

BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO CAURENÓICO PELO FUNGO *Aspergillus terreus* XV INIC / XI EPG - UNIVAP 2011

Clarissa Resende Grassi de Lima¹, Maria Angélica Gargione Cardoso¹, Janice Rafael Arakawa¹, Suraya Said², Sérgio Ricardo Ambrósio³, Nilton Syogo Arakawa⁴

¹ UNIVAP/Laboratório de Farmacognosia e Imunologia, Av: Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos SP, F: +55 12 3947 1169, clarissa.resende@gmail.com, magcard@univap.br, janirafael@yahoo.com.br

² USP, Av: do Café, s/n, FCFRP, DCF, Ribeirão Preto – SP, F:+55 16 3602 1044, susaid@usp.br

³ UNIFRAN, Av. Armando Salles de Oliveira, 201, Franca-SP, F:+55 0800341212, sergioambrosio@unifran.br

⁴ UEL, /Departamento de Ciências Farmacêuticas, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CCS, DCF, Londrina – PR, F: +55 43 3371 4988, Fax: +55 43 3371 2475, arakawans@uel.br

Resumo- Biotransformação é um processo que visa modificar estruturalmente compostos orgânicos através de reações enzimáticas. Esta tecnologia sustentável, química verde, é realizada em meio aquoso, temperatura ambiente, pH neutro, baixo nível de poluição e modificações químicas difíceis de serem obtidas por reações químicas convencionais. O objetivo do trabalho foi verificar a melhor condição de cultura para a biotransformação do ácido caurenóico (AC) pelo *Aspergillus terreus*. O AC é um composto orgânico extraído da planta *Mikania glomerata*, o guaco, que possui ação antiinflamatória. O AC foi extraído através de Cromatografia em coluna. O fungo *Aspergillus terreus* foi inoculado ao meio líquido Czapeck em duas etapas (pré-fermentativa e fermentativa), sendo o substrato (AC) inoculado na fase fermentativa. Os extratos da cultura foram filtrados, particionados e analisados diariamente, através de cromatografia em camada delgada até a total biotransformação. Os resultados demonstraram que as melhores condições de cultura foram: meio líquido Czapeck, agitação de 120 rpm, 30°C, por 384 horas. O análogo biotransformado será isolado, identificado e avaliado em relação ao aumento ou diminuição do seu potencial antiinflamatório.

Palavras-chave: Biotransformação, Ácido Caurenóico, *Aspergillus terreus*.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde (Farmácia)

Introdução

O gênero *Mikania* compreende cerca de 300 espécies as quais algumas são usadas na medicina popular (AGRA *et al.*, 2007; 2008). Muitos trabalhos demonstram as diversas atividades biológicas atribuídas ao guaco como, atividade anti-alérgica (FIERRO *et al.*, 1999), antimicrobiana (PESSINI *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2003); anti diarreica (SALGADO *et al.*, 2005) e anti-inflamatória das vias aéreas (FALCÃO *et al.*, 2005).

Um dos principais componentes do guaco é o diterpeno Ácido caurenóico (ácido *ent*-caur-16-en-19-óico), conhecido como AC, apresentado na **Figura 1** (DA COSTA, 1996).

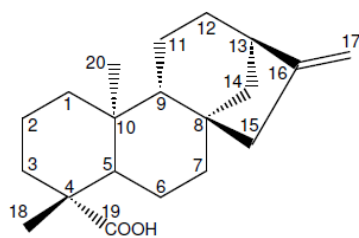


Figura 1: Estrutura do ácido *ent*-caur-16-en-19-óico (ácido caurenóico).

Biotransformação é um processo no qual um composto orgânico é modificado a um produto estruturalmente correlacionado, recuperável, mediado por reações químicas “simples” e catalisadas por enzimas contidas nas células. Neste processo utiliza-se um catalisador biológico com a finalidade de modificar um determinado substrato, envolvendo um número limitado de etapas enzimáticas. (BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1987, CANNEL, 1998, GIRI ET AL., 2001, LIMA & MOTA, 2003).

As biotransformações são preferidas aos processos químicos, pois atualmente existe um forte apelo dos órgãos públicos, principalmente os não-governamentais perante as indústrias e laboratórios de pesquisa, quanto à adequação ao desenvolvimento sustentável. (CHOUDHARY *et al.*, 2005).

As razões para ser considerada uma tecnologia verde, englobam diversos fatores, pois as reações enzimáticas podem ser realizadas em soluções aquosas (possuem baixa eficiência em solventes orgânicos), à temperatura ambiente, pH próximo a neutralidade, sem a necessidade de altas pressões, condições severas e quantidade

significante de energia, polui menos que os solventes orgânicos e metais utilizados nas sínteses químicas e tecnicamente podem ocorrer modificações químicas em vários centros moleculares, inclusive em locais que dificilmente poderiam ser alcançados através da síntese química, além do baixo custo para a implementação de centros de pesquisa (GIRI *et al.*, 2001)

Os resultados obtidos através da biotransformação podem ser utilizados para produzir ou modificar compostos bioativos, visando melhorar drogas antigas, aumentar a sua potência, o tempo de meia vida, estabilidade e diminuir seus efeitos adversos (MIYAZAWA, 2001, HEA *et al.*, 2006).

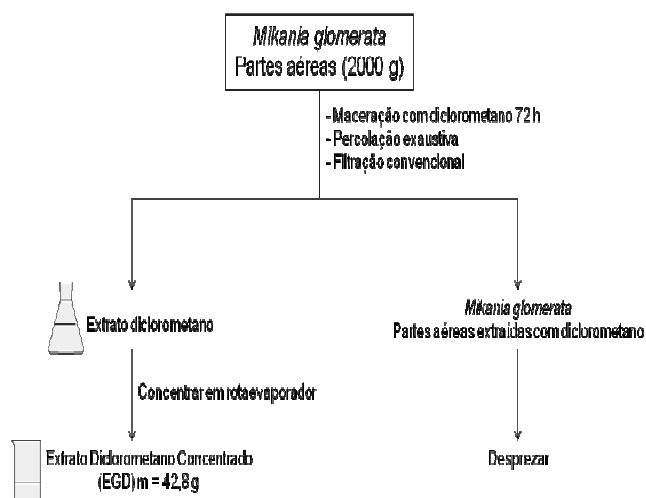
O presente trabalho teve como objetivo geral realizar a biotransformação do Ácido caurenóico (AC) pelo fungo *Aspergillus terreus*, obtendo assim análogo(s) biotransformado(s) para posterior análise da sua ação antiinflamatória em relação ao protótipo AC.

Metodologia

O Ácido caurenóico foi obtido das partes aéreas secas e rasuradas de “Guaco” (*Mikania glomerata* – lote GUA0109VB, colhido em abril de 2008) junto a um fornecedor de plantas medicinais (Nutri-ervas) localizado em São Paulo – Capital, na Rua do Bucolismo no. 144 – Brás, CEP 03008-040.

Realizou-se o processo de maceração do material vegetal, seguido de percolação exaustiva ambas com Diclorometano e posterior filtração convencional. De acordo com o fluxograma abaixo:

Fluxograma 1: Preparo do Extrato Bruto



O extrato de guaco diclorometânico (EGD) foi submetido à partição com metanol e água, e a

fração resultante, submetida à partição com hexano e acetato de etila. A fração hexânica (EGDH) após ser submetida ao rotaevaporador apresentou formação de cristais.

O AC foi obtido através de sucessivas etapas de fracionamento cromatográfico, efetuadas a partir da fração hexânica. Para tal, 11,4 g de EGDH foi submetido à cromatografia líquida a vácuo (CLV; Pelletier *et al.*, 1986) utilizando-se uma coluna de vidro de 9 cm de diâmetro por 16 cm de altura contendo em sua extremidade inferior uma placa sinterizada. Para este procedimento foram utilizados 460 g de sílica gel do tipo 60H (Merck, código 1.07736) com empacotamento a vácuo. A proporção de sílica em relação à quantidade de amostra foi de aproximadamente 40:1 – uma proporção relativamente pequena para uma boa resolução cromatográfica, porém essa primeira coluna era simplesmente para uma separação inicial dos componentes de acordo com o grau de polaridade dos metabólitos. Como fases móveis, foram utilizadas misturas de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade, além do metanol ao final do processo.

As sub-frações obtidas foram então analisadas por Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), composta por sílica gel GF₂₅₄ – Macherey-Nagel, código: 816320.1 e utilizando-se como fase móvel mistura de hexano:acetato de etila na proporção de 8:2 (V/V). O AC foi utilizado como padrão nesse procedimento, permitindo verificar que esse metabólito era o constituinte principal da fração EGDH3.

A manutenção dos fungos, assim como a preparação das culturas e extração dos fluídos destas foram realizados de acordo com Arakawa (2008), com modificações como seguem.

O *Aspergillus terreus*, foi mantido em estoque em meio PDA a 4 °C, posteriormente repicado em meio PDA inclinado e incubado a 30 °C por sete dias para a obtenção de esporos (Arakawa, 2008). Em seguida, os esporos foram coletados em suspensão aquosa por raspagem de pipeta e, após contagem em câmara de Neubauer, estes foram inoculados ao meio de cultivo na concentração de 1.10^7 esporos/mL de meio de cultivo. O meio utilizado para a biotransformação foi o Czapeck, (3,0 % de sacarose, 0,2 % de NaNO₃, 0,1 % de K₂HPO₄, 0,05 % de MgSO₄.7H₂O, 0,05 % de KCl e 0,001 % de FeSO₄.7H₂O) com pH inicial ajustado em cinco (Alviano *et al.*, 1992).

A biotransformação pode ser dividida em duas etapas, a pré-fermentativa e a fermentativa. Na etapa pré-fermentativa, inoculou-se a solução de esporos em dois erlenmeyer com 150 mL de meio líquido cada. As culturas foram incubadas a 30 °C,

sob agitação constante de 120 rpm por 72 horas, tempo necessário para a obtenção de maior quantidade de biomassa, antes de ser submetido ao processo de biotransformação. Em seguida, realizou-se a filtração da biomassa obtida em ambiente asséptico, sendo o fluido da cultura descartado e a biomassa obtida transferida para um meio de cultivo fresco.

Após a transferência, as culturas foram incubadas por mais 24 horas (a 30 °C e 120 rpm) e ao final deste período foi suplementado com a AC (0,2 mg/mL) dissolvida em DMSO (0,2 %), iniciando a etapa fermentativa. O solvente escolhido foi aquele que promove menor interferência sobre a viabilidade celular dos fungos testados (Arakawa, 2008).

As culturas foram re-incubadas nas mesmas condições anteriores e amostras de um mL do meio de cultura de ambos os frascos foram coletadas de 24 em 24 horas, até o período necessário para a detecção do processo de biotransformação do AC.

A análise diária consistiu na retirada, com o auxílio de uma pipeta automática, de um mL do caldo de cada cultura, submetido à partição com o mesmo volume de Acetato de etila (três extrações). A fase orgânica obtida foi concentrada em banho-maria e o microextrato bruto da biotransformação foi então submetido a análises por CCDC utilizando-se como fase móvel mistura de hexano:acetato de etila na proporção de 8:2 (v/v).

Detectada a biotransformação com auxílio de CCDC, realizou-se a ampliação da escala do processo, mantendo as mesmas condições de cultivo, porém com um volume maior de meio líquido, 300 mL em cada erlenmeyer. Para assim, garantir a obtenção de uma quantidade maior do derivado biotransformado.

O caldo resultante da ampliação do processo, depois de detectada a biotransformação por cromatografia em camada delgada comparativa com padrão autêntico de AC foi submetido à filtração à vácuo para dar início aos processos de isolamento do derivado.

Resultados

As condições para obtenção de esporos do fungo *Aspergillus terreus* envolvem o meio de cultura PDA (Potato Agar Dextrose), tempo de incubação por um período de sete dias a 30 °C, de acordo com estudos realizados anteriormente pelo orientador em Arakawa, 2008.

O cultivo do fungo durante as etapas pré-fermentativa e fermentativa envolve as seguintes condições: Meio líquido Czapeck, agitação de 120 rpm à 30°C (Incubadora Shaker).

Observou-se que para o fungo selecionado a idiofase (massa micelial máxima) é atingida após um período de 24 horas, de modo que a adição do substrato utilizado no processo de biotransformação do presente trabalho (ácido caurenóico, 0,2 g/L) foi realizada nessa etapa sempre 1 dia após o desenvolvimento dessas culturas no meio fermentativo.

O tempo para que ocorra a total biotransformação foi de 384 horas, avaliação realizada com análise diária dos microextratos da cultura em CCDC.

Discussão

O meio de cultura Czapeck por ser um meio pobre em nutrientes, ativa o metabolismo do fungo *Aspergillus terreus*, o que conseqüentemente faz com que o substrato inoculado, o ácido caurenóico sofra ação das enzimas fúngicas, sendo assim biotransformado.

O tempo necessário para a massa micelial atingir sua fase estacionária, no meio de cultura fermentativo, é o momento adequado para a adição do substrato AC, devido à ativação das enzimas utilizadas na biossíntese dos metabólitos secundários (Gaden-Júnior, 2000; Elias *et al.*, 2006), sendo assim, esse período foi escolhido para inocular o substrato.

O tempo total de biotransformação, 384 horas, pode ser reduzido, diminuindo a quantidade de fonte de carbono (Sacarose), presente no meio de cultura Czapeck.

Conclusão

Os resultados demonstraram que as melhores condições de cultura foram: meio líquido Czapeck, agitação de 120 rpm, a 30°C, por 384 horas. Após o processo de filtração para a obtenção do extrato da cultura, serão realizados partição e diversos métodos cromatográficos para isolar e identificar o análogo encontrado.

O derivado biotransformado encontrado será submetido à análise comparativa do seu potencial antiinflamatório em relação ao seu protótipo AC, assim poder-se-á contribuir para o entendimento do mecanismo de ação do ácido caurenóico e para o desenvolvimento de novas drogas na farmacologia antiinflamatória, tudo isso através de uma tecnologia sustentável, a biotransformação.

Agradecimentos

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pela bolsa de iniciação científica concedida PIBIC-UNIVAP.

À Prof^a Dr^a Suraya Said (USP- Ribeirão Preto) e ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio (UNIFRAN) pela concessão das linhagens de *A. Terreus*.

Aos professores doutores Nilton Syogo Arakawa (Projeto FAPESP: 2009/10115-4) e Maria Angélica Gargione Cardoso pela dedicada orientação.

Referências

AGRA MF, FRANÇA PF, BARBOSA-FILHO JM 2007. *Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil*. Rev Bras Farmacogn 17: 114-140.

AGRA MF, SILVA KN, BASÍLIO IJLD, FRANÇA PF, BARBOSA-FILHO JM 2008. *Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil*. Rev Bras Farmacogn 18:472-508.

FIERRO IM, SILVA AC, LOPES CD, MOURA RS, BARJA-FIDALGO C. 1999. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. J Ethnopharmacol 66: 19-24.

PESSINI GL, HOLETZ FB, SANCHES NR, CORTEZ DAG, DIAS-FILHO BP, NAKAMURA CV 2003. *Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular*. Rev Bras Farmacogn 13 (Supl. 1): 21-24.

SALGADO HRN, RONCARI AFF, MOREIRA RRD 2005. *Antidiarrhoeal effects of Mikania glomerata Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice*. Rev Bras Farmacogn 15: 205 - 208.

FALCÃO HS, LIMA IO, SANTOS VL, DANTAS HF, DINIZ MFFM, BARBOSA-FILHO JM, BATISTA LM 2005. *Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil*. Rev Bras Farmacogn 15: 381-391.

CANNEL, R.J.P.: *Natural products isolation*. Ed Humana Press Inc., 441, 1998.

BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B.: *Basic biotechnology*, 2nd ed. Academic Press, 228, 1987.

DA COSTA, F.B., VICHNEWSKI, W., HERZ, W. *Constituents of viguiera aspilloides and V. robusta*. Biochem. Syst. Ecol., 24, 6, 585 – 587, 1996.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C.C.; SINGH, A.; WARD, O.P.; NARASU, M.L.: *Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzymes systems: current trends and future prospects*. Biotechnol. Adv., 19, 175 – 199, 2001.

LIMA, N.; MOTA, M.: *Biotechnologia. Fundamentos e aplicações*, Ed. Lidel, 157, 2003.

CHOUDHARY, M.I., GONDAL, H.Y., ABBASKHAN, A., RAHMAN, A. *Microbial transformations of gelomulide G: A member of the rare class of diterpene lactones*. Chem. Biodivers., v. 2, 1401 – 1408, 2005.

MIYAZAWA, M. *Biotransformations of Lignans and Neolignans*. Curr. Org. Chem., 5, 975 – 986, 2001.

ARAKAWA, N.S. *Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de Viguiera robusta Gardn. (Asteraceae)*. 2007. 141 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

GADEN-JUNIOR, E.L. *Fermentation process kinetics*. Biotechnol. Bioeng. 6, 629-635, 2000.