



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Estudo da atividade ω -transaminase do fungo endofítico associado à *Humiria balsamifera* em reação enantioselectiva da 1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina

Larissa Zambe Pinheiro¹, Maria Sandra Ramos Queiroz¹, Bruno Marco Alves da Silva¹,
Geciane Tonniazo², Denise Oliveira Guimarães³,
Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza⁴ e Ivana Correa Ramos Leal¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Laboratório de Produtos Naturais e Ensaios Biológicos (LaProNEB) - Caixa Postal 21941-902- Rio de Janeiro – RJ - E-mail: larissazambe@gmail.com

²Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI- Erechim

³Universidade Federal do Rio de Janeiro (Macaé) – Laboratório de Produtos Naturais, Pólo Novo Cavaleiro

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química, Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica

RESUMO

Os fungos endofíticos são micro-organismos que mantêm uma associação mútua com a planta hospedeira, e devido a essa interação podem desenvolver um aparato quimioenzimático bem diferenciado. Nesse trabalho foi investigada a atividade de ω -transaminases expressas pelo fungo endofítico HB4a, frente a amina racêmica 1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina. Foi realizada uma análise em Cromatógrafo em fase gasosa, com coluna de 5% fenilmetil-policiloxino. Com as células liofilizadas do micro-organismo foi observada uma bioconversão de 25 % à 1-tetralona. Com a utilização das células íntegras foi observado 45% de conversão. Para obter o excesso enantiomérico, foi realizada uma análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com fase móvel de n-hexano e isopropanol (95:5) (v/v) e com fase estacionária em coluna quiral OD-H. Os resultados mostraram um excesso enantiomérico de 70% para o enantiômero R, em 48 horas de incubação. Os resultados evidenciam a presença de ω -transaminases (S)-seletivas no fungo endofítico estudado.

Palavras-chave: aminotetralina, reações de ω -transaminação, tetralona, fungo endofítico, resolução cinética.

INTRODUÇÃO

As restingas recobrem aproximadamente 79% da costa brasileira (CARVALHO et al, 2001). O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro, ocupa a costa entre Quissamã, Carapebus e Macaé (ARAUJO et al, 1998).

A espécie vegetal *Humiria balsamifera*, nativa do sudeste do Brasil, pertence à família Humiriaceae, e é conhecida popularmente como bálsamo de humiri.

A utilização de MO no desenvolvimento de novos produtos e processos biotecnológicos vem se destacando recentemente. Uma aplicação biotecnológica de relevante importância para a indústria farmacêutica é a utilização de MO em reações de ω -transaminação, utilizando substratos quirais, a fim de se obter blocos de aminas enantiomericamente puras, utilizadas na síntese de fármacos. Esses blocos de aminas são importantes na construção de uma gama de produtos farmacêuticos, como exemplo a 1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina, que é empregada na síntese da norsertalina.

Esses MO combinam a riqueza bioquímica da planta com a sua capacidade fermentativa, o que torna mais simples o processo de obtenção de compostos de interesse biotecnológico por uma fonte quimioenzimática. Nesse contexto, os doze Princípios da



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Química Verde são observados, uma vez que o processo se baseia no desenvolvimento da química sustentável.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal (*Humiria balsamifera*) foi coletado pela Profa. Dr^a. Tatiana Konno-NUPEM- UFRJ/Macaé, no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba em 2011, no Município de Quissamã. A exsicata foi depositada no herbário da UFRJ-RJ sob o número de registro RFA38751. Os fungos endofíticos associados à espécie vegetal foram isolados a partir das folhas, por colaboradores do grupo, sendo o fungo codificado como HB4a o escolhido para os estudos no presente trabalho.

O fungo endofítico HB4a foi crescido em placa de Petri contendo Agar batata dextrose (BDA) por 7 dias, à temperatura de 30 °C. Em seguida, 6 fragmentos dos micélios crescidos (0,5 cm de diâmetro) foram adicionados em Erlenmeyers contendo 12 mL de meio pré-fermentativo e 0,5mM de piridoxina. A pré-cultura foi incubada sob agitação de 120 rpm, 30 °C, por 5 dias. A massa micelial obtida foi totalmente inoculada com 20 mL de meio fermentativo Czapek modificado (HILÁRIO et al, 2012) e com 50mM da amina comercial *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina. A mistura reacional foi agitada em incubadora refrigerada tipo Shaker a 30 °C e 120 rpm por 120 h (CLAY et al, 2010; JIANG et al, 2014). Para os controles com as enzimas utilizou-se um equivalente de piruvato como aceptor do grupo amino, o piridoxal-5'-fosfato (0,2 mM) e o ácido pirúvico (50 mM) (CLAY et al, 2010; JIANG et al, 2014).

As amostras obtidas foram particionadas com acetato de etila e posteriormente analisadas por Cromatógrafo em fase Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM) a fim de se identificar a possível conversão à cetona pró-quiral correspondente.

Para análise do excesso enantiomérico da amina formada, as amostras reacionais que apresentaram conversões promissoras para o produto de interesse foram analisadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O comprimento de onda foi monitorado à 265nm para a 1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina. Como fase estacionária utilizou-se a coluna quiral OD-H. A fase móvel foi constituída por n-hexano/isopropanol (95:5) em eluição isocrática. O excesso enantiomérico foi calculado de acordo com a fórmula a seguir (Figura 1) (BORGES et al, 2011).

$$\text{excesso enantiomérico \%} = \left[\frac{A - B}{A + B} \right] \times 100$$

Figura 1: Fórmula para cálculo do excesso enantiomérico. Sendo: A, maior valor em área relativa de pico referente a um dos enantiômeros; B, menor valor em área relativa.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

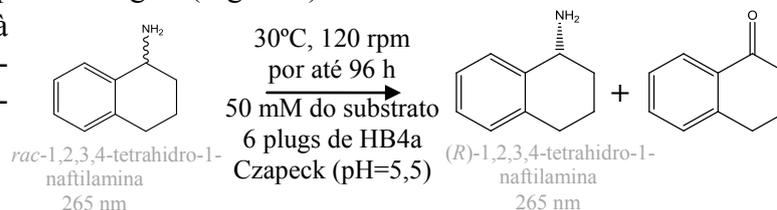
Com o isolamento dos fungos endofíticos a partir da espécie vegetal *H. Balsamifera*, a cepa HB4a isolada das folhas de *H. balsamifera* (Figura 2) foi alvo do presente estudo.

Figura 2: Foto do fungo endofítico isolado da espécie vegetal *Humiria balsamifera*, por Larissa Zambe Pinheiro, em Junho de 2015.



A análise do percentual de conversão à tetralona foi realizado de acordo com a metodologia do esquema a seguir (Figura 3).

Figura 3: Esquema referentes à reação para formação da 1-tetralona a partir da *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina.





XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Na análise por CG-MS, figura 4, é possível observar o perfil cromatográfico dos padrões utilizados, a saber: *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina ($T_r = 13,7$ min) e 1-tetralona ($T_r = 13,9$ min), sendo possível observar em todos os cromatogramas a ausência de picos relevantes referentes a subprodutos ou contaminantes.



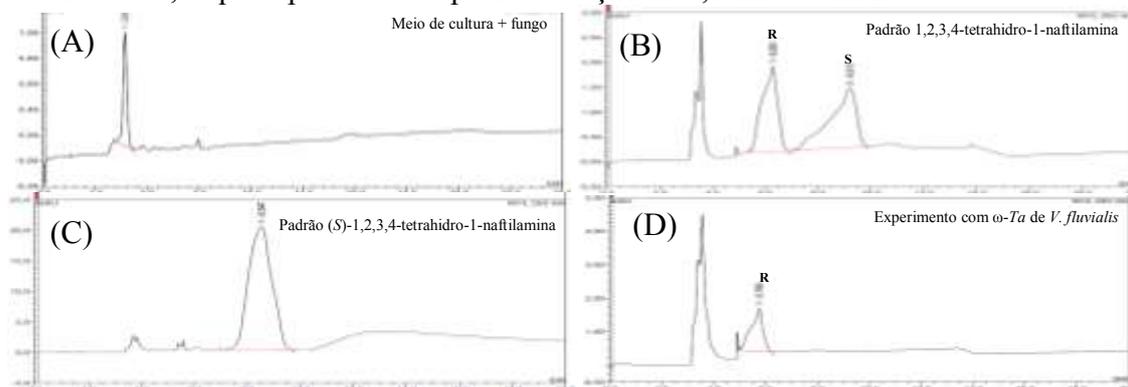
Figura 4: Cromatogramas das análises por CG-EM referentes à reações após 48 horas de incubação. (A) Controle apenas com a *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina; (B) Experimento com células íntegras de HB4a com a piridoxina no meio pré-fermentativo; (C) Experimento com a enzima (*S*)-seletiva de *V. fluvialis*.

Com base na figura 4, e nos valores obtidos das áreas dos picos analisados, podemos observar que o fungo HB4a apresentou um potencial relevante para produção da 1-tetralona, em 48 h de incubação, uma vez que foi possível observar que o MO apresentou um percentual de conversão na presença do substrato *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina de 45%.

É importante salientar que nesse trabalho foi utilizado células íntegras, sendo observado a bioconversão à 1-tetralona de 45% para reação catalisada com HB4a, sendo esse resultado promissor quando comparado aos estudos de Jiang e colaboradores (2014), onde a enzima isolada apresentou conversão de 51% à 1-tetralona. Vale ressaltar que 51% é o valor teórico máximo a ser obtido, considerando que a enzima é (*R*) ou (*S*)-seletiva e, apenas um dos enantiômeros é bioconvertido ao produto, cetona pró-quiral, sendo liberado no meio a amina remanescente. Dessa forma, é possível afirmar que 45% de conversão, encontrado nesse estudo, representa um excelente resultado.

Após a obtenção do percentual de conversão, as amostras foram analisadas em CLAE para identificação do excesso enantiomérico formado. Desse modo, foram analisados todos os padrões comerciais, a fim de se verificar a eficiência da separação do método estabelecido para as análises dos experimentos. Em seguida, as amostras referentes aos experimentos.

Na análise por CLAE, figura 6, é possível observar o perfil cromatográfico dos padrões utilizados, a saber: *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina ($T_r = 6,2$ e $9,2$ min) e (*S*)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina ($T_r = 9,5$ min), sendo possível observar em todos os cromatogramas o pico do solvente, o qual apresenta tempo de retenção de 4,5 a 5 minutos.





XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

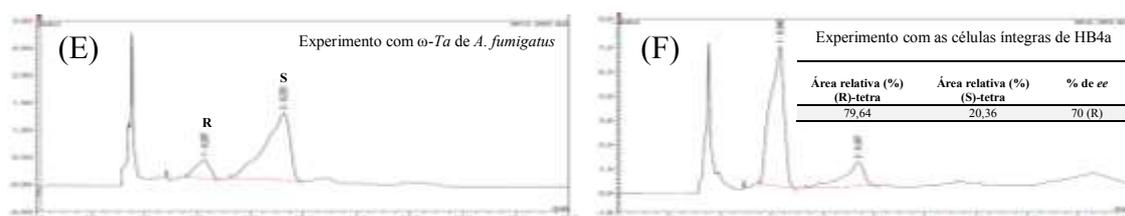


Figura 5: Cromatogramas obtidos por CLAE à 265 nm.

No experimento com as células íntegras de HB4a é possível observar que na presença da *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina houve a diminuição do pico relativo a (*S*)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina. Com isso, sugerimos a biotransformação do racemato em um enantiômero (*R*), com excesso enantiomérico de 70%, e, portanto, fica evidente a presença de transaminases (*S*)-seletivas. Estes resultados são interessantes considerando o uso de células íntegras. No estudo realizado por Kroutil e colaboradores (2010), observou-se um valor de 99% de *ee* após testes como um total de 35 MO liofilizados, entre bactérias e actinobactérias.

CONCLUSÕES

O estudo com a *rac*-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina em processos de biotransformação por fungos endofíticos é bastante escasso, sendo este trabalho o primeiro na literatura trazendo esta informação. Sabe-se que tais blocos aminados estão presentes em uma variedade significativa de medicamentos atuantes no SNC, como a sertralina. Dessa forma, o excesso enantiomérico de 70% alcançado nos experimentos é bastante interessante por se tratar de ensaios com as células íntegras. No entanto, é interessante complementar os estudos através de uma etapa de otimização do processo considerando estudos com os materiais liofilizados e com novas faixas de temperatura, pH e solventes orgânicos, os quais ainda não foram trabalhados. Para a otimização, serão utilizadas faixas de pH de 6,5 a 8, com temperaturas de 25°C à 33°C e os solventes orgânicos utilizados serão o *tert*-butil metileter e o tolueno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo, D.S.D. Restingas fluminenses: biodiversidade e preservação, 1998. Boletim FBCN, n.25, p. 27-51.
- Borges, W. S.; bonato, P. S.; pupo, M. T. Enantioselective biotransformation of propranolol to the active metabolite 4-hydroxypropranolol by endophytic fungi, 2011. Quim. Nova, n. 8, p. 1137-1163.
- Carvalhcarvao, L. C.; Freitas, A. F. N.; Rocha, C. F. D.; Sluys, M. Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de resting no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ, 2001. Revista Brasileira de Botânica. Não paginado.
- Clay, D.; Koszelewskira, D.; Grischek, B.; Gross J.; Lavandera, I; Costa, A.F.; Dias, I.C.A. (ORGS.) Flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e arredores, Rio de Janeiro, Brasil: listagem, florística e fitogeografia, 2001. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Não paginado.
- Hilario, V. C. ; Carrao, D. B. ; Barth, T. ; Borges, K. B. ; Furtado, N. A. J. Jansonius, J. N. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. Biology, 1998. N. 8, p. 759-769.
- Jiang, J.; Chen, X.; Feng, J.; Wu, Q.; Zhu, D. Substrate profile of an ω -transaminase from *Burkholderia vietnamiensis* and its potential for the production of optically pure amines and unnatural amino acids, 2012. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, n. 100, p. 32-39, 2015. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, n. 61, p. 100-107.
- Kroutil, W. Testing of microorganisms for ω -transaminases activity, 2010. Tethedron Asymmetry, n.19, p. 500-503.
- Queiroz, Maria Sandra Ramos, 2015. Fungos endofíticos da espécie vegetal *Humiria balsamifera* da Restinga de Jurubatiba em estudos de biotransformação enantiosseletiva da *rac*-1-feniletilamina e de atividade antimicobacteriana. Dissertação da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.