

1.06.01 - Química / Química Orgânica

REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÕES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS, UTILIZANDO COMO BIOCATALISADOR O FUNGO *Aspergillus flavus*.

Renan Arruda da Costa¹, Brenda Emelly de Jesus da Silva¹, Manoel L. Lopes Junior², Lourivaldo Silva Santos², Marivaldo José Costa Corrêa³.

1. Estudante de Química da Faculdade de Química da Universidade Federal do Pará - (ICEN/UFPA)
2. Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Química - (ICEN/UFPA)
3. Professor da Faculdade de Química - (ICEN/UFPA) - Orientador

Resumo

As biotransformações podem ser consideradas como reações de compostos orgânicos realizadas pelas enzimas que se apresentam isoladas ou nos interiores dos microorganismos, e a molécula de uma determinada substância orgânica pode ser modificada através de uma reação específica, acompanhada ou não de clivagem na cadeia carbônica. O estudo atual sobre fungo endofítico, o qual vem sendo utilizado como biocatalisador em reações de biotransformações, tem como objetivo principal a obtenção e isolamento de moléculas bioativas que possam ser empregadas nas diversas áreas do conhecimento, tais como, medicina e agroindústria. Levando-se em consideração que a pesquisa que utiliza as espécies vegetais necessita de quantidade considerável para que se possa iniciar algum trabalho de pesquisa, e decorre também para a degradação dessas espécies, com a utilização dos fungos endofíticos, ganha-se tempo e a pesquisa contribui para evitar que as espécies vegetais sejam degradadas.

Autorização legal: Projeto de Pesquisa Nº PRO4786-2021 - PROPESP/UFPA

Palavras-chave: Biorreduções; moléculas bioativas; substratos orgânicos.

Introdução

O ser humano procurou sempre buscar alternativas para solucionar problemas relacionados à sua alimentação, doenças e assepsia corporal. As plantas sempre estiveram presentes no cotidiano do ser humano como fonte de alimento, asseio e de tratamento de doenças, em decorrência de sua abundância na natureza e facilidade de obtenção. A sua utilização no controle de pragas e de diversas doenças talvez seja alternativa mais antiga quanto o próprio aparecimento da humanidade (FRANÇA, 2001).

A diversidade química obtida a partir dos fungos endofíticos contempla diversas classes químicas, incluindo policetídeos, derivados do ácido chiquímico, terpenos, alcalóides e peptídeos (PATEL, 1997). Borges et al. (2007) ilustraram uma ampla variedade de novos compostos, bem como substâncias bioativas isolados de fungos endofíticos. Além disso, abordam importante contribuição de fungos endofíticos como agentes de biotransformação, o que tem sido bastante valorizado em processos biotecnológicos quanto à obtenção de moléculas biotransformadas que seriam dificilmente obtidas via síntese convencional em laboratório.

A contribuição dos produtos naturais na medicina ao longo dos anos é bem evidente e a obtenção de diversas moléculas contemplando várias classes químicas, bem como diferentes atividades biológicas, destaca o potencial dos produtos naturais para o tratamento de doenças, tais quais o potente analgésico morfina; a quinina que serviu como guia para o desenho sintético de vários antimalários; a salicina que motivou o desenvolvimento do ácido acetilsalicílico, fármaco amplamente utilizado como analgésico e antiinflamatório; o cardiotônico digitoxina, os anticancerígenos paclitaxel e alcalóides da vinca (vincristine e vimblastina). Desta maneira, torna-se evidente a importância da utilização de fungos endofíticos na busca de novas moléculas bioativas (GIRI et al., 2001).

Metodologia

1) Métodos:

A reativação do *Aspergillus flavus* foi realizada a partir da linhagem já isolada por Corrêa (2011) e identificada pela Dra. Maria Inês de Moura Sarkis - Laboratório de Coleção de fungos/Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ- RJ, e à esterilização do material vegetal e isolamento dos endofíticos foi realizada seguindo o procedimento descrito por Castellani (1939).

2) Substratos:

Procedimento geral para obtenção das chalconas: **1** [(2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona, (IRIE & WATANABE, 1980)], **2** [3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-1-fenilpropan-1-ona], (EDWARDS et al. 1990; TEH et al. 2006)] e um derivado α , β -insaturado **3** [(2E, 6E)-2,6-bis-(benzidileno)-cicloexan-1-ona, (LAKSHMI & RAMAMURTHI,

2005)].

Em um balão de fundo chato e boca esmerilhada (125 mL), colocado em banho de gelo, foram adicionados na seqüência: o solvente (15 mL; EtOH ou MeOH), a cetona (10 mmol), o catalisador (15 mL de solução de NaOH 10%) e o aldeído (11 mmol, excesso de 10%). A mistura de reação foi mantida em agitação magnética à 40 °C por 40 minutos. Posteriormente, foi resfriada e deixada em freezer durante 48h. Após esse período foi feita uma filtração a vácuo. O produto obtido foi recristalizado em metanol.

Já, as cetonas aromáticas: **4** (acetofenona) e **5** (4-nitro-acetofenona), foram adquiridas comercialmente (Fluka e ALDRICH, respectivamente).

3) Reações de Biorredução

Inicialmente o fungo já isolado das folhas de *Paspalum maritimum Trin.* (três discos de 5 mm de diâmetro) foi retirado diretamente da placa de Petri, onde já se encontrava repicado em meio de cultura Sabouraud, e este contendo o inóculo foi transferido de forma asséptica para seis erlenmeyers de 500 mL. Em cada frasco de erlenmeyers foi adicionado, antecipadamente, 250 mL do meio de cultura Sabouraud (reduzido a fonte de carbono em 50%), previamente autoclavados a 121°C durante 15 minutos, clorafenicol (1,0 g/L). Em seguida, foram adicionadas os substratos: 50 µg se líquido e 50 mg se sólido nestes erlenmeyers, os quais ficaram sob agitação no shaker orbital (160 rpm, 28 °C), por um período de dez dias. Após este período, o material foi filtrado, obtendo-se o filtrado e o micélio. O filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila e ao micélio foi acrescentado metanol e, após cinco horas, foi filtrado e concentrado (DO NASCIMENTO, 2019; GIRI, 2001). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão

Os produtos obtidos nas biotransformações, a partir das chalconas como substratos, forneceram as respectivas diidrochalconas, quando utilizado o *Aspergillus flavus*. O fungo se desenvolveu bastante no meio de cultura quando foi utilizada 0,05 g das chalconas, promovendo a biorredução da dupla ligação nos carbonos C- α e C- β das chalconas **1** e **2**, o que foi confirmado pela análise dos espectros de RMN ^1H dos produtos **6** e **7** (Figura 1 e 2). A confirmação das reações de biorreduções de **1** e formação de **6** é a presença dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos H β em δ_{H} 3,10 (t, 2H, J 7,2 Hz) e H α em δ_{H} 3,30 (t, 2H, J 7,02 Hz), e no caso de **2** e formação de **7** são observados sinais referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos H- β em δ_{H} 3,01 (t, 2H, J 7,5 Hz) e aos hidrogênios α -carbonilados H- α em δ_{H} 3,31 (t, 2H, J 7,5 Hz).

Não foram observadas modificações nas ligações da carbonila do sistema cetônico α - β -insaturado, fato que pode ser explicado pela diferença de energia de ligação de C=C ($\Delta E_{\text{C=C}}$ 146,51-151,00 kcal/mol) e de C=O ($\Delta E_{\text{C=O}}$ 173,00-181,00 kcal/mol), sendo, portanto, mais favorável a ruptura da ligação C=C (LOWERING & LAIDER, 1990).

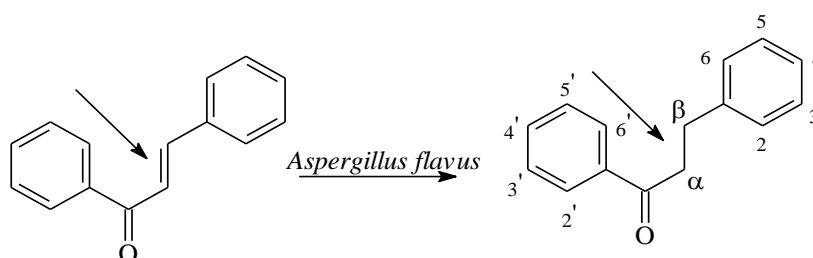


Figura 1- Reação de biorredução da chalcona **1** e formação da diidrochalcona **6**

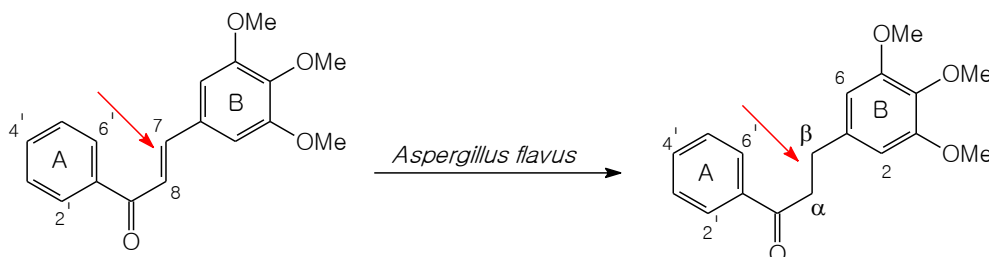


Figura 2- Reação de biorredução da chalcona **2** e formação da diidrochalcona **7**

O derivado α,β -insaturado **3** não sofreu biotransformação quando submetida às mesmas condições de **1** e **2**, fato que pode ser explicado pela regioselectividade das enzimas, em decorrência de sua estrutura tridimensional complexa, onde o substrato tem que se encaixar para que ocorra a formação do complexo enzima-substrato, com posterior liberação do produto.

O produto obtido na biotransformação a partir da acetofenona **4** forneceu o álcool: feniletan-1-ol **8**, confirmado pelo espectro de RMN ^1H obtido, que apresenta os sinais de hidrogênios em δ_{H} 4,93 (q, 1H), devido ao hidrogênio da cadeia lateral, e em δ_{H} 1,50 (d, 3H), em razão do grupo metila.

Na reação de biotransformação quando foi utilizada a 4-nitroacetofenona **5** não foi observada nenhuma modificação no espectro de RMN ¹H obtido, o que confirma os dados encontrados na literatura que mostram o baixo potencial de biorredução de fungos do gênero *Aspergillus* na redução de acetofenonas para-substituídas (KURBANOGLU et al., 2007).

Conclusões

A utilização do microorganismo *Aspergillus flavus* nas reações de biorreduções de chalconas evidenciou principalmente a redução da dupla ligação entre os carbonos C- α e C- β das chalconas originais, indicando um caminho seguro para a obtenção de dihidrochalconas, evitando a utilização de solventes nocivos à saúde e ao ambiente e também o uso de catalisadores, normalmente de valores econômicos elevados. Neste estudo, não foi observado a formação de produtos de oxidação Baeyer-Villiger ou de outros produtos de interesse.

Podemos concluir também que as reações foram quimiosseletivas, onde somente a dupla ligação C = C da porção enona das chalconas foram reduzidas.

Ademais, os resultados indicaram que à medida que as chalconas são substituídas por grupos metoxilas, o rendimento da biorredução decresce significativamente, o que pode ser explicado pela dificuldade da assimilação destas substâncias pelo fungo, provavelmente devido a baixa permeabilidade nas membranas celulares ou a efeitos tanto estéricos, quanto eletrônicos provocados por esses substituintes.

Referências bibliográficas

BORGES, Fábio. C. et al. Atividade alelopática de duas neolignanais isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 51-59, 2007.

CASTELLANI, A. Viability of mold culture off fungi in destiled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225, 1939.

CORRÊA, Marivaldo J. C. et al. Biotransformation of chalcones by the endophytic fungus *Aspergillus flavus* isolated from *Paspalum maritimum* Trin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1333, 2011.

DO NASCIMENTO, Janaira. S. et al. Mapping the biotransformation of coumarins through filamentous fungi. **Molecules**, v. 24, p. 3531, 2019.

EDWARDS, M. L.; STEMERICK, D. M.; SUNKARA, P. S. Chalcones: a new class of antimitotic agents. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 1948-1954, 1990.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª Ed. Florianópolis/ Porto Alegre. UFSC/UFRS, p. 199-525, 2001.

GIRI, A. et al. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 175-199, 2001.

IGLESIAS, M.; MARINAS, J. M.; SINISTERRA, J. V. Ba(OH)₂ as Catalyst in Organic Reactions, Part XVI- Contribution to the Study of the Michael Addition Mechanism to chalcone in interfacial solid- liquid conditions. **Tetrahedron**, v. 43, p. 2335-2342, 1987.

IRIE, K. and WATANABE, K. I. Aldol condensations with Metal (II) complex catalyst. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 53, p. 1366-1371, 1980.

KURBANOGLU, E.B.; . Enantioselective reduction of substituted acetophenones by *Aspergillus niger*. **Tetrahedron**, v. 18, p. 1159-1162, 2007.

LAKSHMI, K. U. and RAMAMURTHI K. Growth and Characterization of 2,3-dibenzylidene-cyclohexanone single crystal. **Crystal Research Technology**, v. 40, p. 1165-1168, 2005.

LOWERING, E. G.; LAIDLER, K. J.; Chemical Kinetics. **Chemical Journal**, v. 38, p. 2367, 1990.

PATEL, R. N. Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. In: **Advanced Applied Microbiology**, v. 43, p- 91-140, 1997.

TEH, J. B.; PATIL, P. S.; FUN, H. K.; RAZAK, I. A.; DHARMAPRAKASH, S. M. 1-Phenyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-prop-2-en-1-one, **Acta Crystallographica**, Section E, v. 62, p. 890-892, 2006.