



BIOCONVERSÃO DE 2-(1,3-BENZODIOXOL-5-ILOXI)-N- [(1E,Z)-FENILMETILENO]-ACETOIDRAZONA (LASSBio 939), UM POTENCIAL AGENTE ANTIINFLAMATÓRIO SINTETIZADO A PARTIR DO SAFROL

CIRILO, Hérica Núbia Cardoso¹; NETTO, Heleno José Costa Bezerra²; FRAGA, Carlos Alberto Manssour²; BARREIRO, Eliezer Jesus²; LIÃO, Luciano Morais³; DE OLIVEIRA, Valéria⁴

Palavras-chave: Bioconversão; acilidrazona; safrol.

1. INTRODUÇÃO

O uso de fungos filamentosos tais como *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 na realização de reações de oxidação, redução e glicosilação, entre outras, tem se mostrado útil na bioconversão de uma grande variedade de compostos orgânicos (GROGAN e HOLLAND, 2000). Por via química essas reações podem ser bastante difíceis, envolvendo várias etapas de proteção e desproteção, reduzindo consideravelmente os rendimentos. Promover reações régio-, enantio- e diastereoseletivas em uma única etapa estão entre as principais vantagens da utilização desse tipo de reação, que são realizadas em pH próximo da neutralidade e sem necessidade de utilização de reagentes tóxicos. A funcionalização de compostos como o LASSBio 939 (Figura 1) por via microbiológica além de produzir derivados dotados de prováveis novas atividades biológicas, permite a síntese dos possíveis metabólitos animais, o que auxilia em posteriores estudos farmacológicos e toxicológicos. A aplicação dessa metodologia possibilita a obtenção de quantidades suficientes para identificação estrutural, preparação de padrões autênticos para as análises de metabólitos animais e se necessário produção dos mesmos em escala preparativa. O LASSBio 939 é um novo derivado benzodioxola-*N*-acilidrazônico sintetizado a partir do safrol, apresentando propriedades antiinflamatórias significativas (NETTO, 2004). O presente trabalho tem como objetivos a realização de um *screening* com diferentes cepas de microrganismos para identificar aquelas que promovam reações de biotransformação no substrato 2-(1,3-benzodioxol-5-iloxi)-*N*-[(1E,Z)-fenilmetileno]-acetoidrazona (LASSBio 939), produção *in vitro* de derivados funcionalizados do substrato utilizando o microrganismo selecionado, desenvolvimento e padronização de metodologias de monitoramento das cinéticas de reação, visando otimizar o processo para desenvolvimento em escala preparativa.

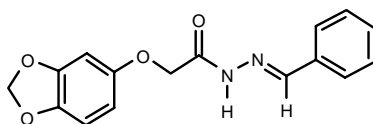


Figura 1. Estrutura química do substrato 2-(1,3-benzodioxol-5-iloxi)-N-[(1E,Z)-fenilmetileno]-acetoidrazona (LASSBio 939).

2. METODOLOGIA

Screening: Foram utilizadas 5 cepas de fungos filamentosos no *screening*, sendo elas *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Mortierella isabelina* NRRL 1757, *Mucor plumbeus* ATCC 4740 e *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145, mantidas em tubos contendo ágar batata inclinado armazenados à 25°C em câmara climática (BOD). Esses microrganismos foram inoculados em erlenmeyers contendo 100 ml do meio de cultura *Potato Dextrose Soy Medium* (PDSM) líquido previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, os erlenmeyers foram incubados sob agitação de 200 rpm a 28 ± 2°C em agitador rotativo por no mínimo 65 horas. Após esse período, adicionou-se a cada erlenmeyer 1,0 ml de uma solução do substrato em dimetilformamida na concentração de 50 mg/ml. Os erlenmeyers foram novamente incubados no agitador a 200 rpm, 28 ± 2°C.

Monitoramento da reação de bioconversão:

Após 24, 48, 72 e 96 horas da adição do substrato ao meio de cultura inoculado, foram retiradas alíquotas de cerca de 2ml do meio de incubação de cada erlenmeyer, em duplicata, e transferidas para eppendorfs. Eles foram centrifugados e o sobrenadante transferido para outros eppendorfs, que foram então congelados para análises posteriores.

Análise do substrato e das alíquotas:

Solução do substrato na concentração de 1,0 mg/ml em dimetilformamida, bem como as alíquotas retiradas do meio de incubação de cada uma das 5 cepas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, foram analisadas por CLAE, em equipamento Gilson, com injetor Rheodyne de 20 µl, coluna Lichrospher 100 RP 18 de 250 x 4 mm com partículas de 5µm de diâmetro (MERCK), fase móvel de Metanol/Tampão Fosfato 0,02M 65:35 sistema isocrático, fluxo de 0,5 ml/min, detector UV no comprimento de onda de 300 nm.

Determinação da cinética de bioconversão:

A avaliação da cinética de biotransformação da cepa selecionada durante o *screening* foi realizada. As alíquotas retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas foram analisadas por CLAE nas mesmas condições cromatográficas citadas acima. As concentrações de cada metabólito foram representadas em um gráfico de concentração em função do tempo, demonstrando a cinética de formação desses produtos, a fim de se verificar o tempo final de reação para obtenção dos produtos de interesse durante a realização do estudo em escala semipreparativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as cepas testadas se mostraram capazes de metabolizar o substrato no período de 1 a 5 dias, produzindo quantidades variáveis de até sete metabólitos

diferentes, detectados por CLAE-UV no sobrenadante de incubação. Dentre eles, apenas os produzidos por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram completamente separados pela metodologia CLAE empregada (Figura 2). Os estudos de cinética de bioconversão do substrato por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram representados graficamente como mostra a Figura 3. Verificou-se uma predominância na formação dos metabólitos II e IV. Todos os demais metabólitos foram formados, porém em pequenas quantidades. Já o metabólito VII foi detectado apenas no tempo de 24 horas, e seu desaparecimento do meio reacional é um indicativo de que foi novamente metabolizado pelo fungo e transformado em um outro metabólito, provavelmente o IV. Sendo assim, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foi a cepa de escolha para a realização de um experimento em escala semi-preparativa (500 mg), e os produtos obtidos foram então separados e purificados por flash cromatografia numa escala de 10-100mg para determinação estrutural utilizando-se os métodos usuais EM, RMN do ^1H e ^{13}C e IV (dados não apresentados).

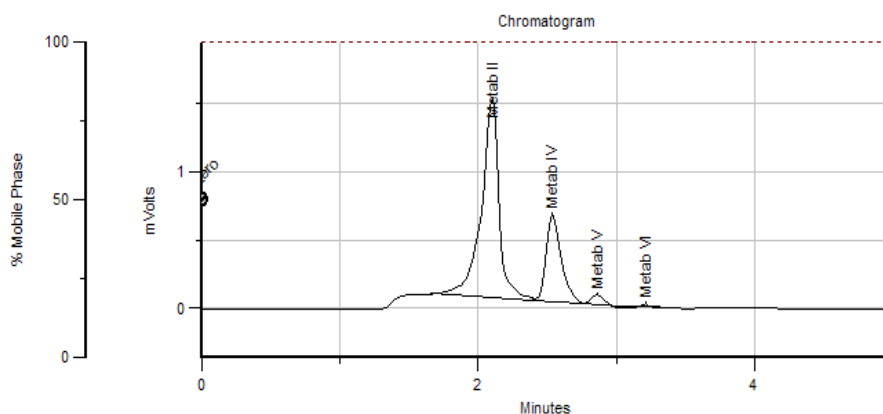


Figura 2: Cromatograma dos metabólitos formados a partir do substrato em 96 horas de incubação com *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

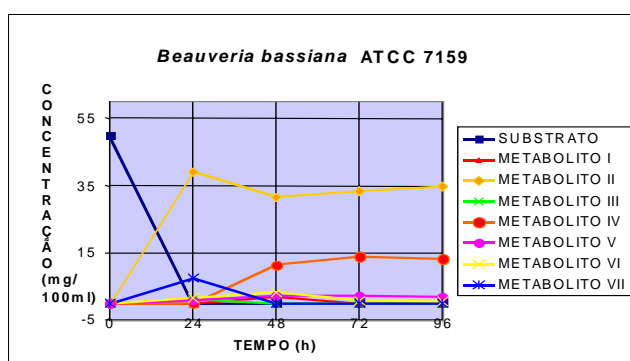


Figura 3: Cinética de biotransformação do substrato por *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

4. CONCLUSÃO

Bioconversão mostrou-se como uma estratégia sintética bastante promissora para produção de derivados funcionalizados de 2-(1,3-benzodioxol-5-iloxi)-*N*-[(1*E*,*Z*)-fenilmetileno]-acetoidrazona (LASSBio 939), e a cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 apresentou os melhores rendimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GROGAN, G. J. and HOLLAND, H. L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. Journal of Molecular Catalysis Part B Enzymatic, v. 9, p. 1-32, mar 2000.

NETTO, H. J. C. B. Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Derivados 6-nitro-benzodioxola-*N*-acilidrazônicos, Desenhados como Candidatos a Protótipos de Fármacos Analgésicos e Antiinflamatórios, Sintetizados a Partir do Safrol. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 713 p., 2004.

¹ Aluna de pós-graduação. Laboratório de Bioconversão – Faculdade de Farmácia – UFG, herica@farmacia.ufg.br

² Colaboradores. Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) – Faculdade de Farmácia - UFRJ

³ Orientador. Instituto de Química – UFG, luciano@quimica.ufg.br

⁴ Co-orientadora. Laboratório de Bioconversão (LABIOCon) – Faculdade de Farmácia – UFG, valeria@farmacia.ufg.br