



UTILIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS VOLÁTEIS PROVENIENTES DE REAÇÕES DE BIOCATÁLISE

MATHEUS DEVANIR CUSTODIO (PIBIC/CNPq/FA/UEM), CARLA PORTO (PQ), ARILDO JOSÉ BRAZ DE OLIVEIRA (PQ), REGINA APARECIDA CORREIA GONÇALVES (PQ), EDUARDO JORGE PILAU (Orientador), e-mail: ejpilau@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Química/ Maringá, PR.

Ciências Exatas e da Terra/ Química

Palavras-chave: Voláteis, fase sólida, biocatálise.

Resumo

O grande interesse da indústria na área da biotecnologia, fomenta o estudo de novas metodologias afim de analisar produtos obtidos de reações de biocatálise utilizando ésteres na presença de fungos filamentosos isolados da pele humana. A classe química de éster pode ser encontrada na natureza em flores e animais e, despertam o interesse da indústria de cosméticos devido ao seu agradável odor. No entanto, sua utilização é muito limitada, devido à baixa estabilidade destes compostos frente à pele humana. Além disso, os micro-organismos encontrados na pele podem acabar catalisando reações químicas nessas substâncias, produzindo produtos com odores desagradáveis. As reações de biocatálise realizadas por estes organismos, no entanto são difíceis de serem observadas. Isto se deve ao fato de os produtos serem muito voláteis e escaparem durante a reação. Desta forma, este trabalho propôs utilizar a técnica de Extração em Fase Sólida (EFS) para capturar esses voláteis e realizar uma análise posterior desses produtos por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM/EM).

Introdução

Atualmente químicos tem procurado utilizar de técnicas menos agressivas ao meio ambiente. Desta forma, a biocatálise desponta como uma





importante técnica, pois faz o uso de enzimas para catalisar reações químicas específicas (GONÇALVES, 2012).

Métodos convencionais de síntese, por exemplo, utiliza-se materiais sintéticos (derivados do petróleo, muitas vezes) que na maior parte do tempo são tóxicos e de difícil descarte. Desta forma, a biocatálise se torna um método mais conveniente para a obtenção de moléculas de grande interesse industrial e acadêmico (GOLÇALVES, 2013), visto que essas reações podem ser realizadas em condições reacionais brandas (temperatura ambiente, pressão atmosférica e pH entre 5 e 8) evitando a formação de subprodutos e minimizando o consumo de energia. Além disso, as enzimas são consideradas eficientes catalisadores pois podem realizar reações orgânicas conhecidas de forma régio- e estéreo-seletiva. Em nossa pele existem muitos micro-organismos (MO) que produzem enzimas e podem catalisar reações, e, dentre estes, podemos destacar, os fungos (PORTO, 2012). Alguns deles podem agir catalisando uma reação em um éster, por exemplo, alterando o odor do componente de fragrância e acabar estragando um bom perfume.

Os ésteres podem ser obtidos por uma reação de esterificação (Figura 1) entre um álcool e um ácido carboxílico, no entanto a reação pode acontecer no sentido inverso (hidrólise/degradação),

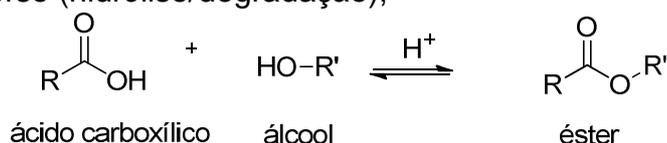


Figura 1: Esquema genérico de uma reação de esterificação/hidrólise.

No entanto, os produtos dessas reações são muito difíceis de serem observados devido a sua alta volatilidade. Sendo assim, a utilização da técnica de Extração em Fase Sólida (EFS) pode ser utilizada para uma melhor observação dos produtos dessas reações. Esta técnica emprega a utilização de cartuchos recheados com sorventes (fase sólida), sendo que o mecanismo de retenção do analito é o mesmo que o mecanismo utilizado para a cromatografia em coluna (JARDIM, 2010).

Materiais e métodos





Neste trabalho, foram selecionadas 5 linhagens de fungos que apresentaram uma alta atividade hidrolítica: *Epicoccum* sp., *Cladosporium* sp., *Rhodotorula* sp., *Phoma* sp., *Aureobasidium* sp. e *Cladosporium* sp.

As cepas foram cultivadas em paca de Petri contendo o meio de cultivo sólido adequado de 24 à 72 horas e, posteriormente, foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo líquido. Foram mantidos em crescimento durante um período de 2 a 4 dias sob agitação de 200 rpm à 30°C. Após esse período, os fungos foram submetidos a filtração à vácuo em peneiras de 200 mesh. Os ensaios de biocatálise foram realizados com cerca de 2 g (peso úmido) do MO e 20 mg do substrato em solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 ; 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0). A suspensão resultante foi colocada sob agitação orbital (Shaker) de 200 rpm à 30 °C. Afim de monitorar o andamento da reação, foram acoplados ao gargalo do erlenmeyer cartuchos de Extração em Fase Sólida (EFS), que foram retirados e extraídos à cada 24, 48 e 72 horas, também foram retiradas alíquotas de 2 mL do sobrenadante nos mesmos períodos.

O cartucho foi extraído com 2 mL de metanol e as alíquotas do sobrenadante com 1 mL de acetato de etila e centrifugação das células. Os produtos da biotransformação foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectro de Massas (CLAE-EM).

Os Ésteres (substratos) selecionados para os ensaios de biocatálise foram: Acetato de hidrocinaamila/ acetato de 3-fenilpropila, "Ester de abacaxi"/3-cicloexilpropanoato de alila, Laurato de etila/ dodecanoato de etila e Glicidato de etil-fenil-metila/Aldeído Morango/Aldeído C-16

Resultados e Discussão

Muitos dos fungos utilizados neste trabalho estavam inativos, desta forma foi necessário fazer uma reativação desses MO.

No entanto, não foi possível realizar a revitalização de alguns MO fungos, tornado assim impossível a realização do experimento com este MO como é o caso do fungo *Rhodotorula* sp.

Em cada biotransformação foram utilizados três cartuchos de EFS afim de capturar os produtos voláteis da reação. Estes cartuchos foram retirados a cada 24 horas durante um período de 72 horas, sendo extraído com álcool metílico. As amostras contendo os produtos, foram submetidas à análise por CLAE-EM.

Em uma análise preliminar, foi possível verificar que estes fungos possuem uma alta capacidade de hidrólise, sendo, portanto, capazes de catalisar





reações desse tipo muito facilmente. Entretanto, como foi dito, os produtos desta reação são extremamente voláteis. Esperava-se que fosse possível analisar os produtos da reação após a extração com o metanol, no entanto isso não foi possível.

Mesmo estando em local fechado e bem refrigerado, os componentes voláteis presentes no cartucho podem ter escapado para a atmosfera. Outro ponto importante é que os éteres são compostos químicos de difícil ionização, portanto pode ser que as moléculas extraídas não puderam ser ionizadas e assim, ser identificadas.

Conclusões

Tendo em vista a dificuldade em se capturar os produtos voláteis de uma reação de biocatálise de ésteres na presença de fungos filamentosos isolados da pele, com alta capacidade de hidrólise, pode-se perceber que a metodologia empregada, utilizando cartuchos de EFS para a captura desses compostos, provou-se uma metodologia não muito eficiente. Desta forma, são necessários mais estudos na área, afim de determinar uma metodologia mais eficiente.

Agradecimentos

UEM/DQI, UEM/DFA, PIBIC/CNPq-FA-UEM.

Referências

GONÇALVES, R.A.C., de OLIVEIRA, A.J.P., GONÇALVES, E. Biocatálise e Biotransformação – Fundamentos e Aplicações. 2012, v. 2, **Editora Schoba Ltda**, São Paulo, SP.

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

Porto, C. S. **Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias**. 2012, 182f. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

JARDIM I. C. S. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica** v. 2, n°1, p. 13-25, 2010.

