

Modificação estrutural do lupeol isolado da espécie *Croton echioides*

Structural modification of isolated lupeol from the species *Croton echioides*

RESUMO

A crescente procura por novos compostos bioativos demanda estudos na área da biotransformação, a qual apresenta significativas vantagens em comparação aos métodos químicos pois garante reações em regiões específicas das moléculas. Devido a grande quantidade de espécies biologicamente ativas classificadas como terpenóides esse estudo visa a biotransformação do lupeol, um triterpeno com associações antitumorais, antimicrobiana, antileishmania entre outras. O objetivo deste trabalho é fazer a modificação estrutural do lupeol para a obtenção de novos compostos com maior atividade antileishmania. Desta forma, seis espécies de bactérias foram escolhidas para realizar o processo de biotransformação sob o composto lupeol, a análise da degradação do composto foi feita através de CCD de sílica gel 60 GF254. Os resultados mostraram que nenhuma das espécies foram hábeis em biotransformar o lupeol no modelo testado.

PALAVRAS-CHAVE: Biotransformação. Lupeol. Bactérias. Leishmania.

ABSTRACT

The growing demand for new bioactive compounds requires studies in the area of biotransformation, which has significant advantages compared to chemical methods because it guarantees reactions in specific regions of the molecules. Due to the large number of biologically active species classified as terpenoids, this study aims at the biotransformation of lupeol, a triterpene with antitumor, antimicrobial and antileishmania associations, among others. The objective of this work is to make the structural modification of lupeol for the creation of new compounds with more intense biological activities, the focus activity of this work is antileishmania activity. In this way, 6 species of bacteria were chosen to carry out the biotransformation process under the compound lupeol, the analysis of the degradation of the compound was made through silica gel 60 GF254 CCD. The results for the biotransformation of lupeol for these 6 species were not favorable.

KEYWORDS: Biotransformation. Lupeol. Leishmania.

Nicole Pan Tavares

nictav@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Izadora Pagnoncelli Netto

izadoranetto@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Cláudio Roberto Novello

crnovello@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Eder da Costa dos Santos

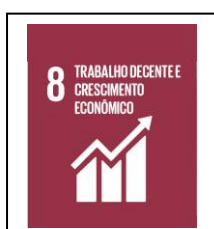
eder.c.santos@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A demanda por novos compostos bioativos, em especial aqueles utilizados na medicina, tem avançado constantemente devido a fatores como a redução de eficiência por uso extensivo de medicamentos ou pelo surgimento de novos patógenos. Áreas como a Química e a Biologia se unem para isolar, identificar e direcionar compostos orgânicos para seu devido uso farmacológico, medicinal ou na indústria em geral.

Os processos de biotransformação apresentam vantagens quando comparados aos correspondentes métodos químicos (QI-HE, et al. 2009). Podem atuar como biocatalisadores, com baixo nível de resíduos, possibilitando reações químio, régio e enantioseletivas, são ambientalmente mais viáveis evitando a geração de subprodutos tóxicos (MARTINS et al., 2017) e capazes de agir com grande eficiência na conversão de energia (HUISMAN; GRAY, 2002).

Uma classe de compostos que vem sendo estudada em relação a biotransformações são os terpenóides. Os terpenóides são o maior grupo de compostos químicos de plantas, representando uma grande classe de metabólitos secundários presentes na flora, na fauna terrestre e também marinha (BHATTI; KHERA, 2004).

O lupeol é um triterpeno que exibe uma grande gama de propriedades biológicas associadas como antitumoral, antimicrobiana, antileishmania, imunomoduladora e antioxidante, dentre outras (ANTU et al. 2017). Muitos estudos se deram recentemente como foco na sua biotransformação, síntese derivada, quimioprevenção, mecanismos de ação, métodos de detecção e quantificação (GALLO; SARACHINE, 2009).

A biotransformação de um composto como o lupeol, traz a possibilidade de novos compostos com propriedades similares e de maior eficiência, gerando uma diversidade bioquímica de derivados deste composto. Desta forma, este projeto visa a análise da biotransformação do lupeol por meio da biocatálise exercida por bactérias e fungos.

METODOLOGIA

1. METODOLOGIA

1.1 Obtenção do lupeol

A amostra de lupeol utilizada neste projeto foi extraída, purificada e caracterizada previamente da fração hexânica do extrato bruto vegetal da *Croton echinoides* Baill. A pureza foi determinada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

2.2 Prospecção de bactérias para biotransformação do lupeol

Testes prévios foram efetuados com um total de 10 biotipos de bactérias advindas de plantas da região do Sudoeste do Paraná, não cadastradas, em contato com o lupeol, pelo método da disco-difusão. Foi feita a aplicação do lupeol nas concentrações de 25 µg, 50 µg e 100 µg. Seis delas foram escolhidas ao acaso e utilizadas para o preparo dos meios de cultura.

1.2 Preparação da cultura microbiana

Foi preparado meio mineral contendo fosfato dissódico 0,248 g, fosfato monopotássico 0,1546 g, sulfato de amônio 0,051 g, sulfato de magnésio hepta hidratado 0,0204 g e cloreto de cálcio diidratado 0,0051 g, estas quantidades de reagentes para 100 mL de água destilada. O meio mineral e demais utensílios foram autoclavados durante 15 min à temperatura de 121 °C. Após resfriamento, verteu-se aproximadamente 5 mL do meio mineral no tubo de ensaio a ser inoculado. Uma cepa já existente, contendo colônias de bactérias bem desenvolvidas, foi utilizada como fonte dos microrganismos. Com o auxílio de uma pinça fez-se a retirada de uma pequena porção de bactérias da cepa e a mesma foi introduzida nos tubos, a quantidade de bactérias extraídas não é contabilizada. Os tubos foram agitados em vórtex por aproximadamente 30 s e em seguida foram deixados em descanso por 24 h à temperatura de 37 °C em estufa incubadora BOD. A atividade metabólica das cepas foi acompanhada através do indicador resazurina (RIBEIRO et al. 2004).

2.3 Análise e isolamento dos metabólitos

Em microtubo de polietileno, foram diluídos 2 mg de lupeol em 2 mL de DMSO como auxílio de agitação por ultrassom por aproximadamente 3 min. Foram aplicados 200 µL da solução de lupeol (1 mg/mL) nos tubos contendo o inóculo. Os tubos foram agitados em vórtex por 30 s e em seguida uma alíquota 100 µL foi retirada de cada um dos tubos e as mesmas foram transferidas para microtubos de polietileno o qual foram denominados de “tempo 0”. Os tubos contendo o inóculo e os 200 µL de lupeol ficaram em repouso a 37 °C em estufa incubadora BOD, alíquotas de 100 µL foram retiradas a cada 48 h durante 20 dias. Imediatamente após a tomada de cada amostra, era feita a extração por partição líquido-líquido com adição de 200 µL de diclorometano. Após agitação dos microtubos e separação das fases, a fase orgânica foi separada e mantida sob refrigeração a -5 °C, para análise posterior.

As frações orgânicas foram analisadas por CCD de sílica gel 60 GF254 juntamente com solução de lupeol como controle. Como fase móvel foi utilizado hexano:diclorometano:clorofórmio (6:3:1) e como revelador solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 105 °C.

2.5 Atividade antileishmania e a avaliação da citotoxicidade:

A avaliação da atividade antileishmania e da citotoxicidade foram desenvolvidas no Laboratório de Ciências Básicas da Saúde, na Universidade Estadual de Maringá aos cuidados do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Formas de promastigotas *L. amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA), com inóculo inicial de 1×10^6 células/mL em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) foram semeadas em placas de 24 poços na presença de diferentes concentrações de lupeol, diluído em Dimetilsulfóxido [DMSO] a 1%, a na ausência dele (controle). Após tratamento, as placas foram incubadas por 72 h a 25 °C. A leitura do experimento foi realizada através da diluição das amostras em formalina 3% e contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle.

A citotoxicidade foi determinada em macrófagos da linhagem J774A.1 pelo ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazóleo) por enzimas desidrogenases mitocondriais. Macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e mantidos a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Em seguida foi adicionado diferentes concentrações de lupeol e a placa foi incubada durante 48 h. Após tratamento as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com MTT (2 mg mL⁻¹), após 4 h foi adicionado DMSO para solubilização do formazan e realizada leitura da absorbância a 492 nm em espectrofotômetro de placas (Bio Tek – Power Wave XS). A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle. A concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão logarítmica.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os testes de inibição para as seis espécies de bactérias foram efetuados a fim de verificar se as mesmas não seriam desativadas no processo de biotransformação estando em exposição ao lupeol. As concentrações utilizadas de 25 µg, 50 µg e 100 µg não interferiram nas atividades metabólicas das bactérias, todas as espécies obtiveram um bom crescimento, sem inibição nas três diferentes concentrações.

No preparo do material de análise, utiliza-se DMSO devido sua baixa toxicidade, desta forma dentre os solventes orgânicos capazes de diluir o lupeol ele seria o menos nocivo as bactérias. Já no acompanhamento da atividade metabólica das cepas no qual utilizou-se o indicador resazurina a percepção é visual pois o indicador modifica sua coloração conforme houver respiração celular, sua coloração oxidada é azul e quando reduzido torna à cor rosa fluorescente (célula viável). Assim foi possível verificar que as cepas estavam em atividade durante todo o experimento.

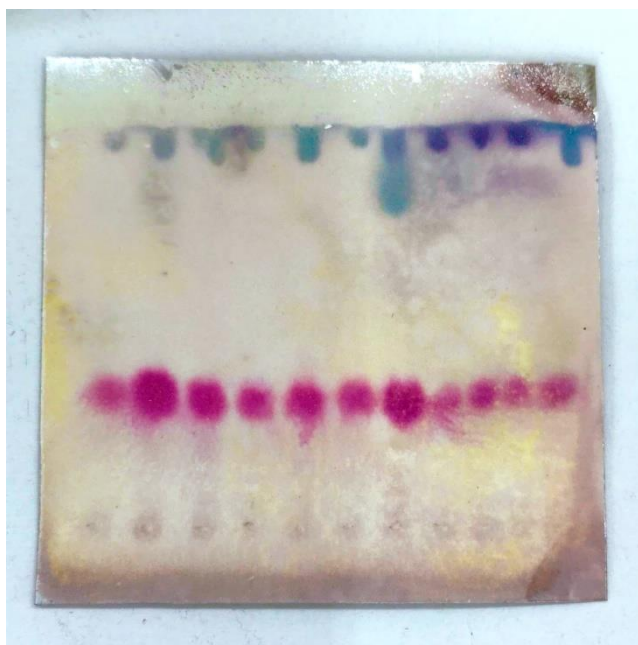
Em relação a extração por partição líquido-líquido, a necessidade de manter a fase orgânica sob congelamento é devido ao fato de ainda haver inóculo das bactérias ali misturado ao possível novo composto, então a baixa temperatura nos garante que não haja atividade metabólica microbiana e assim evita-se uma possível degradação do novo composto.

A atividade inibitória do lupeol contra os promastigotas de *L. amazonensis* foi positiva com um IC₅₀ de 61,17 ± 1,71 µg/mL, comparado aos valores dos agentes padrões amphotericina B e miltefosina que apresentaram IC₅₀ de 0,05 ± 0,00 µg/mL e 7,54 ± 0,45 µg/mL respectivamente. Valores de citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1 (célula de defesa que atua no sistema imunológico) também foram registrados. Testes de citotoxicidade sobre macrófagos são muitos importantes no desenvolvimento de novos agentes capazes de combater os protozoários (MOREIRA et al 2019) considerando o fato de que os protozoários são também eucariotos compartilhando semelhanças às células de mamíferos. O valor de CC₅₀ do lupeol para *L. amazonensis* foi de 195,48 ± 14,77 µg/mL. A partir dos resultados obtidos foi possível calcular o índice de seletividade (SI), que relaciona a citotoxicidade e a atividade nos promastigotas (CC₅₀ células J774A.1 / IC₅₀ nos promastigotas). Foi obtido o valor de SI de 3,2 para o lupeol sendo que, valores de SI > 1,0 indicam que a amostra é mais tóxica para o parasita do que para o macrófago (SILVEIRA, 2016).

Lupeol isolado de *Sterculia villosa* apresentou o valor de IC₅₀ de 65 ± 0.41 µg/mL sobre a forma promastigota de *L. donovani* na literatura (ANTU et al. 2017). O valor de IC₅₀ encontrados para o lupeol neste estudo contra *L. amazonensis* (61,17 µg/mL), semelhante ao valor reportado, pode ser considerado relativamente alto em comparação aos valores apresentados pelas drogas de referência miltefosina (7,54 µg/mL) e amphotericina B (0,05 µg/mL). Entretanto, se apresenta com baixa toxicidade sobre macrófagos (195,48 µg/mL) o que o torna uma droga promissora como substrato para a biotransformação na busca de uma molécula mais ativa contra *L. amazonensis* com um valor de SI mais elevado.

A CCD obtida com a aplicação do lupeol e das extrações dos metabólitos na cultura da bactéria nos diferentes intervalos de tempo pode ser observada na figura 1. O lupeol está visível como uma mancha de coloração rósea de mesmo Rf (0,35) em todas as aplicações. As demais manchas que aparecem em todas as aplicações são compostos residuais contidos no meio de cultura, que não são de interesse neste trabalho. Como o lupeol não mostrou alteração visível durante o experimento deduz-se que não houve biotransformação suficiente para produzir novas substâncias em quantidades detectáveis neste método.

Figura 1. CCD do teste de biotransformação do lupeol.



Fonte: Autorial (2020)

Neste trabalho foram testadas seis cepas diferentes de bactérias (imagens não apresentadas), entretanto como o perfil cromatográfico foi semelhante ao mostrado na Imagem 1, foi concluído que nenhuma destas cepas foram capazes de biotransformar o lupeol em quantidade detectável neste método.

Estava planejado fazer as análises das frações obtidas por CLAE, caso houvesse resultado positivo para a biotransformação do lupeol visível em CCD, com o objetivo de quantificar os metabólitos obtidos. Os metabólitos seriam isolados por cromatografia em coluna clássica e testados nos ensaios com *L. amazonensis* e macrófagos.

Infelizmente, o trabalho foi interrompido pela ocorrência da pandemia gerada pelo Corona vírus COVID-19. No futuro pretende-se dar continuidade no estudo da biotransformação do lupeol utilizando-se outras cepas de bactérias ou fungos no intuito de se obter uma molécula mais ativa e menos tóxica nestes modelos biológicos.

CONCLUSÃO

Diante das informações obtidas foi verificado que não houve êxito na biotransformação do lupeol através das bactérias selecionadas. Devido à grande gama de possibilidades no processo de biotransformação, é difícil afirmar se a falta de êxito se deu por alguma interferência externa ou se as bactérias não possuem vias metabólicas para a degradação do Lupeol.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária pela bolsa fornecida, ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação-PROPPG da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelos recursos financeiros. Ao campus da UTFPR de Francisco Beltrão por disponibilizar os laboratórios e equipamentos.

REFERÊNCIAS

ANTU, D.; JUNAID, J. J.; MANASH, C. D.; PADMANI, S.; UTPAL, C. B. D.; YUSUF, A.; SURAJIT, B. Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.50, p. 512-522, out. 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857917302339>

BHATTI, H. N.; KHERA, R. A. Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. **Journal of Asian natural products research**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 70–104, 2014. Disponível em: <http://search.ebscohost.com.ez48.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=24266458&lang=pt-br&site=ehost-live>

GALLO, M. B.C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, p. 3, 2009. Disponível em: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJBPS_3\(SI1\)/IJBPS_3\(SI1\)46-66o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJBPS_3(SI1)/IJBPS_3(SI1)46-66o.pdf)

HUISMAN, G. W.; GRAY, David G. Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 352-358, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095816690200335X>

MARTINS, I.; VARELA, A.; FRIJA, L. M. T.; ESTEVÃO, M. A. S.; PLANCHON, S.; RENAUT, J. ; AFONSO, C. A. M.; SILVA P. C. Proteomic insights on the metabolism of *Penicillium janczewskii* during the biotransformation of the plant terpenoid

labdanolic Acid. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.5, p. 45, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2017.00045>

MOREIRA, R. R. D. et al. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 61, e33, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652019005000216&lng=en&nrm=iso

QI-HE, C.; JING, L.; HAI-FENG, Z.; GUO-QING, H.; MING-LIANG, F. The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 175-180, set.2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.005>

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. S.; SENNA, S. G.; ROSSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 457, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v30n4/v30n4a11.pdf>

SILVEIRA, M. M. X. Estudo de um derivado de aminoquinolina: citotoxicidade em macrófagos, potencial efeito em *leishmania amazonensis* e mitocôndria, p. 24, 2016. Disponível em: <https://www.ufjf.br/farmacia/files/2015/04/TCC-Michele-Maria-Xavier-Silveira.pdf>