

**Biotransformação de cardanol e derivados por microrganismos da
Amazônia**

Ianni de Oliveira Corrêa
Universidade Federal do Amazonas
ianni.oliveira7@gmail.com

Elison de Souza Sevalho
Universidade Federal do Amazonas
elisonsevalho@hotmail.com

Antonia Queiroz Lima de Souza
Universidade Federal do Amazonas
antoniaqlsouza@gmail.com

Kamila Rangel Primo Fernandes
Universidade Federal do Amazonas
kamila.rangelprimo@gmail.com

Afonso Duarte Leão de Souza
Universidade Federal do Amazonas
souzadq@gmail.com

RESUMO

O líquido da casca da castanha do caju (LCC) é um óleo rico em lipídeos fenólicos extraído do mesocarpo das castanhas de caju. O fenol obtido do LCC, cardanol, pode ser aproveitado como material de partida por diversos segmentos da indústria como a farmacêutica ou química fina. O processo de biotransformação destaca-se como forma de obtenção de compostos orgânicos intermediados por meio de enzimas microbianas como agentes catalíticos. Dessa forma, evidencia-se a importância dos microrganismos originários da floresta Amazônica e o relevante papel exercido por estes, como agentes geradores de produtos naturais com propriedades bioativas. Nesse aspecto, foi proposto obter derivados do cardanol por meio de biotransformação conduzida por linhagens de microrganismos amazônicos e enzimas. Os métodos de biotransformação foram realizados em diferentes meios e condições. Após os procedimentos de biotransformação as amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massas. A partir da análise dos espectros, os resultados obtidos não sugeriram indícios de biotransformação do cardanol, porém o aprendizado obtido com este projeto servirá de base para a busca de novos métodos e a prospecção de microrganismos amazônicos capazes de transformar mesmo os compostos mais resistentes.

Palavras-Chave: biotransformação, fungos da Amazônia, actinobactérias da Amazônia, cardanol.



1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, há uma busca notória por componentes bioativos oriundos da região Amazônica tendo em vista a variedade de plantas nativas com propriedades pouco estudadas (ALMEIDA, 2022). Essa busca está diretamente relacionada à maneira como o crescimento da tecnologia cria uma demanda de novos produtos atrelados a um baixo custo, bons rendimentos e agressão mínima ao meio ambiente (DA SILVA FLORÊNCIO; et.al., 2019). Partindo deste princípio, o processo de biotransformação, apresenta-se como importante ferramenta biotecnológica, que pode ser utilizada de forma ampla em síntese orgânica (DE OLIVEIRA DINIZ; DE LIMA, 2021). Esta técnica pode ser entendida como uma tecnologia que visa contribuir com a indústria química, utilizando-se de enzimas purificadas ou células microbianas livres ou imobilizadas, promovendo em determinados casos reações inviáveis do ponto de vista da química clássica (VASIC-RACKI, 2006; HERNÁIZ et al., 2010; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

Diante dessa ideia, a utilização de microrganismos vivos em processos de biotransformação justifica-se por propriedades como altas regio-, enantio- e estereosseletividade, além de condições reacionais brandas, capacidade de aplicação em diversos substratos, o fato de serem ecologicamente corretos e possuírem um baixo custo. Diante dessas características, a obtenção de novos compostos bioativos torna-se viável a partir da utilização dessa ferramenta biotecnológica (TAKAHASHI et al., 2017).

Relatos apontam para uma série de investigações a respeito do composto obtido a partir da casca da castanha do caju. O líquido da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) (LCC) ou ainda, cashew nut shell liquid (CNSL) como é conhecido internacionalmente, é uma fonte natural única de fenóis insaturados de cadeia longa (TYMAN, 1977). Este composto é produzido no mesocarpo da casca da castanha, e possui diversas aplicações como nas indústrias de resinas, freios e utilização medicinal na obtenção de antissépticos e vermífugos, tendo como uma de suas principais aplicações na indústria de polímeros (PHANI KUMAR et al., 2002; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

Relatos na literatura elucidam as diversas possibilidades de exploração desta matéria-prima, sendo estas, concentradas em segmentos de baixo valor agregado. A partir deste contexto, o cardanol evidencia-se como um dos principais componentes obtidos a partir do LCC, tido como um dos mais importantes e promissores. A partir da sua separação, sua aplicação pode ser destinada a química fina com alto valor agregado, empregando-se como aditivos, surfactantes, fármacos, pesticidas, etc. Sendo este, um subproduto abundante da indústria da castanha, qualquer melhoria relacionada a separação ou concentração deste composto pode representar uma inovação tecnológica promissora (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de linhagens de fungos e actinobactérias coletados na Amazônia para a biotransformação de cardanol e derivados.

3. METODOLOGIA

A metodologia da presente pesquisa consistiu na realização de um levantamento bibliográfico sobre biotransformação de cardanol e derivados por fungos e bactérias. Seguido da obtenção de cardanol e derivados de óleo da castanha de caju por cromatografia em coluna. A partir desta etapa foi realizada a execução dos ensaios de biotransformação do cardanol a partir de linhagens de fungos e bactérias coletadas na Amazônia. Tais ensaios se subdividiram em primeiro, segundo, terceiro e quarto, totalizando um total de quatro experimentos de biotransformação. Onde o primeiro se deu a partir da reativação das linhagens de *Penicillium glabrum*, *P. adametzii* e *P. citrinum*. O segundo utilizou quatro linhagens de fungos filamentosos (*Fusarium sp.*, *Cândida glabrata*, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*) produtores de lipases. O terceiro experimento consistiu



na utilização de cepas de três fungos codificados por (BA,1.1B), (NC1.3A) e (PE2.2C) (mesmos seguem sob caracterização de DNA para confirmação de gênero). E quarto experimento que consistiu na utilização de extratos de microrganismos contendo enzimas. Os extratos foram obtidos a partir das linhagens *Xylaria sp. E8613a*, *X. mellissii*, *Colletotrichum sp. isolate PT1046*, *Nemania abortiva* e *Trichoderma inhamatum*. Os respectivos microrganismos originaram extratos contendo as enzimas lacase, protease e celulase.

Evidencia-se que as linhagens de microrganismos utilizadas na presente pesquisa pertencem à coleção de microrganismos do LaBMicrA. O delineamento geral dos experimentos 1, 2 e 3, seguiu etapas que consistiram na reativação das linhagens de microrganismos em meio de cultura BDA + L, em placas de Petri, a 24 °C, por 120 h em estufa de incubação. Seguido da transferência dos conídios das colônias dos fungos para solução contendo 80% de água destilada e 20% de glicerol em tubos criogênicos de 5 mL, sendo 3 mL de solução para cada linhagem, ajustando-se a turbidez para o n. 06 da escala de McFarland. Contudo, o primeiro experimento, consistiu na utilização da biomassa dos fungos, que a partir do crescimento em meio de cultura Saboraud, sob agitação em incubadora durante 5 dias a 120 rpm e 24 °C, foi transferida para novos frascos Erlenmeyer contendo meio mineral, no qual foi adicionado 25 µL da molécula de cardanol. Os frascos foram submetidos à agitação em incubadora durante 5 dias a 120 rpm e 24 °C.

O segundo experimento consistiu na utilização de placas para cultivo de células de 24 poços, tendo cada poço um volume de 3 mL. O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram organizadas em linhas; códigos A, B, C e D, e colunas, identificadas de 1 a 6. A principal característica desse experimento foi o crescimento das linhagens em meio líquido Saboraud com fonte de carbono reduzida para 5g/mL, seguido da preparação e adição em cada poço de uma solução mãe, com a seguinte composição: 12 µL de cardanol, 1,0 mL de DMSO autoclavado e 9 mL de meio de cultura autoclavado (foram preparados múltiplos de 10 mL da solução mãe com cada meio de cultura, conforme a necessidade – no caso, 20 mL de Sab).

O terceiro experimento consistiu na utilização tubos criogênicos de 5 mL. Onde o volume de 5 µL da suspensão de células foi inoculada em 2 mL de meio líquido Saboraud com fonte de carbono reduzida. Ainda, seguida pela adição de 200 µL de solução mãe, após três dias do inóculo das linhagens nos tubos criogênicos. Foi realizado em paralelo, um experimento B, com as mesmas condições descritas acima, contudo, no dia do inóculo, foi adicionado uma fração de 2 µL da solução mãe, e após três dias de crescimento, foram acrescidos 200 µL da mesma solução.

O quarto experimento consistiu na utilização de extratos de microrganismos contendo enzimas. Onde, 5 mg de cada enzima foi solubilizada em 10 mL de solução tampão PBS. Na sequência foi retirado 900 µL da solução de enzimas e transferidos para microtubos de 2 mL ao qual foi adicionado 100 µL de uma solução de cardanol + DMSO. Foram realizadas coletas, no tempo zero, e em seguida, a cada 2h após o início do experimento. No intervalo de 4h, foi adicionado mais 200 µL da solução de cardanol + DMSO. A ocorrência de biotransformação de todos os experimentos foi avaliada através de análise em um espectrômetro de massas do tipo ion trap, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific®), com fonte APCI, monitorado no modo positivo e negativo na faixa de m/z 100-1000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No levantamento bibliográfico sobre o tema proposto, não foram encontrados dados/relatos de qualquer experimento de biotransformação do cardanol, o que torna este um trabalho pioneiro nesta questão. As buscas foram realizadas nas bases de dados: Web of Science, PubMed, Scopus, Scielo e Google Acadêmico. As pesquisas foram realizadas com combinações dos termos: “biotransformação” “cardanol”, “LCC”. Foi observado, nos experimentos 1, 2 e 3 de biotransformação, que ao todo contabilizou 10 linhagens de fungos, que não houve resultados



conclusivos para biotransformação de acordo com as análises por espectrometria de massas. Bem como, o quarto experimento de Biotransformação que consistiu na utilização de extratos de microrganismos contendo enzimas lacase, protease e celulase, que não apresentou padrão que possa sugerir a biotransformação do cardanol. É sugerido que um dos fatores que possa ter gerado impacto no resultado da presente pesquisa seja a diferença de polaridade entre o cardanol e o meio aquoso no qual foram conduzidos os ensaios de biotransformação. Ressalta-se que o meio aquoso é fundamental para o desenvolvimento das linhagens de microrganismos. Portanto, é necessário que ajustes metodológicos sejam executados, de modo que a interação entre substrato e meio reacional seja efetiva.

5. CONCLUSÕES

Os dados das análises por espectrometria de massas permitiram concluir que não houve a biotransformação do cardanol pelos métodos empregados neste estudo. Torna-se necessário continuar a pesquisa, com eventuais ajustes de procedimento experimental e a seleção de novas linhagens de microrganismos que possam transformar mesmo os compostos mais resistentes como o cardanol. Considere-se, neste sentido a imensa variedade de linhagens de microrganismos amazônicos, e como estes podem ser úteis na promoção de reações e obtenção de produtos de valor agregado, fazendo da região amazônica uma fonte única de potencial biotecnológico inestimável.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Franco Farias. Estudo de revisão da literatura sobre a importância do óleo essencial de Anibacanelilla e estudo experimental da biotransformação do 1-Nitro-2-Feniletano. 2022.
- CORTEZ, Daniela V.; CASTRO, Heizir F. de; ANDRADE, Grazielle SS. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química Nova*, v. 40, p. 85-96, 2017.
- DA SILVA FLORÊNCIO, Márcio Nannini; DE SOUZA ABUD, Ana Karla; DE OLIVEIRA JUNIOR, Antonio Martins. Análise da produção tecnológica em biotecnologia industrial no Brasil. *Revista Tecnologia e Sociedade*, v. 15, n. 37, 2019.
- DE OLIVEIRA DINIZ, Tamiris; DE LIMA, Mateus Xavier. Biotecnologia ambiental como ferramenta de gestão ambiental – Breve revisão. *Arquivos Eletrônicos Científicos*, v. 9, 2021.
- HERNÁIZ, Maria J. et al. Biotransformações aplicadas em solventes verdes. *Química—A European Journal*, v. 31, pág. 9422-9437, 2010.
- MAZZETTO, Selma Elaine; LOMONACO, Diego; MELE, Giuseppe. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. *Química Nova*, v. 32, pág. 732-741, 2009.
- PHANI KUMAR, P. et al. Processo para isolamento de cardanol do líquido técnico da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Revista de Química Agrícola e Alimentar*, v. 16, pág. 4705-4708, 2002.
- TAKAHASHI, Jacqueline A. et al. Filamentous fungi and chemistry: old friends, new allies. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.
- TYMAN, JHP Fenóis de cadeia longa: VIII. Análise quantitativa dos constituintes insaturados de lipídios fenólicos por cromatografia em camada delgada-espectrometria de massa. *Journal of Chromatography A*, v. 136, n. 2, pág. 289-300, 1977.
- VASIC-RACKI, Durda. History of industrial biotransformations—dreams and realities. *Industrial biotransformations*, p. 1-36, 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UFAM pelo apoio durante a execução do projeto; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Programa de Iniciação Científica (IC) pela bolsa e apoio financeiro; aos laboratórios LABMICRA, LABCEM e LAEQ da Central Analítica – CAM/UFAM e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo incentivo e apoio.