

Biohidrogenação quimiosseletiva da chalcona (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona mediada por fermento de pão imobilizado em suportes poliméricos

Flávia L. S. Mundstock^{1*}, Vanessa D. Silva¹, Maria da G. Nascimento¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Química – UFSC, Campus Trindade, Florianópolis – SC 88040-900 *mundstock@qmc.ufsc.br

Neste trabalho, utilizou-se a levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, fermento de pão (FP), imobilizada em filmes de poli(óxido etileno) (PEO), poli(álcool vinílico) (PVA), caseinato de sódio (CS), gelatina (G), e em géis de agar (A) e gelatina (G), como biocatalisador para efetuar a biohidrogenação da (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (1). As reações de biohidrogenação de (1) em sua respectiva deidrochalcona (2) foram realizadas em *n*-hexano a 25 ou 35 °C, por 4-48h. A conversão em produto, em diferentes condições experimentais, foi avaliada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H). As maiores conversões foram obtidas ao utilizar o FP imobilizado em gel de agar, sendo de 29-47%, dependendo da temperatura. Usando o FP imobilizado em filmes de PEO, PVA, CS e G, as conversões ao produto (2) foram baixas, sendo de 0-21%. Estes resultados mostram que é possível imobilizar o FP em diferentes matérias poliméricas para a redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados.

Palavras-chave: biocatálise, biohidrogenação, fermento de pão, imobilização, filmes poliméricos e géis.

Chemoselective biohydrogenation of chalcone (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-phenyl-2-propen-1-one mediated by baker's yeasts immobilized in polymeric supports

In this study, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, baker's yeast, (BY) was immobilized in poly(ethylene oxide) (PEO), poly(vinyl alcohol) (PVA), sodium caseinate (SC), gelatin (G) films and in agar (A) and gelatin (G) gels, and used as a biocatalyst in the biohydrogenation reaction of (2E)-3-(1,3-benzodioxyl-5-yl)-1-phenyl-2-propen-1-one (1). The transformation of (1) into the corresponding dehydrochalcone (2) through biohydrogenation reactions was carried out in *n*-hexane at 25 or 35 °C, for 4-48h reaction. The product conversion, under different experimental conditions, was evaluated by hydrogen nuclear magnetic resonance, ¹H NMR. The highest conversion degrees were achieved using BY immobilized in agar gel, (29-47%), depending also on the temperature. Using BY immobilized in PEO, PVA, SC and G films, the conversion into (2) was lower (0-21%). The results show the feasibility of the use of BY immobilized in polymeric materials to reduce α,β -unsaturated carbonyl compounds.

Keywords: biocatalysis, biohydrogenation, baker's yeast, immobilization, polymeric films and gels.

Introdução

Com o intuito de se obter produtos com maior pureza e utilizando métodos ambientalmente corretos, a ciência tem realizado grandes avanços nas pesquisas de novos catalisadores para as mais diversas reações químicas. Dentre estes avanços, encontra-se a utilização de microorganismos e enzimas como catalisadores, os quais possuem um alto grau de especificidade em relação aos substratos, resultando assim em maior pureza do produto.^{1,2}

As enzimas são conhecidas industrialmente como biocatalisadores e, em geral, são proteínas formadas de longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas e que exercem funções vitais nos organismos vivos. Estes catalisadores diminuem a barreira energética existente entre reagentes e produtos sem sofrer alterações permanentes em sua estrutura.^{3,4,5}

Por muitos anos, os biocatalisadores foram pouco utilizados pelas indústrias químicas, devido às limitações deste método, como sua baixa tolerância a solventes orgânicos, temperaturas e pHs

extremos. No entanto, estas limitações estão sendo contornadas, e o interesse das indústrias e das áreas acadêmicas pelos biocatalisadores vem crescendo exponencialmente.^{1,6}

Uma maneira eficiente de proteger as enzimas e/ou microorganismos do meio orgânico é através da imobilização. O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.⁷ O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre.^{7,8}

Dentre os suportes já amplamente descritos na literatura estão os filmes e géis poliméricos, os quais, em geral, protegem as enzimas e/ou microorganismos, mantendo a atividade catalítica, proporcionando em vários casos a possibilidade de reutilização.^{9,10}

A levedura de *Saccharomyces cerevisiae* conhecida como fermento de pão (**FP**) foi utilizada neste trabalho, devido ao fato deste microorganismo produzir em seu interior enzimas com a capacidade de realizar diversos tipos de reações, como a redução, condensação, ciclização e oxidação, sendo que somente esta última não produz carbono aquiral.^{5,11}

As principais enzimas redutoras produzidas pelo microorganismo são, em geral, as da classe das *desidrogenases* – as que substituem o borodreto de sódio nas reações de redução a carbonila – e as *enona redutase*, as quais reduzem ligações duplas do tipo C=C, em carbonilas α,β -insaturadas. Nestas reações, elas requerem como cofator NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida) ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida), que tem um alto custo. Para contornar este problema, têm se utilizado microorganismos vivos e íntegros para catalisar as reações em química orgânica.^{4,5,12}

Neste trabalho realizou-se a biohidrogenação da chalcona (*2E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona, (**1**) mediada por fermento de pão comercial imobilizada em diferentes suportes poliméricos tais como, **PEO**, **PVA**, **CS**, **G** e **A**, visando averiguar o efeito da imobilização. Os resultados serão comparados com os resultados obtidos para **FP** em sistema bifásico (hexano/tampão fosfato de sódio pH 5,5 50:50% v/v), no qual apesar de não apresentar uma barreira física, é também considerado um método de proteção e/ou imobilização.

Experimental

A chalcona (**1**) foi sintetizada *via* reação de condensação aldólica do piperonal (15 mmol) com acetofenona (15 mmol) em meio básico, conforme procedimento descrito na literatura.^{13,14}

Imobilização do fermento de pão em filmes poliméricos

Para preparação dos filmes de **PEO**, **PVA**, **CS** e **G** utilizou-se o seguinte procedimento: adicionou-se 500 mg de **PEO** ou **PVA**, 2,5 g de **CS** ou 1,0 g de gelatina em béqueres de 50 mL e 20 mL de água destilada, sendo necessária agitação magnética constante até solubilização do material polimérico (~4-50 min). Para obter um filme mais homogêneo de **G** ou **PVA** foi necessário um leve aquecimento (~40 °C). Posteriormente, foram adicionados 4,0 g de **FP** a estas soluções poliméricas, a temperatura ambiente, seguido da homogeneização total dos sistemas.

Estas misturas foram colocadas em placa de Petri (~9 cm de diâmetro) e levadas à capela para evaporação do solvente. Após 24h em temperatura ambiente, obtiveram-se os filmes com o **FP** imobilizado, que foram retirados das placas e armazenados para uso posterior.

Imobilização do fermento de pão em géis de agar e gelatina

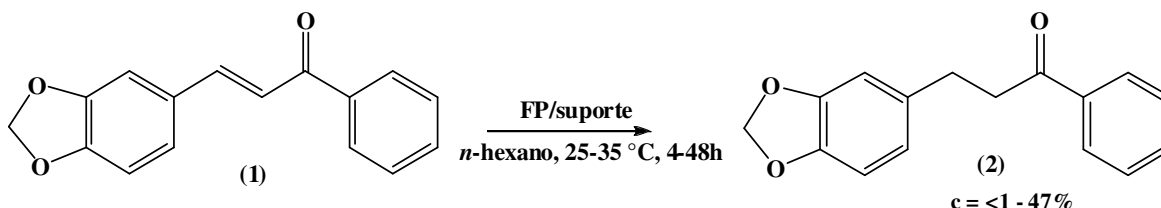
Para a preparação destes géis procedeu-se da seguinte forma: em béqueres de 50 mL foram adicionados 1,0 g de agar (**A**) ou 3,0 g de gelatina (**G**) em 20 mL de água destilada. Os sistemas foram aquecidos para solubilização dos polímeros e, após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 4,0 g de **FP** sob agitação constante até total homogeneização. Para formação dos géis, estes foram levados à geladeira por 2h horas e, posteriormente, passados em uma peneira com cerca de 1 mm², obtendo-se os cubos pequenos e regulares com o **FP** imobilizado. Estes foram usados como catalisadores nas reações de biohidrogenação de (**1**).

*Procedimento geral para a biohidrogenação de (**1**)*

Em um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 126,1 mg (0,5 mmol) de substrato em 30 mL de solvente orgânico, sob agitação em shaker orbital, nas temperaturas de 25 ou 35 °C e 4g de fermento de pão (Fleischmann®) imobilizado nos diferentes suportes. Foram retiradas alíquotas em 4 e 48 h de reação. A formação do produto de biohidrogenação foi verificada por ccd ($R_f(\mathbf{1}) = 0,41$ (hexano/acetato de etila 9:1) e $R_f(\mathbf{2}) = 0,21$). As conversões do substrato em produto foram quantificadas por técnica espectroscópica de RMN-¹H, pela comparação das áreas dos dois tripletos centrados em 3,00-3,50 ppm, característicos aos quatro hidrogênios α,β à carbonila saturados, com a área dos dois dubletos centrados em 7,20-7,80 ppm ($J = 15,6$ Hz) referentes aos dois hidrogênios ligados ao carbono α,β -insaturado.^{14,15}

Resultados e Discussão

A reação de biohidrogenação da chalcona (**1**) mediada por **FP** imobilizado em diferentes suportes poliméricos foi quimiosseletiva formando apenas a correspondente deidrochalcona 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-propenona (**2**). (Equação 1)



Primeiramente, os filmes e géis foram submetidos a testes de estabilidade em *n*-hexano nas temperaturas de 25 e 35 °C. Observou-se que, em geral, os filmes e géis permaneceram estáveis, sem alterações macroscópicas nestas condições, exceto o gel de gelatina que se dissolveu na temperatura de 35 °C, pois esta dissolve em água quente a ~ 40 °C.¹⁶

Após verificar a estabilidade destes filmes, realizou-se a reação de biohidrogenação da chalcona (**1**) mediada por **FP** imobilizado em diferentes suportes poliméricos em *n*-hexano. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Influência da imobilização do fermento de pão na biohidrogenação de (**1**).

Sistema Biocatalítico	Conversão (%)			
	1ª Utilização		2ª Utilização	1ª Utilização ^(a)
	4h	48h	48h	48h
FP/PEO/filme	<1	<1	-	-
FP/PVA/filme	<1	7	-	-
FP/CS/filme	<1	21	11	-
FP/G/filme	<1	17	9	-
FP/Agar/gel	29	47	8	42
FP/G/gel	<1	<1	-	36

[126,1 mg (0,5 mmol) do substrato; 30 mL de *n*-hexano.; 4 g de **FP** imobilizado; 35°C; agitação em shaker orbital]; (a) 25°C.

Observa-se na Tabela 1 que as conversões em (**2**) foram dependentes do suporte utilizado. As maiores conversões foram obtidas com os sistemas **FP/G/filme**, **FP/CS/filme** e **FP/A/gel**, sendo de 17, 21 e 47%, respectivamente, após 48 h de reação a 35 °C. É importante salientar que o sistema **FP/A/gel** é o que contém maior quantidade de água (~15 mL), pois toda água utilizada na

preparação do gel permanece no suporte. Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos da literatura que citam a importância do meio aquoso ou de quantidades mínimas de água para manutenção da atividade catalítica do **FP**, mesmo quando este está imobilizado.^{17,18}

Quando a reação foi realizada com o sistema **FP/G/gel** a 35 °C, a conversão em produto foi muito baixa (< 1%), devido ao fato do gel de gelatina ter dissolvido nesta temperatura, deixando o **FP** em contato direto com o solvente orgânico. Para contornar este problema, a reação foi repetida a 25 °C, usando também o sistema **FP/A/gel**. Observou-se que houve uma melhora na conversão em **(2)** nesta temperatura, sendo que a conversão aumentou de <1 para 36%. Com o sistema **FP/A/gel** a mudança da temperatura de reação não influenciou significativamente na conversão, sendo de 42%.

Para avaliar a manutenção da atividade catalítica do **FP** imobilizado nos diferentes suportes, fez-se a reutilização dos sistemas biocatalíticos **FP/CS/filme**, **FP/G/filme** e **FP/A/gel**. Após a primeira reutilização dos sistemas **FP/A/gel**, a conversão em **(2)** diminuiu consideravelmente, sendo de 47 para 8%. Observou-se que este decréscimo foi menor com os demais filmes. Devido aos baixos valores de conversão em produto, optou-se por não mais reutilizá-los.

Ao utilizar o fermento de pão em sistema bifásico (**SB**) formado de *n*-hexano/tampão fosfato de sódio pH 5,5, o produto **(2)** foi obtido com conversão >99% após 24h de reação. Este sistema não permite a reutilização do biocatalisador, o que pode ser considerado uma desvantagem. Porém, é o método de proteção mais eficiente para o biocatalisador por conter maior quantidade de água, sendo que esta é necessária para a manutenção da atividade catalítica do **FP**.^{17,18}

Conclusão

O fermento de pão foi imobilizado em diferentes matrizes poliméricas, sendo estas em filmes de **PEO**, **PVA**, **CS**, **G** e géis de **A** e **G**. Estes sistemas foram utilizados como catalisadores na reação de biohidrogenação de (2*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona, **(1)** em meio orgânico.

Nos estudos de bioconversão de **(1)**, com os sistemas **FP/A/gel** (35 °C e 25 °C), **FP/G/gel** (25 °C) e **FP/SB** obteve-se a deidrochalcona 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-propenona **(2)** em 47, 42, 36 e 99%, respectivamente. Este estudo mostrou a importância da imobilização do **FP** para reações de biohidrogenação, desde que os sistemas apresentem determinada quantidade de água para a manutenção da atividade catalítica do **FP**.

Agradecimentos

A UFSC pelo apoio técnico, e ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Borges, K. B.; Borges, W. S.; Patrón, R. D.; Pupo, M. T.; Bonato, P. S.; Collado, I. G., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20, 385-397.
2. Fonseca, A. M.; Monte, F. J. Q.; Oliveira, M. C. F.; Mattos, M. C.; Cordell, G. A.; Braz-Filho, R.; Lemos, T. L. G., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, 57, 78-82.
3. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3rd Ed., Worth Publishers: New York, 2000.
4. Campbell, M. K., “*Biochemistry*”, 2nd Ed., Saunders College Publication, 1995.
5. Faber, K.; *Biotransformation in Organic Chemistry.*, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
6. Kotwal, S. M.; Shankar, V., *Biotechnol. Adv.*, 2009, 311-322.
7. Matsuda, T; Marukado, R.; Mukoyama, M.; Harada, T.; Nakamura, K., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, 19, 2272-2275.
8. Huang, X. J.; Yu, A. G.; Jiang, J.; Pan, C.; Qian, J. W.; Xu, Z. K., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, 57, 250-256.
9. Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V., *Process. Biochem.*, 2005, 40, 2677-2682.
10. Achouri, I. M.; Guerfali, M; Gargouri, A.; Belghith, H., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, 57, 145-152.
11. Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20, 513-557.
12. Xiao, M. T.; Huang, Y. Y.; Ye, J.; Guo, Y. H., *Biochem. Eng. J.*, 2008, 39, 311-318.
13. Vogel, A. L.; *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed, John Wiley Sons: New York, 1989.
14. Alberton E.H.; Damazio, R. G.; Cazarolli, L. H.; Chiaradia, L. D.; Leal, P. C.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Silva, F. R. M. B., *Chem.-Biol. Interac.*, 2008, 171, (3), 355-362.
15. Williams, D.H.; Fleming, I.; *Spectroscopic methods in organic chemistry*; 4th Ed., McGraw Hill, 1987.
16. Clark, A. H.; Ross-Murohy, S. B.; *Adv. Polymer Sci.*, 83, 107-115, 1987.
17. Albuquerque, P. M.; Witt, M. A.; Stambuk, B. U.; Nascimento, M.G., *Process. Biochem.*, 2007, 42, 141-147.
18. Albuquerque, P. M.; Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2007.