

## Emprego da levedura *Pichia membranifaciens* CE015 imobilizada em suporte de alginato de cálcio para redução da acetofenona

Araujo, D.M.F. (EMBRAPA AMAPÁ) ; Vasconcelos, S.J.T. (IFCE - CAMPUS CRATEUS) ; Silva, M.R. (UFC) ; Fonseca, T.S. (UFC) ; Mattos, M.C. (UFC) ; Oliveira, M.C.F. (UFC) ; Lemos, T.L.G. (UFC) ; Melo, V.M.M. (UFC)

### RESUMO

Neste trabalho apresentamos o emprego da levedura *Pichia membranifaciens* CE015 imobilizada em suporte de alginato de cálcio como agente para biorredução. Esta se revelou, a partir de uma triagem, como um potencial agente biocatalítico, uma vez que foram obtidos 76% de conversão da acetofenona ao 1-feniletanol com 98% de ee (S). Em seguida, investigou-se o efeito do emprego das células íntegras imobilizadas em suporte de alginato de cálcio como agentes de biorredução. Em um primeiro ensaio estudou-se a cinética de redução da acetofenona nos tempos de 3 até 96 horas, obtendo-se uma conversão máxima de 87% ao respectivo álcool com 95% de ee. Em seguida, foi estudada a reutilização das esferas em mais 2 ciclos, porém, houve um decréscimo para 67% de conversão mantendo-se constante ee de 95%.

### PALAVRAS CHAVES

*Biocatálise; células imobilizadas; Pichia membranifaciens*

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um aumento na produção de compostos quirais como um único enantiômero. A razão mais importante para este fato é a diferença na atividade biológica conferida por cada enantiômero em particular. Em inúmeros casos, um dos enantiômeros produz um efeito indesejável. Dentre os métodos para produção de compostos quirais, a biocatálise vêm ganhando cada vez mais espaço. O emprego de enzimas para sínteses enantiosseletivas confere um meio ecologicamente por serem biodegradáveis e em certos casos reutilizáveis. Dessa forma, as enzimas são úteis na preparação de diversos produtos químicos quirais de interesse químico, farmacológico e outras áreas afins[1,2]. As oxidoredutases são enzimas dependentes de cofactor e são úteis na redução de compostos carbonílicos para produção de álcoois quirais. Estes álcoois podem ser usados como “blocos de construção” na preparação de moléculas quirais mais complexas[3]. No campo da biocatálise, diversos relatos exploram o emprego de células íntegras como fontes de oxidoredutases como por exemplo, *Daucus carota* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*[4,5]. A imobilização de células ou enzimas é um excelente meio para reutilização destes agentes para produção de compostos quirais. Usar biocatalisadores imobilizados oferece diversas vantagens quando comparado ao tradicional emprego das células íntegras: (i) fácil remoção do biocatalisador; (ii) pode ser reutilizado reduzindo custos no processo; (iii) redução da toxicidade do substrato em função da proteção do suporte; (iv) possibilidade de ser empregado fluxo contínuo, reduzindo assim os custos e tempo operacional. A metodologia mais comum de imobilização é o encapsulamento de células empregando hidrogéis iônicos como o alginato de sódio[6,7].

### MATERIAL E MÉTODOS

A levedura *Pichia membranifaciens*, inicialmente a -70°C foi submetida à ativação inoculando-a em 100 mL de meio de cultura batata/dextrose pH 6,5 para crescimento por 24 horas. Em um novo meio de cultura, 1 mL da suspensão anterior foi transferida para desenvolvimento da biomassa por 72 horas. As células foram, então, centrifugadas e lavadas com água destilada para posterior imobilização. Dois gramas da biomassa obtida foram transferidos a 20 mL de uma solução 1% de alginato de sódio. A mistura resultante foi mantida sob agitação por 3 horas e, em seguida, gotejada em uma solução 5% de cloreto de cálcio para desenvolvimento das esferas imobilizadas. A biomassa imobilizada foi mantida a 4°C em solução 5% de cloreto de cálcio, 0,09% de cloreto de sódio e enriquecida com 10% de dextrose para posterior uso. Para a reação de biotransformação, as esferas

de alginato de cálcio foram transferidas para um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH 7,2) e 5 g de dextrose. Em seguida, foi adicionado à mistura resultante, 20 microlitros da acetofenona como substrato para a reação a 170 rpm e 28°C. Ao final da reação, as esferas foram separadas do meio reacional e o extrato bruto foi submetido à extração do produto com acetato de etila (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio. A conversão foi calculada por Cromatografia Gasosa (CG) e o excesso enantiomérico (ee) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Condições: (CG) Injetor e detector a 250°C, coluna OV-5; rampa de temperatura: início 100°C, aumentando 3°C por minuto até 130 °C, tempo de retenção do álcool 3,9 min e cetona 4.2 min. (CLAE) Hexano/isopropanol 95/5, 0.5 mL/min, coluna OD-H, tempo de retenção da cetona: 6,6 min, álcool (R) 9,3 min e (S) 11,6 min.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, selecionou-se a levedura *Pichia membranifaciens* a partir de uma triagem envolvendo sete leveduras. Após análise por CG e CLAE, foi observada uma conversão de 76% da acetofenona ao 1-feniletanol com 98% de excesso enantiomérico (S) em um tempo de 8 dias de reação, após o estudo da cinética da reação nos tempos de 2, 5, 8, 10, 12 e 14 dias. Este resultado manteve-se constante após o oitavo dia de reação. Com o objetivo de maximizar este resultado, resolveu-se empregar a biomassa da levedura imobilizada em suporte de alginato de cálcio. Este suporte confere integridade às células e reduz a toxicidade de substratos exógenos. Similarmente àquele procedimento realizado com células íntegras, estudou-se a conversão e enantiosseletividade da reação em função do tempo. Foram testados tempos de 3, 24, 44, 52, 68, 74, 96 e 120 horas. Inicialmente, a reação exibiu conversão mínima (1%), além da baixa enantiosseletividade (61%). À medida que a reação alcança maiores tempos reacionais, melhores resultados são observados. Com 96 horas foi observado 87% de conversão e 95% de ee (S), cujos valores de mantiveram constantes após 120 horas de reação. Este resultado, quando comparado ao emprego das células íntegras revelou-se como uma melhora de 76 para 87% de conversão, além do decréscimo do tempo reacional de 8 dias para 4 dias (96 h). Em seguida, estudou-se o efeito da atividade enzimática em função do reuso das esferas por novos ciclos, renovando apenas o meio reacional (tampão + dextrose). A reciclagem das esferas imobilizadas mostrou que a conversão decresce em função do número de ciclos de reação. No 1º ciclo de uso, obteve-se uma conversão de 87% ao passo que no 2º e 3º ciclo, o valor de conversão foi de 74 e 67%, respectivamente, mantendo-se constante ee em 95% de S.

## CONCLUSÕES

A levedura *Pichia membranifaciens* CE015 mostrou-se como um potencial agente biocatalítico. Ao substituir o emprego das células íntegras em crescimento por células imobilizadas da levedura a conversão da reação foi melhorada de 76 para 87% mantendo-se praticamente constante a enantiosseletividade da reação (95 a 98%) em favor do enantiômero S. Com relação ao reuso das esferas de alginato de cálcio a atividade enzimática foi reduzida em função do número de ciclos de reutilização. Ao 3º ciclo a conversão de 87% decresceu para 74% mantendo-se constante o excesso enantiomérico do produto em 95%.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências financiadoras: CNPq, CAPES e Funcap. Araujo, D.M.F. agradece pela bolsa PNPd-CAPES.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- [1] V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 40 (2006) 111-120.
- [2] D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* 25 (2006) 66-73.
- [3] R. N. Patel, *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008) 659-701.
- [4] L. C. Fardelone, J. Augusto, R. Rodrigues, P. J. S. Moran, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 29 (2004) 41-45.
- [5] J. V. Comasseto, A. T. Omori, A. L. M. Porto, L. H. Andrade, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 473-476.
- [6] A. Milovanovic, N. Bozic, Z. Vujcic, *Food Chem.* 104 (2007) 81-86

[7] W. Wang, M. Zong, W. Lou, J. Mol. Catal. B Enzym 56 (2009) 70-76