BIORREDUÇÃO DA *p*-NITROACETOFENONA PROMOVIDA POR MICRORGANISMOS PRODUTORES DE DESIDROGENASES

Jennyfer Caroline Dzazio (PIBIC/FA), Luciana de Boer Pinheiro de Souza (Orientador), lucianaboer@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Ciências Exatas e da Terra, Química

Palavras-chave: Enantiosseletividade, biocatálise, biorredução.

Resumo

O interesse por substâncias enantiomericamente puras tanto na comunidade acadêmica quanto no setor industrial, como nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de defensivos agrícola, vem crescendo nos últimos anos. Apesar dos compostos quirais serem comuns na natureza são necessários métodos específicos de síntese para sua obtenção artificial, dentro da área conhecida como síntese assimétrica. Complexos de metais de transição com ligantes quirais são bastante utilizados como agentes redutores quirais. No entanto o custo elevado e a toxicidade dos metais são os principais obstáculos para sua utilização. A biocatálise apresenta-se como ferramenta na obtenção de compostos opticamente puros, pois está mais intimamente relacionada a “química verde”. Diante da biodiversidade de microrganismos existentes na natureza e da necessidade de descobrir novos biocatalisadores para a síntese de blocos de construções quirais, este projeto visou à busca por fungos produtores de enzimas capazes de atuar na biorredução de cetonas para a formação de álcoois enantiomericamente puros, além de contribuir para o desenvolvimento de metodologias sintéticas a partir da utilização de cepas fúngicas.

Introdução

O interesse por substâncias enantiomericamente puras tanto na comunidade acadêmica quanto no setor industrial vem crescendo nos últimos anos. Um grande número de fármacos apresenta quiralidade e têm em sua estrutura um ou mais átomos com orientação tridimensional muito bem definida. É de extrema importância que estes fármacos estejam na forma enantiomericamente pura, ou seja, apenas na orientação correspondente a atividade do fármaco, para que efeitos indesejados, ocasionados pelo enantiômero que não tem efeito terapêutico, não ocorram[1,2].

Álcoois quirais são precursores importantes, que podem servir como intermediários ou como blocos de construção quirais na síntese de diversos compostos de importância biológica[3]. O método amplamente utilizado para a preparação de álcoois quirais consiste na reação de uma cetona pró-quiral com um agente redutor quiral, que poderá conferir enantisseletividade a reação. Complexos de metais de transição com ligantes quirais são bastante utilizados como agentes redutores quirais, no entanto, o custo elevado é principal obstáculo para sua utilização[3,4]. A biocatálise apresenta-se como ferramenta na obtenção de compostos opticamente puros, pois está mais intimamente relacionada a “química verde”[4,5, 6].

Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais são geralmente obtidas de microrganismos (bactérias, bolores e leveduras). Industrialmente, os fungos são mais valorizados porque as enzimas por

ISSN 1676-0093

eles produzidas geralmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio[7].

A utilização de biocatalisadores em reações de redução de compostos carbonílicos surge como a melhor estratégia para a obtenção de álcoois com alta enantiosseletividade, considerando que as enzimas possuem sítios catalíticos com reconhecimento quiral[8-13].

Considerando os aspectos abordados, e principalmente sabendo que as enzimas industriais possuem custos elevados, justifica-se a busca de novos biocatalisadores com características especiais para possível aplicação em biocatálise.

Material e Métodos

Condições de cultivo das cepas fúngicas

As cepas fúngicas que foram utilizadas neste trabalho foram isoladas e fazem parte da coleção do grupo de pesquisa da Profª Adriana Knob do Departamento de Biologia Geral da UNICENTRO. Estas foram cultivadas em placas contendo meio de cultura BDA (ágar batata dextrose).

Visando induzir a produção de enzimas desidrogenase, as cepas foram crescidas em meio líquido de batata dextrose (BD), contendo 20 g/L de batata e 20 g/L de glicose.

Procedimento geral para a preparação do padrão (R,S) *p*-nitrofeniletanol

Para obtenção do álcool racêmico a *p*-nitroacetofenona foi reduzida com $NaBH_4$ (agente redutor), obtendo-se como produto o (*R*,*S*) *p*-nitrofeniletanol.

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 2 g (1 equivalente) do substrato cetônico dissolvido em aproximadamente 50 mL de metanol e 5 equivalentes do agente redutor, controlando-se a temperatura do meio reacional (20-25ºC) em banho de gelo. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), e após o consumo do material de partida, evaporou-se o solvente em rotaevaporador. O resíduo foi solubilizado em 50 mL de diclorometano e lavado três vezes com 30 mL de água. A fase orgânica foi submetida à secagem com $NaSO_4$ anidro, sendo posteriormente rotaevaporada. Obteve-se 68% de rendimento. O produto final foi a analisado por Espectroscopia de Infravermelho.

Procedimento para as reações de biorredução da cetona

Das cepas fúngicas cultivadas em meio sólido transferiu-se três discos (3,3mm) para erlenmeyers contendo 150 mL de meio líquido (200 g/L de batata e 20 g/L de glicose), os quais foram levados à agitador orbital tipo shaker a 100 rpm a 28 °C. Após 4 dias do crescimento micelial, adicionou-se 100 mg da *p*-nitroacetofenona solubilizadas em 1 mL de DMSO e mantidos sob incubação por mais três dias. Alíquotas foram retiradas dos sistemas reacionais a cada 24 horas, durante três dias, as quais foram submetidas a processo de extração líquido-líquido com acetato de etila grau HPLC. Para cada cepa fúngica foi realizado o procedimento reacional em triplicata. Este mesmo procedimento foi utilizado em concentrações variadas para 50 mg e 25 mg da *p*-nitroacetofenona.

Resultados e Discussão

As cepas fúngicas cedidas pela prof. Adriana Knob tiveram que ser replicadas em meio sólido inúmeras vezes por conta de contaminação por bactéria, sendo necessária a purificação das mesmas.

Para preparação do padrão (R,S) *p*-nitrofeniletanol optou-se pela utilização de $NaBH_4$, um agente redutor comumente utilizado em reações de redução de cetonas. Este foi preparado com a finalidade de servir de comparação para as análises em cromatógrafo gasoso das reações de biocatálise.

A análise de Infravermelho do *p*-nitrofeniletanol foi usada para caracterização do álcool racêmico. A presença do sinal da hidroxila em 3400 cm^{-1} e a ausência da banda da carbonila em aproximadamente 1700 cm^{-1} indicam a formação do produto desejado.

As reações de bioredução da *p*-nitroacetofenona foram realizadas em agitador orbital tipo shaker no laboratório de microbiologia da UEPG e na UTFPR dependendo da disponibilidade dos mesmos. Primeiramente as reações foram realizadas com agitação e temperatura constantes (100 rpm a 28 °C), alterando a concentração da cetona a ser estudada a fim de investigar a influência da concentração na reação de bioconversão. Para esta etapa, optou-se por utilizar as concentrações de 25 mg, 50 mg e 100 mg da *p*-nitroacetofenona. Alíquotas foram retiradas em 24 h, 48 h e 72 h de reação, e após passarem pelo processo de extração líquido-líquido com acetato de etila, as amostras deveriam ser analisadas no cromatógrafo a gás com a finalidade de calcular a porcentagem de conversão e excesso enantiomérico.

Outras alterações propostas no projeto inicial, como a mudança de temperatura e pH do meio dependiam dos resultados da influência da concentração do substrato, pois estas seriam realizadas com a concentração que obtivesse o melhor resultado.

Não foi possível analisar os resultados obtidos das biorreduções da p-nitroacetofenona, devido à indisponibilidade do cromatógrafo gasoso do Laboratório Multiusuário da UEPG e da central analítica da UTFPR-PG.

Conclusão/ões

O padrão racêmico (R,S) *p*-nitrofeniletanol foi preparado via metodologia convencional obtendo-se um bom rendimento (68%). A análise de Infravermelho comprovou a formação do mesmo.

As reações de biorredução da p-nitroacetofenona não puderam ser analisadas devido a indisponibilidade do cromatógrafo gasoso, as alíquotas das reações foram conservadas para posterior análise.

Com o desenvolvimento deste projeto foi possível aprender técnicas de purificação e conservação de cepas fúngicas, além de um pequeno contato com a técnica de espectroscopia de Infravermelho.

Agradecimentos

À Instituição de Ensino UEPG, por proporcionar esta oportunidade aos acadêmicos.
Ao órgão Fundação Araucária, pelo indispensável apoio financeiro.
À professora Luciana, pelo apoio, orientação, confiança e pela oportunidade para realização do projeto.
À equipe da Instituição de Ensino UTFPR, que colaboraram para a elaboração e realização do trabalho.
À técnica do Laboratório de Microbiologia da UEPG, pelo auxílio durante a execução do projeto.
Às amigas Helen e Lauanny, pela colaboração e auxílio para o andamento do projeto.

Referências

[1] ROMERO, J.R. **Fundamentos de Estereoquímica dos Compostos Orgânicos**. Ribeirão Preto: Holos, p.108, 1998.

[2] TANG, W. L.; ZHAO, H. **Industrial Biotechnology: Tools and applications. Biotechnology Journal**, v. 4, p. 1725-1739 2009.

[3] TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C.L. **Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica**. Química Nova, v. 26, p. 112-122, 2003.

[4] ARAÚJO, L. S. **Busca de álcool desidrogenases para aplicação em oxidação enantiosseletiva de álcoois.** Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

[5] FABER, K.; PATEL, R. **Chemical biotechnology a happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry**. Curr. Opin. Biotechnol., v. 11, p. 517-519, 2000.

[6] VANDAMME, E. J. **The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals.** Journal of Biotechnology, v. 37, p. 89-108, 1994.

[7] ZANOTTO, S. P. **Utilização de Enzimas e Microrganismos para a Obtenção de Compostos Opticamente Ativos**. Tese (Doutorado em Química), Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

[8] COMASSETO, J. V.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, L. H.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M. **Biotransformations of ortho-, meta - andpara -aromatic nitrocompounds by strains of Aspergillus terreus: Reduction of ketones and deracemization of alcohols**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.,v. 39, p. 24–30, 2006.

[9] PEDRINI, P.; GIOVANNINI, P. P.; MANTOVANI, M.; ANDREOTTI, E.; COLALONGO, C. **Reduction screening with endophytic fungi: Synthesis of homochiral secondary alcohols**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic., v. 60, p. 145–150, 2009.

[10] LOPES, R. O.; RIBEIRO, J. B.; RAMOS, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; LEAL, I. C. R.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A. **Highly enantioselective bioreduction of 4-bromoacetophenone**. Tetrahedron Asymmetry, v. 22, p. 1763–1766, 2011.

[11] BIROLLI, W. G.; FERREIRA, I, M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D. A.; MATOS, I. L.; COMASSETO, J. V.; PORTO A. L. M. **Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview**. Biotechnology Advances, v. 33 (5), p. 481 – 510, 2015.

[12] BIROLLI, W. G.; FERREIRA, I, M.; JIMENEZ, D. E. Q.; SILVA, B. N. M.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C.; PORTO A. L. M. **First Asymmetric Reduction of Isatin by Marine-Derived Fungi**. Journal Brazilian Chemical Society, v. 28 (6), p. 1023-1029, 2017.

[13] BENNAMANE, M; RAZI, S.; ZEROR, S.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L. **Preparation of chiral phenylethanols using various vegetables grown in Algeria**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 14, p. 52-56, 2018.