vezes, odor desagradável (MARSIAOLI, 2012). Além disso, pouco se sabe sobre o papel da participação de micro-organismos presentes na pele humana nas reações de hidrólise (ou degradação) desses compostos, apesar de que estudos comprovam que 90% das células que compõem o nosso corpo são de origem bacteriana (DA SILVA, 2012).

## Materiais e métodos

Para os ensaios de biocatálise foram utilizados como substrato o heptanoato de alila, laurato de etila e 9-dodecalactona. Os ensaios foram realizados com o fungo *Aureobasidium sp* e *Epicoccum sp* cultivado em placa de Petri contendo extrato de malte como meio, por 48 h. Após o crescimento, os micélios foram recortados do ágar e transferidos para um Erlenmeyer contendo meio de cultivo, mantidos em agitador orbital (Shaker) para obter o pré inóculo. Após 24h de incubação, o conteúdo foi vertido em outro Erlenmeyer, com meio de cultivo, sendo incubado por 2-4 dias. Após esse período, as colônias dos fungos foram filtradas e ressuspensas em solução tampão fosfato (pH 7,0).

Em Erlenmeyers de 125 mL foram adicionadas 2 g de célula (peso úmido), 50 mL de tampão fosfato estéril e 20 µL de substrato. A suspensão resultante foi agitada em Shaker (28°C; 200 rpm). Os ensaios foram monitorados em tempos de 24, 48, 72 e 96 h, pela retirada de alíquotas de 1 mL do sobrenadante, as quais foram extraídas com acetato de etila (2 x 1 mL). A fase orgânica foi separada e concentrada sob fluxo de nitrogênio.

Os produtos das reações de biotransformação foram monitorados através de análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). Para as análises dos metabólitos foi utilizado as seguintes condições: coluna ZIC-HILIC e gradiente de eluição com (A) água (0,1% de



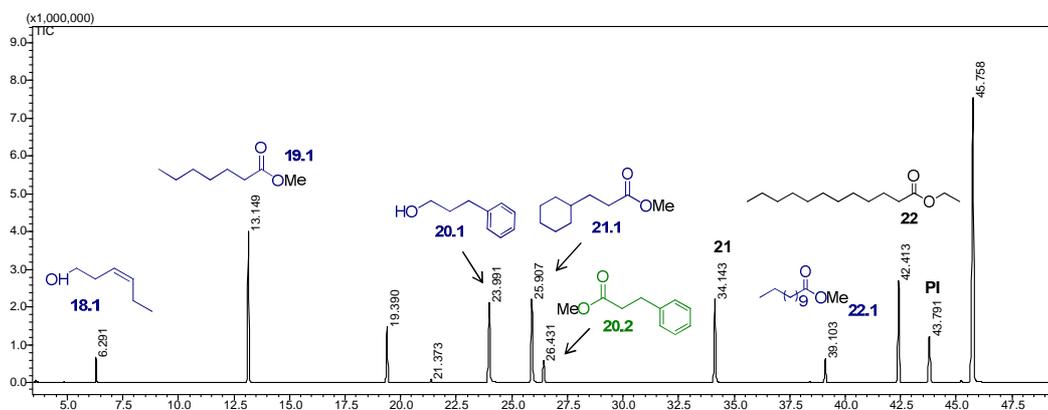
ácido fórmico) e (B) acetonitrila (0,1% ácido fórmico). A corrida foi efetuada em 20 min sob as condições descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros utilizados para a corrida cromatográfica

Tempo(min)	Vazão	%A	%B
20	0.4	5	95
20	0.4	60	40
20	0.4	10	90
20	0.4	10	90

## Resultados e Discussão

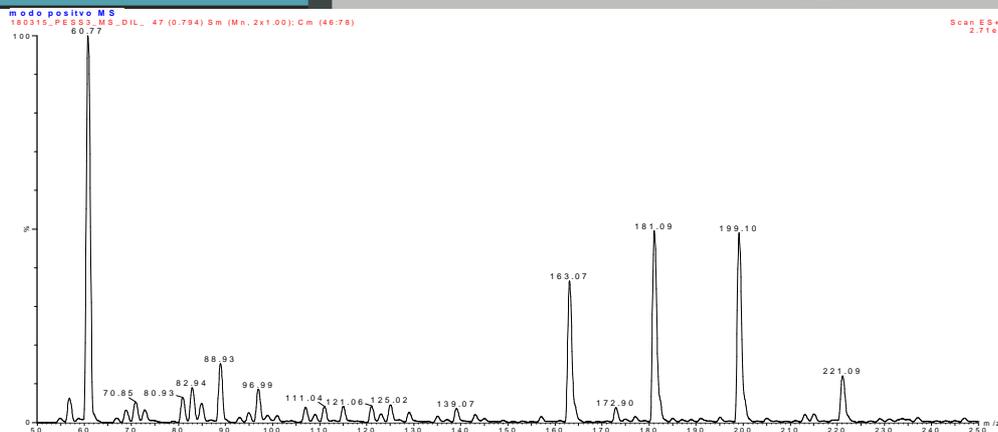
A Figura 2 mostra a análise por GC-EM do ensaio de biocatálise de alguns ésteres usados neste projeto, frente ao fungo *Aureobasidium* sp. A hidrólise dos mesmos pode ser vista pela detecção dos respectivos álcoois e ácidos.



**Figura 2:** Cromatograma de íons totais da biocatálise de ésteres com o fungo *Aureobasidium* sp. (48h de reação).

Os resultados das análises realizada por CLAE-EM apresenta o espectro de massas referente ao substrato 9-dodecalactona que foi detectado na presença quanto na ausência do fungo (Figura 3).

Com a comparação dos resultados, podemos perceber a presença dos mesmos sinais, tanto no ensaio contendo fungo, quanto no controle branco. Desta maneira podemos concluir que não foi possível detectar os sinais do álcool e nem do ácido, relacionados a hidrólise do substrato utilizado. Isto pode ter acontecido devido à volatilidade dos ésteres e a dificuldade em serem ionizados.



**Figura 3:** Espectro de massas da biocatálise do substrato 9-dodecalactona com o fungo *Aureobasidium* sp. (96h de reação).

Novos estudos serão realizados afim de melhorar/otimizar a detecção dessa classe de substrato utilizando CLAE-EM.

## Conclusões

Os ensaios realizados até o momento demonstraram que não ocorreram as hidrolises dos ésteres, no entanto novos parâmetros estão sendo estudados para otimização dos testes da biocatálise.

## Agradecimentos

UEM/DQI, UEM/DFA, UNICESUMAR, PIBIC/CNPq, Universal CNPQ (Processo:477766/2013-2017) e à organização do evento.

## Referências

DA SILVA, C P. **Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias.** 2012. 185f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2012.

MARSAIOLI, A. J.; GONÇALVES, CAROLINE C. S.; Fatos e Tendências da Biocatálise; **Quim. Nova**, v.36, n.10, p.1587-1590, 2013.

ROWE, D.J. Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances. 2005, **Blackwell Publishing Ltd.** CRC Press, Boca Raton, USA.