

Redução de chalconas utilizando cultura de células de *Cereus peruvianus*

Renata Costa Sinzker^{1,2}, Arthur Antunes Ferrarezi¹, Débora Jacomini¹, Claudete Aparecida Mangolin³, Arildo José Braz de Oliveira¹ e Regina Aparecida Correia Gonçalves¹

¹Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Farmácia – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - CEP 87020-900 Maringá – Paraná - E-mail: resinzker@yahoo.com.br

²Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Bioquímica
CEP 87020-900 Maringá – Paraná

³Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Biologia Celular e Genética
CEP 87020-900 Maringá - Paraná

RESUMO

Cereus peruvianus é um cacto conhecido como "mandacaru" e que produz vários compostos de interesse econômico, farmacológico e industrial. Os tecidos de calos foram mantidos em meio sólido até serem transferidos para frascos de cultura contendo a substância a ser biotransformada e tampão fosfato pH 7,0 sendo mantidos em agitador orbital. Atualmente os químicos orgânicos sintéticos têm utilizado reações enzimáticas na síntese de intermediários enantiomericamente puros para preparar moléculas opticamente ativas de interesse farmacológico, agroquímico e alimentício. O objetivo do presente estudo foi reduzir chalconas, utilizadas como substratos nas reações de biocatálise, utilizando células de tecidos de calos de *C. peruvianus*. Esta cultura de células apresentou a capacidade de redução regioseletiva das enonas avaliadas. A partir destes resultados, pode-se concluir que as células utilizadas na biocatálise expressam enzimas do tipo redutase podendo então atuar como biocatalisadores em reações orgânicas de redução de duplas ligações.

Palavras-chave: Biocatálise, *Cereus peruvianus*, cultura de células.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a cultura de células de plantas vem sendo utilizada nas transformações de importantes classes de compostos tais como os fenilpropanóides, terpenóides e alcalóides. Muitas vezes estas biotransformações fornecem substâncias que normalmente não estão presentes na natureza e possuem atividades biológicas importantes ¹. As enzimas presentes nas culturas destas células são capazes de catalisar reações estereo, quimio e regioseletivamente, bem como resolver misturas racêmicas ou transformar compostos pró-quirais, com vantagens sobre as sínteses químicas. Diversas reações de biotransformação por cultura de células de plantas foram descritas nos últimos anos como, por exemplo: hidroxilações, glicosilações, oxido-reduções de álcoois e cetonas, epoxidação, reduções de duplas ligações, reduções de nitrocompostos. A cultura de células em suspensão de *C. peruvianus* expressa as enzimas envolvidas em processos de oxidação-redução e diversos tipos de esterases² o que as tornam uma fonte de enzimas, abrindo a possibilidade de empregá-la como um catalisador biológico na síntese orgânica.



Os químicos orgânicos sintéticos a partir da década de 90 têm utilizado as reações de biocatálise e biotransformação como metodologias para a síntese de intermediários enantiomericamente puros ou enriquecidos³. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a capacidade enzimática expressa em células de *Cereus peruvianus* em cultura para interconverter chalconas para posteriormente serem utilizadas como biocatalisadores potenciais em Síntese Orgânica.

MATERIAL E MÉTODOS

Os tecidos de calos foram obtidos da cultura mantida por 20 anos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia Celular e Genética da UEM. Estes calos são mantidos em meio Murashige e Skoog⁴ contendo vitaminas do meio B5⁵, 0.8% de ágar, 4.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético e 4.0 mg/L de *N*-(2-furanylmethyl)-1*H*-purine-6*amine*. Para avaliar a capacidade das células de *Cereus peruvianus* em realizar reações de redução foram utilizados os substratos (2*E*)-1,3-difenilprop-2-en-1-one (**1**) e (2*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**2**) sintetizados e os padrões racêmicos foram preparados para acompanhar as reações biocatalisadas.

Os álcoois racêmicos foram sintetizados a partir da redução com NaBH₄ (Figura 2)⁶ das correspondentes cetonas (Figura 1) utilizadas como substratos.

Figura 1. Substratos utilizados nas reações de biocatálise:

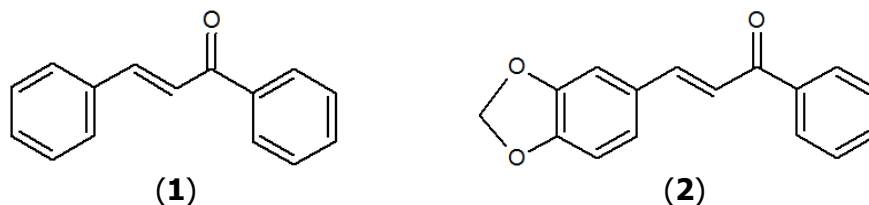
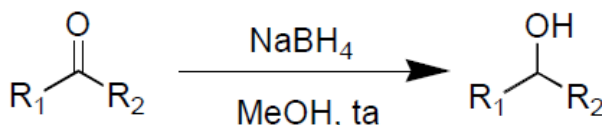


Figura 2. Síntese de álcoois racêmicos



As reações de biocatálise foram efetuadas transferindo-se assepticamente 7,5g (peso fresco) de células de *C. peruvianus* para 9 frascos de cultura tipo Schott de 250,0mL contendo 50,0mL de tampão fosfato (0,1M pH 7,0). As chalconas (30mg/frasco) foram dissolvidas em 1mL de etanol e adicionadas separadamente em 8 frascos. No frasco adicional não houve adição do substrato sendo este considerado como controle. Todos os procedimentos citados anteriormente foram realizados em capela de fluxo laminar. Os frascos foram incubados em um agitador rotatório e mantidos por 5 dias sob agitação (120rpm) à 28°C. Após este período, o meio reacional e as células foram separados através de filtração a vácuo.

O meio reacional filtrado foi transferido para um funil de separação de 250,0mL para extração com três porções de acetato de etila (30,0mL/extração).

As células foram submetidas a três extrações com metanol (30,0mL/extração). A cada extração adicionou-se 30,0mL de metanol à biomassa, manteve-se por 20 minutos no



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

ultrassom, para rompimento das células, após este período a suspensão resultante foi mantida sob agitação em agitador magnético por 24 horas e filtrada a vácuo. As frações de metanol foram reunidas e particionada em água (30,0mL) e acetato de etila (30,0mL), sendo posteriormente realizada a extração com duas porções de acetato de etila (30,0mL/extração).

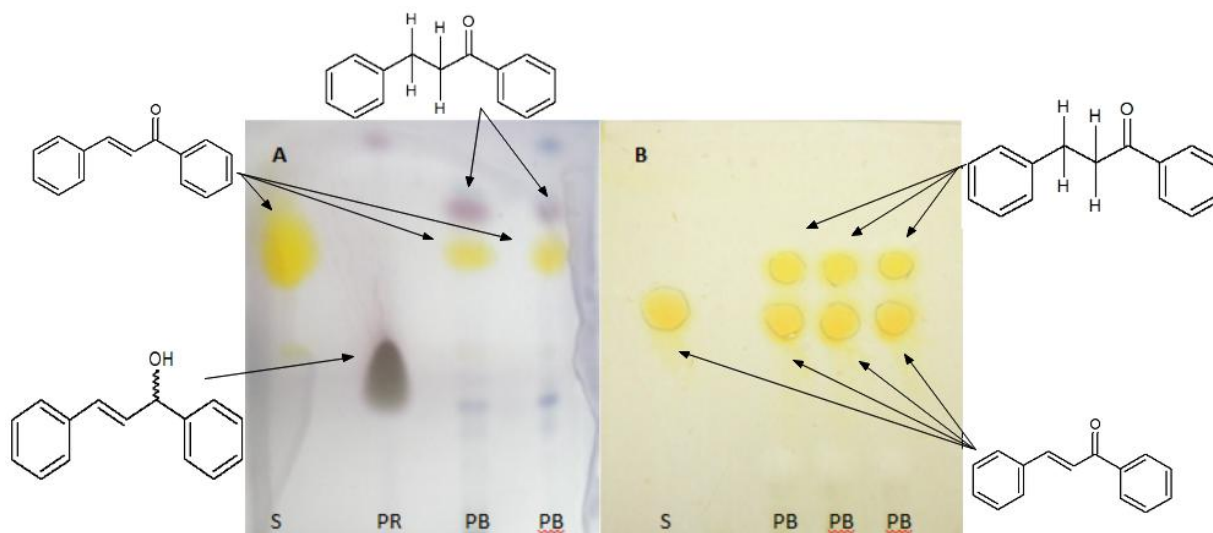
Todas as frações orgânicas foram secas sobre Na_2SO_4 anidro, evaporadas a vácuo, e submetidas à análise por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo a fase móvel: hexano/acetato de etila 90:10 (v/v). Para revelação foi utilizada solução de *p*-anisaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina (Figura 03 e 04).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na maioria dos trabalhos envolvendo reações de biotransformação e utilizando cultura de células vegetais observa-se que as reações ocorrem no meio em que as células estão suspensas, porém quando realizou-se este tipo de extração, utilizando apenas o meio reacional não obteve-se nenhum produto e observou-se um desaparecimento dos substratos adicionados ao meio. Portanto fez-se necessário a utilização de um método extrativo que possibilitasse a obtenção dos possíveis produtos contidos no interior das células.

Ao utilizar as células de *Cereus peruvianus* para promover a redução das cetonas esperava-se obter a formação de álcoois tais quais os padrões racêmicos preparados em laboratório, porém análises de CG/EM e RMN de ^1H e ^{13}C mostraram que a ligação dupla entre os carbonos α e β do substrato (**1**) foi reduzida ao invés da carbonila, conforme descrito em trabalhos anteriores⁷.

Figura 03: CCD do substrato (**1**): S = substrato, PR = padrão racêmico, PB = produto da reação de biocatálise extraído da biomassa. Revelador químico utilizado na placa **A** foi *p*-anisaldeído e na placa **B** foi 2,4-dinitrofenilhidrazina, fase móvel: hexano/acetato de etila 90:10 (v/v).

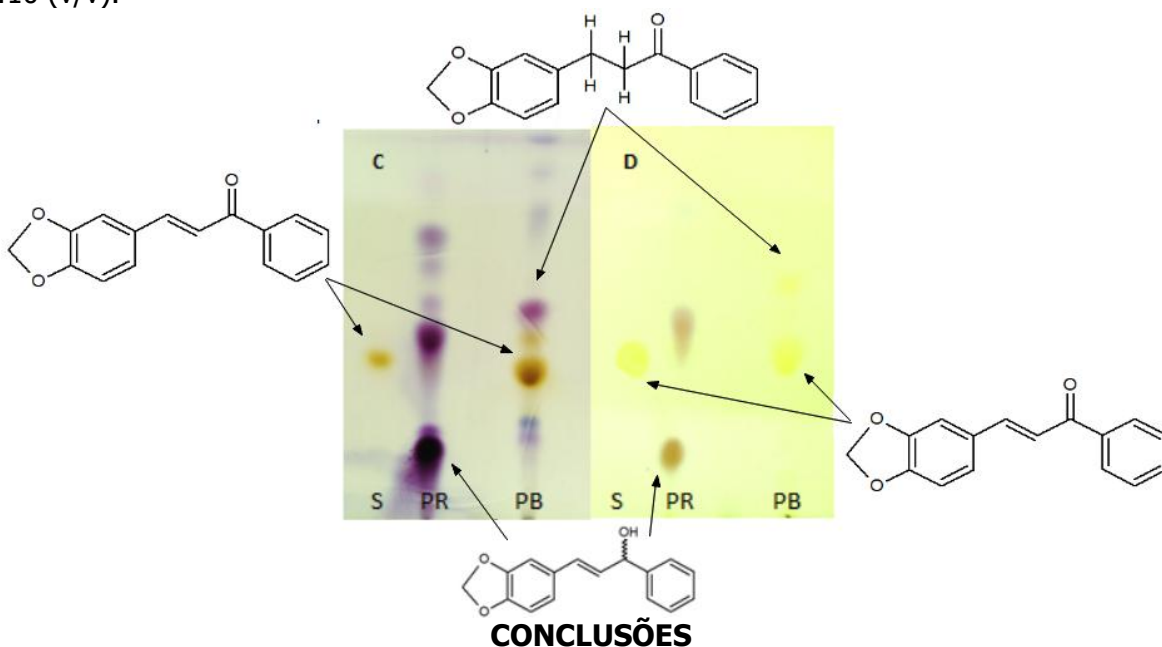




III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

Figura 04: CCD do substrato (2): S = substrato, PR = padrão racêmico, PB = produto da reação de biocatálise extraído da biomassa. Revelador químico utilizado na placa **C** foi *p*-anisaldeído e na placa **D** foi 2,4-dinitrofenilhidrazina, fase móvel: hexano/acetato de etila 90:10 (v/v).



A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que as células utilizadas na biocatálise expressam enzimas do tipo redutase podendo então atuar como biocatalisadores em reações orgânicas de redução de duplas ligações. Portanto a cultura de células de *Cereus peruvianus* representa uma nova fonte biocatalisadora para redução regioseletiva de enonas.

REFERÊNCIAS

- (1) SUGA, T., HIRATA T. Biotransformação of exogenous substrates by plant cell cultures. **Phytochemistry**, v. 20, p.2393-2406, 1990.
- (2) MACHADO, F. A. P.S. A. M., CAPELLASSO, M., OLIVEIRA, A. J. B., GONÇALVES, R. A. C., Zamuner, M. L. M., MANGOLIN, C. A., MACHADO, M.F. P. S. Alkaloid Production and Isozymes Expression from Cell Suspension Culture of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Journal of Plant Sciences**, v. 1, p. 324-331, 2006.
- (3) FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook**. Berlin: Springer Verlag, 6th Edition, 2011.
- (4) MURASHIGE, T.; Skoog, F. **A resied medium for rapid growth and bioassays with tabaccotissue cultures**. *Physiol. Plant.* 1962.
- (5) GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. **Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells**. *Experimental Cell Research*. 1968
- (6) VOGEL, A. I. **Textbook of practical organic chemistry**. London: Longman Scientific and Technical, 5th edition, 1989.
- (7) GONÇALVES, R. A. C.; CUNHA, A. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; MACHADO, M. F. P.; DOS SANTOS, R. A. M. Aplicações da cultura de células e tecidos de plantas em reações de biotransformações. In: MARSALOLI, A. J. e PORTO, A. L. M. (Ed.). **Biocatálise e Biotransformação: fundamentos e aplicações**. Salto/SP: Editora Schoba Ltda, v.1, 2010. p.101 – 157.