

METODOLOGIAS PARA BIOTRANSFORMAÇÃO DE EUGENOL E ISOEUGENOL EM VANILINA

Jade Ribeiro Carneiro¹; Heiddy Marquez Alvarez²; Serly Santiago Machado³; Angélica Maria Lucchese²

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rc.jade@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e mail: marquezheddy@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: serlysantiago@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: vanilina, micro-organismo, biocatálise.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a procura por aromas naturais pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos tem aumentado cada vez mais devido à preferência dos consumidores por produtos de origem natural (Pacheco, 2007). Além da notória simpatia por parte dos consumidores, esses produtos são produzidos a baixo custo, a partir de fontes renováveis e possuem maior valor comercial se comparados com os sintéticos. A vanilina (aroma de baunilha) é um dos compostos aromáticos mais utilizados nas indústrias farmacêuticas e de alimento e é considerada um produto natural se obtida através de processos biotecnológicos tendo seu custo (a vanilina natural rende US\$ 3.200 por kg e a artificial US\$ 12 por kg) e sua procura no mercado mais elevado (Daugsch & Pastore, 2005). Vários trabalhos mostram a produção biotecnológica da vanilina através de micro-organismos como fungos (Mello, 2002), (Srivastava, 2010) tendo como substrato para a sua biocatálise o eugenol (óleo de cravo) ou isoeugenol (isômero do eugenol). Por conta disso, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a atividade catalítica de 20 espécies de fungos oriundas da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Estado da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de feira de Santana (UEFS) coletados nos municípios do semi-árido baiano, na biotransformação do eugenol e isoeugenol em vanilina em duas diferentes metodologias.

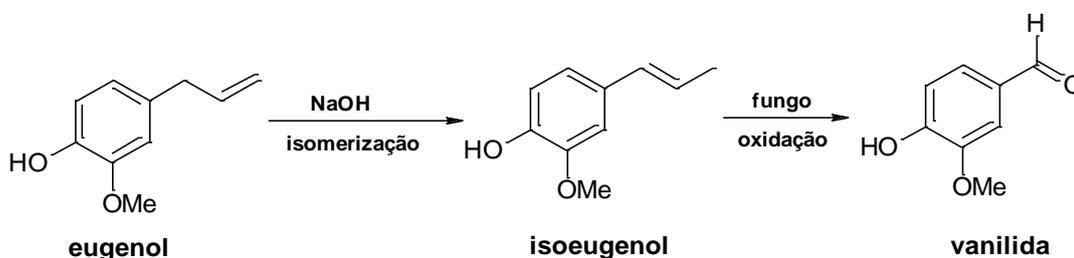


Figura 1. Transformação do eugenol a vanilina

METODOLOGIA

Os fungos conidiais avaliados foram coletados nos municípios pertencentes ao semiárido baiano a partir de materiais vegetais em decomposição. Estes pertencem a

Coleção de Cultura de Micro-organismos do Estado da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA, selecionados aleatoriamente. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos da UEFS (Lapron). Para a manutenção da viabilidade destes micro-organismos sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, usou-se o método de preservação de Castellani (1967) a temperatura ambiente. A metodologia utilizada foi a de Hommann (2004) com modificações.

Em frascos de 10 mL adicionou-se 5,0 mL do caldo do meio YM (Yeast Mold and Broth) para 1L de água destilada, que foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Após esfriar o recipiente de reação adicionou-se 01 disco de micro-organismo dos fungos 26/07, 35/07, 4Ag12, 07/06, 42/07, 1MS, 101/06, 13/07, 2M2, 29/07, 86/06, 2M3, 35/06, 4Ag6, 88/06, 4Ag7 com circunferência de 5 mm. Os frascos foram armazenados na BOD a 30 °C por 96 h, em repouso, após o período de cultivo foram inoculados em frascos de 10mL contendo 5mL de meio YM e uma alíquota de 10 µL de uma solução de eugenol em etanol (1:1) de concentração 3,26mM, após 96h em agitação, acrescentou-se 2,0 mL de acetato de etila (2x) para a extração do produto biotransformado, Figura 2.

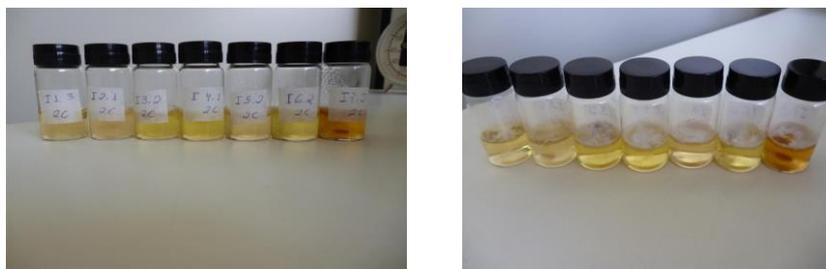


Figura 2. Biotransformação do eugenol na presença de diversos fungos.

Para verificar a reprodutibilidade do método foi realizado o mesmo experimento, porém em frascos de 100 mL. Foram adicionados 100mL do caldo YM a cada frasco e acrescentado uma alíquota de uma solução de eugenol em etanol (1:1), foram postos 05 discos dos micro-organismos 42/07, 12/07, 4Ag12 e 82/06. Foram feitas 3 coletas 48h, 72h e 96h. O solvente foi evaporado e o extrato bruto analisado por cromatografia gasosa. A identificação dos componentes foi feita com base na utilização de **amostras** padrões adquiridas comercialmente.

II. Em frascos de 10 mL adicionou-se 5,0 mL do caldo do meio BDA para 1L de água destilada, que foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Após esfriar o recipiente de reação adicionou-se 01 disco de micro-organismo dos fungos 2Ag1c, 4Ag12, 1Ag12B, 101/06, 12/07, 86/06, 35/07, 35/06, 42/07, 2m3, 82/06 com circunferência de 5 mm. Os frascos foram armazenados por 96h na câmara de incubação de Baixa demanda de oxigênio (BOD) a 30°C em repouso e foram inoculados em frascos de 10 mL contendo 5mL de meio BD juntamente com uma alíquota de 10µL da solução de isoeugenol em etanol (1:1) de concentração 3,26mM e armazenados em agitação por 24h, após esse período foi realizada extração da parte orgânica com 2mL de acetato de etila. O solvente foi evaporado e o extrato bruto analisado por cromatografia gasosa. A identificação dos componentes foi feita com base na utilização de **amostras** padrões adquiridas comercialmente.

RESULTADOS

Nas análises cromatográfica das amostras dos fungos estudados inicialmente, 26/07, 35/07, 4Ag12, 07/06, 42/07, 1MS, 101/06, 13/07, 2M2, 29/07, 86/06, 2M3, 35/06, 4Ag6, 88/06, 4Ag7 não indicaram produtos da biotransformação do eugenol e este também não foi consumido. Por conta disso, no novo experimento realizado houve uma mudança no substrato, no meio e no tempo reacional. O novo substrato foi o isoeugenol, um isômero do eugenol, mais facilmente oxidável quando comparado com o eugenol, além de ser um intermediário no processo de bioconversão do eugenol em vanilina. O tempo reacional foi reduzido para 24h para selecionar, primeiramente, os fungos que cresciam na presença deste substrato. Através da análise das amostras por cromatografia gasosa, ficou claro que os fungos 2Ag1c, 4Ag12, 1Ag12B, 101/06, 12/07, 86/06, 35/07, 35/06, 42/07, 2m3, 82/06 testados com essa nova metodologia também não biotransformaram o isoeugenol.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os fungos analisados não foram capazes de biotransformar o eugenol e o isoeugenol nas metodologias utilizadas. Novos testes utilizando outra série de fungos (29) está sendo realizada no laboratório.

REFERÊNCIAS

- MELLO, S. C. M. et al. Métodos para indução e análise de enzimas secretadas por *Dicyma pulvinata*. Circular Técnica, v. 17, ISSN 1516-4349, nov. 2002.
- HOMANN, M. J. et al. Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. *Tetrahedron*.v. 60, n. 3, p.789-797, out. 2004.
- DAUGSCH, Andreas; PASTORE, Gláucia. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. *Quim. Nova*, v. 28, n.4, p.642-645, 2005.
- PACHECO, Sabrina Moro Villela; FURIGO JÚNIOR, Agenor; MORGADO, Ayres Ferreira. Uma revisão sobre rotas sintéticas e biotecnológicas para produção de vanilina. *Periódicos Tchê Química*. V. 4, n. 8, p. 45-51, 2007
- SRIVASTAVA, S. et al. Metabolic pathway reconstruction of eugenol to vanillin bioconversion in *Aspergillus niger*. *Bioinformation*, v.4, n.7, p. 320-325, 2010.