

## **Bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro para aplicação em reações de biorremediação enantiosseletiva de cetonas**

Bezerra AFM<sup>1</sup>, Vasconcelos HS<sup>2</sup>; Neto JFN<sup>1</sup>, Sousa HML<sup>1</sup>, Araújo LS<sup>3</sup>, Oliveira FM<sup>1</sup>, Zanotto SP<sup>4</sup>, Andrade LH<sup>3</sup>, Barroso HS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM. <sup>2</sup> Centro Universitário do Norte Laureate, Manaus-AM. <sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo-SP, Brasil. <sup>4</sup> Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

E-mails: alziramarreiros@gmail.com; joaquimfnn@gmail.com,  
hiltonmarcelo18@gmail.com, fernando.mo2011@gmail.com; hileia.barroso@gmail.com,  
hebe.vasconcelos@gmail.com, lidianepiaui@yahoo.com.br, leandroh@iq.usp.br,  
sandrazanotto@yahoo.com.br

### **Resumo**

A busca por novos biocatalisadores é um dos atuais interesses das indústrias biotecnológica e farmacêutica. As enzimas de origem microbiana se apresentam como excelentes catalisadores devido a capacidade de sintetizar intermediários químicos biologicamente ativos. Alguns destes são bastante difundidos na produção de fármacos, como os alcoóis enantiomericamente puros. Sua síntese pode ser realizada utilizando fungos em reações de biorredução assimétrica de cetonas. Diante da vasta diversidade microbiana presente na região amazônica e a necessidade de investigações nesta área, este trabalho teve como objetivo realizar a bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro, a fim de avaliar o potencial em reações de biorredução enantiosseletiva de cetonas. A atividade enzimática de 91 fungos filamentosos foi avaliada. Neste quesito, nove destacaram-se ao obter excelentes resultados, com taxas de conversão maiores que 80% e excesso enantiomérico superiores a 99% no processo de biorredução das cetonas aromáticas: 4-cloroacetofenona e 4-metilacetofenona. O fungo, cujo código de identificação é SED 41, apresentou atividade enzimática capaz de biorreduzir a 4-cloroacetofenona ao (*R*)-1-(4-clorofenil)etanol, obtendo uma conversão >99% e excesso enantiomérico >99% para o enantiômero-*R*. O isolado SED 108 converteu 60% da 4-metilacetofenona ao (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol com excesso enantiomérico de 81% (*S*). Estes resultados

demonstram o potencial dos fungos filamentosos isolados na bacia amazônica em reações de biorredução enantiosseletiva dos derivados da acetofenona e a versatilidade na produção tanto do enantiômero *S* como o *R*.

**Palavras-chave:** Biocatálise, micro-organismos, biorredução, alcoóis quirais.

### Introdução

Os alcoóis enantiomericamente puros são amplamente utilizados como intermediários químicos em diversas áreas, principalmente, nas indústrias farmacêutica, agroquímica e biotecnológica (Patel, 2014). A produção biotecnológica de compostos químicos por biocatálise possui vantagens em relação à química sintética pois diminuem o impacto ambiental e gastos energéticos devido as condições reacionais brandas (Xu, 2013). Isto está relacionado com a utilização das enzimas produzidas pelos micro-organismos como catalisadores reacionais. Esta abordagem tem sido visada pois apresenta elevada enantiosseletividade e por ser benéfica ao meio ambiente. A biorredução assimétrica de cetonas para obtenção de alcoóis quirais pode ser realizada com células íntegras de micro-organismos ou com enzima oxirredutase isolada (Soni e Banerjee, 2006).

As reações com células íntegras de micro-organismos representam uma alternativa mais acessível, uma vez que seu sistema possui os caminhos metabólicos para regeneração de cofatores como o  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NAD(P)H}$  (Ni e Xu, 2012). Além disso, o cofator das oxirredutases, o  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NAD(P)H}$ , confere elevada enantiosseletividade ao inserir quiralidade à molécula alvo, sendo uma boa estratégia para a produção de alcoóis opticamente ativos, possibilitando alcançar o rendimento teórico de quase 100% e enantiosseletividade de 99%. (Soni e Banerjee, 2006)

A produção de enzimas de origem fúngica é um processo bastante estudado, mas poucos são os relatos a respeito da utilização destes micro-organismos, isolados da região amazônica, em processos biotecnológicos. Diante da crescente necessidade de busca por novos biocatalisadores, a biodiversidade fúngica da região amazônica é extremamente promissora para a pesquisa do seu potencial de aplicação em processos biocatalíticos. Assim, este trabalho tem como objetivo principal verificar o potencial de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro/Amazônia, para produção de enzimas redutases para realizar reações de redução de dois derivados da acetofenona de forma enantiosseletiva.

## Material e Métodos

A avaliação da atividade enzimática dos fungos realizou-se de acordo com o procedimento descrito por Araújo (2011). Conforme as seguintes etapas:

*Reativação.* Os fungos estão preservados pelo Método de Castellani e foram reativados utilizando o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose. Os cultivos foram incubados a 28 °C por 7 dias.

*Pré-inóculo.* O inóculo do fungo foi adicionado a um erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura (MCFE7) e incubados a 28 °C sob agitação orbital, 160 rpm por quatro dias.

*Inóculo/Reação.* Neste ensaio, foram utilizadas microplacas (24 poços). Após quatro dias, foram adicionados, em cada poço da microplaca, 2 mL de pré-inóculo e 40 µL das soluções das cetonas 4-metilacetofenona e 4-cloroacetofenona (5 mmol/L). As microplacas foram mantidas em agitador orbital por 3 dias nas mesmas condições citadas anteriormente.

*Extração.* Após 3 dias, foi adicionado éter etílico (2 mL) a cada poço da microplaca e extraída a mistura reacional (fase aquosa) sendo transferida para um tubo Falcon e centrifugada (1 min, 6000 rpm) para separação de fases.

*Análise.* As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa e coluna com fase estacionária quiral. O excesso enantiomérico dos compostos foram determinados por comparação cromatográfica com amostras dos (*R,S*)-alcóois sintetizados quimicamente, fornecidos pelo Laboratório de Química Fina e Biocatálise da Universidade do Estado de São Paulo - USP, e das cetonas. O excesso enantiomérico (ee) foi definido como a razão de  $[S]-[R]/[S]+[R] \times 100\%$ , em que [*R*] e [*S*] são as concentrações dos enantiômeros (*R*) e (*S*), respectivamente.

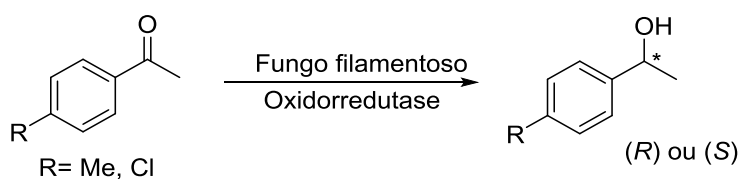
As soluções padrões dos alcoóis: (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol e (*R,S*)-1-(4-clorofenil)etanol; e das cetonas: 4-cloroacetofenona e 4-metilacetofenona foram preparados numa concentração de 5 mmol/L. Para isto, diluiu-se 0,25 mmol dos substratos em 1 mL de dimetilformamida (DMF) para os alcoóis; e etanol para as cetonas.

Meio de Cultura MCFE7 = (pH 5,6) = KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 %; 1,0 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,04%; 0,4 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (0,04 %; 0,4 g/L), Dextrose (0,025 %; 0,25 g/L), Peptona (0,025 %; 0,25 g/L).

## Resultados e Discussão

A atividade enzimática de 91 isolados fúngicos foi avaliada através da biorredução de 4-cloroacetofenona e 4-metilacetofenona aos seus respectivos alcoóis. Os resultados mais relevantes foram dos seguintes isolados: SED 35, SED 64, SED 89, SED 4, SED 132, SED 05, SED 10, SED 123 e SED 75 (Tabela 1).

Tabela 1. Biorredução de 4-cloroacetofenona (Cl) e 4-metilacetofenona (Me).



<i>Reação</i>	<i>Fungos Filamentosos</i>	<i>Substrato</i>	<i>Conversão (%)</i>	<i>ee<sup>a</sup> (%)</i>
1	SED 35	Me	28	44(R)
2		Cl	87	>99 (R)
3	SED 64	Me	-	-
4		Cl	77	>99(R)
5	SED 89	Me	79	>99 (R)
6		Cl	52	79(R)
7	SED 41	Me	84	97(R)
8		Cl	>99	>99(R)
9	SED 132	Me	44	74(R)
10		Cl	94	93 (R)
11	SED 05	Me	69	94 (R)
12		Cl	95	91 (R)
13	SED 10	Me	63	85 (S)
14		Cl	86	78 (S)
15	SED 123	Me	53	35 (R)
16		Cl	89	95 (R)
17	SED 75	Me	75	64 (S)
18		Cl	-	-

<sup>a</sup>Condições reacionais: 5 mmol/L dos substratos 1 e 2 em 2 mL de meio de cultura, 160 rpm, 28 °C, 72h. A configuração absoluta foi determinada por comparação com dados da literatura. ee.: excesso enantiomérico.

Os valores de conversão variaram entre 28% a 84% quando o substituinte R da acetofenona era o grupo metila (Me) e de 52% a >99% quando o substituinte era o cloro (Cl). Nas reações 2, 8, 10, 12, 14 e 16 com o substrato clorado as conversões foram excelentes (>80) e com elevado excesso enantiomérico (ee) (>90%) nas reações 2, 4, 8, 10, 12 e 16. Por outro lado, nas reações com o grupo substituinte Me apenas na reação 7 ocorreu conversão acima de 80% e nas reações 5, 7 e 11 obteve-se ee >90%.

Dentre os nove isolados fúngicos, sete reduziram as cetonas para produzir o enantiômero-*R* e apenas dois foram enantiosseletivos para sintetizar o enantiômero-*S*. O SED 10 converteu 63% do 4-metilacetofenona com e.e. 85% para o (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol e o 4-cloroacetofenona ao (*S*)-1-(4-clorofenil)etanol (conversão 86% e excesso enantiomérico 78%); o SED 75 reduziu 75% de 4-metilacetofenona em (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol com ee 85%.

O isolado SED 41 apresentou o melhor resultado na avaliação enzimática, pois catalisou 4-metilacetofenona e 4-cloroacetofenona com elevadas conversões (83% e >99%, respectivamente) e e.e. para o enantiômero-*R* (97% e >99%, respectivamente).

Os melhores resultados foram obtidos nas reações onde o substrato era uma cetona com o substituinte cloro (Cl) em seu anel aromático. Assim, as enzimas redutases produzidas pelos isolados fúngicos, SED 35, SED 41, SED 132, SED 05, SED 10 e SED 123 tiveram maior afinidade com a cetona clorada. Isto pode ser explicado pelo fato do cloro ser um grupo substituinte retirador de elétrons, o que facilita a reação de redução. O isolado SED 64 demonstrou-se específico para reduzir a cetona com substituinte cloro, convertendo 77% da cetona ao enantiômero (*R*) do álcool com elevado e.e. (>99%), mas não reduziu a cetona substituída pelo grupo Me. Por outro lado, o isolado SED 75 foi específico para a redução da cetona com substituinte Me, convertendo 75% da cetona a álcool com excesso enantiomérico 64% para o enantiômero (*S*).

A maioria dos isolados fúngicos apresentaram enzimas oxidorredutase com preferência pela formação do enantiômero-*R* do álcool. Já o SED 10 e o SED 75 produziram oxidorredutases diferentes dos demais, que tiveram preferência na síntese do enantiômero-*S*.

O isolado fúngico SED 41 apresentou ótimos resultados como biorredutor enantiosseletivo, reduzindo tanto a 4-cloroacetofenona como a 4-metilacetofenona com altas taxas de conversão e excesso enantiomérico para o enantiômero-*R*.

### Conclusões

Este trabalho obteve resultados que demonstram o potencial biotecnológico das enzimas produzidas pelos isolados de fungos filamentosos de sedimentos de rio Negro, pois, sintetizaram com sucesso alcoóis quirais enantiomericamente puros a partir das reações de biorredução da 4-cloroacetofenona e 4-metilacetofenona, além da versatilidade na produção tanto do enantiômero-*S* como o enantiômero-*R*.

Destacou-se o isolado fúngico SED 41 como um biocatalisador promissor em reações de biorredução de cetonas para a obtenção de alcoóis quirais enantiomericamente puros.

### Referências

- Araújo LS, Kagohara E, Garcia TP, Pellizari VH, Andrade LH (2011) Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. *An Antarctic Survey. Mar Drugs*9: 889-905.
- Ni Y, Xu JH. (2012) Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnology Advances*30: 1279–1288.
- Patel PK, Singh S, Kumar A, Sandhyavali MS, Priyadarshini SR, Yadav IK (2014) Microbial reduction of ketones and its derivatives. *Ind J of Research in Pharm and Biotechnology*2: 1020-1029.
- Soni P, Banejjer UC (2006) Enantioselective reduction of acetophenone and its derivatives with a new yeast isolate *Candida tropicalis* PBR-2 MTCC 5158. *Biotechnology Journal*1: 80-85.
- Xu G, Yu H, Xu J (2013) Facile access to chiral alcohols with pharmaceutical relevance using a ketoreductase newly mined from *Pichia guilliermondii*. *Chin J Chem*31: 349-354.