

REAÇÕES DE BIOCATÁLISE MEDIADAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS PARA A OBTENÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS SINTÉTICOS VERSÁTEIS

Juliana Carvalho Fernandes (PIBIC/UEM), Arthur Antunes Ferrarezi, Arildo José Braz de Oliveira, Regina Aparecida Correia Gonçalves (Orientadora), e-mail: racgoncalves@uem.br

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

Ciências da Saúde–Farmácia

Palavras-chave: biotecnologia, chalcona, enzimas

Resumo:

Dentro da biotecnologia o uso de enzimas como catalisadores em reações químicas tem sido uma alternativa promissora e sustentável, além de possuírem ação altamente seletiva. As chalconas apresentam aplicações farmacológicas de interesse e os seus produtos de biotransformação representam potenciais alvos ou intermediários sintéticos versáteis. O presente trabalho visou a realização de reações de biocatálise mediadas por fungos filamentosos do gênero *Phoma* sp. (F45) e *Aureobasidium* sp. (F46) com substratos derivados das chalconas para a avaliação da biotransformação das mesmas. As análises de CCD e de RMN de ¹H demonstraram que houve a metabolização das chalconas, no entanto não foi possível a extração e detecção dos produtos da biotransformação.

Introdução

Dentro da biotecnologia, a biocatálise se destaca como uma ferramenta de alta seletividade, proporcionando uma maior probabilidade de gerar produtos com elevados excessos enantioméricos, utilizando condições reacionais mais brandas (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2014). Além disso, o emprego de células íntegras de micro-organismos representa uma alternativa ao uso de reagentes químicos para obtenção de novos produtos a partir de um substrato, atendendo aos princípios da Química Verde (CHOI; HAN; KIM, 2015).

As chalconas são compostos α , β -insaturados caracterizados por apresentarem atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória, o que justifica empregá-las como substratos nas reações de biocatálise representando uma estratégia promissora para descoberta de novas aplicações medicinais (CHAVAN *et al.*, 2016).

Os fungos da pele humana representam uma fonte de enzimas com potencial aplicação em reações de biocatálise, visto que são capazes de metabolizar os mais diversos tipos de compostos orgânicos (SILVA, 2012). O objetivo do presente trabalho foi realizar a biotransformação de substratos pró-quirais por meio das reações de biocatálise mediadas por fungos filamentosos de origem humana.

Materiais e métodos

Substrato e micro-organismos utilizados

Utilizou-se a *trans*-chalcona (**1**) e *p*-metoxi-chalcona (**2**) como substratos 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.

Reações de biocatálise

Para as reações de biocatálise, os fungos crescidos foram filtrados e adicionados em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio aquoso adequado, adicionou-se 10 µL do substrato solubilizado em DMSO à suspensão e o sistema reacional foi incubado em agitador orbital a 28 °C e 200 rpm. Foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio reacional nos períodos de 12, 24, 48 e 72 horas para acompanhar o consumo do substrato e a formação do(s) produto(s). As alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução saturada de NaCl e extraídas com 1 mL de AcOEt. A fase orgânica recolhida foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, analisada previamente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e enviada para análises de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H).

Resultados e Discussão

Primeiramente foi realizada a seleção do substrato a ser utilizado nas reações e verificação de sua pureza. O substrato escolhido foi a *trans*-chalcona (**1**) (Figura 1), após análise em cromatografia em camada delgada (CCD), constatou-se que estava impuro e o mesmo foi purificado por recristalização em etanol a quente.

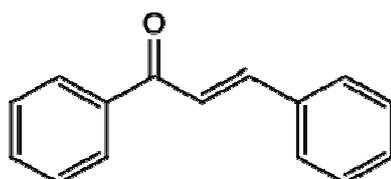


Figura 1 –Estrutura molecular da *trans*-chalcona (**1**).

Com a substância purificada, realizou-se a síntese do padrão racêmico por meio da redução com NaBH_4 desta e posterior análise em CCD para acompanhar as reações de biocatálise.

Inicialmente, para que ocorra a reação de biocatálise, realizou-se o crescimento dos fungos em meio líquido, para obtenção de biomassa suficiente, porém os fungos não cresceram de forma adequada e, portanto, realizou-se um novo repique dos mesmos e um microcultivo. Após tais procedimentos, obteve-se um crescimento adequado dos fungos.

A *p*-metoxi-chalcona (**2**) foi selecionada como um novo substrato para realizar as reações de biotransformação, por apresentar ampla atividade farmacológica e por possuir grupos funcionais cuja redução química por métodos convencionais é onerosa e requer reagentes de custo elevado e potencialmente perigosos. Dessa forma, o substrato **2** foi submetido à recristalização de modo a deixá-lo com pureza adequada (avaliada por CCD) e foi sintetizado seu padrão racêmico para posterior acompanhamento nas reações de biocatálise.

Após a realização das reações de biocatálise com os substratos **1** e **2**, alíquotas foram extraídas do meio reacional e submetidas a análises por CCD e de RMN de ^1H para avaliar quais grupos funcionais da molécula haviam sido biotransformados. Os espectros referentes ao substrato **2** encontram-se ilustrados na Figura 2.

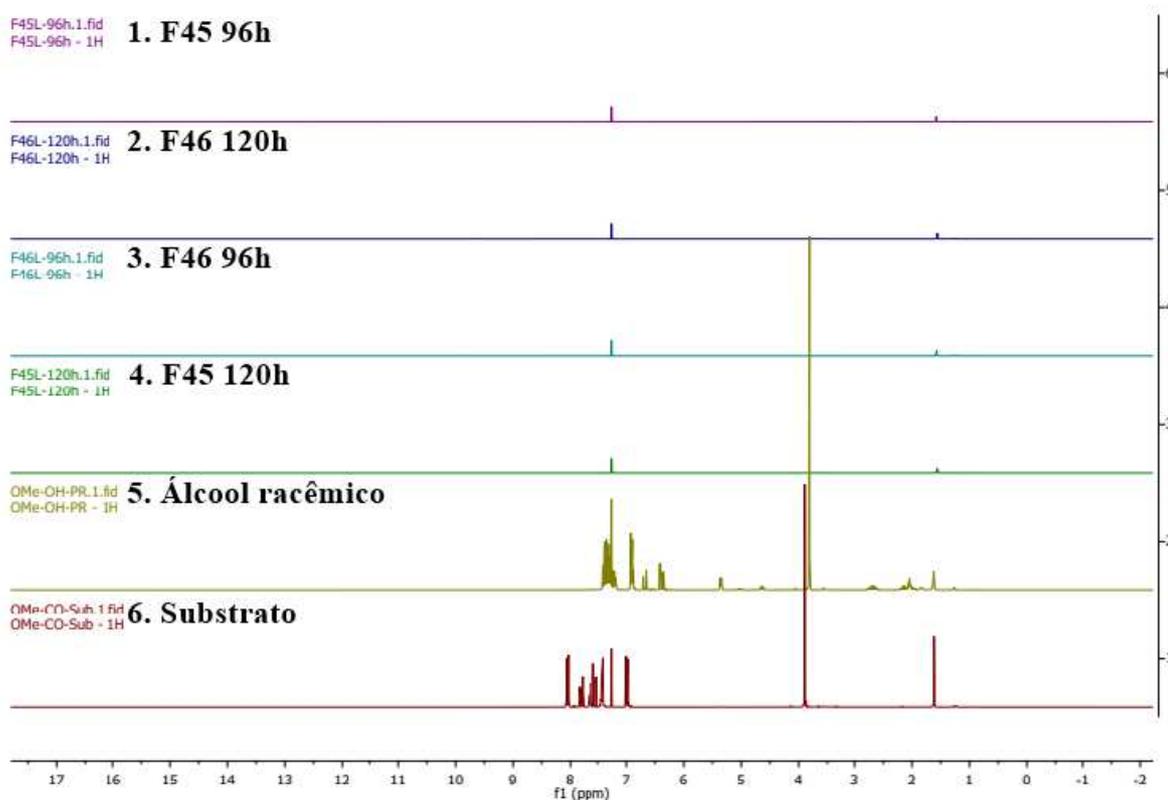


Figura 2 – Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) das reações de biocatálise (1, 2, 3 e 4), do substrato *p*-metoxi-chalcona (6) e de seu álcool racêmico (5).

Confirmando o resultado observado previamente em CDD realizada durante o monitoramento das reações, com os substratos **1** e **2**, e quando compara-se os espectros de RMN de ^1H do substrato **2**, de seu álcool racêmico e com os espectros das reações de biocatálise, observa-se que não há nenhum sinal correspondente ao substrato e/ou de seu produto de biotransformação.

Provavelmente quando a chalcona é metabolizada no interior das células dos fungos, seu produto de biotransformação apresenta maior polaridade e encontra dificuldade para ultrapassar a membrana plasmática, não sendo excretado para o meio extracelular (HYLEMON & HARDER, 1998) e, portanto, os produtos resultantes das reações de biocatálise não são extraídos pelo método convencional utilizado e não são detectados em nenhuma amostra analisada.

Conclusões

As reações de biocatálise das chalconas mediadas por fungos filamentosos foram realizadas, no entanto, não foi possível estudar os produtos oriundos desta biotransformação, possivelmente aprisionados no interior das células fúngicas e estudos futuros são necessários para otimização dos métodos de extração e detecção.

Agradecimentos

À Dra. Anita J. Marsaioli, à Dra. Carla Porto, à UEM, Fundação Araucária e ao CNPq.

Referências

CHAVAN, B. B. *et al.* **Synthesis and Medical Significance of Chalcones- A Review**. Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, v. 6, n. 56, p. 1-7, Julho de 2016.

CHOI, J. M.; HAN, S. S; KIM, H. S. **Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects**. Biotechnology Advances, 2015.

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

HYLEMON, P. B.; HARDER, J. **Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems**. FEMS Microbiology Reviews, v. 22, n. 5, p. 475-488, 1998.

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.