

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Fungos endofíticos de *Tapirira guianensis* Aublet. com potencial para biotransformação da *rac*-metilbenzilamina

Bruno Marco Alves da Silva¹, Larissa Zambe Pinheiro¹, Maria Sandra Ramos Queiroz¹,
Geciane Tonniazo², Denise Oliveira Guimarães³ 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: bmarco.alves@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

RESUMO

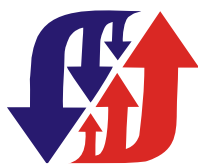
Os microrganismos endofíticos, alvo desse trabalho, foram isolados da espécie vegetal Tapirira guianensis Aublet. e foram nomeados como TG1, TG9, TG24. Com o objetivo de avaliarmos a resolução cinética promovida pela biotransformação a partir das células íntegras dos fungos endofíticos, foi realizada a análise por Espectrofotometria, à 245 nm, para a detecção da acetofenona formada durante a reação de transaminação do substrato rac-metilbenzilamina. O microrganismo TG1 apresentou os maiores valores de bioconversão, segundo o método de leitura por espectrofotometria, após 72 horas de incubação no meio reacional, atingindo uma concentração em micromolar de aproximadamente 0,35 ($\pm 0,001$). Enquanto os microrganismos TG9 e TG24 apresentaram uma concentração em micromolar de aproximadamente 0,1 e 0,36, em 96 e 120 horas respectivamente. Os resultados evidenciam a presença de ω -transaminases expressas pelos fungos endofíticos estudados.

Palavras-chave: fungos endofíticos; ω -transaminase; acetofenona; biotransformação; metilbenzilamina.

INTRODUÇÃO

O termo endofítico refere-se aos fungos que colonizam os tecidos internos das plantas em uma relação mutualista e sem causar dano aparente. Por outro lado, os fitopatogênicos são responsáveis por causar distúrbios no metabolismo celular da planta (SCHULTZ; BOYLE, 2005). Esses fungos estabelecem uma relação de equilíbrio com seu hospedeiro, entre seus mecanismos de virulência e os mecanismos de defesa da planta, apresentando também um aparato quimio-enzimático diferenciado.

O emprego de micro-organismos na síntese de blocos de aminas já é descrito na literatura, em estudos realizados por Vasconcelos e colaboradores (2014), a produção do



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

quimioterápico Taxol foi realizada pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da espécie *Taxus brevifolia*.

Nesse mesmo contexto, blocos de amina são também amplamente usadas para síntese de compostos bioativos e medicamentos (KOSZELEWSKI et al., 2010). Como por exemplo, o (R)-4-fenilbutan-2-amina é um precursor do anti-hipertensivo dilevalol (CLIFTON, 1982); a (S)-1-fenil-1-propilamina é precursor de um potente agente antidepressivo (CORBETT, 2007); e a (S)-2-amino-1-metóxiopropano é usado na produção de herbicidas metolacoloro (S-Dimetenamida-P) (KOSZELEWSKI et al., 2010). A (S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina (amina comercial), utilizada nesse trabalho, é empregada na síntese da norsertalina. A norsertalina é estruturalmente semelhante à sertralina, e está atualmente em ensaios clínicos na Sepracor, com estudos para o tratamento da depressão, como um seletivo inibidor da recaptação da serotonina (ISRS) (THALEN et al, 2009).

Nesse contexto estão as ω -transaminases, que são enzimas que podem ser expressas por micro-organismos, como os fungos endofíticos, que por apresentarem um aparato quimioenzimático diferenciado são capazes de expressar um vasto número de enzimas, como as transaminases e lipases.

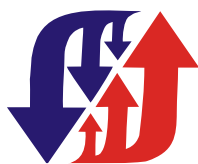
MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal 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 excisata foi depositada no herbário da UFRJ-RJ sob o número de registro RFA 38757. Os fungos endofíticos associados à espécie vegetal foram isolados a partir das folhas, por colaboradores do grupo, sendo os fungos codificados como TG1, TG9 e T24 os escolhidos para os estudos no presente trabalho.

O fungo endofítico foram crescidos 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 6 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 10 mL de meio fermentativo Czapek modificado (HILÁRIO et al, 2012) e com 50mM da amina comercial *rac*-metilbenzilamina. 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 amina, o piridoxal-5'-fosfato (0,2 mM) e o ácido pirúvico (50 mM) (CLAY et al, 2010; JIANG et al, 2014).

Alíquotas de 500 μ L foram coletadas de 24h em 24h, ao longo dos 5 dias, e analisadas por espectrofotometria à 245 nm, em uma placa de 96 poços, para identificação da acetofenona.

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.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o isolamento dos fungos endofíticos a partir da espécie vegetal *Tapirira guianenses Aublet*, as cepas TG1, TG9 e TG24 (Figura 1), isoladas das folhas da espécie vegetal, foram alvo do presente estudo.



Figura 1: Foto dos fungos endofíticos TG1, TG9 e TG24 isolados da espécie vegetal *Tapirira guianenses Aublet*, por Bruno Marco, em janeiro de 2016.

No trabalho de Queiroz (2015) a reação de transaminação do substrato *rac*-metilbenzilamina foi monitorada através da detecção da acetofenona formada no meio reacional, uma vez que apresenta absorção a um comprimento de onda de 245 nm. Essa absorção está relacionada com o grupo carbonila presente na molécula da acetofenona, o qual está conjugado com o sistema aromático.

Com base na curva de calibração obtida da acetofenona ($r^2=0,9702$) (Figura 2), foi avaliado o percentual de conversão à acetofenona.

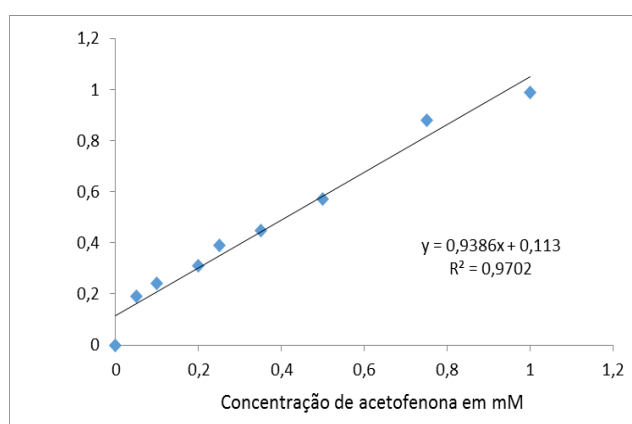
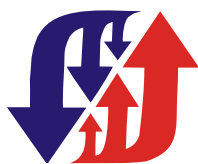


Figura 2: Gráfico da curva de calibração da acetofenona.

Conforme pode ser observado na figura 3, os fungos endofíticos obtiveram maior taxa de conversão após 72h de incubação, apresentando uma concentração de aproximadamente 0,4 mM. Enquanto o controle positivo com a transaminase (*S*)-seletiva de *V. fluvialis* atingiu uma concentração em micromolar de 0,10 ($\pm 0,010$) em 48 horas de incubação.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

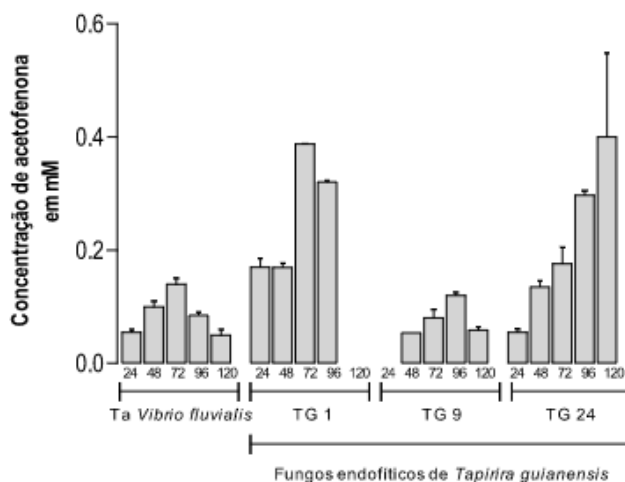


Figura 3: Gráfico referente a variação na concentração de acetofenona por tempo de cultivo dos fungos endofíticos TG1, TG9 e TG24. A média dos experimentos representam os resultados realizados em triplicata.

É importante ressaltar que esse resultado considera a metodologia com células íntegras, que por sua vez apresentam características irregulares e com alterações metabólicas que podem ocasionar mudanças quanto à enzima liberada ao longo de um determinado tempo pelo complexo enzimático do microrganismo (VALADARES, 2013; LOPES et al, 2014).

CONCLUSÕES

No trabalho de Queiroz (2015) esse perfil de atividade também foi observado para fungos endofíticos, em especial para o *Stemphylium lycopersici*, isolado das folhas da espécie vegetal *Humiria balsamifera*, que manteve a concentração em mM de acetofenona em torno de 0,125 mM ($\pm 0,012$), em 48 horas de incubação.

Nesse contexto, os fungos TG1, TG9 e TG24 apresentaram resultados de grande relevância, considerando o uso do fungo íntegro como biocatalisador, e não a enzima isolada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schultz, B.; Boyle, C.; Mycol. Res. 2005, 109, 661.
- Koszelewski, D., Tauber, K., Faber, K., & Kroutil, W. (2010). ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. Trends in biotechnology, 28(6), 324-332.
- Corbett, J.W. et al. (2007) Heteroatom-linked indanylpyrazines are corticotropin releasing factor type-1 receptor antagonists. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 6250-6256.
- Thalén, L. K., Zhao, D., Sortais, J. B., Paetzold, J., Hoben, C., & Bäckvall, J. E. (2009). A chemoenzymatic approach to enantiomerically pure amines using dynamic kinetic resolution: application to the synthesis of norserttraline. Chemistry—A European Journal, 15(14), 3403-3410.
- Queiroz, M. S. R. de; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2015.