

OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ATRAVÉS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Karina Bora de Oliveira ¹; Brás Heleno de Oliveira ^{2*}

¹Departamento de Farmácia, UFPR, Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba – PR.

²Departamento de Química, UFPR, CP 19081, CEP 81531-990, Curitiba – PR.

*autor para correspondência e-mail: bho@ufpr.br

Recebido em 21/05/2009, Aceito em 12/04/2010

RESUMO: A obtenção de substâncias bioativas através de biocatálise ou biotransformações de substâncias orgânicas tem recebido crescente atenção da indústria farmacêutica. O número de patentes de processos nesta área já é considerável e vários estão em uso pela indústria. Este interesse pela técnica é devido às vantagens inerentes aos processos biocatalíticos tais como utilização de condições brandas e possibilidade de obter produtos difíceis de serem obtidos por métodos químicos. Substâncias orgânicas naturais, especialmente aquelas obtidas de plantas, tem sido utilizadas pela medicina há séculos e muitas ainda utilizadas pela indústria ainda são obtidas exclusivamente de fontes naturais. Para melhorar as propriedades farmacológicas estas substâncias podem ser modificadas estruturalmente. Isto pode ser conseguido utilizando biocatálise. Esta revisão é uma introdução ao tema e tem o objetivo de descrever de modo sucinto os procedimentos utilizados para a biotransformação de produtos naturais bem como mostrar alguns exemplos industriais.

PALAVRAS-CHAVE: Biotransformações, biocatálise, produtos naturais, substâncias bioativas.

ABSTRACT: The production of bioactive compounds by biocatalysis or biotransformations of organic compounds have received increasing attention from the pharmaceutical industry. The number of patents of processes in this area is considerable and many are in use by the industry. This high

interest for the technique is due to the inherent advantages of the biocatalytical processes like mild reaction conditions and the possibility of obtaining products difficult to obtain by chemical procedures. Organic natural compounds, specially those obtained from plants, have been used by medicine for centuries and many are still being used by the industry and obtained exclusively from natural sources. In order to improve the pharmacological properties the structures of those compounds can be modified. This can be achieved using biocatalysis. This review is an introduction to the subject and describes concisely the procedures used for the biotransformation of natural products. A few industrial examples are also shown.

KEYWORDS: Biotransformations, biotacalysis, natural products, bioactives compounds.

INTRODUÇÃO

A história da medicina está intimamente ligada ao uso de plantas medicinais. Um exemplo clássico é o dos glicosídeos cardíacos digitoxina e digoxina presentes em *Digitalis purpurea* (Scrophulariaceae), planta utilizada desde 1785 para tratamento de problemas cardíacos. Outro exemplo, mais recente, é o da vincristina e vimblastina, alcalóides encontrados em *Catharanthus roseus* (Apocinaceae) e utilizados para o tratamento de alguns tipos de câncer (BALICK & COX, 1996).

Assim como ocorre com drogas sintéticas, durante o desenvolvimento de novos produtos, nem sempre a substância original possui as características ideais para a finalidade a que se destina. Alguns parâmetros farmacológicos e/ou farmacotécnicos podem exigir a modificação estrutural da substância de modo a otimizar aqueles parâmetros. Isso tem ocorrido, por exemplo, com os antibióticos β -lactâmicos. Devido principalmente ao uso inadequado microorganismos tem desenvolvido resistência às penicilinas o que tem exigido a obtenção de

derivados ativos contra as cepas resistentes. Desta forma surgiram as penicilinas semi-sintéticas obtidas através de modificação estrutural das naturais.

A obtenção de derivados de substâncias bioativas é normalmente feita de maneira economicamente viável através de reações orgânicas. Em alguns casos, entretanto, os métodos químicos clássicos podem não ser os mais adequados ou mesmo viáveis. Nessas situações o uso de métodos biocatalíticos podem ser vantajosos e até mesmo únicos.

BIOTRANSFORMAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS: CONCEITO E FUNDAMENTOS

Biotransformações de substâncias orgânicas, ou biocatálise em química orgânica, pode ser entendida como o uso de catálise enzimática para realizar pequeno número de modificações em substâncias orgânicas. Geralmente apenas uma reação química está envolvida (figura 1). O processo é diferente da fermentação comum em que determinada substância é completamente sintetizada por determinado microorganismo através das

diversas rotas metabólicas do microorganismo envolvido.

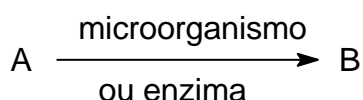


Figura 1 – Representação simplificada de uma reação orgânica biocatalítica.

A base teórica da utilização de biocatálise em transformações orgânicas é a grande diversidade e número de enzimas disponíveis na natureza. A análise do mapa metabólico evidencia uma extraordinária variedade de tipos de reações catalisada por enzimas. Estas vão desde reações de hidrólise até as que resultam na formação de ligações C-C (e.g. condensações aldólicas). É interessante observar que enzimas de mamíferos tem equivalentes em microorganismos. Isto ocorre, por exemplo, com um grupo de enzimas chamadas coletivamente de citocromo P450. Essas enzimas são muito importantes em mamíferos pois estão envolvidas em processos de detoxificação. Elas catalisam a oxidação de seus substratos, aumentando a polaridade das moléculas e, assim, facilitando a excreção. Ocorre que vários microorganismos realizam oxidação de substratos de maneira análoga às realizadas em mamíferos (AZERAD, 1999). Isto significa que enzimas equivalentes evoluíram de maneira semelhante em organismos completamente diferentes. Esta diversidade e flexibilidade da ação enzimática é que permite a utilização de biocatálise na modificação de compostos orgânicos. Dessa forma, em princípio, seria possível encontrar enzimas para catalisar a maioria das reações

químicas orgânicas. As vantagens e desvantagens do processo irão determinar a viabilidade de cada caso específico.

O uso de biocatálise para modificações de moléculas orgânicas tem várias vantagens. As condições reacionais são suaves, não são produzidos rejeitos industriais tóxicos e as reações são específicas. Dentre as desvantagens podem ser citadas a perda de atividade enzimática com o tempo, custos mais altos assim como as maiores dificuldades no desenvolvimento de processos envolvendo microorganismos em cultivo. Entretanto, em muitos casos, as vantagens predominam e tem levado a indústria químico-farmacêutica a desenvolver processos biocatalíticos para a obtenção de substâncias bioativas. Este assunto tem despertado o interesse não apenas acadêmico mas também industrial. Esse interesse é evidenciado pelo crescente número de publicações em periódicos e livros, bem como o de patentes. Para maior aprofundamento no tema o leitor poderá consultar livros (FABER, 2004; LIESE et al., 2006) ou artigos de revisão (DAVIS & BORER, 2001; STRAATHOF et al., 2002; TAO & XU, 2009). Outros exemplos de biotransformações envolvendo produtos naturais, tais como paclitaxel (Taxol), antibióticos β -lactâmicos, estatinas e eptilonas podem ser encontrados em um capítulo de livro publicado recentemente (OLIVEIRA, 2009).

PROCEDIMENTOS

A biotransformação de determinada substância orgânica pode ser feita com enzima isolada ou com um microorganismo que a

contem. Em ambos os casos inicialmente é feita uma triagem em pequena escala para avaliar as enzimas e/ou microorganismos disponíveis (figura 2) (OLIVEIRA, 2009). A substância que se quer modificar é colocada em contato com a enzima ou o microorganismo e, depois de algum tempo, a mistura reacional é avaliada por métodos cromatográficos. Quando o resultado é

positivo as condições podem ser otimizadas para aumento de rendimento e, posteriormente, o processo pode ser escalonado com vistas a produção comercial do derivado. Esta é uma área multidisciplinar envolvendo desde técnicas microbiológicas até análises cromatográficas e identificação espectrométrica dos produtos formados.

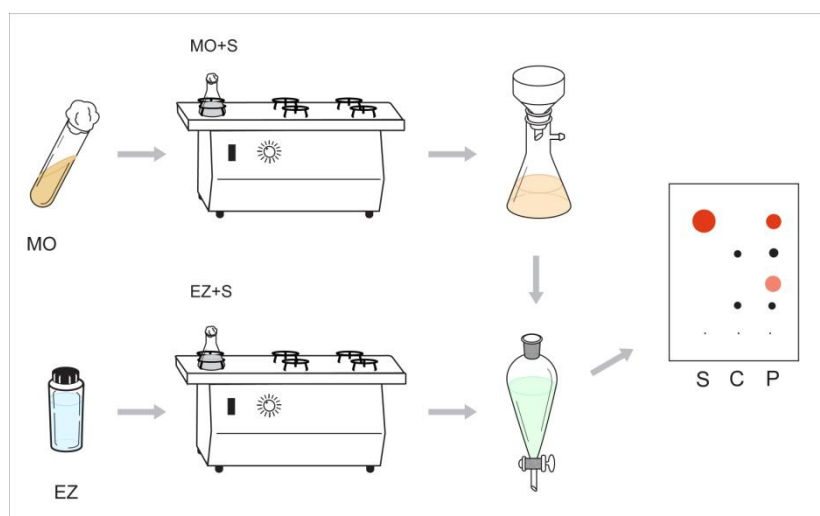


Figura 2 – triagem de biocatalisador utilizando microorganismo (MO) ou enzima (EZ). S=substrato; C=controle; P=produto bruto (OLIVEIRA, 2009).

EXEMPLOS

Descrevemos abaixo alguns exemplos de obtenção de importantes substâncias bioativas. Os primeiros, além de ainda serem processos industriais em uso, tem importância histórica pois foram desenvolvidos há várias décadas. Os últimos são exemplos mais recentes e servem para mostrar que a indústria químico-farmacêutica continua investindo grandes esforços na obtenção de drogas através de biocatálise.

ESTERÓIDES

Biotransformações envolvendo esteróides são frequentemente descritos devido à importância histórica, industrial e medicinal. Eles são utilizados, por exemplo, como anti-inflamatórios e como anticoncepcionais femininos. No início do desenvolvimento da indústria dos esteróides o desafio para produzir a cortisona (3) a partir da progesterona (1) era funcionalizar o C-11 do núcleo esteroidal. Apesar de poder ser feita por métodos químicos, esta funcionalização requeria várias etapas e produzia baixos rendimentos com altos custos. A mesma funcionalização, através da hidroxilação do C-

11 (2) , foi conseguida através de biotransformação utilizando o fungo filamentoso *Rhizopus arrhizus* (figura 3). Dessa forma foi possível a produção em larga

escala da cortisona (3) e o método se converteu num importante processo industrial que foi patenteado em 1952 (MURRAY & PETERSON, 1952).

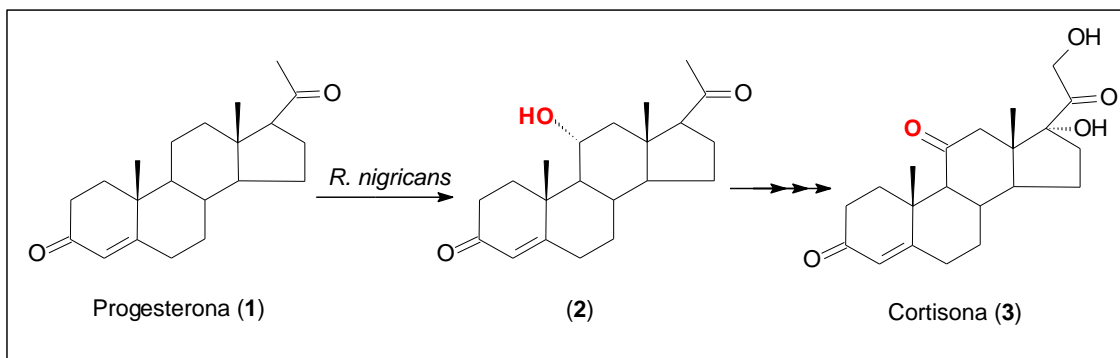


Figura 3 – rota sintética simplificada da obtenção da cortisona ressaltando a etapa crítica de funcionalização do C-11 da progesterona.

As matérias-primas para produção de esteróides são obtidas de fontes naturais. Uma das mais importantes é a diosgenina, que pode ser obtida à partir das raízes de algumas espécies de Dioscoreaceae. Outras classes de substâncias naturais também são utilizadas para esta finalidade. Uma delas é a dos esteróis, como o β -sitosterol (4) , encontrado na fração insaponificável de óleos vegetais. Para serem utilizados como intermediários para síntese de esteróides é necessário remover a cadeia lateral ligada ao C-17. Um exemplo deste procedimento foi o da biotransformação de β -sitosterol (4) em androstadiendiona (5) (OLIVEIRA & BUENO,

1996), um intermediário importante na indústria de esteróides. Neste caso uma série de reações oxidativas levou à degradação da cadeia lateral do β -sitosterol (figura 4). Alguns processos industriais utilizam o mesmo princípio (KUTNEY et al., 2000). Os bem-sucedidos processos desenvolvidos para a indústria dos esteróides resultou num significativo volume de dados sobre modificação microbológica desta classe de compostos (MAHATO & GARAI, 1997). Graças a estes trabalhos hoje é possível hidroxilar biocataliticamente várias posições do esqueleto carbônico esteroidal utilizando microorganismos adequados.

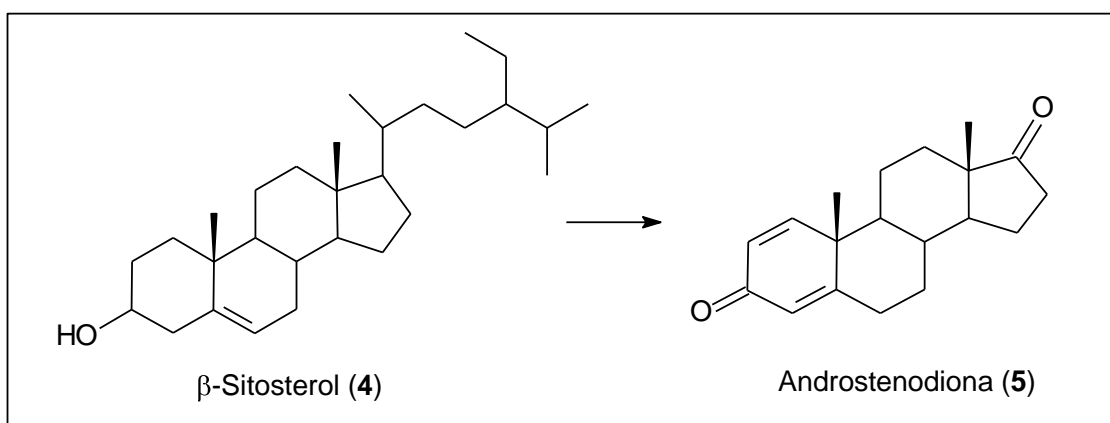


Figura 4 – Exemplo de biocatálise utilizando microorganismo isolado de solo, para a transformação do β -sitosterol em adrostadiendiona.

EFEDRINA

A efedrina (9) é um alcalóide encontrado em várias espécies de *Ephedra* (Ephedraceae) (ABOURASHED et al., 2003). Ela é utilizada para o controle dos sintomas da asma e da febre do feno. Apesar de ser encontrada em várias plantas a droga é comercialmente obtida por via sintética sendo um dos exemplos mais antigos envolvendo

biocatálise orgânica. O fenilacetilcarbinol (8), intermediário-chave da rota sintética, é obtido pela reação do benzaldeído com ácido pirúvico (7) catalisada pela piruvato descarboxilase (figura 5). Este é um bom exemplo do uso de biocatálise para a formação de ligação C-C. Vários microorganismos possuem esta enzima e alguns processo já foram patenteados com esta finalidade (TRIPATHI et al., 1997).

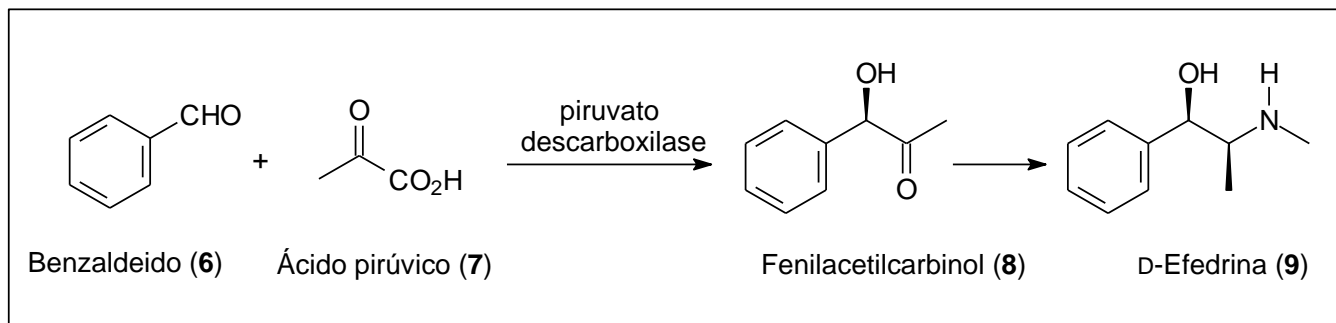


Figura 5 – Síntese da efedrina utilizando o intermediário fenilacetilcarbinol, obtido da condensação do benzaldeído com ácido pirúvico catalisada pela piruvato descarboxilase.

ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (vitamina C, 14) é uma substância natural encontrada em várias plantas. Ela é amplamente utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos devido às suas propriedades anti-oxidantes. A rota sintética envolve uma etapa de oxidação seletiva de uma das hidroxilas do D-sorbitol

(11) levando à L-sorbose (12) (figura 6). Esta etapa crítica é catalisada pelo *Gluconobacter oxydans*, constituindo ótimo exemplo de reação oxidativa regioseletiva difícil de ser realizada com oxidantes comuns. Este processo foi desenvolvido e patentado por Tadeus Reichstein em 1941 e hoje leva seu nome (REICHSTEIN, 1941).

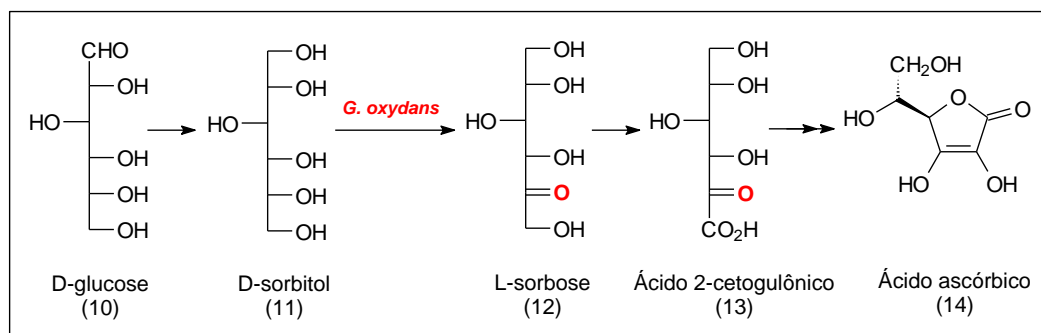


Figura 6 – Rota sintética do ácido ascórbico evidenciando a etapa crítica de conversão do sorbitol em sorbose catalisada pelo *Gluconobacter oxydans*.

MIGLITOL

O miglitol (18) é um pseudo-monossacarídeo inibidor da α -glicosidase utilizado para o tratamento da diabetes tipo 2 (SCOTT & SPENCER, 2000). Ele pode ser obtido a partir da 1-deoxinojirimicina (17), também um inibidor da α -glicosidase, encontrada em folhas de amoreira (*Morus alba* e *Morus bombycis*). A 1-deoxinojirimicina é produzida industrialmente por via sintética

similar a da obtenção da vitamina C. Também neste caso a etapa crítica envolve a oxidação regioseletiva de uma das hidroxilas do 1-aminosorbitol (15) pelo *G. oxydans* (figura 7) (KINAST & SCHEDEL, 1981). Este exemplo mostra que o mesmo microorganismo pode ser usado para a obtenção de substâncias diferentes. A enzima envolvida, portanto, é capaz de aceitar pequenas modificações na molécula do sorbitol e realizar a oxidação desejada.

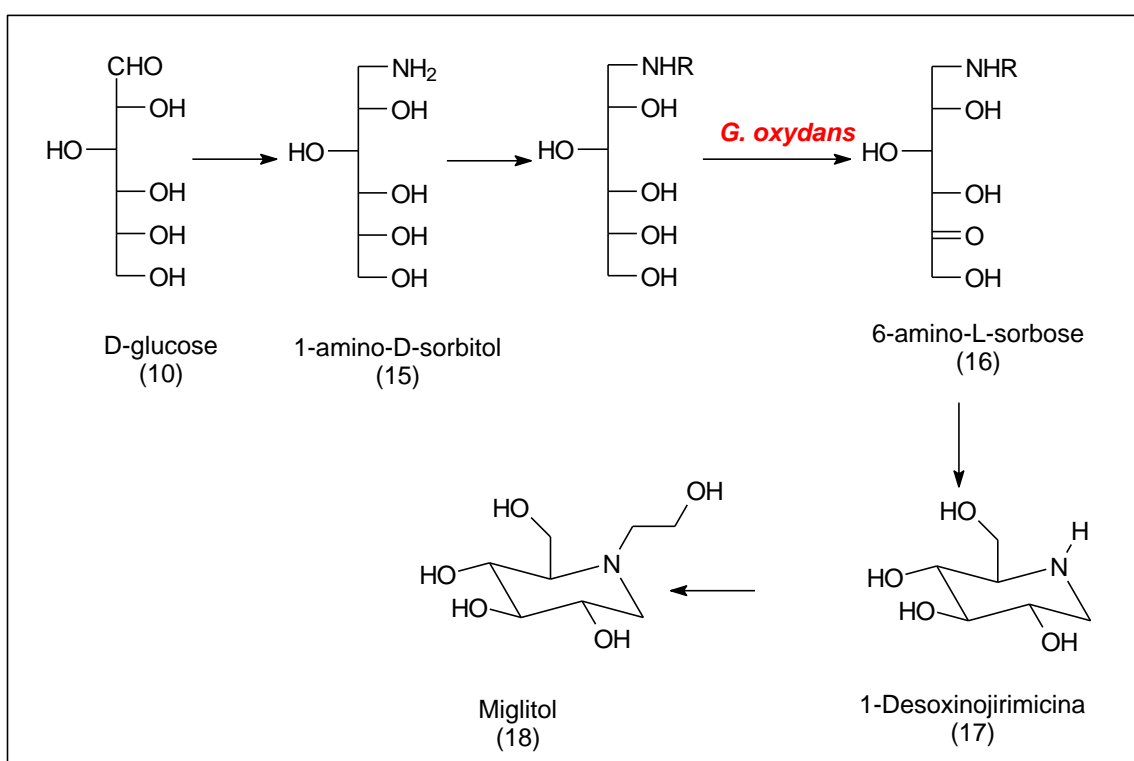


Figura 7 – Rota sintética do miglitol, similar à do ácido ascórbico. A etapa crítica de conversão do 1-aminosorbitol em 1-aminosorbose catalisada pelo *G. oxydans*.

ÁLCOOL PERÍLICO

O álcool perílico (22) é um monoterpênóide encontrado no óleo essencial de *Perilla frutescens* (FUJITA & NAKAYAMA, 1992) e também em outras plantas. Ele tem sido estudado com relação a atividade contra alguns tipos de câncer como, por exemplo, o câncer pancreático (MATOS et al., 2008). Essa importante propriedade tem despertado o

interesse na sua obtenção por métodos semi-sintéticos. Devido à semelhança estrutural com o limoneno (21), este monoterpeno tem sido utilizado como matéria-prima para a obtenção do álcool perílico (22). O limoneno é o principal constituinte do óleo da casca da laranja e o Brasil é o maior produtor mundial desta substância. A oxidação regioseletiva, necessária para a obtenção do álcool, é difícil de ser realizada por via química. Por este

motivo procedimentos biocatalíticos já foram desenvolvidos. Num dos relatos o limoneno foi convertido no álcool perílico pelo *Fusarium verticilloides* (figura 8) (DE OLIVEIRA & STRAPASSON, 2000). Esse grande interesse pela substância tem levado ao desenvolvimento de processos para sua

obtenção em larga escala. Um interessante processo biocatalítico, descrito em uma patente, descreve a obtenção do álcool perílico a partir do limoneno, em altas temperaturas (55-70 °C), utilizando o microorganismo termofílico *Bacillus stearothermophilus* (ORIEL & CHANG, 1996)

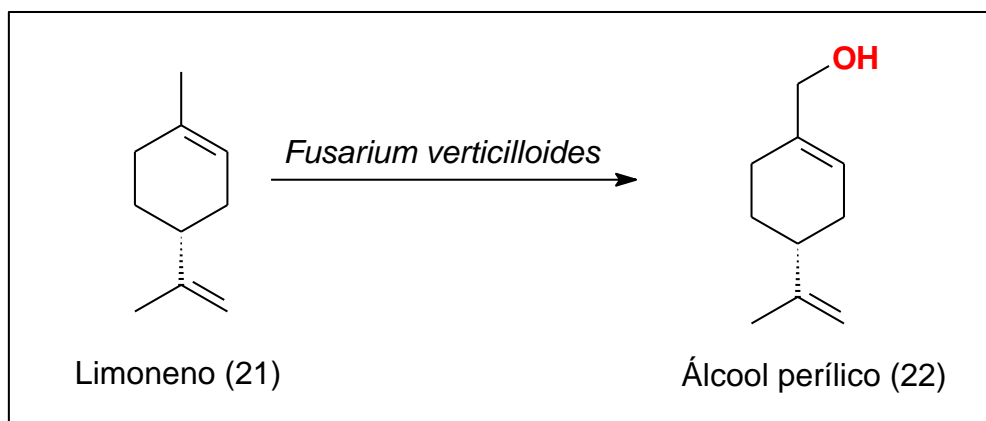


Figura 8 – Obtenção do álcool perílico pela hidroxilação do limoneno catalisada por uma monooxigenase do *Fusarium verticilloides*.

COLCHICINÓIDES

A colchicina (23) é um alcalóide encontrado em *Colchicum autumnale* (Liliaceae) e outras plantas do gênero. Ela é uma substância com propriedades anti-inflamatórias utilizada para o tratamento das dores articulares provocadas pela gota. Além disso ela atua também como agente anti-

mitótico e, por isso, derivados tem sido preparados e testados para utilização como antitumorais. Um dos processos descritos para obtenção de derivados envolve a glicosilação da molécula em C-3 (figura 9). A reação, catalisada por uma glicosiltransferase, foi realizada com o *Bacillus megaterium* (BOMBARDELLI et al., 2002).

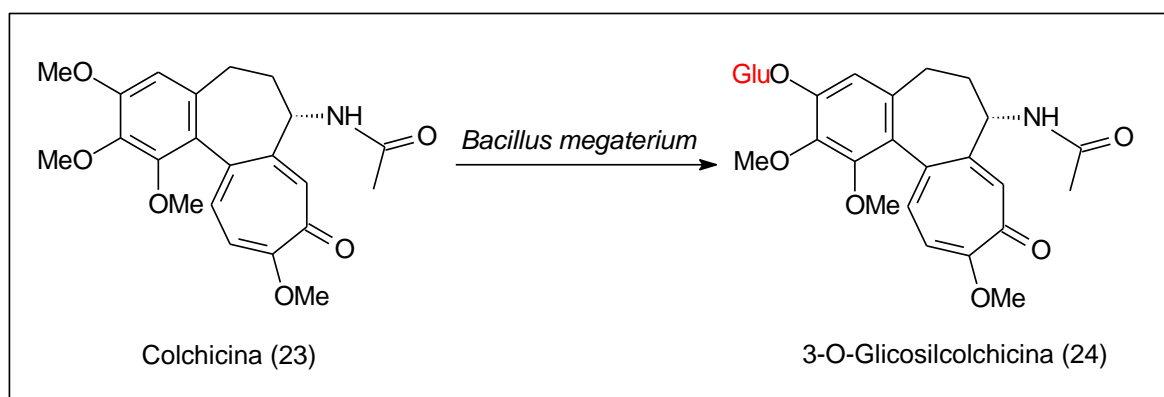


Figura 9 – Obtenção de derivado glicosilado da colchicina catalisado por uma glicosiltransferase de *Bacillus megaterium* (Glu= glucose).

ISOFLAVONAS

Isoflavonas são substâncias naturais com esqueleto carbônico do tipo 3-fenil- γ -cromona (ao invés de 2-fenil- γ -cromona das flavonas). Elas são encontradas em várias plantas, principalmente as leguminosas, onde ocorrem também na forma de glicosídeos. Isoflavonas são também denominadas fitoestrógenos devido à semelhança estrutural com os estrógenos. Por isso elas são utilizadas como alternativa na terapia de reposição hormonal feminina. Isoflavonas são obtidas comercialmente de fontes naturais, principalmente da soja.

As agliconas são melhor absorvidas do que os respectivos glicosídeos. Em pacientes com flora intestinal regular estes glicosídeos são hidrolisado por enzimas da microflora. Quando a flora intestinal está alterada a absorção dos glicosídeos de isoflavonas é

prejudicado. Portanto, para melhorar a biodisponibilidade, é conveniente administrar estas substâncias na forma de agliconas. Para remover a unidade de açúcar dos glicosídeos de isoflavonas é possível usar métodos químicos. Entretanto as condições normalmente utilizadas podem gerar subprodutos resultantes do ataque ao anel cromona. Uma alternativa usada comercialmente é a do uso de enzimas hidrolíticas para realizar a reação. Vários processos já foram descritos para esta finalidade. Num deles o extrato bruto contendo glicosídeos de isoflavonas são submetidos à ação de esterase e glicosidase levando à obtenção das agliconas correspondentes (SHEN & BRYAN, 2000). O processo pode ser exemplificado pela hidrólise da daidzina (25) produzindo a aglicona correspondente, a daidzeina (26) (figura 10).

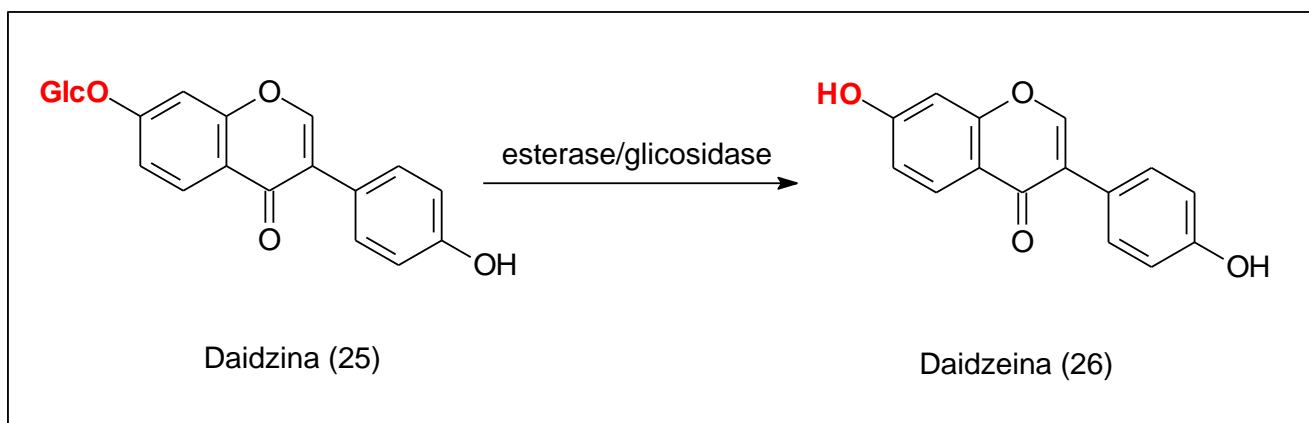


Figura 10 – Obtenção da daidzeina através da hidrólise da daidzina catalisada por uma esterase e/ou glicosidase.

CONCLUSÕES

Os exemplos mostrados nesta revisão, tanto os mais antigos quanto os mais

recentes, mostram que o uso de biocatálise ou biotransformações continua em franco progresso na indústria farmacêutica. É importante ressaltar que o caráter multidisciplinar dos procedimentos envolvidos

é adequado ao profissional da Farmácia, cuja formação engloba as técnicas necessárias desde a fase de seleção de biocatalisador até o desenvolvimento de processos. Este tema, portanto, deveria ter sua inclusão incentivada nos cursos de Farmácia do país.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES pelo apoio financeiro e ao Tiago de Lima Oliveira pela criação das figuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOURASHED, E. A. et al. Ephedra in perspective - a current review. *Phytotherapy Research*. v. 17, p. 703-712, 2003.
2. AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. In TH. SCHEPER. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.
3. BALICK, M.J.; COX, P.A. *Plants, People, and Culture*. New York: Scientific American Library, 1996.
4. BOMBARDELLI, E.; PONZONE, C.; BOMBARDELLI, E. New biotransformation of colchicine derivatives to anti-tumor 3-O-glycosylcolchicine compounds. US6372458-B1, 2002.
5. DAVIS, B. G.; BORER, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Natural Product Reports*. v. 18, p. 618-640, 2001.
6. DE OLIVEIRA, B. H.; STRAPASSON, R.A. Biotransformation of the monoterpene, limonene, by *Fusarium verticilloides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 43, p. 11-14, 2000.
7. FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry - A Textbook*. New York: Springer-Verlag, 2004.
8. FUJITA, T.; NAKAYAMA, M. Perilloside A, A Monoterpene Glucoside from *Perilla-frutescens*. *Phytochemistry*. v. 31, p. 3265-3267, 1992.
9. KINAST, G.; SCHEDEL, M. 6-Amino-6-desoxy-L-sorbose prodn. - by microbial conversion of 6-desoxy-D-glucitol. US4246345-A, 1981.
10. KUTNEY, J. P.; MILANOVA, R. K.; VASSILEV, C. D.; STEFANOV, S. S.; NEDELICHEVA, N., V; KUTNEY, P.; MILANOVA, K. High yield microbial conversion of phytosterol to androstadienedione and androstenedione, in presence of solubilizer, e.g. silicone. US6071714-A; 2000.
11. LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. *Industrial Biotransformations*. New York: Wiley-VCH, 2006.
12. MAHATO, S. B.; GARAI, S. Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids*. v. 62, p. 332-345, 1997.
13. MATOS, J. M. et al. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Research*. v. 147, p. 194-199, 2008.

De Oliveira, K. B. De Oliveira, B. H. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. IX (1) 89 – 99, 2012.

14. MURRAY, H. C.; PETERSON, D. H. Oxygenation of steroids by Mucorales fungi. US2,602,769, 1952.
15. OLIVEIRA, B.H. Obtenção de novos fármacos através da biotransformação de produtos naturais. In R.S.YUNES; V.CECHINEL FILHO. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: UNIVALI, 2009.
16. OLIVEIRA, B. H.; BUENO, D.D. Biotransformação de Esteróis. Química Nova. v. 19, p. 233-236, 1996.
17. ORIEL, P. J.; CHANG, H. C. Prodn. of perillyl cpds. such as perillyl alcohol, perillyl aldehyde and alpha-terpineol from limonene - using a Bacillus stearothermophilus strain. US5487988-A, 1996.
18. REICHSTEIN, T. Process for the manufacture of levoascorbic acid. US2,265,121, 1941.
19. SCOTT, L. J.; SPENCER, C.M. Miglitol - A review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. Drugs. v. 59, p. 521-549, 2000.
20. SHEN, J. L.; BRYAN, B. A. Prodn. of aglucone isoflavone enriched extract - by reacting a vegetable protein extract with a beta-glucosidase or esterase to convert glucone isoflavone(s). US6015785-A, 2000.
21. STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. Current Opinion In Biotechnology. v. 13, p. 548-556, 2002.
22. TAO, J. H.; XU, J.H. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. Current Opinion In Chemical Biology. v. 13, p. 43-50, 2009.
23. TRIPATHI, C. M.; AGARWAL, S.C.; BASU, S.K. Production of L-phenylacetylcarbinol by fermentation. Journal Of Fermentation And Bioengineering. v. 84, p. 487-492, 1997.