



BIOCATÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS PELA LEVEDURA *RHODOTORULA SP.*

Renan Moura Garcia¹, Gustavo Adriano Egler Souza², Rogério Aparecido Minini dos Santos³

RESUMO: As reações utilizando métodos biocatalíticos se encontram em extensiva expansão, pois a mesma possibilita a síntese de compostos com uma estereoquímica específica. As metodologias com uso de micro-organismo servindo como catalisadores naturais têm sido implantados em várias áreas industriais, fornecem um resultado relativamente rápido através das reações químicas, além do fato de economizar matérias primas, energia, produtos químicos e reagentes quando comparados com métodos convencionais. A *Rhodotorula sp.* apresentou grandes taxas de conversões nas reações biocatalíticas, como na obtenção de 2-metilciclohexanol e 3-metilciclohexanol com um rendimento de 83,75% e 98% respectivamente. A (+)-(S)-carvona dos substratos usados foi o que apresentou maior síntese de compostos sendo gerado o (1R,2S,4R)-neodiidrocarveol com 29,36% e a (-)-(R)-carvona uma conversão do mesmo composto porém com 100% de rendimento.

PALAVRAS-CHAVE: Biocatálise; Biotransformação; Catalisadores naturais; Micro-organismos.

1 INTRODUÇÃO

A biocatálise assimétrica é essencial para os mais básicos processos em reações utilizadas usando micro-organismos para que mantenha assim funcionalidades como síntese e degradação de moléculas, armazenamento e uso de energia, sendo assim eles participam de uma forma muito importante entre o meio que estes micro-organismos estão inseridos e o tipo de substrato presente (WOHLGEMUTH, 2010).

Com o crescente número de micro-organismos associado a novas técnicas, inovadoras estratégias podem ser estabelecidas na aplicação da biocatálise, recentes combinações produzindo compostos diferenciados e específicos, criando assim uma biblioteca de testes biológicos e perfis de crescimentos celulares para possíveis futuros estudos envolvendo micro-organismo (RICH et al., 2002).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MÉTODOS GERAIS

Todos os reagentes, solventes e os respectivos substratos foram reduzidos quimicamente para obtenção dos padrões racêmicos. Nesta metodologia é estabelecido que 0,1 g do substrato e 10,0 mL de álcool etílico 95° seja resfriado a 0°C em balão de 50,0 mL. Em seguida, foi acrescentado lentamente 0,1 g de boro-hidreto de sódio (NaBH₄). Após esta adição foi mantido em agitação durante 60 minutos. Após este período, adicionou-se 20,0 mL de solução saturada de cloreto de amônio (NH₄Cl) e promovida a extração através de funil de separação, utilizando duas porções de 20,0 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) e adicionado sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), seguida de filtração da fase orgânica. O solvente foi evaporado sob vácuo.

2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas de alumínio da Merck. A fase móvel utilizada foi hexano:acetato de etila (90:10) utilizando-se de reveladores químicos, como solução ácida de p-anisaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina. Os produtos de biocatálise foram analisados em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de massas (GC-EM), modelo 5977-A, Agilent Technologies Co., Ltda. cuja a fase estacionária era uma coluna HP-5MS (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) e a fase móvel gás Hélio.

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. renan.mtn@hotmail.com

² Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. gustavo_adriano13@hotmail.com

³ Professor M.e Rogério Aparecido Minini dos Santos



2.3 PREPARO DO MICRO-ORGANISMO

A levedura *Rhodotorula* sp. foram cultivados em placa de Petri contendo o meio de cultura adequado. Após este período de cultivo foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL, contendo cerca de 50 mL de Extrato de Malte ME, sendo incubados por 48 horas a 28 °C sob agitação (200 rpm). Após esse período, as células microbianas foram adicionadas em tubo Falcon e centrifugados por 5 minutos a 2500 rpm, sendo que o sobrenadante foi desprezado posteriormente.

2.4 REAÇÃO DE BIOCATÁLISE

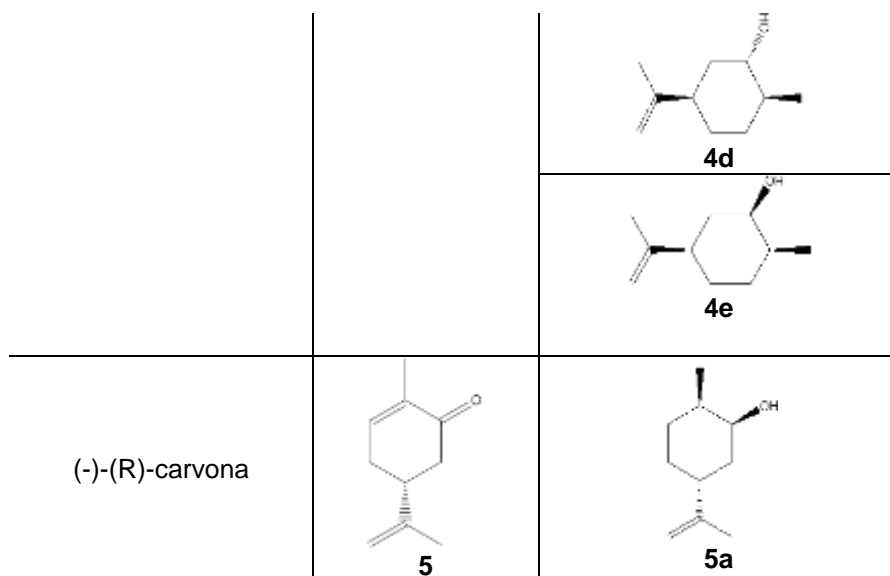
Em Erlenmeyers de 125 mL contendo 40 mL de tampão Sørensen (NaH_2PO_4 - KH_2PO_4) pH 7,0, foi adicionado cerca de 2 g de massa celular (peso úmido) do micro-organismo e 10 mg do substrato. Os frascos reacionais foram mantidos sob agitação de 200 rpm, à 28°C e monitorados por alíquotas de 2 mL a cada 24, 48 e 72 horas. As fases orgânicas coletadas foram secas com Na_2SO_4 anidro, e finalmente analisada por CG-EM.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através da utilização da *Rhodotorula* sp. como biocatalisador dos substratos (1) – (5), foi obtido os produtos observados na Tabela 1. Os percentuais de cada produto foram calculados através das áreas relativas dos cromatogramas. As reações podem gerar produtos isômeros, no entanto, a coluna utilizada no cromatógrafo gasoso não possibilita a obtenção da isomeria dos mesmos.

Tabela 1: Produtos obtidos por biocatálise utilizando *Rhodotorula* sp.

Nome	Substrato	Produtos
2-metilciclohexanona	 1	 1a
3-metilciclohexanona	 2	 2a
4-metilciclohexanona	 3	 3a
(+)-(S)-carvona	 4	 4a
(+)ate-(S)-carvona	 4	 4b
		 4c



Na tabela 2 é possível observar as taxas de conversão dos substratos utilizados em porcentagem.

A levedura do gênero *Rhodotorula* sp. apresentou uma grande atividade biocatalítica, possivelmente através de uma enzima redutora para a obtenção dos álcoois quirais 2-metilciclohexanol (**1a**) e 3-metilciclohexanol (**2a**). No processo das reações catalisadas as enzimas participam de forma ativa acelerando o processo reacional aumentando a energia de ativação entre o substrato e o produto, tendo como consequência um aumento significativo do tempo em que essas reações ocorrem. As oxirredutases são uma das possibilidades das enzimas envolvidas nas reações sendo estas classificadas em três grupos sendo respectivamente: desidrogenases (ou redutases), oxigenases e oxidases.

Pode ser observado na reação envolvendo a molécula 4-metilciclohexanona (**3**), observar do álcool quiral 4-metilciclohexanol (**3a**) com um rendimento final de 98%. Utilizando o substrato (+)-(S)-carvona (**4**) os produtos obtidos apresentaram o rendimento de 29.36% para (**4a**), 26.51% para (**4b**), 19.11%, para (**4c**), 3.65% para (**4d**) e 21.38% para (**4e**). Na utilização do substrato (-)-(R)-carvona (**5**) a levedura obteve sucesso em realizar a conversão do substrato (**5**) com 100% de rendimento no produto (1R,2S,4R)-neodiidrocarveol como pode ser observado.

Tabela 2: Taxa de conversão dos substratos

Micro-organismo	Substrato	Produto / Rendimento (%)					
<i>Rhodotorula</i> sp.	1	83,75					
	2	98,50					
	3	98,50					
	4	4a	4b	4c	4d	4e	4f
		29,36	26,51	19,11	3,65	21,38	-
	5	5a	5b		5c		
100		-		-			

Fonte: Dados da Pesquisa

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os fungos apresentam uma seletividade específica para os substratos, além de uma massa de células compatível, pois tanto a concentração de levedura quanto a de substrato usado podem influenciar nas conversões, assim também como o pH e a temperatura. Com o avanço nos estudos sobre biocatálise e a disponibilidade de novos micro-organismos pode-se esperar a aplicação desta metodologia tanto nas áreas industriais e farmacêuticas, além de fornecer novos padrões e perfis de crescimento para futuros estudos.



REFERÊNCIAS

WOHLGEMUTH, Roland. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. **Current Opinion In Microbiology**, Buchs, v. 13, n. 3, p.283-292, jun. 2010.

RICH, Joseph O; MICHELS, Peter C; KHMELNITSKY, Yuri L. Combinatorial biocatalysis. **Current Opinion In Chemical Biology**, Iowa, v. 6, n. 2, p.161-167, 1 abr. 2002.