

**PROJETO E CONSTRUÇÃO DE UM BIOREATOR PARA SÍNTESE ORGÂNICA ASSIMÉTRICA CATALISADA POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (FERMENTO BIOLÓGICO DE PADARIA)**

Ricardo de Souza Pereira

Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista (UNESP) - CP 355 - 14801-970 - Campus de Araraquara - Araraquara - SP

Recebido em 25/9/96; aceito em 2/4/97

**PROJECT AND CONSTRUCTION OF A BIOREACTOR FOR REACTIONS CATALYZED BY BAKER'S YEAST (*Saccharomyces cerevisiae*). A model for the construction of a simple and cheap apparatus to be used as bioreactor for reactions catalyzed by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is described. The bioconversion and separation of cells from products and residual substrates are obtained at the same time. The reactions carried out in this type of reactor are faster than those catalyzed by immobilized cells. Yeast cells can be cultivated in this bioreactor operating with cell recycling at appropriated conditions using glucose and other nutrients.**

**Keywords:** baker's yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; reactor; immobilized cells; asymmetric synthesis.

**INTRODUÇÃO**

Cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico de padaria) têm sido muito utilizadas pelos químicos orgânicos para a execução de vários tipos de reações, das quais se destacam reações de redução e condensação para a produção de síntons quirais usados na síntese de fármacos em indústrias farmacêuticas (Figuras 1 e 2)<sup>1-3</sup>.

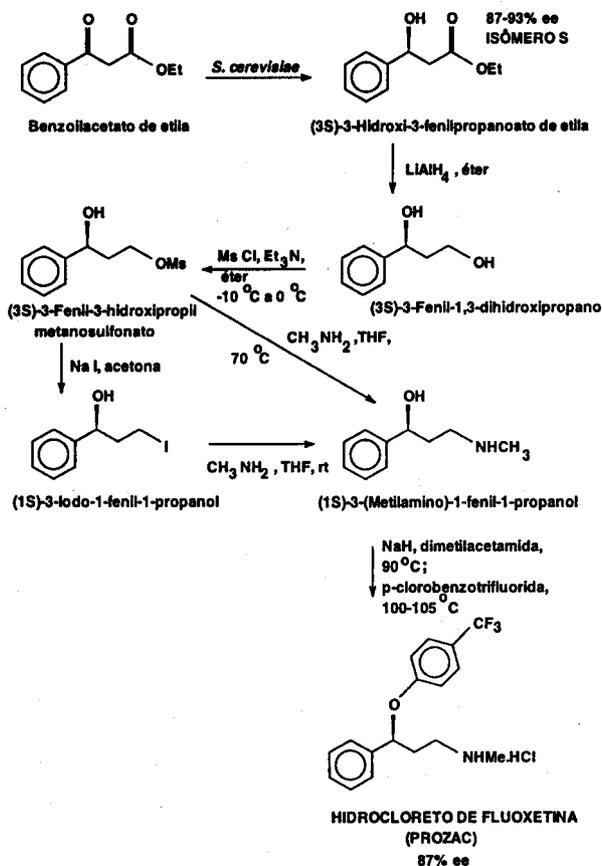


Figura 1A. Síntese de fluoxetina (PROZAC) (é usada como anti-depressivo)<sup>4</sup>.

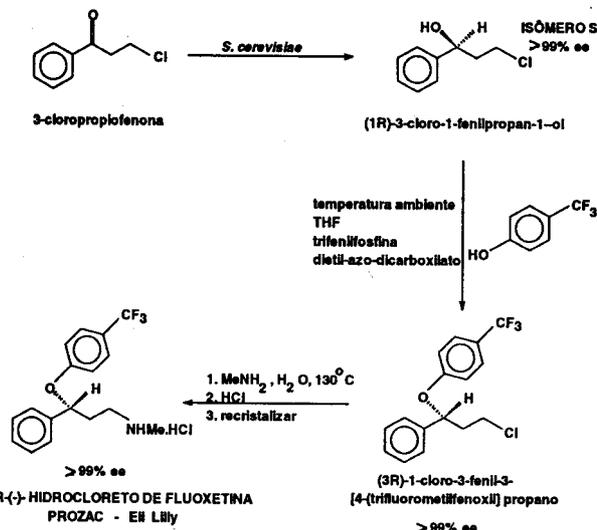


Figura 1B. Síntese de fluoxetina (PROZAC) (é usada como anti-depressivo)<sup>5</sup>.

A fluoxetina, droga usada como antidepressivo, pode ser sintetizada utilizando dois procedimentos (A e B), descritos na figura 1, que são iniciados com uma etapa de bioconversão catalisada pela levedura *S. cerevisiae*.

A L-carnitina, droga usada na prevenção de infarte do miocárdio, desordens musculares e outras doenças cardíacas<sup>6,7</sup>, pode ser obtida através de duas etapas de reação, sendo que a primeira trata-se de uma bioconversão catalisada pelas células de *S. cerevisiae*, conforme mostrado na figura 2. Nesta bioconversão, realizada pelo Prof. Sih e colaboradores, o excesso enantiomérico aumenta se a cadeia do éster é aumentada de C<sub>8</sub> a C<sub>16</sub>, porém, o rendimento químico diminui<sup>8</sup>.

A produção seletiva do isômero "L" é essencial pois a forma isomérica "D" é tóxica para o organismo humano<sup>3,6,7</sup>. A produção de um alto excesso enantiomérico varia com a cepa (linhagem) usada do microorganismo<sup>8,9</sup>. O químico orgânico utiliza cepas comerciais deste microorganismo (no caso, fermento biológico de padaria) e como cada fabricante de fermento utiliza sua própria cepa, a qual tem características bioquímicas<sup>2, 3</sup> e morfológicas próprias<sup>10</sup>, a reprodutibilidade

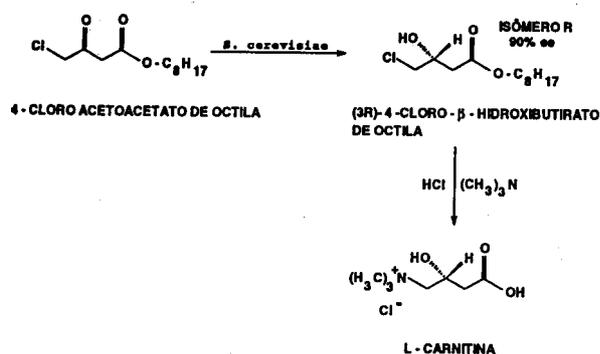


Figura 2. Síntese de L-carnitina.

dos experimentos feitos em outros laboratórios ou mesmo em outros países é um problema importante e que deve ser tratado com atenção<sup>2,3</sup>.

A separação do produto final da reação das células de *Saccharomyces cerevisiae* constitui outro problema. Normalmente, o produto é extraído usando solventes orgânicos como éter, clorofórmio ou benzeno. Estes solventes são letais para o microorganismo por destruírem as membranas celulares e por este motivo as células não podem ser reutilizadas como catalisadores. **Outra desvantagem, quando as células são utilizadas na forma livre, é o fator tempo, pois muitas vezes o processo de extração pode levar algumas horas.**

Uma alternativa para contornar estes problemas é a imobilização de células. Os suportes mais comumente usados são alginato de cálcio<sup>11</sup>, poliacrilamida<sup>12</sup> e crisotila<sup>13</sup>. Nos dois primeiros as células são aprisionadas em uma rede, o que dificulta a difusão de substratos a serem biotransformados, devido à pequena superfície de contato. A crisotila não apresenta este problema, porém as células são impedidas de dividir e crescer.

O bioreator apresentado neste trabalho, foi desenvolvido com o objetivo de solucionar os problemas de separação do produto e substratos residuais nas bioconversões.

## PARTE EXPERIMENTAL

A figura 3 mostra o esquema do reator. O motor pode ser um simples motor elétrico e que opere a baixa rotação. Foi utilizado, nos experimentos, um agitador mecânico da Fisatom (modelo 720), com velocidade controlável (velocidade ficou por volta de 120 rotações por minuto).

O reator é dividido em dois compartimentos. O compartimento 1 do bioreator é o "Compartimento de Reação" e foi contruído utilizando-se um frasco plástico com tampa cujas dimensões estão descritas na figura 3. Neste frasco foram feitas aberturas de aproximadamente 1 cm de diâmetro nas quais foram coladas (cola plástica Superbond 1000), membranas semipermeáveis de sacos de diálise (dialysis sack), feitas de celulose e que retém proteínas de até 12.000 Daltons, obtidas da Sigma Chemical Company (U.S.A.). A principal característica destas membranas é que elas são permeáveis a moléculas pequenas (produto da reação de biotransformação, por exemplo), mas impermeáveis a macromoléculas (moléculas de proteínas) e, obviamente, às células de fermento. Na verdade, estas membranas agem como uma peneira molecular. As moléculas do produto são recolhidas no compartimento 2 ("Compartimento Coletor de Produto"), que forma uma espécie de camisa ao redor do compartimento 1. As células de fermento biológico ficam sempre retidas no "Compartimento de Reação" (= compartimento 1), sendo facilmente isoladas do produto da reação.

Este reator apresenta a vantagem de permitir a separação do produto final da reação das células de fermento de maneira imediata, sem a necessidade do uso de extração com solventes orgânicos, ou o uso de outros métodos de separação (por exemplo,

filtração ou centrifugação). O dispositivo descrito associa as características de células na forma imobilizada (produtos de reação são separados das células facilmente) e de células na forma livre (superfície de contato é grande, pois os microorganismos não estão presos em uma rede de um polímero e, por esta razão, as reações ocorrem mais rapidamente). A grande vantagem deste sistema é que em concentrações apropriadas (meio com glicose<sup>3</sup> e oligoelementos como metais<sup>14</sup>), as células conseguem se dividir e crescer, fazendo com que o reator possa ser usado continuamente. Este dispositivo é mais vantajoso que o uso de simples "sacos de diálise" pois as membranas coladas nas aberturas são laváveis e reaproveitáveis, assim como o reator. A membrana conseguiu ser reutilizada por cerca de 14 dias. Depois deste prazo teve que ser substituída, porque não ocorria passagem de moléculas.

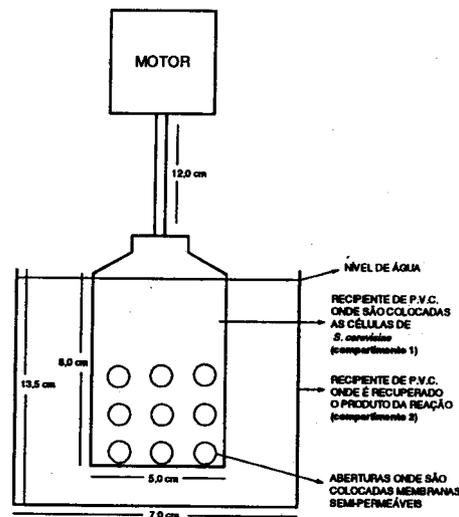


Figura 3. Esquema do reator com suas respectivas dimensões e posição das membranas semipermeáveis.

O reator foi testado usando como substrato acetoacetato de etila (o substrato mais utilizado para reações de redução com *S. cerevisiae*<sup>1</sup>). O conteúdo do compartimento 2 foi recolhido, depois de 12 horas de reação, evaporado em evaporador rotativo e purificado por cromatografia de coluna. Através de espectroscopia de infravermelho e R.M.N. foi verificado a presença de  $\beta$ -hidroxibutirato de etila. Esta reação está esquematizada, a seguir, na figura 4.

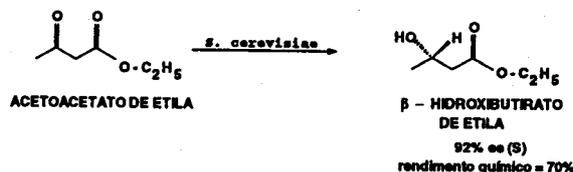
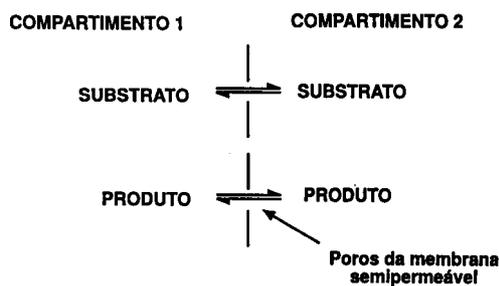


Figura 4. Biotransformação do acetoacetato de etila por *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico de padaria).

## Metodologia para utilização do fermento de padaria no reator

As células (fermento biológico de padaria) são misturadas com água (de preferência bidestilada e deionizada) em um béquer. Esta suspensão é agitada por uma hora para que se consiga atingir a produção máxima de NAD(P)H (nucleotídeos de adenina na forma reduzida) no interior das células de fermento<sup>2</sup>. Nesta fase também podem ser adicionados compostos

inibidores de enzimas (cloroacetofenona, álcool alílico, metilvinil-cetona, etc.)<sup>3</sup>. Uma vez que estes inibidores penetrem nas células, eles se fixam no sítio ativo das enzimas e não saem das células e, não migram para o compartimento 2. Em seguida, a suspensão é transferida para o compartimento 1 do reator e é adicionado o composto químico a ser biotransformado (substrato). Ocorre saída do substrato para o compartimento 2, até que se tenha um estado de equilíbrio. Neste ponto parte do substrato é transformado em produto. Este também fica em um estado de equilíbrio entre os dois compartimentos até que ocorra toda a biotransformação (ver esquema 1).



Esquema 1

**Esquema 1.** Ilustração esquemática do estado de equilíbrio entre os dois compartimentos do reator.

É necessário retirar lentamente a água do compartimento 2 para que se possa ter todo o produto (obviamente com algumas baixas concentrações de substrato). A água migra do compartimento 1 para o 2 levando o que resta destas pequenas moléculas (grandes moléculas como proteínas extracelulares não atravessam as membranas do bioreator). No compartimento 1 permanecerá apenas o fermento.

Os métodos empregados nas reações com *S. cerevisiae* são basicamente dois<sup>3</sup>:

#### a.1) Método com adição de açúcar

Este método é baseado no procedimento descrito por Seebach e colaboradores (1984)<sup>15</sup>. Pode-se introduzir uma modificação que é a introdução de uma pequena quantidade de  $ZnSO_4$ <sup>16</sup>, quando se quer aumentar a atividade da enzima álcool desidrogenase, (que produz isômeros R) e que é zinco dependente (como visto no mecanismo de ação desta enzima)<sup>3</sup>. Para isto, preparar em separado a seguinte composição:

- 1) 20 g de fermento de padaria dissolvido em 10ml de água;
- 2) 10 g de D-glicose em 38 ml de água ;
- 3) 0,0128 g de sulfato de zinco (se houver a necessidade de produção de isômeros R, do contrário não adicionar<sup>3</sup>) em 1,3 ml de água.

Misturar tudo sob agitação mecânica em banho termostático a 30°C por 30 minutos. Em seguida adiciona-se 1 mmol de substrato a ser biotransformado. O tempo que leva para ocorrer a biotransformação varia para cada tipo de substrato (composto químico a ser biotransformado) e normalmente leva de 6 a 72 horas. Após este período retira-se a água do compartimento 2 e mistura-se com um solvente orgânico (éter ou clorofórmio). No caso do acetoacetato de etila ele possui solubilidade em água (1 ml são dissolvidos em 18ml de água), e é também solúvel em alguns solventes orgânicos. A mistura da água do compartimento 2 com um solvente orgânico forma um coeficiente de partição em que o produto (que normalmente é um composto orgânico) dissolve-se mais na fase orgânica. Esta última, então, é evaporada com o auxílio de um evaporador rotativo. Depois disto, este produto é purificado em cromatografia de coluna.

Neste bioreator, foram testados também substratos que não eram solúveis em água (cerca de 14 compostos). Neste caso, a solubilidade em água foi conseguida com a adição de TWIN 80. A proporção deste detergente varia de substrato para substrato, sendo que o ideal é ir adicionando gota a gota o TWIN 80 até que o substrato esteja completamente solubilizado na água. Estes substratos não podem ser divulgados, pois seus álcoois correspondentes estão sendo testados como tripanocidas no presente momento.

Outros solubilizantes de compostos orgânicos em água são as ciclodextrinas. Estas moléculas já foram usadas para solubilizar compostos orgânicos que foram biotransformados pelo fermento de padaria<sup>17,18</sup>.

#### a.2) Método sem adição de açúcar

Adiciona-se 1 mmol de substrato a uma suspensão de 35 g de fermento de padaria em 20 ml de água, sob agitação mecânica e em banho termostático a 30°C por 30 minutos. Após o tempo necessário para terminar a reação, extrai-se e purifica-se a mistura conforme descrito no item anterior.

### COMPARAÇÃO ENTRE ALGUNS SUPORTES E O BIOREATOR

#### A) Poliacrilamida

- 1) Dificuldade de difusão do substrato;
- 2) Células não se dividem;
- 3) Altamente tóxico para células, pois inibe o transporte de elétrons na cadeia respiratória de **qualquer cepa** de *S. cerevisiae*;
- 4) Inibe a produção de NAD(P)H (cofatores essenciais para redução dos substratos) em **qualquer cepa**.

#### B) Alginato de Cálcio

- 1) Dificuldade de difusão do substrato;
- 2) Células não se dividem;
- 3) Em algumas cepas ativa a produção de NAD(P)H, em outras ocorre inibição.

#### C) Bioreator

- 1) Facilidade de difusão do substrato;
- 2) Células se dividem e crescem;
- 3) Não altera o metabolismo bioquímico das células;
- 4) Facilidade de recuperação do produto.

### AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Proc. n.º. 30.12.41/95-3) pelo apoio financeiro, ao Prof. Dr. Nelson Durán (UNICAMP) e à Prof. Dra. Cecília Laluce (UNESP-Araraquara) pela leitura crítica deste manuscrito.

### REFERÊNCIAS

1. Csuk, R.; Glänzer, B. I.; *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49.
2. Pereira, R. S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1995**, *55*, 123.
3. Pereira, R.S.; *Quím. Nova* **1995**, *18*, 452.
4. Chênevert, R.; Fortier, G.; Rhlid, R. B.; *Tetrahedron* **1992**, *48*, 6769.
5. Fronza, G.; Fuganti, C; Grasselli, P.; Mele A.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6019.
6. Bare, G.; Jacques, P. H.; Hubert, J.B.; Rikir, R.; Thonart, P. H.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, *28/29*, 445.
7. Goodman, L. S.; Gilman, A.; *As Bases Farmacológicas*

- da Terapêutica*, Guanabara Koogan, 8ª ed., pp 140 e 1027, 1991.
8. Shieh, W.; Gopalan, A. S.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2993.
  9. Weijers, C. A. G. M.; Litjens, M. J. J.; de Bont, J. A. M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 297.
  10. Pereira, R. S.; Parizotto, N. A.; Baranauskas, V.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *59*, 135.
  11. Vives, C.; Casas, C.; Gòdia, F.; Solà, C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *38*, 467.
  12. Zyla, K.; *J. Ind. Microbiol.* **1994**, *13*, 30.
  13. Sorrilha; A. E. P. M.; Marques, M.; Joekes, I.; Morán, P. J. S.; Rodrigues J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 191.
  14. Pereira, R. S.; Durán, N.; *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 857.
  15. Seebach, D.; Sutter, M. A.; Weber, R. H.; Zuger, M. F.; *Org. Synth.* **1984**, *63*, 1.
  16. MacLeod, R.; Prosser H.; Fikentscher, L.; Lanyi, J.; Mosher, H. S.; *Biochemistry* **1964**, *3*, 838.
  17. Bar, R.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *31*, 25.
  18. Singer, Y.; Shity, H.; Bar R.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *35*, 731.