

## Biotransformação da tacrina por biocatálise microbiana

## Biotransformation of tacrine by microbial biocatalysis

### RESUMO

Izadora Pagnoncelli Netto  
[izadoranetto@alunos.utfpr.edu.br](mailto:izadoranetto@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Francisco Beltrão,  
Paraná, Brasil

Eder da Costa dos Santos  
[eder.c.santos@hotmail.com](mailto:eder.c.santos@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Francisco Beltrão,  
Paraná, Brasil

Cláudio Roberto Novello  
[crnovello@utfpr.edu.br](mailto:crnovello@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Francisco Beltrão,  
Paraná, Brasil

Nos últimos anos, o processo de biotransformação de compostos bioativos ganhou espaço entre pesquisadores e atraiu interesse da indústria, mostrando-se uma maneira viável para obtenção e otimização de substâncias. A tacrina é um fármaco com atividade anticolinesterásica empregado no tratamento da doença de Alzheimer, sendo eficiente na manutenção da concentração de acetilcolina no sistema nervoso. Por outro lado, possui efeitos colaterais graves que muitas vezes inviabilizam a manutenção do fármaco. A possibilidade de viabilizar o uso da tacrina modificando sua estrutura e assim, minimizar seus efeitos colaterais, vem sendo estudada, e é o objetivo deste trabalho. Para isso, seis espécies de bactérias foram selecionadas e submetidas ao contato com a tacrina, para a biotransformação, e analisadas através da técnica de Cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel 60 GF254. Os resultados mostraram que nenhuma das espécies de microorganismos foi hábil em biotransformar a tacrina no modelo testado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biocatálise. Anticolinesterásico. Bactérias. Alzheimer.

### ABSTRACT

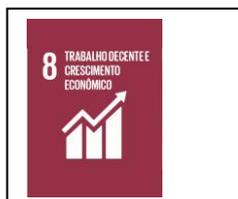
In recent years, the process of biotransformation of bioactive compounds has gained space among researchers and has attracted interest from the industry, proving to be a viable way to obtain and optimize substances. Tacrine is a drug with anticholinesterase activity used to treat Alzheimer's disease, being efficient in maintaining the concentration of acetylcholine in the nervous system. On the other hand, it has serious side effects that often make maintenance of the drug unfeasible. The possibility of enabling the use of tacrine by modifying its structure and thus minimizing its side effects, has been studied, and is the objective of this work. For this, 6 species of bacteria were selected and subjected to contact with tacrine, for biotransformation, and analyzed using the silica gel 60 GF254 CCD technique. The results showed that none of the species of microorganisms was able to biotransform the tacrine in the tested model.

**KEYWORDS:** Biocatalysis. Anticholinesterase. Alzheimer.

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

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



## INTRODUÇÃO

O processo biocatalítico de transformação de compostos bioativos tem atraído crescente interesse da comunidade científica e industrial nos últimos anos, tendo em vista o expressivo número de artigos e patentes publicados recentemente. A biotransformação ganha destaque por apresentar vantagens se comparada a métodos químicos convencionais para obtenção de compostos, como a não geração de resíduos industriais tóxicos, condições de reação suaves, além de muitas vezes representar o único meio de obter determinado composto (DE OLIVEIRA, DE OLIVEIRA, 2012).

Na medicina, algumas substâncias bioativas, apesar de apresentarem atividade para combater patologias, muitas vezes não estão nas condições ideais para serem aplicadas ou requerem complexo processo químico para produção, assim a metodologia da biocatálise representa uma alternativa para a transformação de fármacos e otimização de suas condições, como acontece na produção de esteroides, por exemplo (DE OLIVEIRA, DE OLIVEIRA, 2012).

A tacrina é um importante fármaco empregado no tratamento da Doença de Alzheimer (DA), possui atividade inibidora reversível da enzima acetilcolinesterase (AChE) auxiliando assim na manutenção de altas concentrações de acetilcolina (ACh) no sistema nervoso e, conseqüentemente, retardando a progressão da doença. A tacrina, foi a primeira droga aprovada para tratamento da DA em 1993 (MINETT; BERTOLUCCI, 2000), porém seus efeitos colaterais ainda impedem a manutenção do medicamento em alguns casos, por causar problemas gastrointestinais graves e aumentar o nível de enzimas hepáticas, além de requerer altas doses diárias (ALMEIDA, 1998).

Há grande interesse em estudar análogos estruturais da tacrina, com o objetivo de minimizar os seus efeitos colaterais e garantir melhor atividade do fármaco no combate a DA (PISONI, 2011). Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo utilizar a biocatálise do inibidor como uma alternativa viável para uma possível obtenção de compostos mais eficientes e de melhor manutenção para o tratamento.

## METODOLOGIA

### 1. METODOLOGIA

#### 1.1 Obtenção da tacrina para análise

O padrão de tacrina utilizada nos ensaios foi adquirida da Cayman Chemical Company, padrão comercial, item 70240.

#### 1.2 Preparação da cultura microbiana

Para o ensaio foram selecionadas 6 cepas já preparadas contendo espécies provenientes de plantas do sudoeste do Paraná não cadastradas como fonte de microorganismos.

Foi preparado meio mineral, utilizando 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, para cada 100 ml de água destilada. A fim de evitar contaminações, os utensílios utilizados e o meio mineral foram autoclavados por aproximadamente 15 minutos a 121 °C. Após

resfriamento em estufa BDO, os tubos para inoculação das bactérias foram preparados com 5 mL de meio mineral. Em cada tubo, foi adicionada uma pequena parcela de microorganismos, retirada das cepas previamente preparadas, com o auxílio de uma pinça. A quantidade de bactérias extraídas não foi determinada. Posteriormente, os tubos contendo o inóculo foram agitados em vortéx por cerca de 30 segundos e permaneceram em estufa incubadora BDO a 37 °C por 24 horas para repouso e crescimento da cultura.

O monitoramento do crescimento do inóculo, bem como a atividade metabólica se deu através do indicador colorimétrico resazurina.

Para adicionar a tacrina aos inóculos foi necessário submetê-la a um processo de diluição. O solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente orgânico de baixa toxicidade para os microorganismos (CARDOSO, 2011). Desta forma, foi diluído 1 mg de tacrina em 2 mL de DMSO com o auxílio de banho de ultrassom.

Em cada inóculo foi adicionado 0,2 mL da solução de tacrina, com concentração 0,5 mg/mL, totalizando 100 µg por tubo, e sujeito a agitação em vortéx.

### 1.3 Análise e isolamento dos metabólitos

Neste estudo, foram analisadas amostras diluídas de tacrina, em diversas concentrações, durante um determinado intervalo de tempo de exposição nos microorganismos selecionados. Desta forma, o tempo de exposição foi de 3 semanas e as amostras foram tomadas com um intervalo de 48 h.

Ao longo do ensaio as cepas permaneceram em estufa BDO a 37 °C, com o objetivo de manter as condições propícias para o desenvolvimento das bactérias, exceto no momento da extração.

A extração foi feita através da técnica de partição líquido-líquido, utilizando diclorometano para separar as substâncias de interesse do caldo microbiano. Para isso, a cada alíquota, foram retirados 100 µL do caldo e transferidos para um microtubo de polietileno, nele foram adicionados 200 µL de diclorometano que permaneceu em repouso até a separação das fases, e posteriormente foi feita a coleta da fase superior. As alíquotas de extração foram armazenadas e classificadas de acordo com o tempo de biocatálise e com a espécie de bactéria, e foram armazenadas em freezer a -5 °C, a fim de conservar a amostra e diminuir a possível degradação por bactérias que pudessem estar presentes, permanecendo congeladas até o momento de análise.

As frações orgânicas foram analisadas por Cromatografia em camada delgada, tendo como fase estacionária sílica gel 60 GF254 e utilizando o padrão de tacrina como controle. Como fase móvel foi utilizado clorofórmio:metanol:acetona (8,3:1,1:0,6) e como revelador solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 105 °C.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

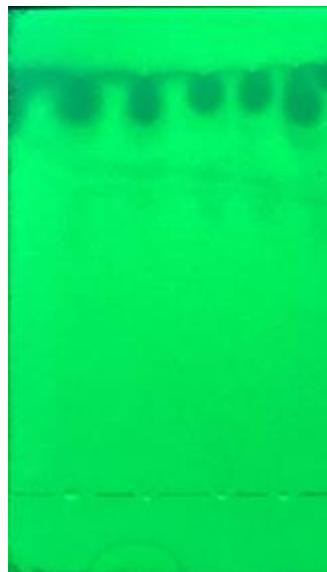
Os ensaios foram conduzidos com o objetivo de fornecer condições favoráveis a biotransformação da tacrina pelos microorganismos. Assim, se justifica a utilização de um meio de cultura mineral, restringindo as fontes de carbono presente e forçando uma interação das bactérias com o fármaco para a produção de energia (BUSHNELL; HASS, 1941). A tacrina foi diluída em solvente orgânico DMSO, pois apresenta baixa toxicidade aos microorganismos (CARDOSO, 2011). nas concentrações utilizadas.

A atividade metabólica das culturas foi monitorada através do uso do indicador colorimétrico de oxirredução resazurina, que, ao entrar em contato com cepas onde há respiração celular sofre redução, modificando sua cor de azul para rosa (RIBEIRO et al., 2004). Desta forma, os testes de viabilidade das culturas preparadas foram satisfatórios mostrando que a atividade metabólica estava ativa para todas as bactérias durante o experimento.

A técnica utilizada para extrair os compostos de interesse do caldo microbiano foi a partição líquido-líquido, através do Diclorometano, por possuir maior afinidade com possíveis derivados da tacrina, tendo assim maior interação com ela do que o meio de cultura, e formando duas fases tornando possível a extração das amostras para análise. As amostras foram armazenadas em microtubos de polietileno em freezer a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , evitando que, caso houvesse qualquer contaminação com as bactérias, não ocorresse modificação dos compostos por ação metabólica. As amostras foram então aplicadas em placa de sílica gel 60 GF254.

Para a escolha da fase móvel encontrou-se dificuldade na otimização da fase móvel. Os vários testes de eluentes feitos não chegaram em uma opção ideal para o composto, entretanto é possível ver nitidamente a mancha característica da tacrina com fator de retenção ( $R_f$ ) de aproximadamente 1 (Figura 1). Ajustes da fase móvel deverão ser feitos no futuro a fim de se obter um  $R_f$  próximo de 0,5.

Figura 1. CCD do teste de biotransformação da tacrina.



Fonte: Autoral (2020)

Todas as seis bactérias foram submetidas às mesmas condições de meio de cultura, concentração de tacrina aplicada e tempo de exposição. Cada cepa foi testada para atividade metabólica ao longo do estudo, e todas foram identificadas como viáveis. As aplicações foram separadas em placas de acordo com o microorganismo, totalizando assim seis placas de CCD, cada uma com 8 aplicações. O padrão de tacrina foi aplicado em todas as placas, e a eluição se deu pela mesma fase móvel em todos os casos. Não foi possível observar a biotransformação pela metodologia testada.

As análises foram interrompidas em decorrências da pandemia causada pelo vírus COVID-19. Quando as atividades forem retomadas há o interesse em realizar novo experimento, estabelecendo diferentes condições para a biocatálise, e abordar novo método de investigação por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna, dando assim outra alternativa para a obtenção de resultados satisfatórios.

#### AGRADECIMENTOS

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

- ALMEIDA, O. P. Tratamento da doença de alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** São Paulo, v. 56, n. 3B, p. 688-696, 1998. Disponível em:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-282X1998000400029&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X1998000400029&lng=en&nrm=iso).
- BUSHNELL, L. D.; HASS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, maio. 1941. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374727/pdf/jbacter00729-0101.pdf>>
- CARDOSO, M.F.C.; Dimetilsulfóxido. **Revista virtual de Química: Métodos de preparação industrial de solventes e reagentes químicos.** v. 3, n. 4, 8 nov. 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Desktop/Referencias/DMSO/186-1804-4-PB.pdf>
- DÁVILA, C.; VITERI, C.; CASTRO, P.; Tacrina, **Revista de Medicina de la Universidad de Navarra**, v. 41; n. 1; p. 58-64; 6 out. 2016. Disponível em:  
<https://revistas.unav.edu/index.php/revista-de-medicina/article/view/6856/6016>
- DE OLIVEIRA, K. B.; DE OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 11, 1 abr. 2012. Disponível em:  
<https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/17777/10636>

MINETT, T. S. C.; BERTOLUCCI, P. H. F. Terapia colinérgica na doença de alzheimer. **Revista Neurociências**, v. 8, n. 1, p. 11-14, 31 mar. 2000. Disponível em: <https://periodicos.unifesp.br/index.php/neurociencias/article/view/8951/6484>

PISONI, D.S.; Síntese e avaliação biológica de novas tetraidroacridinas quirais obtidas a partir de cetonas terpênicas. **Tese de doutorado em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre. abr. 2011. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/30862>

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. da 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 p. 457, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v30n4/v30n4a11.pdf>