

## Desenvolvimento de método analítico para a quantificação de ácido perílico obtido por biotransformação de limoneno.

Bruno Motta Lessa (TC)<sup>1</sup>, Eliane Gonçalves Carvalho (TC)<sup>1</sup>, Marcelo R. Romero Tappin (PG)\*<sup>1</sup>, Paulo S. Bergo Lacerda (PQ)<sup>1</sup>, Maria Antonieta Ferrara (PQ)<sup>1</sup>, Antonio Carlos Siani (PQ)<sup>1</sup>, Elba P. da Silva Bon(PQ)<sup>2</sup>. Email: marcelot@far.fiocruz.br

<sup>1</sup>Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250 Rio de Janeiro, RJ.

<sup>2</sup>UFRJ, Instituto de Química, Ilha do Fundão, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica. Av Athos da Silveira Ramos, 149, Bloco A, 5º andar, Sala 539 Ilha do Fundão 21941-909 - Rio de Janeiro, RJ.

Palavras Chave: Limoneno, Ácido Perílico, Biotransformação, CGAR.

### Introdução

As propriedades do D-limoneno e seus derivados em inibir células tumorais, através da inibição da isoprenilação de proteínas têm sido extensamente demonstradas.<sup>1,2,3</sup> Entre estes derivados, um dos mais potentes é o ácido perílico (AP). Estes e outros trabalhos, demonstrando o alto potencial do AP e de outros derivados do D-limoneno vêm induzindo a pesquisa sobre a produção destas substâncias. Speelmans e colaboradores<sup>4</sup> demonstraram a produção de AP a partir de D-limoneno utilizando a Bactéria *Pseudomonas putida*. Duetz e colaboradores<sup>5</sup> publicaram uma revisão mostrando os diferentes produtos provenientes da biotransformação (principalmente bacteriana) do limoneno. Com o desenvolvimento de processos de produção e a pesquisa clínica do AP, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a sua quantificação nos meios em que é produzido. As principais técnicas utilizadas na literatura incluem o a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)<sup>6</sup> e a Cromatografia em Fase Gasosa de Alta resolução (CGAR)<sup>7</sup>; esta última técnica sendo utilizada para analisar monoterpenos. Tradicionalmente, a coluna cromatográfica utilizada para esta análise é a DB-5, a mesma que é normalmente utilizada na análise de óleos essenciais.<sup>7,8</sup> No entanto, o fato desta apresentar um grupamento polar resulta em um sinal de baixa intensidade para o AP, devido à difusão da amostra através da coluna. Para contornar esta questão, o AP foi derivatizado com BSTFA<sup>7</sup>, que também acarreta o aumento das etapas de preparo de amostra. Outra opção é o uso de coluna com fase mais polar que a DB-5, na busca por uma vantagem advinda do grupamento carboxílico do AP. Esta estratégia já foi utilizada para analisar amostras com o ácido perílico,<sup>4</sup> contudo não há estudos publicados sobre o desenvolvimento e a pré-validação do método analítico visando a quantificação de AP utilizando colunas com esta característica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e pré-validar um método analítico baseado em CGAR utilizando coluna HP-Innowax e avaliar o potencial desta

coluna para a análise de derivados do limoneno provenientes de processos fermentativos.

### Resultados e Discussão

A injeção de amostras de AP concentrada, (cerca de 1000 ppm) em coluna HP-5 apresenta sinais deformados indicando sobrecarga de amostra. Com a troca da coluna por HP-innowax há uma mudança significativa do formato do sinal com um pico capilar (um sinal alto e fino). Outros derivados do D-limoneno também foram injetados (aldeído e álcool perílico) apresentando resultados semelhantes em corridas de 30 minutos. A formação de picos capilares permite uma melhor resolução entre os picos aumentando a exatidão dos resultados da análise. Foi preparada uma curva de AP com concentrações de cerca de 160-1000 µg/ml. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi estimado em 0,9997, o coeficiente da variação máximo foi de 0,95%, com o limite de detecção estimado em 65 µg/ml, utilizando o erro padrão do intercepto. O limite de quantificação foi determinado em 160 µg/ml (o limite inferior da curva). O método de preparo de amostra foi avaliado, o resultado apontou para 98,1% de recuperação. Uma amostra proveniente da fermentação do limoneno foi quantificada como teste, resultando no valor de 548 mg/l para o AP.

### Conclusões

A metodologia analítica por CGAR, desenvolvida com o uso de uma coluna HP-Innowax, forneceu resultados confiáveis, quanto à detecção e quantificação de ácido perílico como produto de biotransformações de monoterpenos.

<sup>1</sup>Crowell, P.L. et al., *Biochemical Pharmacology* **1994**, 47, 1405.

<sup>2</sup>Bardon, S.; Foussard, V.; Fournel, S.; Loubat, A. *Cancer Letters* **2002**, 181, 187.

<sup>3</sup>Ferri, et. al. *Biochemical Pharmacology* **2001**, 62, 1637.

<sup>4</sup>Speelmans, G.; Bijlsma, A.; Eggink, G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 50, 538.

<sup>5</sup>Duetz, W.A. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 269.

<sup>6</sup>Ezennia, E.I.; Phillips, L.R.; Wolfe, T.L.; Tabibi, S.E. *J. Chromatogr. B*, **1977**, 688, 354.

<sup>7</sup>Zhang, Z.; Chen, H.; Chan, K.K.; Budd, T.; Ganapathi, R. *J. Chromatogr. B* **1999**, 728, 85.

<sup>8</sup>Chan, K.K. *J. Chromatogr. A* **2001**, 936, 47.