

OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA PELE HUMANA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO PARA OBTENÇÃO DE INSUMOS DE FRAGRÂNCIAS

Juliana Carvalho Fernandes (PIBIC/UEM)¹, Arthur Antunes Ferrarezi¹, José Eduardo Gonçalves², Arildo José Braz de Oliveira¹, Regina Aparecida Correia Gonçalves (Orientadora)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: biocatálise, imobilização, carvona

Resumo:

O emprego de reações de biocatálise, na Biotecnologia, representa uma alternativa mais ambientalmente aceitável em relação aos métodos tradicionais de síntese, além de permitir a obtenção de produtos opticamente ativos com bons excessos enantioméricos. A (4*R*)-(–)-Carvona e seus produtos de biotransformação, do tipo monoterpenoides, apresentam um alto potencial de utilização a nível industrial. No presente trabalho, realizou-se a otimização da reação de biotransformação da (4*R*)-(–)-Carvona, utilizando fungos filamentosos isolados da pele humana imobilizados em matriz de alginato de cálcio, na presença de diferentes fontes de carbono. Os resultados mostraram que houve total conversão do substrato e, além disso, os fungos filamentosos imobilizados na matriz de alginato de cálcio mostraram-se estáveis mesmo após 4 meses de estocagem.

Introdução

Dentro da biotecnologia, o uso de enzimas como catalisadores em reações químicas tem sido uma alternativa sustentável e promissora, além de possuírem ação altamente seletiva (JEGANNATHAN, R. K.; NIELSEN, P. H., 2013). A imobilização é uma técnica que consiste em confinar uma enzima cataliticamente ativa ou células íntegras dentro de um sistema reacional, de modo a impedir seu contato direto com o meio reacional no qual se encontram o substrato e o(s) produto(s) de biotransformação (ROSEVEAR, 1984).

A (4*R*)-(–)-Carvona é um monoterpenoide amplamente utilizado como aromatizante e seus produtos de biotransformação possuem 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 otimizar a reação de biotransformação da (4R)-(-)-Carvona utilizando fungos filamentosos da pele humana imobilizados em matriz de alginato de cálcio, em diferentes meios reacionais.

Materiais e métodos

Substrato e micro-organismos utilizados

Utilizou-se a (4R)-(-)-Carvona como substrato e os fungos filamentosos do gênero *Phoma* sp. (F45) e *Aureobasidium* sp. (F46), gentilmente cedidos pela Prof^a Dra. Anita J. 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 micro-organismos

A reativação dos fungos filamentosos foi feita com meio líquido de extrato de malte e peptona a 28 °C e 200 rpm durante 48 horas, depois transferidos para novo meio de mesma constituição e incubados por mais 24 horas nas mesmas condições.

Imobilização dos fungos filamentosos e reações de biocatálise

Foi preparada uma suspensão fúngica em água deionizada estéril e alginato de sódio, a qual foi gotejada sobre uma solução de CaCl₂ 0,2 M sob agitação magnética suave. Após isso, as *beads* permaneceram nessa solução por 20 minutos, para promover seu enrijecimento, em seguida foram filtradas e acondicionadas em água deionizada estéril a 4 °C até o momento do uso. As *beads* previamente filtradas foram colocadas em Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio aquoso (tampão Tris-HCl + Frutose, tampão Tris-HCl + Sacarose ou tampão Tris-HCl + Glicose). Em seguida adicionou 10 µL do substrato 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 em Camada Delgada (CCD).

Estudo de estabilidade

As *beads* obtidas na imobilização foram estocadas sob refrigeração, de modo a avaliar a viabilidade celular e a atividade enzimática após períodos de 2 e 4 meses.

Resultados e Discussão

De modo a verificar a eficiência da imobilização, realizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos fungos **F45** e **F46**, livres e imobilizados. Foi possível observar com clareza a morfologia dos fungos livres e, além disso, pôde-se visualizar os fungos aprisionados nas *beads*, como mostrado na Figura 1.

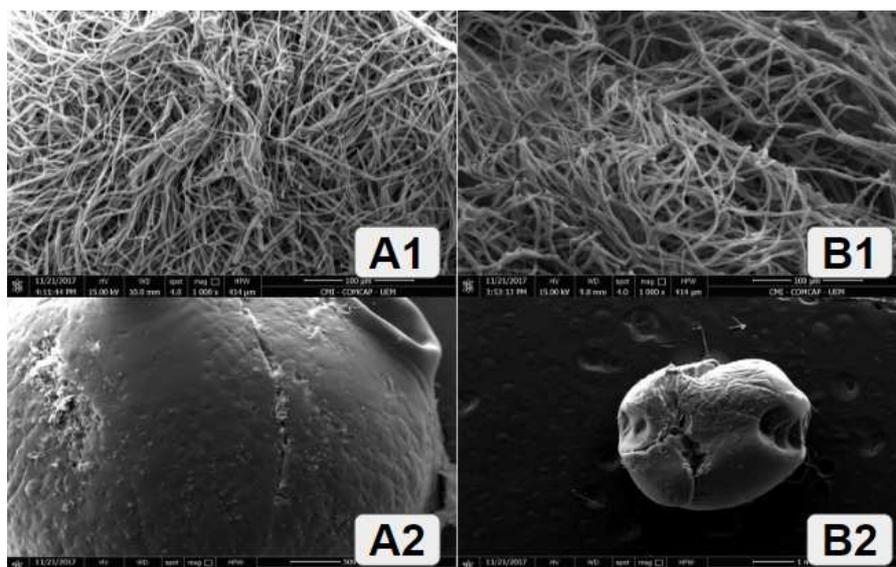


Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura (tensão de aceleração de 15 kV). Filamentos de F45 (**A1**) e F46 (**B1**) em aumento de 1000x. (**A2**) F45 imobilizado em aumento de 243x e (**B2**) F46 imobilizado em aumento de 100x.

A análise das cromatoplasmas resultantes das reações biocatalíticas, do substrato e um padrão químico racêmico de seus respectivos álcoois mostraram total conversão do substrato em seus respectivos produtos de biotransformação (Figura 2). Tais resultados sugerem que os açúcares atuam como fontes de hidreto para as enzimas Enoato Redutase (ENR) e Álcool Desidrogenase (ADH), gerando os produtos totalmente reduzidos do substrato (diidrocarveóis).

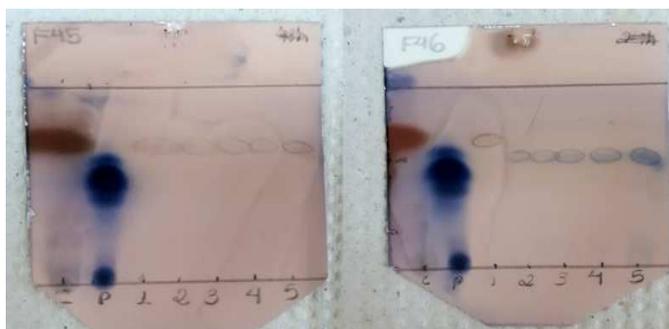


Figura 2 – CCD das reações de biocatálise em tampão Tris-HCl + Sacarose dos fungos **F45** (esquerda) e **F46** (direita). **C**: Substrato; **P**: padrão racêmico; **1 a 5**: 24, 48, 72 e 96h de reação, respectivamente.

Paralelamente aos experimentos com as reações de biocatálise, também foi realizado o teste de estabilidade e viabilidade dos fungos **F45** e **F46** imobilizados (*beads*), com o intuito de avaliar a viabilidade celular e a manutenção da atividade biocatalítica após períodos de estocagem em refrigerador. As *beads* foram adicionadas sobre o meio de cultura semissólido e incubadas a 28 °C. Após 72 h observou-se o crescimento satisfatório do micélio, indicando que os fungos mantiveram seu metabolismo bioquímico preservado mesmo depois da imobilização e armazenamento. Isso mostra que os mesmos podem ser utilizados após longos períodos de estocagem, como um reagente químico comum, permitindo o uso fracionado desses biocatalisadores.

Conclusões

Observou-se que a otimização da técnica foi alcançada, uma vez que pôde-se observar as reações de conversão nas placas de CCD. Além disso, os fungos imobilizados permanecem viáveis mesmo após longos períodos de estocagem, o que os habilita como biocatalisadores convenientes para o uso laboratorial.

Agradecimentos

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

Referências

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

JEGANNATHAN, R. K.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzymes use in industrial production- a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v.42, p. 228-240, 2013.

ROSEVEAR, A. Immobilised biocatalysts — a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 127-150, 1984.

SILVA, C P. Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias. 27/02/2012. 185 p. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Programa de Pós-graduação em Química, 2012.