

# OBTENÇÃO DIASTEROSSELETIVA DE (1R, 4R)-DIIDROCARVONA A PARTIR DE (R)-CARVONA UTILIZANDO FUNGOS CONIDIAIS ISOLADOS NO SEMI-ÁRIDO BAIANO COMO BIOCATALISADORES

**Enesio Rodrigues Nascimento Neto<sup>1</sup>, Heiddy Márquez Alvarez<sup>2</sup>, Angélica Maria Lucchese<sup>3</sup>, Serly Santiago Machado<sup>4</sup>, Osmar Calderón Sanchez<sup>4</sup>, Ivan Sergio Colás González<sup>4\*</sup>, Luis Fernando Pascholati Gusmão<sup>5</sup>**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando do Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [rodrigues\\_enesio@hotmail.com](mailto:rodrigues_enesio@hotmail.com)
2. Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [marquezheddy@gmail.com](mailto:marquezheddy@gmail.com)
3. Co-orientadora, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [sicolas@yahoo.com.br](mailto:sicolas@yahoo.com.br)
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [sicolas@yahoo.com.br](mailto:sicolas@yahoo.com.br)
5. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [sicolas@yahoo.com.br](mailto:sicolas@yahoo.com.br)

## INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios em síntese orgânica é realizar a hidrogenação seletiva de compostos orgânicos, como a carvona, que apresentam mais de um grupamento funcional. Sistemas catalíticos bimetálicos têm sido utilizados na redução da carvona, mas nenhum deles atinge uma alta seletividade do produto de reação (Miguel et al., 2001). Um dos produtos da redução de carvona, a diidrocarvona, figura 1, é um monoterpreno com potencial aplicação na indústria de flavorizantes e aromatizantes. Além disso, pode ser empregada como precursor de produtos de interesse farmacêutico. Este composto pode ser sintetizado a partir de uma redução regiosseletiva da carvona. Na figura 1 se apresentam alguns dos possíveis produtos de redução da carvona, via enzimática. A R-(-)-carvona possui três sítios possíveis de serem reduzidos: a dupla ligação exocíclica -C=C- (verde), a dupla ligação endocíclica -C=C- (vermelha) e a carbonila -C=O (azul). Assim dependendo da enzima presente, enoato redutase (ER) ou carbonil redutase (CR), diferentes produtos de redução poderão ser formados, através da redução da dupla ou da carbonila, respectivamente.

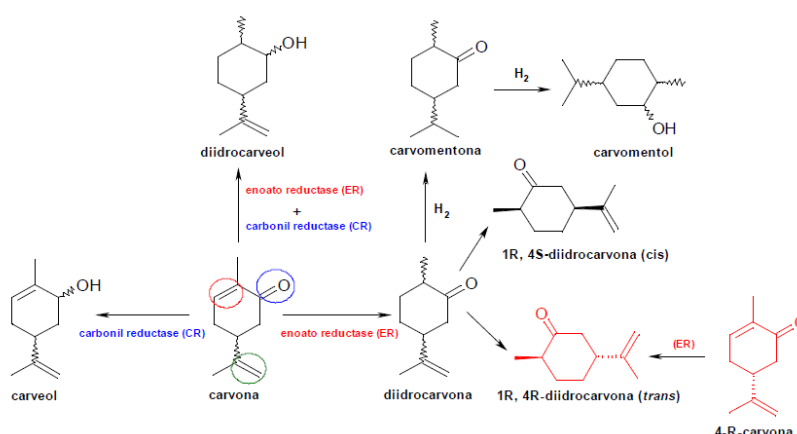


Figura 1. Produtos de birredução da carvona

Vários trabalhos reportam a transformação de R-(-)-carvona e/ou S-(+)-carvona a diidrocarvona, utilizando diferentes micro-organismos como leveduras, bactérias, fungos filamentosos, cultura de células e microalgas marinhas como biocatalisadores. Goretti e colaboradores descreveram os resultados obtidos de uma triagem da atividade biocatalítica de

leveduras de origem ambiental. Estes micro-organismos expressaram um bom potencial de biorredução para a dupla ligação endocíclica na S-(+) carvona (Goretti et. al, 2009).

Embora diversos micro-organismos e plantas já sejam conhecidos como biocatalisadores para a redução de carvona, a busca por novos micro-organismos capazes de realizarem esta conversão ainda é um assunto de interesse, considerando que o conhecimento da diversidade microbiana brasileira é baixo, principalmente no que se refere ao potencial de aplicação. A região do semi-árido baiano é parte da diversidade biológica pouco explorada no Brasil e possui características para apresentar organismos resistentes a condições extremas de temperatura e umidade e, em consequência, enzimas de grande potencial para aplicação em processos industriais (Sena et al., 2006). Neste trabalho foi investigada a ação biocatalítica de catorze (14) fungos conidiais isolados de folhas em decomposição oriundas do semi-árido baiano, na redução de R-(-)-carvona.

## MATERIAL E MÉTODOS

O substrato utilizado para a conversão foi R-(-)-Carvona, 99%, da marca Acros Organics. Os reagentes utilizados para preparar o meio de Cultura foram adquiridos da HIMEDIA. O acetato de etila utilizado para realizar as extrações e as análises cromatográficas é de procedência Fmaia. Os micro-organismos, fungos conidiais pertencentes aos gêneros *Beltrania*, *Myrothecium*, *Cladosporium sp.*, *Gonytrichum chlamydosporium*, *Aspergillus*, *Dictyosporium*, *Periconia*, *Dictyoachaeta*, *Curvularia*, *Myrothecium*, *Beltraniella*, *Pithomyces chartarum*, *Periconia hispidula*, *Clodosporium* foram isolados de folhas em decomposição, oriundas do semi-árido baiano.

*Redução da R-(-)-carvona via química (Kelly and Deeble, 1986; Faria et al., 2000)*

A redução da R-(-)-carvona via química foi realizada através de modificações da síntese relatadas na literatura (Kelly e Deeble, 1986; Farias et al., 2000). Para ativação do zinco em pó, em um béquer colocou-se 3g de zinco (Zn) e 15 mL de ácido clorídrico (HCl) (10%), durante 2 minutos. A mistura foi filtrada, e o sólido remanescente lavado com água, seguido por acetona. Para a obtenção do produto de redução, num balão de reação dissolveu-se 1,3g de hidróxido de potássio, KOH (0,023 mol), em 6 mL de MeOH / H<sub>2</sub>O a 95%. Posteriormente adicionou-se 2,6g de Zn, ativado previamente (0,039 mol) e 1g de R-(-)-carvona (0,006 mol). A mistura foi agitada, sob refluxo, durante 9h. Posteriormente filtrou-se a mistura de reação e o solvente do filtrado foi removido sob pressão reduzida, com auxílio de um rotaevaporador. Ao resíduo adicionaram-se 2mL de H<sub>2</sub>O e realizou-se a extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase orgânica foi lavada com água e seca sob sulfato de sódio anidro Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e após filtração, o solvente foi removida até obter-se um óleo amarelo. A conversão da reação foi de 81% da mistura diastereoisomérica (1R, 4R)-diidrocarvona e (1S, 4R)-diidrocarvona na proporção de 85:15, determinada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

*Redução da R-(-)-carvona via microbiológica*

Preparou-se o meio YM (Yeast Mold and Broth) suplementado com minerais, constituídos de 3,0 g extrato de levedura; 3,0 g de extrato de malte; 5,0 g de peptona; 5,0g dextrose; 0,6 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,4 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,08 g MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,05 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O para 1L água destilada. O meio de cultura (5,0 mL) foi transferido para um frasco de reação de 10 mL de capacidade e esterilizado por 20 minutos a 121°C, em autoclave. Após esfriar, acrescentou-se uma alíquota de 10µL de uma solução de R-(-)-carvona:etanol (1:1) (v/v), resultando numa concentração final de 0,1% (v/v). Na mistura reacional foi adicionado 01 disco de micro-organismo, com circunferência de 6 mm. Os frascos foram mantidos em repouso na câmara de incubação BOD, a 30°C por 120 h (5 dias). Após extração com acetato de etila, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para determinação da conversão e da diastereosseletividade. As misturas de reação extraídas em acetato de etila foram analisadas

num cromatógrafo CG-MS QP2010 da SHIMADZU, com coluna capilar CP-Sil-5CB-MS, WCOT de sílica fundida, 30mx0,25mmIDx0,25µm. Tomou-se 2 µL das amostras diluídas em acetato de etila, que foram injetadas utilizando-se relação de Split de 30. A temperatura do injetor foi 220°C e do detector a 240°C. A temperatura inicial foi de 70°C, elevando-se 4°C por minuto até 240°C. O detector de massas teve a interface mantida a 240°C, fonte iônica a 200°C e o quadrupolo a 100°C, com ionização eletrônica a 70 eV e razão massa carga 40 a 600 m/z. Utilizou-se o He (Hélio) como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A análise quantitativa foi obtida pela integração do Cromatograma Total de Íons (TIC), pelo método da normalização. A identificação dos componentes foram com base na comparação dos espectros de massas da biblioteca CLASS-VP do software NIST-107 e por comparação com o padrão preparado por via química.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 mostra o resultado da triagem para os fungos testados quanto à bioredução da R-(-)-carvona. Foi observada a formação de um único produto de reação, correspondente a (1R, 4R)-diidrocarvona pelos fungos dos gêneros *Beltrania*, *Idriella*, *Dictyochaeta*, *Myrothecium* e *Beltraniella*.

Nas condições de biotransformação empregadas, utilizando-se etanol como co-solvente, somente foi observada a biorredução quimiosseletiva da dupla ligação endocíclica. Foi verificado, de forma geral, que dos catorze fungos testados, somente cinco fungos bioconvertem a R-(-)-carvona a um único produto, a (1R, 4R)-diidrocarvona, com conversões que oscilam entre 3,6 e 84%, conforme dados apresentados na tabela 1, indicando assim a presença da enzima enoato redutase.

No que se refere à diastereosseletividade na R-(-)-carvona, está bem estabelecido que a adição anti de hidrogênio a face “si” na posição alfa e a face “re” na posição beta da dupla ligação C=C é preferencial, pois a adição na face contrária é estericamente impedida pela presença do agrupamento isopropenila (Shimoda et al., 1998; Shimoda and Hirata, 2000; Faria et al., 2000).

A biorredução da R-(-)-carvona pelo método biocatalítico utilizando o fungo *Idriella* forneceu conversões semelhantes às obtidas por via química, embora a diastereosseletividade foi superior no primeiro método, já que a presença de apenas um dos possíveis diastereoisômeros foi observada nos cromatogramas avaliados.

**Tabela 1.** Conversão da R-(-)-carvona em (1R, 4R)-diidrocarvona por fungos conidiais isolados do semi-árido baiano.

Entrada	Código	Micro-organismo	Conversão (%)	Seletividade (%)
1	35/06	<i>Beltrania</i>	58,0	>99
2	12/07	<i>Myrothecium</i>	9,0	>99
3	07/06	<i>Cladosporium</i> sp.	0	0
4	26/06	<i>Gonytrichum</i> <i>chlamydosporium</i>	0	0
5	27/06	<i>Aspergillus</i>	0	0
6	53/06	<i>Dictyosporium</i>	0	0
7	82/06	<i>Periconia</i>	0	0
8	98/06	<i>Idriella</i>	84	>99
9	101/06	<i>Dictyochaeta</i>	40	>99
10	03/07	<i>Curvularia</i>	0	0
11	29/07	<i>Beltraniella</i>	3,6	>99
12	36/07	<i>Pithomyces</i> <i>chartarum</i>	0	0
13	42/07	<i>Periconia hispidula</i>	0	0
14	114/07	<i>Cladosporium</i>	0	0

Condições reacionais: 0,1% (v/v) de carvona/etanol em 5,0 mL de meio YM, complementado com co-fatores, incubado em repouso na câmara de incubação BOD a 30°C por 120 h. A conversão foi determinada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

## CONCLUSÕES

Os micro-organismos dos gêneros *Beltrania*, *Idriella*, *Dictyochaeta*, *Myrothecium* e *Beltraniella* foram capazes de atuarem como biocatalisadores levando a redução de R-(-)-carvona a trans-diidrocarvona. Embora a estereoquímica da estrutura controle a estereosseletividade da redução da R-carvona, uma maior diastereosseletividade foi obtida na via biocatalítica em comparação a via química. Esses micro-organismos pelo fato de terem apresentado melhores resultados quanto a capacidade de conversão, serão utilizados para a realização do estudo da cinética da reação de biorredução e mais teste deverão ser feitos, afim de otimizar o processo de biocatálise.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FARIA, M. L.; MAGALHÃES, L. A.; SILVA, F. C.; MATIAS, L. G. O.; CESCHI, M. A.; BROCKSON, U.; BROCKSON, T. J., (2000), Enantiodivergent syntheses of cycloheptenone intermediates for guaiane sesquiterpenes. *Tetrahedron: Asymm.*, v. 11, p. 4093 – 4103.
- GORETTI, M.; PONZONI, C.; CASELLI, E.; MARCHIGIANI, E.; CRAMAROSSA, M. R.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; FORTI, L. (2009), Biotransformation of electron-poor alkenes by yeasts: Asymmetric reduction of (4S) (+)-carvone by yeast enoate reductases. *Enz. and Microbial Tech.*, v. 45, p. 463 – 468.
- KELLY, L. F.; DEEBLE, G. J., (1986), Selectivity in Organic Synthesis: Chemo- and Regiospecific Reductions of Carvone. *J. Chem. Education.*, v. 63, n.12, p. 1107-1108.
- MATSUSHIMA, A.; SATO, Y.; OTSUKA, M.; WATANABE, T.; YAMAMOTO, H.; HIRATA, T. (2008), An enone reductase from *Nicotiana tabacum*: cDNA cloning, expression in *Escherichia coli*, and reduction of enones with the recombinant proteins. *Bioorganic Chem.* v. 36, p. 23–28.
- MIGUEL, S. R.; ROMÁN-MARTÍNEZ, M. C.; CAZORLA-AMORÓS, D.; JABLONSKI, E. L.; SCELZA, O. A. (2001), Effect of the support in Pt and PtSn catalysts used for selective hydrogenation of carvone. *Catal. Today*, v. 66, p. 289–295.
- QUEZADA, M. A.; CARBALLEIRA, J. D.; SINISTERRA, J. V., (2009), *Monascus kaoliang* CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using iso-propanol as co-substrate: Optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones. *Bioresource Tech.*, v.100, 2018 – 2025.
- SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES Neto, A.; UETANABARO, A. P. T. (2006). Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana, v. 35, p. 91-98.
- SHIMODA, K.; HIRATA, T.; NOMA, Y (1998), Stereochemistry in the reduction of enones by the reductase from *euglena gracilis* Z. *Phytochemistry*, v. 49, n. 1, p. 49-53.
- SHIMODA, K.; HIRATA, T. (2000), Biotransformation of enones with biocatalysts — two enone reductases from *Astasia longa*. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, v. 8, p. 255–264.