



II CONPESQ Congresso de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Os novos rumos da ciência pós-pandemia

12 a 16 de abril de 2021 Universidade Federal do Cariri - UFCA

ESTUDO E ANÁLISE DO FLAMBOYANZINHO COMO POTENCIAL AGENTE DE BIOTRANSFORMAÇÕES NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS APLICÁVEIS EM INDÚSTRIA

Rhodivam Lucas Mendes Feitosa¹

Centro de Ciência e Tecnologia
Universidade Federal do Cariri
rhodivam.lucas1@gmail.com

Anderson Zhong Fan²

Centro de Ciência e Tecnologia
Universidade Federal do Cariri
anderson.zhong@aluno.ufca.edu.br

Magno de Lima Silva³

Centro de Ciência e Tecnologia
Universidade Federal do Cariri
lima.magno@aluno.ufca.edu.br

Allana Kellen Lima Santos Pereira⁴

Centro de Ciência e Tecnologia
Universidade Federal do Cariri
allana.lima@ufca.edu.br

RESUMO

Existem processos que usam enzimas de vegetais nas indústrias com perspectiva econômica e ecológica como biocatalisadores. Vários estudos são feitos com o uso de plantas para os processos de biorredução com intenção de produzir diversos tipos de produtos, como cosméticos e fármacos. O projeto tem como objetivo estudar o potencial de biocatálise da família Fabaceae, utilizando partes dos vegetais para transformação de cetonas e aldeídos a fim de obtermos seus álcoois correspondentes. A metodologia aplicada consiste na biorredução de diferentes substratos a partir de redutases presentes em células íntegras da espécie vegetal flamboyanzinho (*Caesalpinia pulcherrima*). As reações de Biocatálise foram realizadas, porém devido a restrições de acesso aos laboratórios por causa da pandemia COVID-19, ainda encontram-se em processo de obtenção dos resultados. A partir dos resultados obtidos se chegará à conclusão se ocorreram as biotransformações esperadas ou não.

Palavras-Chave: Biocatálise. Espécies vegetais. *Caesalpinia pulcherrima*. Enzimas.

¹ Bolsista

² Bolsista.

³ Bolsista.

⁴ Orientadora, docente do Centro de Ciência e Tecnologia.

ABSTRACT: There are processes that use plant enzymes in industries with an economic and ecological perspective as biocatalysts. Several studies are done using plants for bioreduction processes with the intention of producing different types of products, such as cosmetics and drugs. The project aims to study the biocatalysis potential of the Fabaceae family, using parts of vegetables to transform ketones and aldehydes in order to obtain their corresponding alcohols. The applied methodology consists of the bioreduction of different substrates from reductases present in whole cells of the flamboyanzinho plant species (*Caesalpinia pulcherrima*). Biocatalysis reactions were carried out, however due to restrictions on access to laboratories due to the COVID-19 pandemic, they are still in the process of obtaining the results. The extraction of the enzymatic concentrate from flamboyanzinho was carried out and for this determination two routine laboratory methods will be used: the Lowry Method, modified by Hartree (HARTREE, 1972) and the Bradford Method (BRADFORD, 1976). From the results obtained, it will be concluded whether the expected biotransformations occurred or not.

Keywords: Biocatalysis. Plant species. *Caesalpinia pulcherrima*. Enzymes.

1 INTRODUÇÃO

As biotransformações são definidas como modificações da estrutura molecular de uma substância catalisada por meio biológico e são ditas como processos eficientes para a produção de compostos orgânicos quirais (MACHADO, et al 2009). Dessa forma, existe uma procura intensa por essas substâncias pelo simples fato do seu potencial biotecnológico (ANDRADE et al, 2006).

Os catalisadores biológicos têm composições específicas e características singulares que os tornam diferentes dos catalisadores convencionais. Somado a isso, eles ainda contribuem para uma química mais verde. Com intenção de reduzir o uso de matérias-primas de fontes não renováveis, a busca por produtos naturais vem aumentando continuamente (OMORI, PORTAS, DE OLIVEIRA 2012).

O emprego de células íntegras de vegetais como agentes biocatalisadores que atuam na redução das cetonas para a produção de álcool vem aumentando bastante. Isso acontece porque esse novo modelo de utilização de plantas como agentes biorredutores tem vários pontos positivos, como a facilidade no acesso dos materiais, baixo custo e estabilidade (SOUZA, 2012; KURBANOGLU et al., 2010).

Dessa forma, pesquisas relacionadas às áreas de biocatálise são importantes para a produção de novos produtos e no melhoramento de técnicas e processos. Segundo Moraes (2014), a fabricação de compostos enantiosseletivos e regioespecíficos, obtidos de forma limpa, podem ser aplicados em diversos campos da ciência e na indústria.

O projeto tem como função realizar e observar as biotransformações em compostos

carbonílicos (substratos) tais como aldeídos e cetonas aromáticas e alifáticos utilizando as células íntegras de espécies vegetais, da família Fabaceae. A planta em estudo é o flamboyanzinho (*Caesalpinia pulcherrima*). Ela é uma planta da América Central que se adaptou ao clima brasileiro e, por isso, é bem distribuída em todo o país. Segundo Oderinde (2008), o flamboyanzinho é um arbusto com cerca de 2 a 3 m de altura, com flores e espinhos nos galhos. É uma planta bastante cultivada por suas flores vistosas e por sobreviver em climas extremos.

Figura 1 - Imagem da flor do Flamboyanzinho



Fonte: imagem do autor (2020)

Essa espécie de arbusto possui potencial para ser um biocatalisador pelo alto teor de proteína presente nas sementes. Segundo em seus testes, Yusuf (2007) fala que as leguminosas são importantes fontes de proteína em países tropicais. Além disso, ele cita que a composição de sementes de Flamboyanzinho é aproximadamente de 48% de proteínas. Esse valor é maior do que em plantas como *Acacia mellifera* (com 41,6%), a *Bauhinia triandra* (com 42,7%), *Lathyrus odoratus* (42,8%), e *Glycine max* (nome comum: soja, com 42,8%) (Prakash et al., 2001).

O Flamboyanzinho pode ser uma boa fonte de proteínas e de baixo custo. Junto a isso, associa-se ao fato de que as enzimas são proteínas, o que supõe que as sementes de *Caesalpinia pulcherrima* podem ser grandes agentes biocatalisadores. As células das plantas podem ser utilizadas em reações de redução de compostos carbonílicos já que suas enzimas podem ser utilizadas para a produção de produtos de elevado valor agregado,

como fármacos ou cosméticos com elevada pureza (SANTIAGO, 2017).

Assim, o projeto busca contribuir para o conhecimento da diversidade biológica vegetal, explorando a nível molecular fontes naturais vegetais, buscando implantar a biocatálise como uma nova linha de pesquisa de produtos naturais na Universidade Federal do Cariri. O projeto de biocatálise estuda a capacidade de biorredução de cetonas e aldeídos com o uso de sementes de vegetais da família Fabaceae. Foi analisado o potencial biorredutor das cascas e sementes da *Caesalpinia pulcherrima*, buscando a investigação de novas fontes vegetais com potencial promissor para biotransformação de substratos a partir de células íntegras.

2 METODOLOGIA

O biocatalisador utilizado para a realização das biorreduções foi o flamboyanzinho (*Caesalpinia pulcherrima*). As sementes usadas na pesquisa foram coletadas dos arbustos de casa e também das plantas que estão no campus da UFCA de Juazeiro do Norte localizado no município de Juazeiro do Norte-CE.

Figura 2- Imagens das sementes e das cascas do Flamboyanzinho.



Fonte: imagem do autor (2020)

2.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Inicialmente o material vegetal foi separado da casca, foi triturado em pedaços pequenos e pesados. Em seguida, foi lavado com uma solução de hipoclorito de sódio 5% por 10 minutos. Logo após, foi acondicionado em erlenmeyer. Nos experimentos foram utilizadas as sementes do flamboyanzinho como biocatalisadores da reação. Em solução

aquosa, misturou com os substratos a serem testados e foram agitados em um agitador rotativo a 150 rpm. Os substratos foram benzaldeído (1), 2,4-dicloroacetofenona (2), acetofenona (3), 4-aminoacetofenona (4). Cada substrato foi analisado de forma separada e a biorredução de cetonas, aldeídos aromáticos e foram realizadas usando uma proporção de 75 ml de água, 100 mg de substrato e aproximadamente 10 g de sementes de Flamboyanzinho. Estes foram acondicionados em Erlenmeyers de 250 ml e foram submetidos a agitação em mesa agitadora orbital a 150 rpm por 72 horas. As amostras então foram filtradas e o filtrado foi extraído com AcOEt (3x40mL). Essa metodologia foi desenvolvida por Machado (2006).

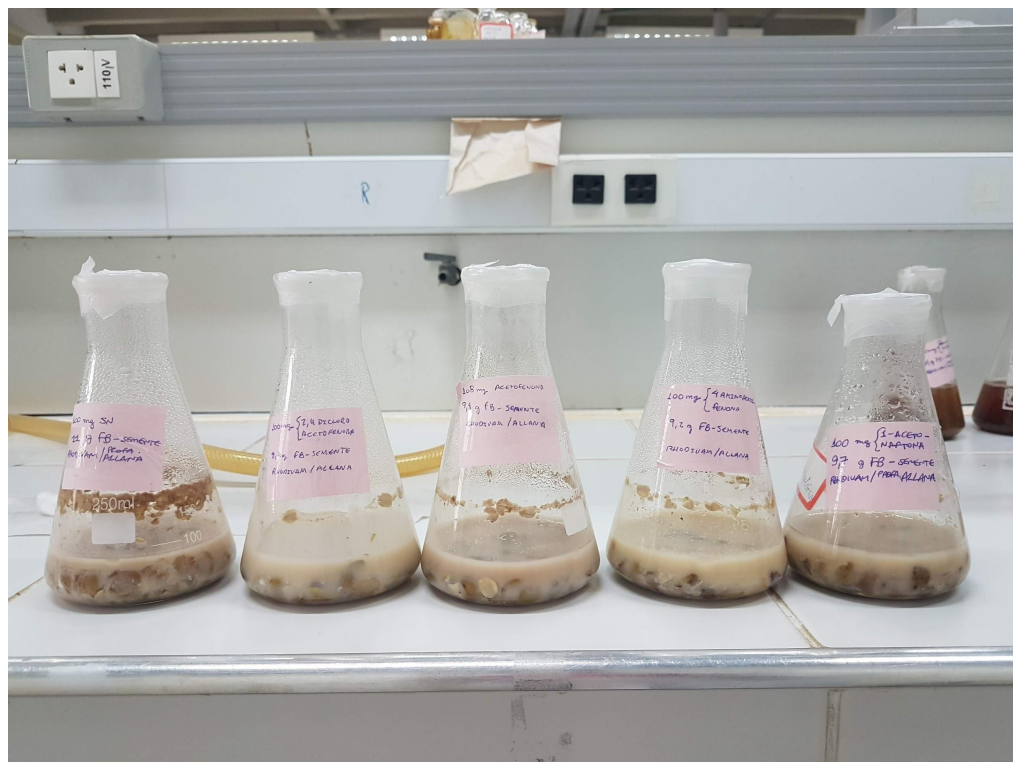
Também foi testada o potencial de redução das cascas das sementes do flamboyanzinho, no qual seguiu as mesmas etapas citadas acima mas com proporções diferentes. Assim, foi usada a proporção de 150 ml de água, 200 mg de substrato e aproximadamente 24 g das cascas de Flamboyanzinho, acondicionada em Erlenmeyer (250 ml) e foram submetidos a agitação em mesa agitadora orbital a 150 rpm por 72 horas.

Figura 3- Mistura com as cascas e sementes que ficaram 72 horas na mesa giratória.



Fonte: imagem do autor (2020)

Figura 4 - Massa com alta viscosidade que foi formada com a mistura realizada com sementes.



Fonte: imagem do autor (2020)

Os padrões dos álcoois racêmicos foram obtidos através de síntese química a partir das cetonas e dos aldeídos padrões com borohidreto de sódio. Em erlenmeyers de 250 mL adicionou-se, respectivamente, 1 g de cada substrato e 50 mL de etanol. A solução resultante foi colocada em um banho de gelo e agitada, utilizando um agitador magnético. Agitando-se o erlenmeyer constantemente, 200 mg de borohidreto de sódio foi adicionado em pequenas porções usando-se uma espátula. Após adição, o sistema foi deixado em agitação por cinco horas. Com o fim da reação, adicionou-se lentamente HCl 0,1M (20 mL) até cessar o desprendimento de hidrogênio, seguido de mais 50 mL de água. A purificação dos produtos foi efetuada através de coluna cromatográfica de sílica gel. Todos os padrões foram analisados por infravermelho.

A determinação estrutural dos produtos de biotransformações foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos obtidos na análise por IV. As descrições dos modelos e condições dos aparelhos utilizados para caracterização das substâncias encontram-se a seguir:

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em

espectrômetro Perkin-Elmer modelo 720. Para as substâncias sólidas foram utilizadas pastilhas de KBr e para as demais foram preparados filmes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o flamboyanzinho, foram realizadas todas as etapas para averiguar se o mesmo possui potencial para ser um biocatalisador.

Para as sementes ficou inviável porque formou-se uma solução altamente viscosa que dificultou a realização das reações e consequentemente dos bioprodutos. Para as cascas, foi possível fazer as análises de infravermelho em quatro bioprodutos.

As biorreduções foram realizadas a 30°C durante 72 horas, para avaliar o potencial redutor das enzimas presentes nos biocatalisadores.

As biotransformações, especificamente as biorreduções, descrevem um sistema de redução economicamente viável e ambientalmente correto. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas no sentido de sintetizar álcoois. A redução estereosseletiva está sendo um dos métodos mais empregados, uma vez que permite a produção desses derivados em rendimentos quantitativos (BIZERRA et al., 2010).

Por fim, os resultados obtidos pela espectroscopia no infravermelho foram comparados com os álcoois padrões para conferir se reagiu.

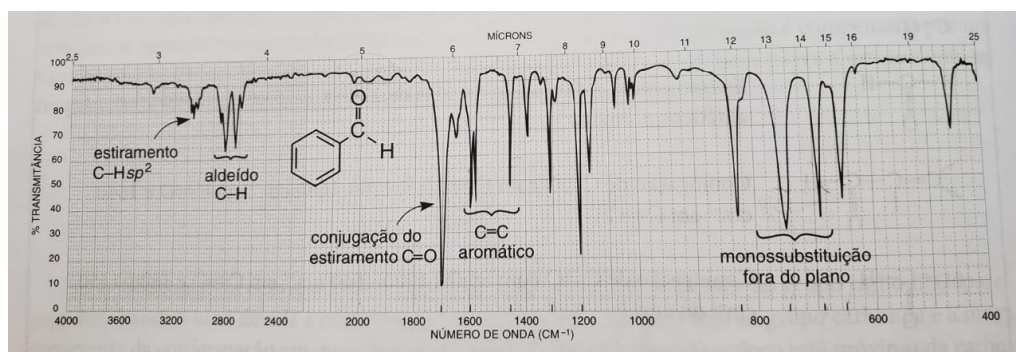
Redução dos substratos com NaBH₄

A síntese química dos álcoois padrões foi realizada com NaBH₄, um reagente quimiosseletivo empregado na redução de grupos carbonila. Este é um agente redutor brando que reage rapidamente com aldeídos e cetonas.

Benzaldeído (1)

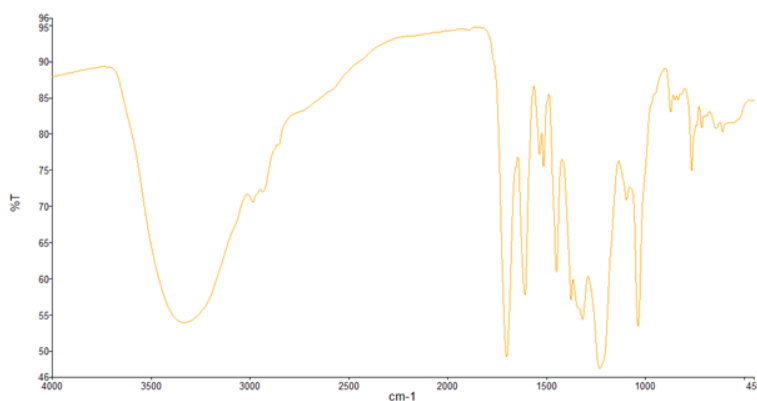
As análises no infravermelho comprovam que ocorreu a biorredução do composto carbonílico ao álcool correspondente. A Figura 4 apresenta o espectro de IV obtido para o composto **1** (benzaldeído) e seu bioproduto de biorredução encontra-se na Figura 5. A partir da análise do espectro de infravermelho os compostos puderam ser caracterizados. No espectro IV do substrato **1** (Figura 4) verificamos a presença de banda de carbonila de cetona conjugada próxima a 1.700 cm⁻¹. Na Figura 5, espectro do bioproduto, constatamos que houve reação de biorredução, pois observamos uma banda em torno de 3.300 cm⁻¹ correspondente à hidroxila de álcool, o que nos sugere que houve formação do álcool benzílico.

Figura 5: Benzaldeído (1)



Fonte: PAVIA (2010)

Figura 5: Bioproduto da biorredução do benzaldeído com células íntegras do flamboyanzinho

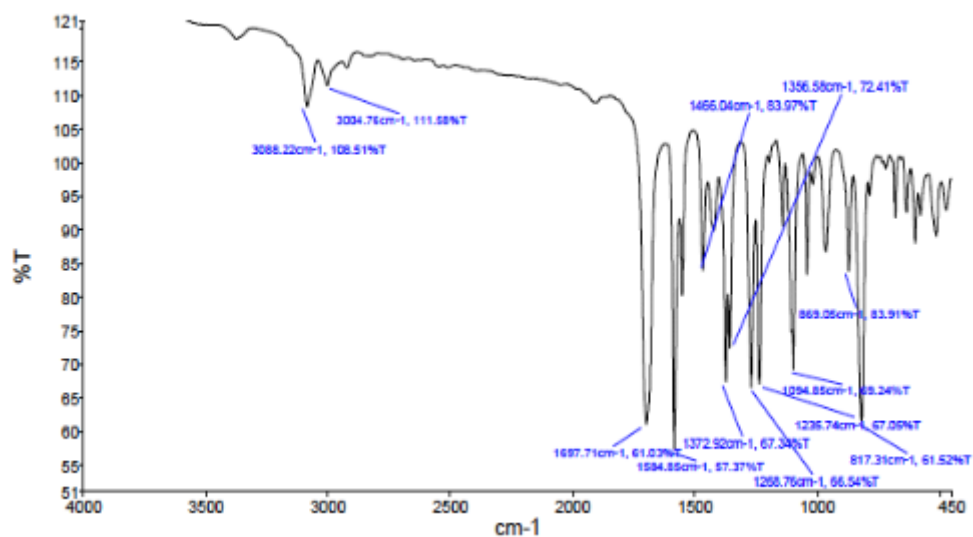


Fonte: imagem do autor (2021)

2,4-dicloroacetofenona (2)

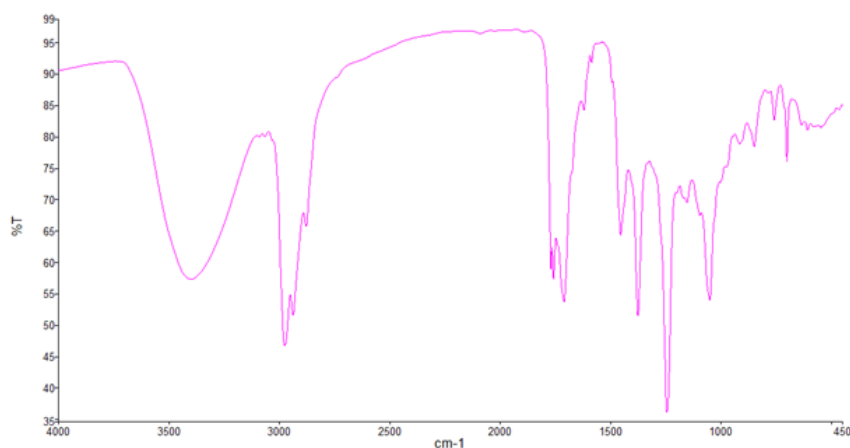
As análises no infravermelho comprovam que ocorreu a biorredução do composto carbonílico ao álcool correspondente. As Figuras 6-7 representam os espectros de IV obtidos para o composto 2 (2,4-dicloroacetofenona) e seu bioproduto de biorredução. A partir da análise do espectro de infravermelho os compostos puderam ser caracterizados. No espectro IV do substrato 2 (Figura 6) verificamos a presença de banda de carbonila de cetona em 1.697 cm⁻¹. Na Figura 7, espectro do bioproduto, constatamos que houve reação de biorredução, pois observamos uma banda simétrica próxima a 3.300 cm⁻¹ correspondente à hidroxila de álcool, o que nos sugere a formação do álcool 1-(2,4-diclorofenil)etanol.

Figura 6: 2,4-dicloroacetofenona (**2**)



Fonte: imagem do autor (2020)

Figura 7: Bioproduto da biorredução da 2,4-dicloroacetofenona com células íntegras do flamboyanzinho



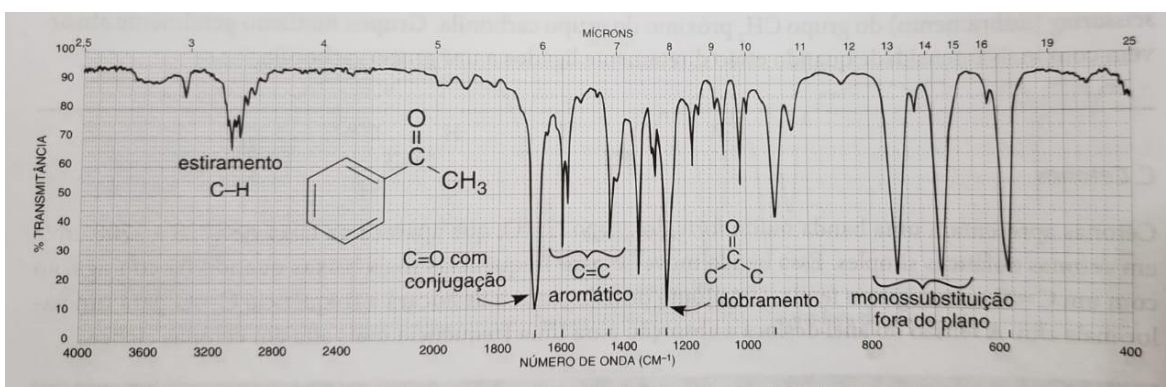
Fonte: imagem do autor (2021)

Acetofenona (**3**)

As análises no infravermelho comprovam que ocorreu a biorredução do composto carbonílico ao álcool correspondente. As Figuras 8-9 representam os espectros de IV obtidos para o composto **3** (acetofenona) e seu bioproduto de biorredução. A partir da

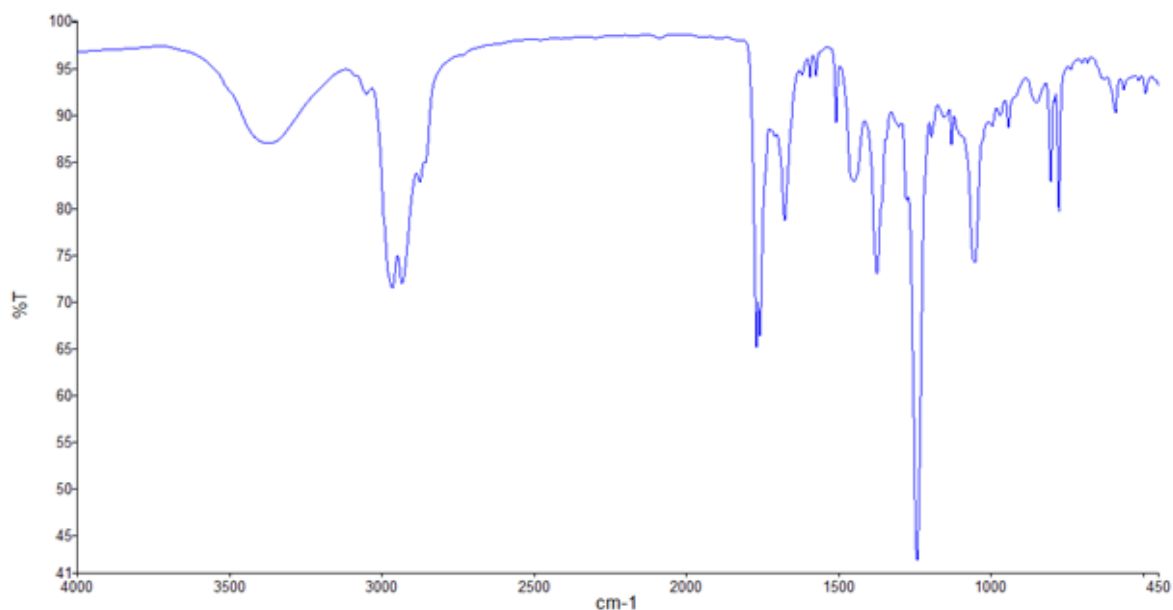
análise do espectro de infravermelho os compostos puderam ser caracterizados. No espectro IV do substrato 3 (Figura 8) verificamos a presença de banda de carbonila de cetona conjugada em 1.709 cm^{-1} . Na Figura 9, espectro do bioproduto, constatamos que houve reação de biorredução, pois observamos uma banda próxima a 3.400 cm^{-1} correspondente à hidroxila de álcool, o que nos sugere a formação do álcool 1-feniletanol. Porém a reação não ocorreu totalmente, uma vez que verificamos no espectro do bioproduto a presença de banda próxima a 1.680 cm^{-1} de carbonila de cetona conjugada.

Figura 8: Acetofenona (3)



Fonte: PAVIA (2010)

Figura 9: Bioproduto da biorredução da acetofenona com células íntegras do flamboyanzinho

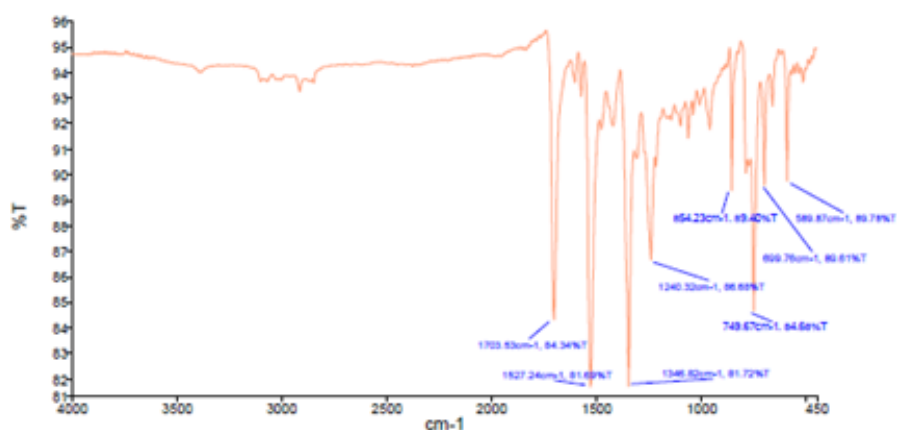


Fonte: imagem do autor (2021)

4-aminoacetofenona (4)

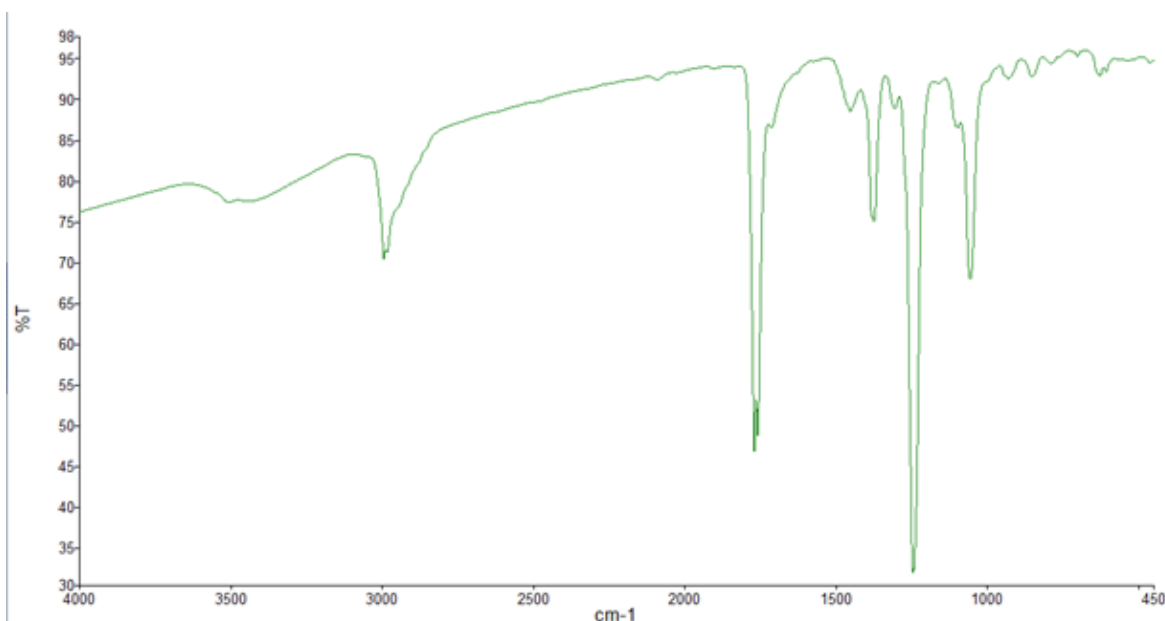
As análises no infravermelho comprovam que não ocorreu a biorredução do composto carbonílico ao álcool correspondente. As Figuras 10-11 representam os espectros de IV obtidos para o composto **4** (4-aminoacetofenona) e seu bioproduto de biorredução. A partir da análise do espectro de infravermelho os compostos puderam ser caracterizados. No espectro IV do substrato **4** (Figura 10) verificamos a presença de banda de carbonila de cetona em 1.705 cm^{-1} . Na Figura 11, espectro do bioproduto, constatamos que não houve reação de biorredução, pois não observamos uma banda simétrica próxima a 3.300 cm^{-1} correspondente à hidroxila de álcool, o que nos sugere a não formação do álcool 1-(4-aminofenil)etanol.

Figura 10: 4-aminoacetofenona (**4**)



Fonte: imagem do autor (2020)

Figura 11: Bioproduto da biorredução da 4-aminoacetofenona com células íntegras do flamboyanzinho



Fonte: imagem do autor (2021)

Devido a restrições de acesso aos laboratórios por causa da pandemia COVID-19 ainda encontra-se em processo de obtenção dos resultados dos demais bioprodutos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biorreduções de cetonas e aldeído aromático utilizando o flamboyanzinho (*Caesalpinia pulcherrima*) como biocatalisador, revelam a presença de enzimas redutases. Através dos espectros de infravermelho dos bioprodutos, verificamos que os substratos benzaldeído (1), 2,4-dicloroacetofenona (2) e acetofenona (3) foram reduzidos aos seus álcoois correspondentes. Assim concluímos que ocorreu reação para os substratos 1, 2 e 3, porém para o substrato 4-aminoacetofenona (4) não houve reação. Portanto, afirmamos que o flamboyanzinho atua como um promissor biocatalisador em reações de biorredução.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFCA.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L.H., et al. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, p.84-90, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138111770500202X>. Acesso em 10 de fevereiro de 2021.

BIZERRA, A. M. C., et al. Reduction processes biocatalyzed by *Vigna unguiculata*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 566-570, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0957416610001564>. Acesso em 05 de fevereiro de 2021.

GIRI, A., et al. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 175-199, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975001000544>. Acesso em 10 de fevereiro de 2021.

KURBANOGLU, E. B. et al. Continuous production of (S)-1-phenylethanol by immobilized cells of *Rhodotorula glutinis* with a specially designed process. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 461-464, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0957416610000698>. Acesso em 10 de fevereiro de 2021.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v.22, p.229-245, 1999. Disponível

em:http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=2043. Acesso em 1 de fevereiro de 2021.

LOPES, R. D. O., et al. Highly enantioselective bioreduction of 4-bromoacetophenone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 22, p. 1763-1766, 2011. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0957416611005672>. Acesso em 1 de fevereiro de 2021.

MACHADO, L. L. et al. Bioreduction of Aldehydes and Ketones using Manihot species. **Phytochemistry**, v.67, p.1637-1643, 2006. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942206001087>. Acesso em 1 de fevereiro de 2021.

MACHADO, L. L., et al. Enantioselective acetylation of racemic alcohols by Manihot esculenta and Passiflora edulis preparations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 157-162, 2009. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381117709001374>. Acesso em 29 de janeiro de 2021.

MORAES, M. I. **Biorredução de aldeídos e cetonas utilizando células íntegras de espécies vegetais cultivadas no Estado do Piauí**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)- Universidade Federal do Piauí, Edições UFPI, Teresina, Brasil, 2014.

PAVIA, Donald *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 5. ed. Bellingham, Washington: Cengage Learning, 2015.

ODERINDE, Rotimi Ayodele; ADEWUYI, Adewale; AJAYI, Ibrionke A. Determination of the mineral nutrients, characterization and analysis of the fat-soluble vitamins of Caesalpinia pulcherrima and Albizia lebeck seed and seed oils. **Seed Science and Biotechnology**, Nigéria, 11 set. 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/281981395_Determination_of_the_mineral_nutrients_characterization_and_analysis_of_the_fat-soluble_vitamins_of_Caesalpinia_pulcherrima_and_Albizia_lebeck_seed_and_seed_oils. Acesso em: 11 fev. 2020.

ORDEN, A. A., et al. Anti-Prelog reduction of ketones by hairy root cultures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, p. 216-220, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/281981395_Determination_of_the_mineral_nutrients_characterization_and_analysis_of_the_fat-soluble_vitamins_of_Caesalpinia_pulcherrima_and_Albizia_lebeck_seed_and_seed_oils. Acesso em: 11 fev. 2020.

SANTIAGO, P. A. L. **Estudo da redução de acetofenonas utilizando biocatalisadores da região amazônica para obtenção de substâncias com elevada pureza enantiomérica de interesse farmacológico**. 2017. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.

SOUZA, J. M. O. **Biorredução de cetonas aromáticas utilizando células íntegras de *Helianthus annuus* L. (Girassol)**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

YUSUF, A.A.; MOFIO, B.M.; AHMED, A.B. Nutrient Contents of Pride of Barbados (*Caesalpinia pulcherrima* Linn.) seeds. **Pakistan Journal of Nutrition**, Nigeria, p. 117-121, 1 fev. 2007. DOI 10.3923/pjn.2007.117.121. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/215621362_Nutrient_Content_of_Pride_of_Barbados_Caesalpinia_pulcherrima_Linn_seeds. Acesso em: 17 fev. 2020.