

PEROXIDASE ORIUDOS DE FONTES VEGETAIS COMO BIOCATALISADORES NA OBTENÇÃO DE BIOAROMAS.

Rita de Cássia Sousa Carneiro¹; Heiddy Marquez Alvarez², Angélica Maria Lucchese³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: kassiaceutika@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheiddy@gmail.com
3. Co-orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Peroxidase, propenilbenzeno, rabanete.

INTRODUÇÃO

O aroma é um dos mais importantes atributos de alimentos, bebidas e cosméticos. Atualmente observa-se a preferência de consumo de produtos que contém em sua formulação ingredientes naturais em substituição aos aditivos químicos, o que faz com que esses produtos tenham apelo de mercado diferenciado. “Compostos obtidos por ação microbiana podem ser considerados "naturais", fato que promove grande aceitação por parte do consumidor.” (TAN et al, 1998, p.47). Dessa forma, agregando, maior valor aos produtos que utilizam esses aromatizantes produzidos biotecnologicamente.

O isossafrol é um óleo essencial extraído da *Pimenta Longa*. A oxidação deste substrato produz o piperonal, importante fixador de fragrâncias, muito utilizado na indústria de cosméticos, farmacêuticas, alimentícias e higiene e limpeza.

A pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC), natural da região amazônica, é uma espécie que produz óleo essencial rico em safrol (1,2-metilenodioxibenzeno-4-propenil), chegando a 75-92% da composição do óleo essencial. Este óleo é empregado na indústria de cosméticos, pois quando isomerizado fornece o isossafrol. Um de seus produtos de oxidação é o piperonal, (ANA et al, 2003) que pode ser utilizado como intermediário importante na síntese de fármacos como a L-DOPA e a Epinefrina, figura 1, entre outros. Entretanto, o maior apelo econômico desta substância está ligada a seu uso na indústria de perfumes como fixador biodegradável.

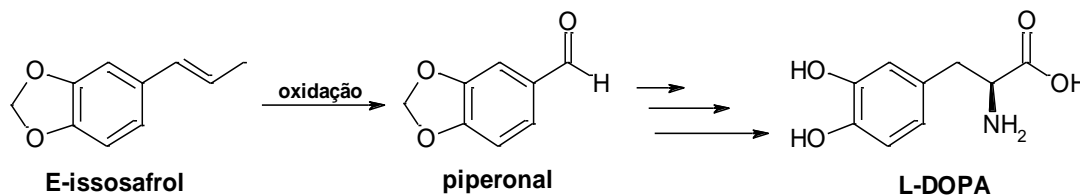


Figura 1. Obtenção da L-DOPA a partir do isossafrol

Essas indústrias atualmente têm uma demanda crescente por aromas naturais, que são obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais. Considerando esta demanda de mercado este projeto visa o desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para a produção de aromas naturais utilizando matéria prima de baixo custo disponível no país como a raiz do rabanete.

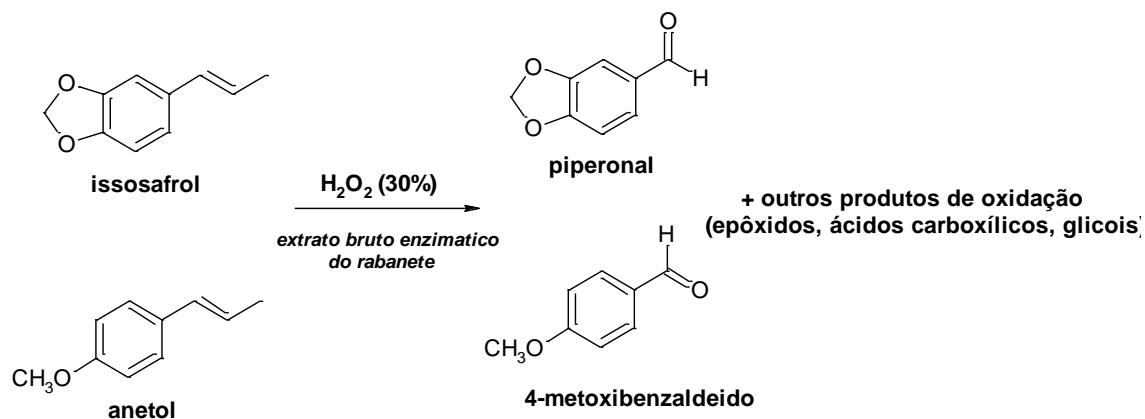
METODOLOGIA

As amostras de rabanete foram adquiridas no mercado local da cidade de Feira de Santana. O tecido vegetal foi lavado, fracionado em porções de 250g e estocado a -10°C . Para obter o extrato bruto, cada porção foi homogeneizada no liquidificador industrial com 500mL de tampão fosfato 100mM pH 6.5 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Vetec). Posteriormente esse extrato foi filtrado utilizando um funil e algodão e centrifugado a 6.500 rpm (centrifuga Nova Técnica NT815), durante 30min a 4°C . O sobrenadante foi mantido a 4°C .

Para a precipitação das proteínas adicionou-se lentamente 300g de sulfato de amônio (Synth; 80% de saturação) a 500mL do extrato bruto obtido como descrito anteriormente. Esta etapa foi conduzida em banho de gelo. Após a dissolução do sal e precipitação da proteína a solução foi deixada em repouso por uma hora a -10°C em freezer. Em seguida colocou-se a solução para centrifugar a 8000rpm durante 60min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado dessa solução foi dissolvido num pequeno volume de tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100mM pH 6,0 em um béquer. Colocou-se em um balão de 25mL e completou-se com o de tampão fosfato 100mM pH 6.5 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Este concentrado proteico (CP) constituiu a fonte de peroxidase de baixa pureza a ser utilizada nos experimentos a seguir.

Reações com o Issosafrol e Anetol

As reações foram conduzidas variando-se as proporções de substrato:peróxido, e a quantidade de extrato bruto enzimático no meio reacional. A quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , agente oxidante) inicialmente utilizada foi de 0,4mmol. As primeiras reações foram realizadas com quantidades equimoleculares de H_2O_2 e substrato (issosafrol ou anetol), figura 2. O solvente de reação também variou, utilizando-se 10 mL



de etanol 20%, ou 10mL de etanol 50% e/ou 10mL THF 20%.

Figura 2. Oxidação de issosafrol e anetol na presença de peróxidase de hidrogênio ao 30%.

As reações foram realizadas numa incubadora orbital (shaker) sob agitação durante o tempo de reação descrito nas tabelas anteriores (24 e 48 horas). Decorrido o tempo de reação, retiraram-se as amostras e realizou-se a extração das mesmas utilizando diclorometano (CH_2Cl_2) ou acetato de etila ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). As reações feitas com etanol foram extraídas com CH_2Cl_2 e as reações feitas com o solvente THF foram extraídas com $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$. Ao finalizar a reação química adicionou-se um pouco de bisulfito de sódio para eliminar o excesso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que ficou sem reagir. As amostras foram extraídas no solvente orgânico adequado e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4).

O mesmo procedimento foi realizado com as amostras que continham o solvente THF, só que ao invés de adicionar 5mL de diclorometano, colocou-se 5mL de acetato de etila. Depois, essas amostras foram levadas para a capela de exaustão para gases para evaporar o solvente restante.

Após realizados todos esses processos, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Na figura 3, se apresenta uma figura do rabanete utilizado na pesquisa.



Figura 3. Rabanete

Para 250g de rabanete utilizados obteve-se um rendimento de 4,87g extrato bruto enzimático. Essa massa foi dissolvida em num balão de 25 mL com a solução tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é possível fazer 2.500 reações.

As reações que foram preparadas com etanol a 50% e extraídas com acetato de etila foi constatado que não formou duas fases, não sendo possível realizar a extração. Por isso as amostras preparadas com etanol foram extraídas com diclorometano. Pode-se observar que após a evaporação na capela de exaustão para gases algumas amostras continham água a remoção foi realizada através da adição de bisulfito de sódio (agente secante).

Na reação enzimática, onde se utilizou o extrato proteico de rabanete como fonte peroxidásica a conversão foi apenas 15% na presença de tetrahydrofurano (THF) como solvente, no entanto a seletividade se manteve maior >98%, tabela 1.

Tabela 1. Descrição do sistema de oxidação catalítica para isosafrol (0,4 mmol), 30°C .

#	Catalisador	Oxidante (mmol)	Solvente (10 mL)	Tempo (h)	Conv. (%) ^a	Seletividade do piperonal (%) ^a
1	Extrato bruto de Rabanete (1,8 U)	H_2O_2 30% (0,4mmol)	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 20%	48	10	>98
2	Extrato bruto de Rabanete (1,8 U)	H_2O_2 30% (0,4mmol)	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 20%	48	0	0
3	Extrato bruto de Rabanete (1,8 U)	H_2O_2 30% (0,4mmol)	THF 20%	48	15	>98

^{a)} Determinado por CG

Na tabela 1 se pode observar que o melhor solvente de reação é o tetrahydro furano. Outros experimentos foram feitos avaliando o tempo de reação, a temperatura e a quantidade de agente oxidante, mas ainda não foram analisados por cromatografia gasosa por problemas de matérias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato bruto de peroxidase de rabanete foi um biocatalisador com baixa atividade na oxidação de isossafrol. Novos testes estão sendo realizados utilizando anetol como substrato.

REFERÊNCIAS

ANA, M. Azevedo.; VERÓNICA C. Martins, DUARTE M.F. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, Volume 9, p. 199-247. 2003. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265603090033>>. Acesso em 23 nov. 2012.

BARBOSA, D.P. et al. Epoxidation of natural propenylbenzenes catalyzed by [FeIII(Salen)Cl] and [FeIII(PPP)Cl]. *Catal. Comm.*, v. 8, p. 1041-1046, 2007.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v.25, pp.455-464, 2002.

SANTOS, A. S. Processos de Oxidação Microbiológica do Isossafrol a Piperonal. Tese de Doutorado, Instituto de Química /UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.

TAN, Q; DAY, D. F. Bioconversion of limonene to α -terpineol immobilized *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. jan. 1998. p. 60. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505003016>>. Acesso em: 24 nov. 2012.

WAUMANS, D.; BRUNEEL, N.; TYTGAT, J. Anise oil as para-methoxyamphetamine (PMA) precursor, *Forensic Science International*. v. 133, pp. 159 – 170, 2003.