

BIOTRANSFORMAÇÃO DE ANETOL EM COMPOSTOS DE MAIOR VALOR AGREGADO

Jéssica S. Falcão¹, Serly S. Machado², Heiddy Marquez Alvarez³, Angélica Maria Lucchese⁴

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jeu.santiago@gmail.com.
2. Participante, Doutora em biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sserly2005@yahoo.com.br.
3. Orientadora, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheddy@gmail.com.
4. Co-orientadora, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Fungos, bio-oxidação e anetol

INTRODUÇÃO

A biotransformação ou biocatálise é um processo biotecnológico que permite obter uma série de compostos para diagnóstico, controle e tratamento de doenças, pela modificação de um composto orgânico em outro por enzimas isoladas ou presentes em células íntegras de organismos vivos (micro-organismos ou plantas). Este processo é um dos mais adequados para a produção de isômeros opticamente puros, intermediários importantes em química fina para a produção de vitaminas, inseticidas, fragrâncias, aromatizantes e fármacos como os hormônios esteroides e anticoncepcionais, entre outros produtos de interesse industrial.

O mercado para a utilização de aromas naturais tem crescido muito nos últimos anos em função de sua aceitabilidade pelos consumidores, principalmente no que se refere aos alimentos.

Embora muitos flavorizantes no mercado ainda são produzidos via síntese química, uma tendência para o uso de aromas naturais tem ocorrido, e somente na indústria alimentícia a demanda por aromas naturais aumentou cerca de 80% nos últimos 10 anos.

Os óleos essenciais são compostos muito utilizados no aroma terapia, técnica muito empregada na Europa, especialmente na França, tendo dado resultados muito bons processos infecciosos, inflamatório e inclusive tumoral. Outras aplicações dos óleos essenciais é na perfumaria (pínenos, citral, safrol) como matéria prima na semi-síntese de loções, sabonetes e perfumes; na indústria alimentícia devido a características organolépticas de muitos óleos; na indústria de produtos de limpeza entre outros.

Os fenilpropenos são moléculas de baixo peso molecular e hidrofóbicas, ou seja, possui medo de água, que constituem as essências aromáticas. O anetol é um óleo essencial extraído da erva-doce, onde em pequenas doses estimula a respiração e a circulação e em doses elevadas provoca perda de memória, problemas visuais e sonolência. Para a preparação de produtos farmacêuticos são utilizadas pequenas proporções para que não tenha nenhum efeito tóxico no homem.

Foram coletados vários tipos de micro-organismos por isso foi necessário à realização de testes onde houve a modificação de algumas condições de cultivo: exclusão de co-fatores do meio, incubação do microrganismo por 96 h antes do acréscimo do substrato e nas condições da reação: agitação a 200rpm a 30°C durante a reação.

METODOLOGIA

Os fungos conidiais avaliados foram coletados nos municípios pertencentes ao semiárido brasileiro 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.

Para verificação da pureza e reativação do crescimento os fungos foram repicados em meio ágar YM (Yeast Mold and Broth), constituído de 3,0 g extrato de levedura; 3,0 g de extrato de malte; 5,0 g de peptona; 5,0 g dextrose para 1L de água destilada e armazenados a 30 °C em câmara de incubação de Baixa Demanda de Oxigênio (BOD), durante 7 dias.

Na realização da triagem utilizou-se a metodologia HOMANN, et al., (2004) de placas de multi-poços com modificações. Em frascos de 10 mL adicionou-se 5,0 mL do caldo YM para 1L de água destilada, que foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Após esfriar o recipiente de reação, acrescentou-se uma alíquota de 10 µL de uma solução de Anetol em etanol (1:1) de concentração 3,26 mM e 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 este período de cultivo acrescentou-se 2,0 mL de acetato de etila (2x) para a extração do produto biotransformado. Para verificar a reprodutibilidade do método foi realizado o mesmo experimento, porém em frascos de 100 mL., adicionou-se 100mL do caldo YM ao frasco e acrescentou-se uma alíquota de uma solução de Anetol em etanol (1:1) de concentração e adicionou-se 05 discos dos micro-organismos 42/07, 12/07, 4Ag12 e 82/06. Foram feitas 3 coletas 48h, 72h e 96h

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A primeira etapa deste trabalho envolvia a seleção de micro-organismo produtores de enzimas capazes de bioconverter o anetol (propenilbenzeno substituído na posição para por um agrupamento metoxila) em anisaldeído ou outros produtos de oxidação. Segundo se apresenta na figura 1, intermediários como trans-epóxido do anetol (1), diol do anetol (2), anisaldeído (3-produto de interesse), ácido p-anísico (4), p,p'-dimetoxiestilbeno (5) podem ser obtidos pela ação da trans anetol oxigenase (TAO) (HAN et. al., 2012).

O anisaldeído é o produto de interesse devido a que é amplamente utilizado como fragrância e saborizante na indústria química. Também é utilizado como revelador de compostos em cromatografia de camada delgada.

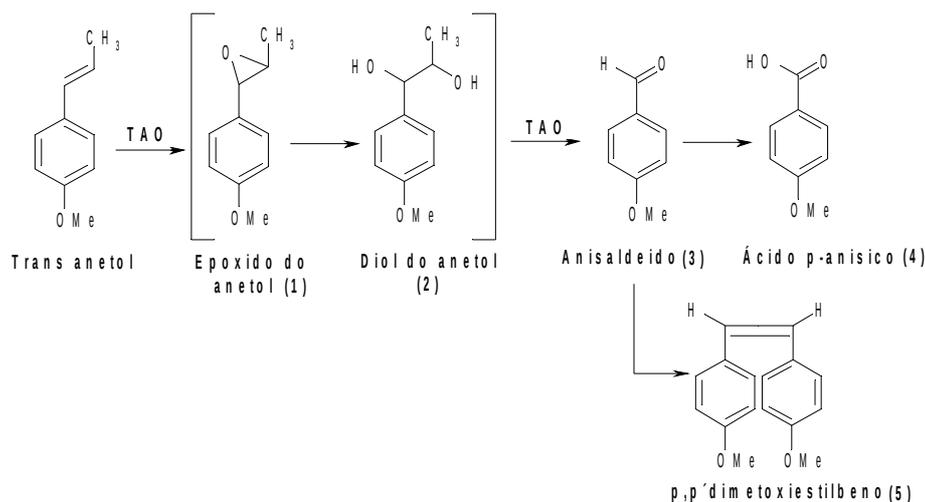


Figura 1. Produtos de biotransformação do trans anetol.

Foram avaliadas mais 55 espécies pertencentes aos diversos gêneros de fungos do semiárido entre eles: *Acremonium*, *Acrogenosporo*, *Alternria*, *Ascomycota*, *Aspergillus*, *Beltraniella*, *Chloridium*, *Cocleopu*, *Gonytrichum*, *Idriella*, *Memnoniella*, *Periconia*, *Picnídeo*, *Pithomyces*, *Pseudobotrytis*, *Sarcopodium*, *Speiropsis*, *Thozetella*, *Volutella*, *Beltrania*, *Chloridium*, *Gonytrichum*, *Pestalotiopsis*, *Cladosporium*, *Dictyochaeta*, *Dictyosporium*, *Memnoniella*, *Curvularia*, *Stachybotrys*, *Speiropsis*, *Thozetella*, *Volutella*. oriundos da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Estado da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) coletados nos municípios pertencentes ao semiárido brasileiro, de materiais vegetais em decomposição.

Na literatura se conhece a ação antimicrobiana dos propenilbenzenos, sobre tudo do anetol, eugenol e isoeugenol. Por tal motivo, foi preparado um experimento com o objetivo de verificar se o anetol estava inibindo o crescimento dos fungos. Através deste experimento realizou-se o monitoramento da biomassa dos fungos após 14 dias de reação. Por comparação com o controle positivo (sem adição de anetol), verificou-se que o anetol não inibiu o crescimento microbiano, devido a que não teve variação significativa da biomassa seca. Ao analisar, por cromatografia gasosa, os cromatogramas obtidos dos extratos orgânicos (extraídos em acetato de etila), percebeu-se a não formação de produtos de biotransformação; sugerindo assim a ausência de enzimas (oxidase) capazes de metabolizar o anetol.

Outro experimento foi realizado utilizando quinze novos isolados de fungos (07/06, 35/06, 82/06, 101/06, 98/06, 12/07, 26/07, 35/07, 42/07, 1M5, 2M2, 2M3, 4Ag6, 4Ag7 e 4Ag12) como biocatalisadores. Neste experimento foram modificadas algumas condições de cultivo: exclusão os co-fatores do meio, incubação do micro-organismos por 96h antes do acréscimo do substrato e nas condições da reação: agitação a 200 rpm a 30°C durante a reação.

Os resultados da reação de biotransformação com os fungos 4Ag12 e o micro-organismo 12-07 indicaram a formação de um produto de oxidação que ainda não foi identificado.

Novos testes serão realizados para aumentar a quantidade de substrato e identificar o produto de oxidação formado.



Figura 2: Crescimento dos fungos

CONCLUSÃO

Neste trabalho concluiu-se que com o uso desta metodologia que o substrato não inibiu o crescimento microbiano devido aos valores da biomassa seca encontrados. Onde de fato, as enzimas do micro-organismo, que apresentam sítios ativos que se “encaixam” no anetol (substrato), para a produção do composto desejado não obteve um resultado esperado. Embora não foi observado a formação dos produtos de oxidação desejados, em vários experimentos se obteve um produto não identificado ainda.

REFERÊNCIAS

COMASSETO, J.V. Apostila do Workshop em Biocatálise. Instituto de química UNICAMP, 2002.

LIMA, U. de A. Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Blucher, 2001. 593p

PINHEIRO, D. M.. Biotransformação de terpenos em compostos de aroma. 2003. 227 f. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP:

SATO, S. Produção de esteróides. In: LIMA, U. de A. Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Blucher, 2001. p 179-197

BORGES et al. Stereoselective bitransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron – Assymetry* XXX, 2009.

DIAS, A. C. P. et al. Isolation of a biodegradable sterol-rich fraction from industrial wastes. *Biores Technol*, 82, 2002. p.253-260.

LEHNINGER, A.L. N, D.L; *Princípios da Bioquímica*. 2º ed., Sarvier, SP, 2000.

DONGFEI HAN, JI-YOUNG RYU, ROBERT A. KANALY, HOR-GIL HUR. Isolation of a Gene Responsible for the Oxidation of trans-Anethole to para-Anisaldehyde by *Pseudomonas putida* JYR-1 and Its Expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2012 August; 78(15), 5238–5246.