

Avaliação da biotransformação da (4R)-(-)-Carvona utilizando fungos filamentosos de origem humana immobilizados em matriz de alginato de cálcio

Juliana Carvalho Fernandes (PIBIC/UEM)¹, Arthur Antunes Ferrarezi¹, José Eduardo Gonçalves², Arildo José Braz de Oliveira¹, Regina Aparecida Correia Gonçalves (Orientador)¹, e-mail: racgoncalves@uem.br.

¹Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

²Unicesumar – Centro Universitário de Maringá, Maringá, PR.

Ciências da Saúde - Farmácia

Palavras-chave: imobilização, biocatálise, monoterpenoide

Resumo:

O emprego de reações de biocatálise representa uma alternativa *eco friendly* em relação aos métodos tradicionais de síntese orgânica, pois emite baixa carga de resíduos e utilizam condições reacionais mais brandas. A imobilização de biocatalisadores em matriz de alginato de cálcio é uma técnica de baixo custo, que permite a reutilização dos mesmos. A (4R)-(-)-Carvona é um monoterpenoide e seus produtos de biotransformação apresentam um alto potencial de utilização na indústria farmacêutica e alimentícia. No presente trabalho, realizou-se a avaliação da biotransformação desse monoterpenoide utilizando dois fungos filamentosos isolados da pele humana, immobilizados em matriz de alginato de cálcio. Os resultados mostraram que os mesmos foram capazes de biotransformar o substrato e sua atividade enzimática se manteve após períodos de estocagem.

Introdução

Com o objetivo de gerar um mundo mais sustentável, a Química Verde vem se consolidando como uma ótima estratégia, pois visa a implementação de processos e produtos que reduzam ou, se possível, eliminem a geração de resíduos ao meio ambiente. Dentre as diversas estratégias propostas, a biocatálise recebe destaque, pois utiliza enzimas contidas no interior de células íntegras ou isoladas de microrganismos, por exemplo, e condições reacionais mais brandas (GONÇALVES & MARSAIOLI, 2014; SOUZA-AGUIAR, E. F. et al., 2014).

A imobilização pode ser definida como uma técnica que confina um biocatalisador dentro do meio reacional. Essa técnica é vantajosa por ser simples, rápida e de baixo custo, a qual confere maior estabilidade ao biocatalisador, dispensa o uso de cofatores e ainda permite a reutilização do

biocatalisador por determinado número de ciclos (FRASER & BICKERSTAFF, 1997)

A (4R)-(-)Carvona é um monoterpenoide amplamente utilizado como aromatizante devido ao seu característico aroma adocicado de menta e seus produtos de biotransformação apresentam um alto potencial de utilização na indústria farmacêutica e alimentícia (GORETTI et al., 2013). Os fungos da pele humana representam uma fonte de enzimas com potencial aplicação em reações de biocatálise, visto que no órgão cutâneo são capazes de metabolizar os mais diversos compostos orgânicos (SILVA, C. P., 2012). O objetivo do presente projeto foi avaliar a biotransformação da (4R)-(-)Carvona utilizando os fungos filamentosos isolados da pele humana *Phoma* sp e *Aureobasidium* sp imobilizados em matriz de alginato de cálcio.

Materiais e métodos

Substratos utilizados

Para as reações de biocatálise utilizou-se o monoterpenoide (4R)-(-)Carvona.

Microrganismos utilizados

Foram utilizados os fungos filamentosos do gênero *Phoma* sp (**F45**) e *Aureobasidium* sp (**F46**), gentilmente cedidos pela Prof^a Dra. Anita Marsaioli (IQ-UNICAMP), isolados da pele humana pela Dra. Carla Porto, em sua tese de doutorado (Registro SISNEP – Folha de Rosto 1085/2008, Comitê de Ética em Pesquisa/Faculdade de Ciências Médicas (CEP/FCM) da Unicamp).

Manutenção dos microrganismos

Os fungos filamentosos estão mantidos sob criopreservação no Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LABIPROS) da UEM. A reativação dos mesmos é feita com meio líquido de extrato de malte e peptona a 28 °C e 200 rpm durante 48 horas, onde são transferidos para novo meio de mesma constituição e incubados por mais 24 horas nas mesmas condições.

Imobilização dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos foram imobilizados pelo processo de gelação ionotrópica. Para tal, os fungos foram homogeneizados em uma mistura de água deionizada estéril e alginato de sódio. A mistura foi gotejada, com auxílio de uma seringa e agulha, em uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M, sob agitação magnética suave, onde após o gotejamento as *beads* permaneceram nessa solução por mais 20 minutos, para promover seu enrijecimento. As *beads* foram filtradas e acondicionadas em água deionizada estéril a 4 °C até o momento do uso.

Reações de biocatálise

As *beads* previamente filtradas foram colocadas em erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio aquoso (água deionizada, tampão Tris-HCl ou tampão Tris-HCl + Glicose). Em seguida adicionou 10 μ L do substrato a ser biotransformado e os frascos foram incubados em agitador orbital a 28 °C e 200 rpm durante 5 dias. O consumo do substrato foi monitorado pela retirada de alíquotas a cada 24 horas e analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).

Estudo de estabilidade

Uma batelada de *beads* foi estocada sob refrigeração, de modo a avaliar a viabilidade celular e a atividade enzimática após períodos de 1 semana e 1 mês.

Resultados e Discussão

A partir das análises em CG-EM, os resultados obtidos demonstraram que os fungos **F45** e **F46** foram capazes de biotransformar, nos diferentes meios reacionais durante 120 horas, o substrato (4*R*)-(–)-Carvona em 8 produtos, sendo eles: *trans*-Carveol (**1**), *cis*-Carveol (**2**), *trans*-Diidrocarvona (**3**), *cis*-Diidrocarvona (**4**), *neo*-Diidrocarveol (**5**), Diidrocarveol (**6**), *iso*-Diidrocarveol (**7**) e *neo-iso*-Diidrocarveol (**8**).

Ficou demonstrado que existe influência do meio reacional na conversão do substrato e a seletividade enzimática, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Porcentagem* de conversão da (4*R*)-(–)-Carvona nos diferentes meios reacionais.

Fungo	Água	Tris-HCl	Tris-HCl + Glicose
F46	59,8%	93,7%	>99%
F45	76,3%	85,6%	97,6%

*Calculado por CG-EM

Pôde-se verificar também a porcentagem dos produtos majoritários obtidos em cada reação para os dois fungos avaliados, salientando-se que ambos geraram o produto **3** em maior porcentagem no tampão Tris-HCl e o produto **5** em tampão Tris-HCl + Glicose, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem* dos produtos oriundos da biocatálise nos diferentes meios reacionais avaliados.

Fungo	Produto	Água	Tris-HCl	Tris-HCl + Glicose
F45	<i>cis</i> -Diidrocarvona	40,7%	81,5%	21%
	<i>neo</i> -Diidrocarveol	35,1%	7,5%	75,5%
F46	<i>cis</i> -Diidrocarvona	58,3%	69,7%	10,9%
F46	<i>neo</i> -Diidrocarveol	12,3%	9,5%	86,7%

*Calculado por CG-EM

Por fim, avaliou-se também a estabilidade de armazenamento dos biocatalisadores imobilizados, cujos resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da atividade biocatalítica em período reacional de 120 horas, após períodos de estocagem.

Fungo imobilizado	Período de estocagem	Conversão em água (%) [*]	Conversão em Tris-HCl (%) [*]	Conversão em Tris-HC+Glicose (%) [*]
F45	1 Semana	67,9%	96,1%	98,7%
F46	1 Semana	88,9%	93,2%	97,1%
F45	1 Mês	49,8%	69,3%	98,5%
F46	1 Mês	30,7%	39,7%	98%

^{*}Calculado por CG-EM

Conclusões

A técnica de imobilização dos fungos possibilitou a biotransformação do substrato em Diidrocarvona de Diidrocarveol, além de manter as taxas de conversão mesmo após estocagem. Dessa forma, o controle da seletividade nas reações de biotransformação associado à imobilização representa uma técnica muito atrativa, tendo em vista sua simplicidade e economia, além da possibilidade de reutilização após estocagem.

Agradecimentos

À Dra. Carla Porto; à UEM, Fundação Araucária, CNPq e Unicesumar.

Referências

FRASER, J. E.; BICKERSTAFF, G. F. Entrapment in calcium alginate. **Immobilization of Enzymes and Cells**, p. 61-66, 1997.

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

GORETTI, M. et al. Production of Flavours and Fragrances via Bioreduction of (4R)-(-)Carvone and (1R)-(-)-Myrtenal by Non-Conventional Yeast Whole-Cells. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5736-5748, 2013.

SOUZA-AGUIAR, E. F. et al. Química verde: a evolução de um conceito. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1257-1261, 2014.

SILVA, C. P. Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias. 185 p. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Programa de Pós-graduação em Química, 2012.