



# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## Biotransformação de Terpenos de Interesse Industrial e Farmacêutico através do Fungo Endofítico *Stemphylium licopersici* e Fungo padrão ATCC *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*

Maíra Barcellos Marini<sup>1</sup>, Maria Sandra Ramos Queiroz<sup>1</sup>, Denise Oliveira Guimarães<sup>2</sup>,  
Bartira Rossi Bergmann<sup>3</sup>, Rodrigo Octávio Mendonça Alves de Souza<sup>4</sup>, Ivana Correa  
Ramos Leal<sup>1</sup> e Michelle Frazão Muzitano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Produtos Naturais e Ensaios Biológicos (LaProNEB) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Faculdade de Farmácia- Caixa Postal 21.944-970. Rio de Janeiro – RJ

<sup>2</sup> Laboratório de Produtos Naturais (LaProN)- Universidade Federal do Rio de Janeiro – Dr. Aluísio Teixeira Campus Macaé- Caixa Postal 27930-560. Macaé- RJ

<sup>3</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho- Universidade Federal do Rio de Janeiro Caixa Postal 21.944-970. Rio de Janeiro – RJ

<sup>4</sup> Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Caixa Postal 21.944-970. Rio de Janeiro – RJ  
E-mail: marini.mb@gmail.com

### RESUMO

*Transformações microbiológicas de estruturas orgânicas são de grande interesse por possuírem vantagens como, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimático oferecido pelo microrganismo. Visando avaliar a capacidade biotransformadora do fungo endofítico *Stemphylium licopersici* e do fungo ATCC *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* foi realizado um estudo de biotransformação utilizando como substrato a (R)-carvona, terpeno de importância industrial e farmacológica que apresentou resultados promissores de redução da viabilidade celular das linhagens tumorais U937 (24,9±1,9%) e SK-MEL (45,0±2,1%) neste estudo. A biotransformação da (R)-carvona pelo *S. licopersici* teve como produto o isodihidrocarveol, com conversão total do substrato, quando avaliado por CG-EM. O fungo *C. echinulata* também foi promissor na biotransformação da (R)-carvona, produzindo um produto ainda desconhecido e a dihidrocarvona. Os resultados são interessantes, no entanto faz-se necessário o estudo de biotransformação utilizando outros terpenos como substrato, além da identificação do produto não conhecido e da confirmação por RMN dos produtos obtidos. E ainda, da avaliação da atividade antitumoral dos produtos de redução frente às linhagens U937 e SK- MEL.*

Palavras-chave:, biotransformação, *Cunninghamella echinulata*, fungos endofíticos, *Stemphylium licopersici*, (R)-carvona, terpenos.

### INTRODUÇÃO

A química verde impulsionou o interesse dos químicos de produtos naturais aos sistemas biológicos vivos com capacidade biotransformadora (Andrei *et al.*, 2003). Dentre os microrganismos com capacidade de biotransformação encontram-se os fungos endofíticos. Estes tem recebido atenção por experimentarem relações simbióticas únicas a longo prazo com suas plantas hospederias, produzindo substâncias bioativas como parte dessa interação (Chandra, 2012 ; Wang & Dai, 2011).

Os terpenos são uma classe química muito importante na produção de aromas naturais e produtos de interesse farmacológico, pela ação antitumoral, dentre outras, além de serem os candidatos favoritos para estudos de biotransformação. São precursores facilmente disponíveis e renováveis. Além de tudo, constituem o maior grupo de produtos naturais,



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

havendo mais de 22 mil estruturas compondo essa classe (Demyttenaere & Kimpe, 2001, Janssens *et al.*, 1992). O objetivo do nosso trabalho é avaliar a atividade citotóxica de terpenos de interesse industrial e farmacêutico, a saber: ácido betulínico (AB), limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, (R) – carvona, triterpinen-4-ol e 1,2,4-trihidroxi mentano, frente às linhagens SK-MEL e U937, ampliando o conhecimento sobre a atividade antitumoral destes. Visa ainda, promover estudos de biotransformação com os terpenos mais promissores na presença do fungo endofítico *Stemphylium licopersici* e do fungo padrão ATCC *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*.

### MATERIAL E MÉTODOS

O perfil citotóxico dos terpenos (SIGMA-ALDRICH) foi avaliado frente a duas linhagens de origem tumoral, a U937 (leucemia de origem mielóide) e a SK-MEL (melanoma humano). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada. No tempo de 48 horas foi avaliada a capacidade dos terpenos em inibir o crescimento celular através do ensaio de MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o ensaio de biotransformação os fungos *Stemphylium licopersici* e *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* (ATCC 8688A) foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA por 7 dias a 30 °C. Após, 3 fragmentos dos micélios crescidos (*plugs* de 0,5 cm de diâmetro) foram adicionados em 5mL de meio pré-fermentativo (10 g de extrato de malte; 10 g de dextrose; 5 g de triptona e 3 g de extrato de levedura para 1L de água destilada, o pH foi ajustado para 6,2 com HCl) e incubados por 3 dias à 150 rpm, 30 °C. Após 3 dias, a massa micelial obtida foi totalmente inoculada em 50 mL de meio fermentativo Czapek modificado (25 g sacarose; 2 g de NaNO<sub>3</sub>; 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g KCl; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e água destilada suficiente para completar 1L) (Borges *et al.*, 2011). Em seguida, foi adicionado ao meio fermentativo o 15,6  $\mu$ L monoterpeneo (R)-carvona (Sigma-Aldrich) como substrato, e as culturas foram incubadas à 30 °C e 150 rpm por um total de 21 dias, tendo sido recolhidas alíquotas a cada 48 horas. As alíquotas (500  $\mu$ L) foram extraídas com acetato de etila e, a partição orgânica obtida, analisada por CG-EM e por CCF.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente, foi avaliada a atividade citotóxica dos monoterpeneos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, limoneno, (R)-carvona, 1,2,4-trihidroxi metano e do triterpeneo ácido betulínico frente às linhagens celulares U937 e SK-MEL. O método utilizado para avaliação da toxidez foi o método de MTT. O ensaio de metabolização do MTT avalia a presença de mitocôndrias viáveis e capazes de reduzir o MTT, levando a formação de cristais púrpura de formazan, que são solubilizados por DMSO. Quanto mais intensa é a coloração púrpura obtida, mais mitocôndrias encontram-se viáveis e mais células encontram-se vivas (Morgan, 1997). Todos os terpenos apresentaram atividade antitumoral maior que 40% frente a linhagem celular SK-MEL, a qual mostrou-se mais sensível aos tratamentos do que a linhagem U937. Porém, de todos os tratamentos, podemos destacar o com o ácido betulínico, que na concentração de 0,0025 mM reduziu a viabilidade celular da SK-MEL em 89,9 $\pm$ 3,1% e, da U937, em 84,0 $\pm$ 4,7%. O monoterpeneo mais ativo foi a (R)-carvona, que apresentou redução da viabilidade celular na menor concentração (0,156 mM) em 24,9 $\pm$ 1,9% e 45,0 $\pm$ 2,1%, frente às linhagens U937 e SK-MEL, respectivamente.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Como o monoterpreno (*R*)-carvona é um substrato comercialmente mais barato do que o ácido betulínico, ele foi escolhido como substrato inicial para avaliação do perfil de biotransformação pelo fungo endofítico *Stemphylium licopersici* e pelo fungo padrão ATCC *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*.

De todas as análises realizadas foi verificado que no tempo de 48 h ocorreu a produção do isodihidrocarveol (Figura 1-C), substância sugerida baseado no perfil de similaridade entre os espectros de massas. Foi observado que na amostra referente ao controle, reunindo apenas o fungo *Stemphylium licopersici*, não foi observada produção de nenhuma substância que possa ser identificada por esse método (Figura 1-B) e, no controle (*R*)-carvona+Czapek (Figura 1-A), não houve degradação do monoterpreno utilizado como substrato. No tempo de 96 h, ainda havia presença do produto, porém, o pico não era tão intenso quanto no tempo de 48 h. Após realização dessas análises, para os experimentos seguintes foi preconizado o tempo de 48 h.

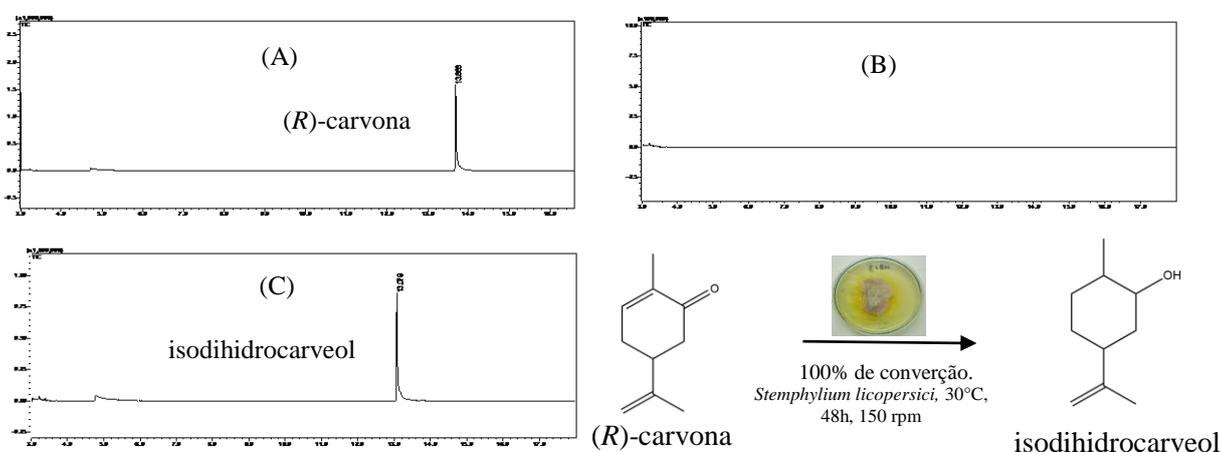
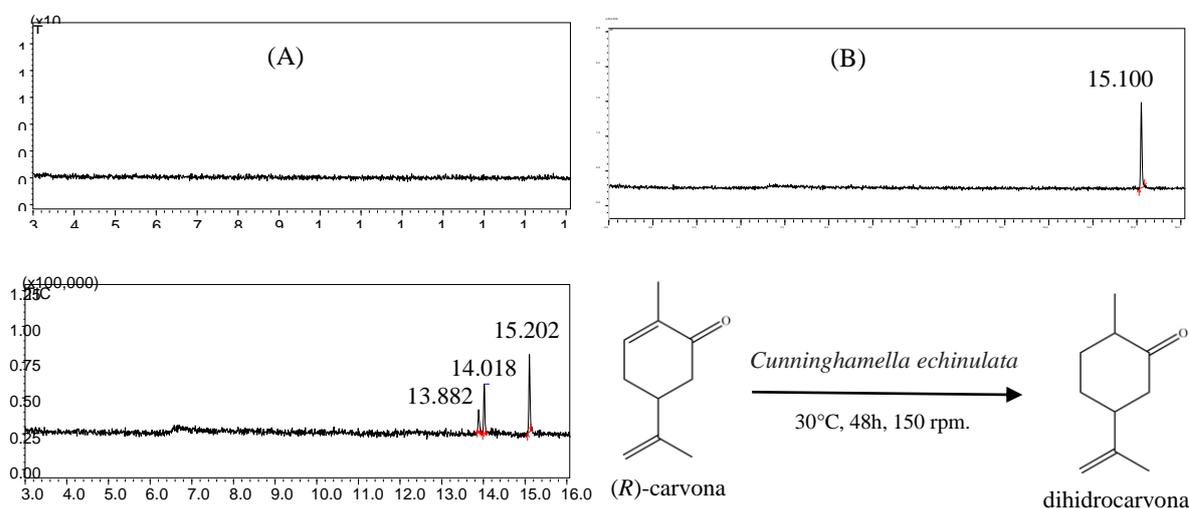


Figura 1: Cromatograma da biotransformação do monoterpreno. (*R*)-carvona pelo fungo endofítico *Stemphylium licopersici* no tempo de 48 h. (A) Czapek + (*R*)-carvona; (B) Czapek + *Stemphylium licopersici*; (C) Czapek + *Stemphylium licopersici*+ (*R*)-carvona.

No ensaio de biotransformação utilizando o fungo *Cunninghamella echinulata*, pôde-se observar a biotransformação da (*R*)-carvona em dois produtos (Figura 2C), um com tempo de retenção de 13,882 min, o qual ainda não foi identificado e, o monoterpreno dihidrocarvona (Figura 2C), com tempo de retenção de 14,02 min, de acordo com a biblioteca NIST e o espectro de massas. Neste caso, a biotransformação da (*R*)-carvona não foi total como observado para o fungo *Stemphylium licopersici* (Figura 1C), pois (*R*)-carvona aparece no cromatograma (Figura 2C) como substrato remanescente no tempo de retenção em 15,10 min.





## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Figura 2: Cromatograma da biotransformação do monoterpreno (*R*)-carvona pelo fungo *Cunninghamella echinulata* no tempo de 48h. (A) Controle Cazpek + *Cunninghamella echinulata*; (B) controle Capek + (*R*)-carvona; (C) Czapek + *Cunninghamella echinulata* + (*R*)-carvona.

### CONCLUSÕES

Os resultados mostram que os monoterprenos possuem atividade citotóxica frente as linhagens SK-MEL e U937, sendo a SK-MEL mais sensível ao tratamento com os terpenos. O ácido betulínico foi o terpeno que apresentou atividade citotóxica mais pronunciada, em ambos os tratamentos. No entanto, as análises do perfil citotóxico precisam ser repetidas para obtenção de resultados com curva de concentração-atividade dos terpenos. Os fungos *Stemphylium licopersici* e *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* foram capazes de biotransformar a (*R*)-carvona em isodihidrocarveol e dihidrocarvona, respectivamente. Os resultados são interessantes, no entanto faz-se necessário o estudo de biotransformação utilizando outros terpenos como substrato, além da identificação do produto não conhecido e da confirmação por RMN dos produtos obtidos. Além disso, faz-se necessária a avaliação da atividade antitumoral, frente à estas mesmas linhagens, dos produtos reacionais obtidos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

#### Journal

Andrei, C.C.; Ferreira, D.T.; Faccione, M. & Faria, T.J. 2003. Biotransformação de substâncias bioativas. Em: Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular. 1ª ed., Editora MANOLE, Brasil.

Chandra. S. 2012. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. Appl Microbiol Biotechnol., v.5(1), p. 47-59.

Demyttenaere, J. & Kimpe, N.D. 2001. Biotransformation of terpenes by fungi Study of the pathways involved. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 11, p. 265–270.

Janssens, L.; De Pooter, H.L.; Schamp, N.M.; Vandamme, E.J. 1992. Production of Flavours by Microorganisms. Process Biochemistry, v. 27, p. 195-215.

Morgan, D. M. L. 1997. Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. Methods in Molecular Biology. v.79, p.179-184.

Shah, S. A.A.; Tan, H.L.; Sultan, S.; Faridz, M.A.B.M.; Mohd Shah, M.A.B.M.; Nurfazilah, S.; Munawar Hussain, M. 2014. Microbial-Catalyzed Biotransformation of Multifunctional Triterpenoids Derived from Phytonutrients. Int. J. Mol. Sci., v. 15, p. 12027-12060.

Simeó, Y. and Sinisterra, J. V. 2009. Biotransformation of Terpenoids: A Green Alternative for Producing Molecules with Pharmacological Activity. Mini-Reviews in Organic Chemistry, v. 6, p. 128-134.