

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Biorredução quimiosseletiva de 2'-hidroxichalconas pelo fungo de ambiente marinho *Penicillium raistrickii* CBMAI 931

Iara Lisboa de Matos, Marcia Nitschke, André Luiz Meleiro Porto

¹Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos
Caixa Postal 780 - 13560-970 São Carlos – SP – Email: lisboaiara@usp.br

RESUMO

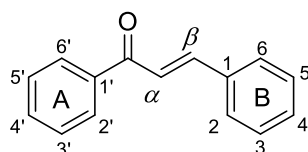
As 2'-hidroxichalconas **1a-3a** foram submetidas à biotransformação pelo fungo de ambiente marinho *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 visando a obtenção de diidrochalconas. As reações foram realizadas tanto no meio de cultivo do fungo quanto em tampão fosfato (pH 7,0 e 8,0). Os compostos **1a-3a** foram biotransformados em suas respectivas diidrochalconas **1b-3b** com bons percentuais de conversão após 14 d de reação.

Palavras-chave: Biorredução, Enerredutase, Chalconas.

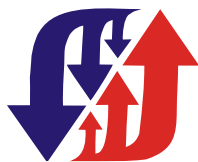
INTRODUÇÃO

Chalconas são definidas como cetonas α,β -insaturadas em que tanto o grupo carbonílico quanto o fragmento olefínico estão ligados a um anel aromático. Além de possuírem potenciais farmacológicos, esta classe de compostos são intermediários chave para a síntese de flavonoides (Figura 1) (CORRÊA et al., 2011). Chalconas podem sofrer reações de biotransformação para a obtenção de uma variedade de produtos, dentre os quais destacam-se os produtos de hidrogenação, hidroxilação, metilação e ciclização.

Figura 1. Estrutura fundamental das chalconas.



Microrganismos, como fungos e bactérias, são ricos em enzimas capazes de promover biotransformações químicas com controle regio-, quimio- e estereosseletivo. Estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa têm apresentado resultados promissores frente a biotransformação de cetonas α,β -insaturadas por fungos de ambiente marinho (Ferreira et al., 2014). Dessa forma, este trabalho teve por objetivo a obtenção de diidrochalconas **1b-3b** a partir da biotransformação de 2'-hidroxichalconas **1a-3a** empregando o fungo de ambiente marinho *Penicillium raistrickii* CBMAI 931.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese dos padrões sintéticos

As 2'-hidroxichalconas **1a-3a** foram sintetizadas adicionando-se 0,01 mol de 2-hidroxiacetofenona e 0,011 mol dos derivados do benzaldeído (benzaldeído, *p*-metoxibenzaldeído e *p*-fluorbenzaldeído) em um balão contendo 50 mL de etanol. Após 10 min de agitação foram adicionados 5,0 mL de NaOH 5M. A mistura reacional foi mantida em agitação e à temperatura ambiente por 12 h e finalizada com adição de 10 mL de HCl. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. Todos os compostos foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Espectrometria de Massas e Infravermelho. Dessa forma, foram sintetizados os compostos (*E*)-1-(2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**1a**), (*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (**2a**) e (*E*)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**3a**).

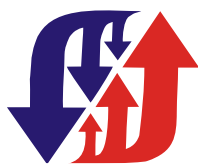
Cultivo dos microrganismos

Primeiramente, o fungo *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 foi cultivado em meio sólido (2% de malte, 2% de ágar, água do mar artificial e pH 7) por 7 d em estufa incubadora a 32 °C. Após o período de cultivo em meio sólido, os fungos foram cultivados em meio líquido (2% de malte em água do mar artificial, pH 7). Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo foram autoclavados à temperatura de 121 °C durante 20 minutos. Após resfriar o meio de cultura até alcançar a temperatura ambiente, com o auxílio de uma seringa com 0,1 mm de diâmetro, foram adicionados 10 discos do fungo previamente cultivado em meio sólido. Os frascos Erlenmeyer foram mantidos em agitação orbitalar por 7 d, 130 rpm e 32 °C.

Reações de biorredução das 2'-hidroxichalconas 1a-3a

As células do fungo *P. raistrickii* cultivadas em meio líquido foram filtradas a vácuo. Dessa forma, as reações de biorredução foram realizadas adicionando-se a frascos Erlenmeyer de 250 mL, 5 g das células úmidas, 100 mL diferentes meios reacionais (meio de cultivo de crescimento do fungo, tampão fosfato pH 7 e 8) e 50 mg das 2'-hidroxichalconas **1a-3a** dissolvidas em 300 μL de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbitalar por 7-14 d, 130 rpm e 32 °C.

Após este período, foram adicionados 100 mL de acetato de etila e a mistura foi mantida em agitação magnética por 30 min, visando a quebra das células e extração dos compostos. Em seguida, os micélios foram filtrados a vácuo, lavados com acetato de etila e extraídos com acetato de etila (3 x 30 mL). O resíduo orgânico foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado, evaporado por pressão reduzida e analisado por método cromatográfico (CG-EM).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

As chalconas são caracterizadas pela presença de um sistema contendo uma carbonila α,β -insaturada. Estes compostos possuem deficiência em elétrons nos $C\alpha$ e $C\beta$ da ligação dupla insaturada, causada pelo efeito eletrônico retirador de elétron do grupo $C=O$. Assim, a presença de grupos doadores e receptores de elétrons nos anéis aromáticos influenciam diretamente na reatividade do sistema α,β -insaturado da chalcona, o que pode afetar as reações biocatalíticas. Dessa forma, as chalconas **1a-3a** foram sintetizadas com diferentes substituintes no anel B (**1a**, *p*-H; **2a**, *p*-OCH₃; **3a**, *p*-F).

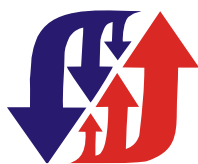
O fungo de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931 foi utilizado nas reações de biotransformação das 2'-hidroxichalconas **1a-3a** e apresentou-se como uma fonte de enredutases ao promover majoritariamente a biorredução quimiosseletiva do sistema α,β -insaturado dos substratos (Tabela 1).

Tabela 1. Biorredução de chalcona **1a-3a** por fungo de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931.

2'-hidroxichalconas 1a R = H 2a R = OCH ₃ 3a R = F	<i>Penicillium raistrickii</i> 7 d, 130 rpm, 32 °C	diidrochalconas 1b-3b	flavanonas 1c-3c						
Condições	Conversão Determinada por CG/EM (70 EV, %)								
	Hidrogenação			Ciclização			Substrato		
	1b	2b	3b	1c	2c	3c	1a	2a	3a
Meio de cultivo	64	50	63	5	3	6	31	47	31
T. Fosfato pH 7	72	44	30	18	9	18	10	47	52
T. Fosfato pH 8	48	38	30	43	12	23	9	50	47

As reações foram realizadas em três condições diferentes (solução tampão fosfato pH 7, pH8 e no meio de cultivo). Quando a reação foi realizada no tampão fosfato (pH 7 e 8) foi observado que o aumento na formação do produto de ciclização (Tabela 1). Portanto, em solução, as 2'-hidroxichalconas podem sofrer ciclização espontânea para produzir uma mistura racêmica de flavanonas, fato este que foi confirmado por meio de controles abióticos. Já quando a reação foi realizada no meio de cultivo dos fungos foram observados bons valores de conversão dos produtos de hidrogenação e baixa formação dos produtos de ciclização.

Nas reações realizadas no meio de cultivo dos fungos, a 2'-hidroxichalcona **1a** apresentou os maiores valores de conversão para o produto de dihidrogenação **1b**, seguida pelo substrato **3a** que foi biotransformado majoritariamente no produto **3b**. O substrato **2a** apresentou as menores conversões para o produto de dihidrogenação **2b**, quando comparados aos demais. Dessa forma, observa-se a influência dos substituintes no anel B. O grupo metoxila, doador de elétrons dificultou a adição do íon hidreto. Em contra partida, a presença do átomo de flúor favoreceu a adição do íon hidreto na obtenção do produto dihidrogenado **3b**.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Na Tabela 2 observa-se que, quando a reação realizada no meio de cultivo do fungo foi mantida por 14 d, houve o aumento na formação dos produtos de dihidrogenação **1b-3b**. Logo, este fungo mostrou-se eficaz ao promover a biotransformação de derivados de 2'-hidroxichalconas **1a-3a** em suas correspondentes dihidrochalconas **1b-3b**.

Tabela 2. Biorredução de chalcona **1a-3a** por *P. raistrickii* CBMAI 931 (meio de cultivo, 14 d, 130 rpm, 32 °C).

CONDIÇÕES	CONVERSÃO DETERMINADA POR CG/EM (70 EV, %)								
	Hidrogenação			Ciclização			Substrato		
	1b	2b	3b	1c	2c	3c	1a	2a	3a
TOTAL 14D	83	53	73	4	6	12	13	41	15

CONCLUSÕES

Diante dos resultados pode-se concluir que a presença de enzimas enredutases no fungo de ambiente marinho *P. raistrickii* CBMAI 931 permitiu a biorredução quimiosseletiva e regioseletiva da ligação C=C das 2'-hidroxichalconas com boas conversões. Sendo assim, este fungo pode ser aplicado para a biorredução de uma série de 2'-hidroxichalconas com diferentes substituintes, visto que cada substituinte pode influenciar de maneira diferente na reatividade do substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Corrêa MJC, Nunes FM, Bitencourt HR, Borges FC, Guilhon GMSP, Arruda MSP, Marinho AMR, Santos AS, Alves CN, Brasil DSB, Santos LS.2011. Biotransformation of chalcones by the endophytic fungus *Aspergillus flavus* isolated from *Paspalum maritimum*. Trin. J Braz Chem Soc 22:1333-1338.

Ferreira IM, Rocha LC, Yoshioka SA, Nitschke M, Jeller AH, Pizzuti L, Porto ALM.2014. Chemoselective reduction of chalcones by whole hyphae of marine fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, free and immobilized on biopolymers. Biocatal Agric Biotechnol 3:358-364.