

REDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS POR *Periconia hispidula*

Danielle Silva Santana¹; Angelica Maria Lucchese²; Tereza Simonne Mascarenhas Santos³; Heiddy Marquez Alvarez⁴; Serly Santiago Machado⁵

¹. Bolsista PROBIC, Graduanda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: danysantana_5@hotmail.com

². Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

³. Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tereza.simonne@gmail.com

⁴. Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheddy@gmail.com

⁵. Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sserly2005@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: acetofenona, redução, *Periconia hispidula*

INTRODUÇÃO

Alguns produtos de interesse em diversas áreas industriais podem ser obtidos com sucesso através do processo biocatalítico realizado em laboratório, tendo micro-organismos como fonte de enzimas para catalisar as reações (CONTI et al, 2001). Culturas microbianas podem ser utilizadas para catalisar a redução de cetonas a álcoois quirais que podem ser utilizados como intermediários na síntese de vários fármacos (HOMANN et al, 2004). A investigação do potencial biocatalítico desses micro-organismos, em especial o fungo da espécie *Periconia hispidula* na redução da acetofenona proporcionará o aumento do conhecimento da atuação enzimática dessa espécie em transformações de cetonas, bem como a obtenção de produtos de interesse industrial.

O produto esperado para esta reação é o 1-feniletanol (figura 1), que é um álcool quiral de interesse industrial, que pode ser útil, dentre outras aplicações, como intermediário para a produção de fármacos. O objetivo geral da pesquisa foi desenvolver um processo biocatalítico utilizando micro-organismos isolados do semi-árido baiano que permita biorreduzir compostos carbonílicos.

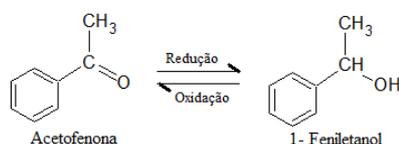


Figura 1 – Esquema da redução e oxidação envolvendo acetofenona e 1-feniletanol

MATERIAL E MÉTODO

Micro-organismo

O fungo *Periconia hispidula* foi cedido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) tendo sido coletado de folhas em decomposição na região do semiárido. Com este fungo, codificado como 42/07, foi realizada a investigação de seu potencial biocatalítico, utilizando como modelo a molécula de acetofenona, para a identificação de sua potencialidade como biorredutor.

Padronização do inóculo

Para a avaliação do crescimento micelial, os fungos foram repicados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro marcadas com três raias (figura 2), contendo meio ágar YM e armazenados em BOD a 30 °C. A medida do crescimento radial dos fungos foi realizada a cada 24 horas por um período total de 192 horas. Os experimentos foram realizados em quintuplicata. Com base nesses resultados, após análise gráfica, convencionou-se o tempo inicial de crescimento do fungo para adição do substrato ao meio líquido.

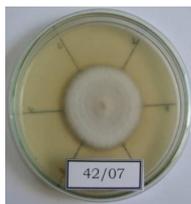


Figura 2 – Foto de placa utilizada na determinação do crescimento micelial de *Periconia hispidula*

Para determinação da quantidade de discos a serem adicionados ao meio líquido reacional e confirmação da massa micelial no início da reação, que se dá apenas após a adição do substrato, o micro-organismo foi pré-cultivado em meio YM (3g extrato de levedura, 3g extrato de malte, 5g peptona, 3g dextrose, 20g Agar, 1L de água destilada) durante 6 dias, a 30°C, na BOD. Inicialmente, fez-se o teste do crescimento do micro-organismo em meio líquido em duas concentrações: 3 discos de micro-organismos (6 mm de diâmetro cada) em 25 mL de meio YM e 5 discos (também com 6 mm de diâmetro) de micro-organismos em 100 mL do mesmo meio. Fez-se 5 repetições de cada tratamento e esses tratamentos foram colocados na BOD, a 30°C, para crescimento da massa micelial por 4 dias. Após esse período, filtraram-se os tratamentos para a obtenção da massa seca dos micro-organismos.

Determinação da cinética reacional

Para a determinação do melhor tempo de incubação e quantidade de meio reacional, dois experimentos distintos foram conduzidos. No primeiro experimento colocou-se 3 discos de micro-organismos, com 6 mm de diâmetro, em 25 mL de meio YM, na BOD, a 30°C, durante 4 dias para crescimento da massa micelial. Após esse período, adicionou-se aos tratamentos 50 µL de solução de substrato (50% acetofenona, 50% etanol) e foram feitas coletas diárias (2 mL em cada coleta) a cada 24 horas, durante 5 dias. As amostras coletadas foram extraídas em acetato de etila e analisadas por cromatografia gasosa em equipamento da marca Varian CP-3380 com detector de ionização de chama (DIC), com coluna CYDEX-B (25m×0,22m×0,22 µm) da marca SGE. Um fluxo de 1 mL min⁻¹ de He (hélio) como gás de arraste foi mantido, com a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial de 100 °C com gradiente de 5 °C min⁻¹ até 170 °C, com temperatura do injetor e detector de 220 °C. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma, pelo método da normalização e para determinação da conversão foi utilizada a relação entre as áreas da acetofenona e do 1-feniletanol nos cromatogramas. A pureza enantiomérica foi determinada nas mesmas condições e coluna e cálculo do excesso enantiomérico (ee) foi definido como a razão de [(S)-(R))/(S)+(R)]×100%, em que (R) e (S) são as concentrações dos enantiômeros, respectivamente. A configuração dos produtos foi identificada por comparação com padrões autênticos de (1S)-feniletanol.

Para confirmação das conversões obtidas, novas reações foram realizadas para testar o potencial biocatalítico dos micro-organismos diante da acetofenona, sem coleta diária, coletando-se apenas no final do período de reação estabelecido de 4 dias (período que apresentou maior porcentagem de conversão nos testes anteriores). As condições da reação foram mantidas, modificando-se apenas o período de coleta.

No segundo experimento, colocou-se 5 discos de micro-organismos, com 6 mm de diâmetro, em 100 mL de meio YM, na BOD, a 30°C, durante 4 dias para crescimento da massa micelial. Após esse período, adicionou-se aos tratamentos 50µL de solução de substrato (50% acetofenona, 50% etanol) e foram feitas coletas diárias (2 mL em cada coleta) a cada 24 horas, durante 5 dias. As amostras coletadas foram extraídas em acetato de etila e analisadas por cromatografia gasosa, conforme as condições acima citadas. Para confirmação das conversões obtidas, novas reações foram realizadas para testar o potencial biocatalítico dos micro-organismos diante da acetofenona, sem coleta diária, coletando-se apenas no final do período de reação estabelecido de 4 dias (período que apresentou maior percentual de

conversão nos testes anteriores). As condições da reação foram mantidas, modificando-se apenas o período de coleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação do crescimento micelial radial, conforme figura 3, indicam que após 144 há uma redução na taxa de crescimento. Segundo Fellows (1994), a maior produção enzimática ocorre, em geral, no final da fase logarítmica (Log) ou na fase estacionária de crescimento, embora na fase estacionária a produção de metabólitos secundários possa ocorrer levando a contaminação do meio reacional com outras substâncias, assim o tempo de 96 horas foi estabelecido para o acréscimo do substrato, ou seja, o início da reação somente se deu após a maior produção celular do fungo, quando se obteve uma maior produção das enzimas necessárias para o processo catalítico.

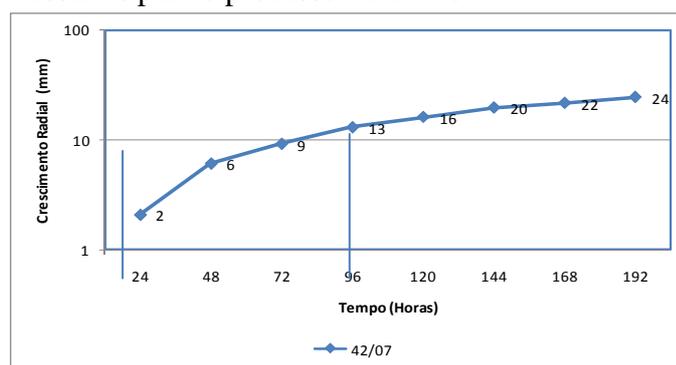


Figura 3 - Curva de crescimento de *Periconia hispidula*

Diante do teste de crescimento em duas concentrações diferentes, foi possível a construção da Tabela 1, que contém os valores da massa seca (MS) do fungo em questão, nas duas concentrações já especificadas, bem como os valores médios e o desvio padrão (σ).

Tabela 1 – Massa seca de *Periconia hispidula*

C ¹	T ²	MS ³	C ¹	T ²	MS ³
3 discos em 25 mL YM	1	0,93	5 discos em 100 mL YM	1	1,54
	2	1,15		2	0,76
	3	1,01		3	1,25
	4	1,26		4	1,22
	5	1,18		5	1,1
	Média	1,11		Média	1,17
σ^4	0,12	σ^4	0,25		

¹ Concentração; ² Tratamentos; ³ Massa seca; ⁴ Desvio padrão

Diante das massas secas obtidas, pode-se observar que a disponibilidade de massa celular após 4 dias não apresentou muita diferença nas diferentes concentrações de micro-organismos empregadas, portanto, realizou-se um experimento inicial com a menor concentração. Os valores de conversão do substrato estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem de conversão da acetofenona em 1-feniletanol por *Periconia hispidula* em 25mL

C ¹	Tempo ² (Horas)	% c ³
3 discos em 25 mL YM	24	34
	48	58
	72	81
	96	94
	120	67

¹ Concentração; ² Tempo das coletas; ³ Porcentagem de conversão

Percebe-se que o tempo ideal para a reação é de 96 horas (4 dias), numa concentração de 3 discos de micro-organismos com 25mL de meio YM. Após 96 horas, pode acontecer a reação inversa ou reações de degradação dos produtos, o que faz com que a porcentagem de conversão seja menor a partir do quarto dia. Entretanto, a partir da realização dos novos testes do potencial de bioconversão, feitos com volume total, sem coleta diária, a reprodutibilidade dos resultados não foi a mesma observada nos resultados da coleta diária. A porcentagem de conversão do substrato ao final do período de reação (4 dias) foi menor, atingindo uma média de 38%, sugerindo que as coletas diárias perturbam o sistema reacional interferindo na reação que estava em andamento.

Diante disso, realizou-se um experimento com um maior volume de meio e de inóculo (5 discos). Os valores de conversão do substrato estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 – Porcentagem de conversão da acetofenona em 1-feniletanol por *Periconia hispidula* em 100 mL

C ¹	Tempo ² (Horas)	c ³ (%)
5 discos em 100 mL YM	24	6
	48	19
	72	19
	96	38
	120	49
	144	52
	168	59
	192	64
	216	73
	240	71

¹ Concentração; ² Tempo das coletas; ³Porcentagem de conversão

Percebe-se que o máximo de conversão foi obtido com 216 horas de reação, já que não houve uma grande diferença com relação a conversão obtida em 240 horas. A seletividade da reação foi elevada (superior a 99%) indicando que a enzima levou a produção de apenas um dos enantiômeros. A configuração deste enantiômero foi identificada como S através da comparação do tempo de retenção de padrões autênticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a enantiosseletividade desta biorredução por *Periconia hispidula* tenha sido elevada, as taxas de conversão atingiram apenas 73% e somente em tempos mais elevados, de 216 horas. Como a meta deste trabalho é a busca de biocatalisadores para utilização em processos de redução, na derivatização de produtos naturais carbonilados, conversões mais elevadas em baixos tempos reacionais são desejáveis. Desta forma, sugere-se que novos micro-organismos sejam avaliados frente a este mesmo sistema reacional com o objetivo de identificar biocatalisadores que possam levar ao produto de redução com conversões mais elevadas e/ou em menores tempo de reação, bem como estudos de otimização de meio reacional e parâmetros como pH, temperatura, aeração, entre outros, que possam elevar a conversão obtida no sistema estudado.

REFERÊNCIAS

- CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. *Química Nova*, Campinas, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v24n5/a14v24n5.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2010.
- FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos**: princípios e práticas. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.
- HOMANN, M. J.; VAIL, R. B.; PREVITE, E.; TAMAREZ, M.; MORGAN, B. DODDS, D. R.; ZAKS, A. Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. *Science Direct*. Tetrahedron, n. 6, 2004.