

BIOCATÁLISE DE 19-NOR-4-ANDROSTENO-3,17-DIONA UTILIZANDO-SE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS NA BAHIA

Danielle Silva Santana¹; Tereza Simonne Mascarenhas Santos², Angelica Maria Lucchese³, Serly Santiago Machado⁴

¹ Bolsista PROBIC, Graduanda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: danysantana_5@hotmail.com

²Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tereza.simonne@gmail.com

³ Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

⁴ Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sserly2005@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: 19-nor-4 androsteno-3,17-diona, biocatálise, micro-organismos

INTRODUÇÃO

Os esteróides apresentam grande importância médica, pois são utilizados como anti-inflamatórios e anticoncepcionais (FERNANDES et al., 2003). Estes podem ser obtidos a partir dos esteróis através de processos químicos muito complexos. Os esteróis se encontram abundantemente na natureza em frações não saponificáveis de gorduras de animais e plantas (OLIVEIRA; BUENO, 1995). A transformação química dos esteróis a esteróide leva a uma clivagem seletiva da cadeia em C17; como não há método químico eficiente para tal conversão, a procura por métodos enzimáticos, como a biotransformação, é intensa, já que estes podem apresentar algumas vantagens em relação aos métodos químicos.

Os processos biotecnológicos estão sendo amplamente inseridos no ramo industrial para as mais diversas funções, inclusive em aplicações na área de Ciências Farmacêuticas, como a indústria farmoquímica (MOREIRA, 2009). A produção de fármacos esteroidais e hormônios é baseada na combinação de tecnologia microbiana e síntese química (DONOVA, 2007). Os principais fatores que conferem tamanha ascensão a tais processos estão relacionados com o baixo custo associado ao benefício ambiental, com os resultados satisfatórios das biotransformações já utilizadas em larga escala e com a facilidade de obter o produto desejado através deste método em comparação aos métodos químicos convencionais.

A biotransformação é baseada nos processos químicos que acontecem nos organismos vivos, onde podem ocorrer transformações de um substrato em produtos de maior valor agregado na presença de enzimas, que atuam como catalisadores. O objetivo geral da pesquisa foi estudar o desenvolvimento de um processo biocatalítico utilizando actinobactérias isoladas do semi-árido baiano que permita biotransformar o 19-nor-4-androsteno-3,17-diona em produtos de maior valor agregado.

MATERIAL E MÉTODOS

As actinobactérias foram cedidas pela Coleção de Cultura de Micro-organismos do Estado da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA, tendo sido isolados pelo MSc. Getúlio F. Bomfim de cinco cupinzeiros dos municípios de Feira de Santana, Lafaiete Coutinho e Morro do Chapéu, no estado da Bahia. Os isolados foram codificados de acordo com o município de origem como FS (Feira de Santana), LC (Lafaiete Coutinho) e MC (Morro do Chapéu) (BOMFIM, 2010). As actinobactérias que foram utilizadas são as seguintes: FS46 (*Bacillus*), MC30 (*Streptomyces*), FS43 (*Bacillus*), MC46 (*Bacillus*), FS37 (*Bacillus*), LC17 (*Streptomyces*), LC07 (*Streptomyces*), LC10 (*Streptomyces*), MC36 (*Streptomyces*), FS40 (*Bacillus*), FS41 (*Bacillus*).

Os micro-organismos foram pré-cultivados em meio de cultura CCA (2g nitrato de potássio, 10g amido, 0,3g caseína, 2g cloreto de sódio, 2g fosfato de potássio dibásico, 0,05g sulfato de magnésio, 0,02g carbonato de cálcio, 0,01g sulfato ferroso, 1L água destilada)

durante oito dias e a temperatura de 28°C. Após esse período, as actinobactérias foram inoculadas (1 plugue, circunferência com 6 mm de diâmetro) em frascos de vidro com capacidade de 100mL, contendo 10 mL de meio de cultura CCA e 400µL de solução do substrato (19-nor-4 androsteno-3,17-diona), sendo uma proporção de 30mg do substrato para 1mL de acetona, em triplicata. O controle positivo era micro-organismos + meio CCA e o negativo, meio CCA + substrato. Estes frascos foram colocados numa câmara incubadora com agitação orbital (Shake; Marconi modelo MA-420) a 150 rpm a 30°C durante 8 dias.

Ao final deste período, foi feito o plaqueamento de todos os tratamentos, medida do pH, filtração à vácuo (para aquisição do peso seco) e coleta do meio reacional. As amostras coletadas foram extraídas em acetato de etila, sendo que foram feitas três repetições com o volume de acetato de etila correspondente a um terço do volume total do meio reacional para cada repetição. Após a extração, o solvente foi evaporado em capela e o extrato bruto analisado por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. A identificação dos componentes foi com base 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante dos procedimentos realizados, foi possível a construção da Tabela 1, contendo os valores médios do pH do meio reacional ao final da reação e a média peso seco (MS) dos micro-organismos utilizados. Os tratamentos (TC) de 1 a 11 representam os controles positivos, os quais contem apenas o micro-organismo indicado, no meio CCA. Os tratamentos (T) de 13 a 23 são compostos pelos micro-organismos indicados, no meio CCA, na presença de 400µL da solução de substrato que foi preparada. O tratamento 12 (controle negativo) contem apenas meio CCA e 400µL da solução de substrato. O pH inicial do meio CCA foi de 8,18.

Tabela 1 - Cepas resistentes ao 19-nor -4 androsteno-3,17-diona

Micro-organismos	TC ¹	pH	MS (g)	T ²	pH	MS (g)
FS 46 (<i>Bacillus</i>)	1	8,76	0,0263	13	8,03	0,0360
FS 40 (<i>Bacillus</i>)	2	7,72	0,0129	14	7,50	0,0183
FS 43 (<i>Bacillus</i>)	3	6,91	0,0299	15	7,70	0,0295
MC 46 (<i>Bacillus</i>)	4	8,76	0,0189	16	7,73	0,0297
FS 37 (<i>Bacillus</i>)	5	8,39	0,0168	17	7,45	0,0205
FS 41 (<i>Bacillus</i>)	6	8,50	0,0079	18	7,97	0,0287
LC 17 (<i>Streptomyces</i>)	7	7,96	0,0268	19	7,85	0,0191
LC 07 (<i>Streptomyces</i>)	8	7,73	0,0255	20	8,01	0,0092
LC 10 (<i>Streptomyces</i>)	9	7,86	0,0136	21	7,95	0,0133
MC 36 (<i>Streptomyces</i>)	10	7,82	0,0246	22	7,56	0,0152
MC 30 (<i>Streptomyces</i>)	11	7,32	0,0372	23	7,92	0,0295
Sem micro-organismo ³	12	7,66	0,0182			

¹ Tratamentos controle (TC): contém micro-organismo indicado em meio CCA. ² Tratamentos (T) contendo o micro-organismo indicado em meio CCA e 400µL da solução de substrato. ³ Tratamento contendo apenas meio CCA e 400µL da solução de substrato. Médias de 03 repetições.

Os resultados preliminares de avaliação da massa celular indicam que os micro-organismos pertencentes ao gênero *Streptomyces* (LC17, LC07, LC10, MC 36, MC30) foram mais sensíveis a presença do esteróide, uma vez que a massa celular obtida foi inferior a do controle. Por outro lado, os micro-organismos do gênero *Bacillus* (FS 46, FS 40, FS 43, MC 46, FS 37, FS 41) se mostraram mais resistentes à presença do substrato, o que é possível observar a partir da massa celular obtida que foi maior na presença do substrato do que na sua

ausência. Observa-se que em nenhum dos tratamentos houve variação brusca do pH. Se o pH tivesse alterado para valores muito ácidos ou muito básicos, isso poderia desnaturar as enzimas ou até mesmo provocar a morte dos micro-organismos (KOMETANI, 1989). Mas, como todos os valores se encontram entre 6,91 e 8,76, a ausência de reação possivelmente não é devido ao pH.

Além dessas características, outros fatores interferem também para a obtenção de bons resultados como, micro-organismos, a composição do meio de cultivo e condições impostas como pH, temperatura e outras (KOMETANI, 1989). A viabilidade celular dos micro-organismos após o período de reação foi verificada através do plaqueamento, que pode ser demonstrado pela Figura 1.

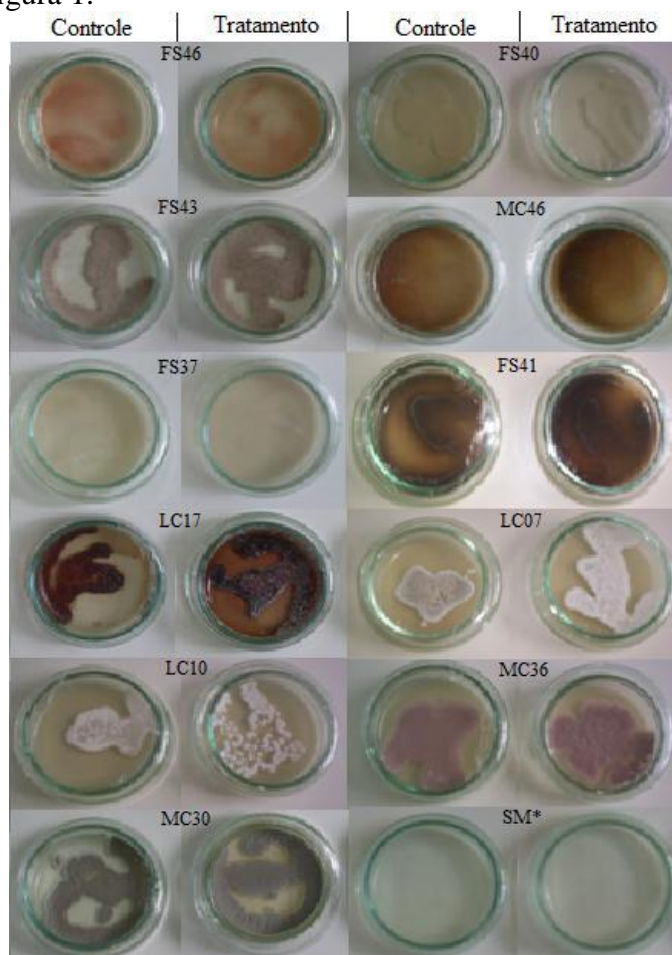


Figura 1 – Plaqueamento dos tratamentos. *SM = sem micro-organismo

Pode-se observar, através dos resultados do plaqueamento, que todos os micro-organismos conseguiram sobreviver tanto na presença do substrato quanto na sua ausência durante os testes biocatalíticos. Isso é importante, pois é possível afirmar que a não conversão do substrato não se deu pela ausência ou morte dos micro-organismos.

Os esteróis, especialmente, são marcados como substâncias hidrofóbicas de baixa solubilidade em água e o substrato/produtos são potenciais inibidores sobre o micro-organismo na biotransformação (BEILEN et al, 2003). Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para lidar com isso, como a adsorção em sólidos transportadores (LEE; LIU, 1992), células magneticamente imobilizadas (FIYGARE; LARSSON, 1987), bioconversão direta no meio sólido (PEREZ et al, 2005), dentre outras. No entanto, no processo de biotransformação de células inteiras, a toxicidade do solvente é muitas vezes um fator limitante (WANG et al, 2006).

As amostras oriundas dos testes biocatalíticos com todos os micro-organismos foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Entretanto, pela análise do extrato bruto do meio reacional, obtido através da extração com acetato de etila e posterior evaporação do solvente, foi possível observar que em nenhum dos tratamentos houve conversão do substrato. De fato, outros fatores, como condições de temperatura, ou agitação do meio reacional, por exemplo, podem ter influenciado na produção de enzimas e consequentemente na conversão do substrato.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos com a realização do experimento, pode-se inferir que ou as condições utilizadas para a realização dos testes biocatalíticos não foram as mais adequadas para que haja a conversão do substrato utilizado ou estes micro-organismos não produzem enzimas adequadas para interação com o esteróide selecionado.

Entretanto, pode-se afirmar que os micro-organismos utilizados foram resistentes, em níveis diferentes, ao substrato. Dessa forma, a ausência de conversão não está relacionada à sensibilidade dos micro-organismos frente ao substrato, o que impediria seu crescimento, mas sim a outros fatores de condições do meio reacional, ou até mesmo a não produção de enzimas capazes de atuarem como biocatalisadores. Assim, testes futuros devem ser conduzidos com modificações nas condições reacionais e ampliação no número dos micro-organismos testados.

REFERÊNCIAS

- BEILEN, J. B. V. et al. Practical issues in the application of oxygenases. **Trends Biotechnol**, nº21, v.4, 2003. p.170-177.
- BOMFIM, G. F. **Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de cupinzeiros da região da Mata de Cipó, Bahia**. 2010. 67f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil.
- DONOVA, M. V. Transformation of steroids by actinobacteria: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, p. 1-14, 2007.
- FERNANDES, P.; CRUZ, A.; ANGELOVA, B.; PINHEIRO, H.; CABRAL, J. M. S. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 688-705, 2003.
- FIYGARE, S. LARSSON, P. O. Steroid transformation using magnetically immobilized *Mycobacterium* sp. **Enzyme Microb Technol**, nº9,1987. p.494-499.
- KOMETANI, T. **Baker s yeast mediated biorreduction**. A new procedure using ethanol as the energy source. *Chemistry Letters*. 1989.
- LEE, C. Y.; LIU, W. H. Production of androst-4-ene-3, 17-dione from cholesterol using immobilized growing cell of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 adsorbed on solid carriers. **Appl Microbiol Biotechnol**, nº36, 1992. p. 598-603.
- MOREIRA, J. S. **Triagem de microrganismos isolados no estado da Bahia para biotransformação de compostos esteroidais**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- PEREZ, C. et al. Bioconversion of phytosterols to androstanes by *Mycobacteria* growing on sugar cane mud. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, nº32, v.3, 2005. p.83-86.
- OLIVEIRA, B. H.; BUENO, D. D. Biotransformação de esteróides. **Química Nova**, v. 19, p. 233-236, 1995.
- WANG, Z. et al. Biotransformation of phytosterol to produce androsta-dieno-diona por células em repouso de *Mycobacterium* em sistema de ponto de fusão. **Process Biochemistry**, v.41, 2006. p.557-561.