



Revista Eletrônica de Farmácia Vol 2 (1), 1-5, 2005.  
ISSN 1808-0804

## BIOTRANSFORMAÇÃO DO 1,8-CINEOL POR BACTÉRIAS LIVRES E IMOBILIZADAS

*Biotransformation of the 1,8-cineole for free and immobilized bacteria*

Ludimila P. Almeida<sup>1</sup>, Pedro H. Ferri<sup>2</sup>, José R. Paula<sup>3</sup>, Mariângela F. Santiago<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de graduação em Farmácia e bolsista de IC/PIBIC-CNPq

<sup>2</sup> Prof. Adjunto do Instituto de Química - Universidade Federal de Goiás

<sup>3</sup> Prof. Adjunto da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás

<sup>4</sup> Prof<sup>a</sup>. Adjunta da Faculdade de Farmácia e Orientadora - Universidade Federal de Goiás

\*Autor para correspondência: e-mail: mfs@farmácia.ufg.br

**Recebido em 27/10/2004 - aceito em 28/06/2005**

**RESUMO:** O óleo essencial das folhas dessecadas de *Eucalyptus microcorys* F. Muller coletadas em Silvânia-GO, possuem 87% do monoterpenóide 1,8-cineol. Este monoterpeno é um dos principais compostos do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* Labill de grande interesse para as indústrias, principalmente as de perfumaria, alimentos e farmacêutica. O objetivo do trabalho foi a hidroxilação do 1,8-cineol por bactérias livres e immobilizadas. A hidroxilação da molécula do 1,8-cineol é importante para obtenção de novos aromas. O óleo essencial de *Eucalyptus microcorys* também apresentou inibição sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e a hidroxilação da molécula do 1,8-cineol pode aumentar esta atividade. Neste trabalho utilizou-se as bactérias *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas fluorescense*. Entretanto a *Pseudomonas putida* foi a que apresentou melhor resultado na biotransformação do 1,8-cineol. O meio MMB utilizado para biotransformação foi desenvolvido com a seguinte composição: 0,5g de glicose, 0,2g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de MgSO<sub>4</sub>, quantidade traços de Fe, B, Mn, Zn, Cu e Mo em 100 mL de água destilada. Após 60-65 horas a 30°C, pH 6,5 e 180 rpm adicionou-se 100 µL do 1,8-cineol no meio MMB sendo mantido nas mesmas condições de temperatura, pH e agitação, por períodos de 48-120 horas. O solvente que mostrou mais eficiente para extração do 1,8-cineol foi o acetato de etila. O revelador para o composto 1,8-cineol na cromatografia de camada delgada foi a vanilina sulfúrica constituída por uma solução de 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 45 mL de etanol, 1g de vanilina e 10 mL de água destilada. A fase móvel usada na cromatografia foi hexano/acetato de etila (75:25). Os resultados da biotransformação foram investigados através da técnica de CG/EM. A bactéria *Pseudomonas putida* conseguiu transformar o substrato 1,8-cineol em dois novos compostos: hexo-2-hidroxicineol e o 1-hidroxi-p-ment-3-ona.

**PALAVRAS-CHAVE:** 1,8 - Cineol, biotransformação, bactérias, imobilização

**ABSTRACT:** The essential oil of leaves of the *Eucalyptus microcorys* F. Muller collected in Silvânia-GO, possesses 87% of 1,8-cineole. This monoterpene is one of the main composed of the essential oils of *Eucalyptus globulus* Labill and they are of great interest for the industries, mainly the perfumeries, food and pharmaceutical. The objective of this work was the hydroxylation of 1,8-cineole for free and immobilized bacteria. The hidroxilation of the molecule of 1,8-cineole is important for obtaining new aromas. The essential oil of *Eucalyptus microcorys* also presented inhibition on the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and the hydroxylation of the molecule of 1,8-cineole can increase this activity antibacterial. In this work it was tested the *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii* and *Pseudomonas*

*fluorescence* bacterias. However the *Pseudomonas putida* went to that presented a significant result and facilitated the biotransformation of the composition 1,8-cineole. The main culture used for biotransformation (MMB) was: 0,5g of glucose, 0,2g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g of MgSO<sub>4</sub>, amount lines of Fe, B, Mn, Zn, Cu and Mo in 100 mL of distilled water. After 60-65 hours to 30°C, pH 6,5 and 180 rpm 100 µL the 1,8-cineole was added in main MMB and was maintained at the same temperature conditions, pH and agitation, for periods of 48-120 hours. The solvent that showed more efficient for extraction of 1,8-cineole was the ethyl acetate. The ideal revelator for the composition 1,8-cineole at thin layer chromatography was a solution of 10 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrated, 45 mL ethanol, 1g of vanillin and 10 mL of distilled water. The mobile phase used at the chromatography was 1:3 of ethyl/hexano acetate. The results of biotransformation were investigated through the technique of GC/MS. The bacteria *Pseudomonas putida* got transform the substratum 1,8-cineole in two new composed: exo-2-hydroxycineole and the 1-hydroxy-p-menth-3-one.

**KEYWORDS:** 1,8 – Cineole, biotransformation, bacterias, imobilization

## INTRODUÇÃO

O emprego de microrganismos inteiros (bactérias, algas ou fungos filamentosos) é uma alternativa para a fonte de atividade enzimática capaz de metabolizar um substrato orgânico em presença de um meio de cultura ou num ambiente compatível (HOLLAND,1981; LIZUKA & NAITO,1981; SEBEK,1983; SERVI,1990; CSUK & GLÄNZER, 1991; SERVI,1992).

As bactérias *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescece* e *Azotobacter vinelandii* possuem monoxigenases e geralmente seu ciclo catalítico é dependente de ferro, a maioria dos quais pertencentes ao citocromo P-450 que têm sido largamente estudados e utilizados em reações de oxigenação. As monoxigenases podem realizar uma rede e um número de reações de oxigenação que são úteis para síntese de novos compostos (FABER, 1997).

O citocromo P-450 da *Pseudomonas putida* que naturalmente catalisa a reação de oxidação da cânfora (MARK *et al*,2000), pode ser utilizado para catalisar reações de oxidação utilizando outros substratos aromáticos como por exemplo o 1,8-cineol. Os mecanismos dessas reações não são totalmente entendidos e as enzimas envolvidas são pouco caracterizadas apesar das reações serem estáveis (MARK *et al.*, 2000).

O uso de gel é um dos mais simples métodos de imobilização proporcionando a imobilização em suaves condições para provocar o mínimo de alterações aos biocatalisadores durante o processo (BUSTO, 1998). Ele é utilizado para melhorar os rendimentos das biotransformações, como a imobilização de células viáveis em gel de alginato, que é uma técnica extensamente utilizada. Tal imobilização de célula foi utilizada desde os anos cinqüenta e é explorado hoje em dia para aplicações industriais nos campos agrícolas e farmacêuticos (ADAM *et al*, 2001).

Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas para várias indústrias, notadamente as de perfumaria, alimentos e farmacêuticas (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993). O óleo essencial das folhas dessecadas de *Eucalyptus microcorys* F. Muller coletadas em Silvânia-GO, possuem 87% do monoterpenóide 1,8-cineol (ESTANISLAU *et al.*, 2001). Este monoterpeno é um dos principais compostos do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* Labill de grande interesse para as indústrias. O objetivo do trabalho foi a hidroxilação do 1,8-cineol por bactérias livres e imobilizadas. A hidroxilação da molécula do 1,8-cineol é importante para obtenção de novos aromas. O óleo essencial de *Eucalyptus microcorys* também apresentou inibição sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e a hidroxilação da molécula do 1,8-cineol pode aumentar esta atividade. Portanto, a funcionalização desta molécula pode conduzir a formação de um novo derivado que é de grande interesse nos processos industriais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Microrganismos

Utilizaram-se as bactérias *Pseudomonas putida* (CCT 0548T) da coleção da Fundação Tropical André Tosello, Campinas, SP; *Azotobacter vinelandii* 1218 da coleção da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Piracicaba, SP e *Pseudomonas fluorescece* 2312 do Instituto Biológico de São Paulo, SP.

### Substrato

1,8-cineol (eucaliptol), marca Sigma, Lote 120K2615.

### Meio de cultura usado para biotransformação (MMB)

Foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia/UFMG com a seguinte composição: 0,5g de glicose, 0,2g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,4g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,6g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g de  $\text{MgSO}_4$ , quantidade traços de Fe, B, Mn, Zn, Cu e Mo em 100 ml de água destilada. Após 60-65 horas a  $30^\circ\text{C}$ , pH 6,5 e 180 rpm adicionou-se 100  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  e 1000  $\mu\text{l}$  do 1,8-cineol no meio MMB e foi mantido nas mesmas condições de temperatura, pH e agitação, por períodos de 48-120 horas.

### Imobilização das bactérias

A imobilização da *P. putida* foi com alginato de sódio 1% em suspensão na solução de cloreto de cálcio a 1% e glicose a 10 %. A imobilização da *A. vinelandii* também foi realizada após seu crescimento no meio mínimo (MMB). Colocou-se cada bactéria em meio com 0,5 g alginato de sódio e 50 ml de água destilada, agitou-se para homogeneizar. Em um béquer de 400 - 500 ml foi preparado uma solução de 25 g de glicose, 2,5 g  $\text{CaCl}_2$  em 250 ml de água destilada, esta solução foi submetida a agitação suave pelo agitador magnético. Após a homogeneização das colônias da bactéria na solução de alginato, estas foram gotejadas na solução com agitação suave e constante, continuou-se a agitação durante 15 minutos. Separou-se os glóbulos formados os quais foram lavados com água destilada.

Biotransformação - Após 60-65 horas a  $30^\circ\text{C}$ , pH 6,5 e agitação de 180 rpm do meio MMB, adicionou-se 100  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  e 1000  $\mu\text{l}$  do 1,8-cineol e foi mantido nas mesmas condições de temperatura, pH e agitação, por períodos de 48-120 horas. Inoculou-se a bactéria imobilizada em alginato e incubou-se a  $30^\circ\text{C}$  e 180 rpm por 48 horas em incubador rotativo (Shaker).

### Extração dos compostos biotransformados

O solvente usado para extração do 1,8-cineol biotransformado foi o acetato de etila, o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo a  $38^\circ\text{C}$ .

### Cromatografia de camada delgada

Preparou-se placas cromatográficas com sílica Merck, Kieselgel 60  $\text{F}_{254}$  sobre placas de vidro (10x2 cm, 10x10 cm e 20x10; espessura de 0,5 mm), as quais foram ativadas a  $100-105^\circ\text{C}$  por 1 horas. Diluiu-se o 1,8-cineol biotransformado em acetato de etila e com o auxílio de um capilar aplicou-se a amostra nas placas cromatográficas. Utilizou-se o 1,8-cineol (Sigma) como substância química de referência. Aplicou-se também o meio MMB com bactéria sem 1,8-cineol para controle. Eluiu-se com acetato de etila/Hexano 1:3 mais gotas de metanol. Após o processo cromatográfico revelou-se com vanilina sulfúrica constituída de uma solução de 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, 45 ml etanol puro, 10 ml água destilada, 1 g de vanilina.

### Avaliação da Composição Química

Amostras dos compostos biotransformados foram submetidas a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) em um equipamento modelo QP5050A (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida (CBP-5; 30m x 0,25mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ) (Shimadzu, Kyoto, Japão), mantendo-se um fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup> de Hélio, como gás de arraste, e aquecimento com temperatura programada ( $60^\circ\text{C}$  com um gradiente de  $3^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $246^\circ\text{C}$  e em seguida, com um gradiente de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $270^\circ\text{C}$ , mantendo-se uma isoterma de 5,6min, com um tempo total de corrida de 70 min). A energia de ionização do detector foi mantida em 70 eV, sendo o volume de injeção da amostra de 0,5 $\mu\text{l}$  diluídas em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (~10%). A análise foi conduzida no modo scan, com um intervalo de massas de 40-400 u.m.a e razão de split de 1:20, a uma velocidade de 1 scan s<sup>-1</sup>, com as temperaturas do injetor e da interface mantidas em  $220^\circ$  e  $240^\circ$ , respectivamente. A identificação dos componentes foi baseada na comparação dos espectros de massas com aqueles constantes da biblioteca NIST (através de busca automática e manual) e por comparação com os dados da literatura a partir da comparação com os índices de retenção de Kovats (Adams, 2001). Os índices de retenção foram obtidos através da co-injeção de uma mistura de

hidrocarbonetos C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub> (Sigma, Saint Louis, USA), e a partir da aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz (Dool e Kratz, 1963; Estanislau et al., 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias *P. putida* e *A. vinelandii* foram inoculadas no meio MMB e obtiveram um bom desenvolvimento. A *P. fluorescens* foi inoculada no meio MMB e não apresentou desenvolvimento, por esse motivo, não foi utilizada nos experimentos. Após inoculação com as bactérias *A. vinelandii* e *P. putida* em uma temperatura a 30°C, em pH 6,9, volume de 100 µl de 1,8-cineol e tempo de contato da bactéria com o substrato de 120 horas, observou-se melhores resultados no processo de biotransformação com *P. putida* através de cromatografia e camada delgada.

Foi também utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) com amostras de 1,8-cineol biotransformadas. Após a realização do CG/EM na amostra de 1,8-cineol modificado pela *P. putida*, observou-se a presença de dois compostos distintos. Após identificação através da técnica de CG/EM observou-se que a bactéria *Pseudomonas putida* conseguiu transformar o substrato 1,8-cineol em dois novos compostos: hexo-2-hidroxicineol e o 1-hidroxi-p-ment-3-ona.

## CONCLUSÕES

A bactéria *A. vinelandii* não biotransformou o substrato 1,8-cineol nas condições estudadas, mas os resultados da biotransformação do composto 1,8-cineol foram significativos quando utilizou-se a *P. putida*, sendo capaz de biotransformar o substrato 1,8-cineol em dois novos compostos: exo-2-hidroxicineol e 1-hidroxi-p-ment-3-ona. A *P. fluorescens* não foi capaz de crescer e nem biotransformar o substrato no meio de cultura proposto neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, W.; LUKACS, Z.; KAHLE, C.; SAHA-MÖLLER, C.R.; SCHREIER, P. Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons by free and immobilized *Bacillus megaterium* cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.11, p.377-385. 2001.

ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, p.456. 2001.

BUSTO, M. D. An experimental illustrating the effect of immobilisation on enzyme properties. *Biochemical Education*. v.26, p.304-308. 1998.

CRAVEIRO, A. A. QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e Química Fina. *Química Nova*. v.16, n.3, p.224-228. 1993.  
Csuk, R.; Glänzer, B. I. *Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry*. *Chemistry Review*, v.91, p.4997. 1991.

DOOL, H. V. D.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, n. 11, p. 463-471, 1963.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição Química e Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais de Cinco Espécies de *Eucalyptus* Cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3. ed. Áustria: Springer, p.234. 1997.

HOLLAND, H. L. Microbial end in vitro Enzymic Transformation of Alkaloids. Em: *The Alkaloids*. Manske, R. H. F.; Rodrigo, R. G. A. Academic Press: New York. 323-400, 1981.

LIZUKA, H.; NAITO, A. Microbial Conversion of Steroids and Alkaloids. Springer-Verlag Berlin Heidelberg :New York. p.400.1981.

MARK, E.; WALSH, P. K.; NIGEL A. J.; EADY, H.; HILL, A. O.; WONG, L. Catalytic reductive dehalogenation of hexachloroethane by molecular variants of cytochrome P450<sub>cam</sub> (CYP101), European Journal of Biochemistry, v.267 n.18. 2000.

SEBEK, O. K. Fungal transformations as a useful method for the synthesis of organic compounds. Mycologia, v.75, p.383-394. 1983.

SERVI, S. Baker's yeast as a reagent in organic synthesis . Synthesis, p.1-25. 1990.

SERVI, S. Microbial Reagents in Organic Synthesis. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands. p.381.1992.