

**APLICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DO GÊNERO
Beauveria sp NA PRODUÇÃO DE DERIVADOS
DE NARINGENINA.**

Juliana PENSO, Valéria de OLIVEIRA

**Laboratório de Bioconversão, Faculdade de Farmácia – Universidade Federal
de Goiás**

julianapenso@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Beauveria* sp., bioconversão, naringenina

Introdução

A capacidade de bioconversão dos microrganismos tem sido bastante empregada na obtenção de protótipos e na otimização das propriedades de candidatos a fármacos, a partir da utilização do candidato como substrato para a bioconversão (FURA et al, 2004).

Os fungos filamentosos destacam-se entre os microrganismos utilizados em reações desse tipo. O uso de bactérias é limitado a cepas de Actinomicetos, tendo em vista que outros grupos de bactérias consomem o xenobiótico por utilizarem-no como fonte de carbono e nitrogênio (AZERAD, 1999).

A espécie *Beauveria bassiana* ATCC 7159 é capaz de realizar várias reações, entre elas oxidações, reduções e hidrólises (CIRILO, 2006). É a segunda espécie de fungo filamentoso mais frequentemente utilizada em reações biocatalíticas, ficando atrás somente da espécie *Aspergillus niger*. *Beauveria spp* pertence à família *Moniliaceae*. (GROGAN e HOLLAND, 2000). Diversas cepas de *Beauveria sp* foram extraídas de amostras de solo do cerrado e identificadas pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como IP3a, IP6, IP8, IP11, IP94, IP98, IP127, IP132, IP147 e IP153 (COSTA et al, 2008).

Os flavonóides são fenóis de ampla distribuição nas plantas (BREINHOLT et al, 2002). A sua estrutura básica consiste no núcleo flavânico, que possui 15 átomos de carbono. As classes de flavonóides são diferenciadas por anéis heterocíclicos adicionais, pelas diversas posições do anel B e pela distribuição dos grupos hidroxila, metila e metoxila (DAS e ROSAZZA, 2006).

O potencial farmacológico da naringenina tem sido intensamente investigado, e a literatura já conta com relatos de que a naringenina ajuda no reparo do DNA no câncer de próstata (GAO, 2006), melhora a resistência a insulina (HORIBA, 2010), tem efeito antioxidante (SHIMODA, 2010) e vasodilatador (AJAY et al, 2003).

A produção de derivados de naringenina tem sido intensamente pesquisada, prioritariamente com a intenção de melhorar as propriedades do composto inicial. Ibrahim (2000) produziu um derivado sulfatado de naringenina a partir de uma cultura de *Cunninghamella elegans* NRRL 1392 e obteve um rendimento de 23% (Figura 1). Seu propósito era chegar a um protótipo com melhor atividade antioxidante.

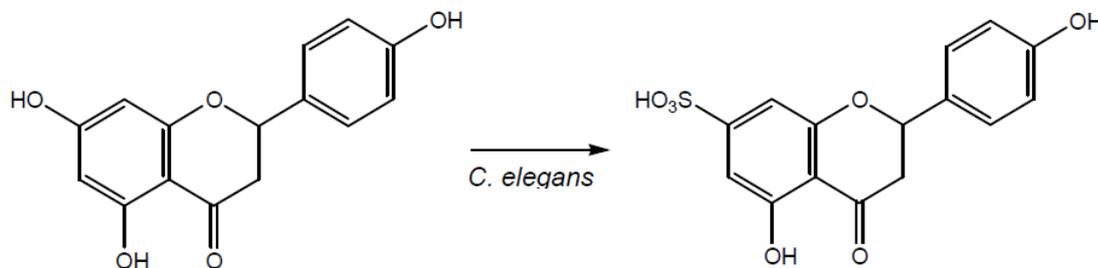


Figura 1: Sulfatação da naringenina utilizando *C. elegans* (IBRAHIM, 2000)

Já Shimoda (2010) utilizou células de *Eucalyptus perriniana* na biotransformação de naringina e naringenina e obteve nove derivados glicosilados. A metilação regioespecífica da naringenina, com o intuito de aumentar sua solubilidade, foi obtida pela expressão de uma o-metiltransferase da soja em *Escherichia coli*, gerando um metabólito metilado na posição 4' (KIM et al, 2005).

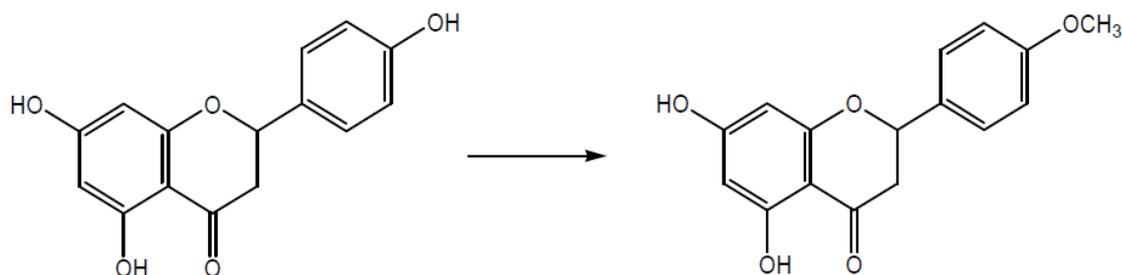


Figura 2: Metilação da naringenina por o-metiltransferase da soja em *E. coli* (KIM et al, 2005).

Material e Métodos

Além da cepa de *Beauveria bassiana* ATCC 7159, foram utilizadas cepas isoladas de amostras de solo do cerrado (IP3a, IP6, IP8, IP11, IP94, IP98, IP129, IP132, IP147 e IP153). Estas cepas pertencem ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Todas as cepas foram mantidas a 4 °C em tubos inclinados contendo ágar batata. Antes do uso, todas as cepas foram repicadas em ágar batata e incubadas a 28 °C por 7 dias. Após este período, o micélio foi suspenso em 2 mL de glicerol 25% (p/v) esterilizado. Alíquotas de 0.5 mL de cada cepa foram utilizadas para inocular Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido PDSM (Peptone Dextrose Soybean Meal) (COSTA et al, 2008). As culturas foram mantidas em incubadora rotatória a 200 rpm e 27 ± 2°C por 72 horas antes de receberem, uma a uma, 50 mg de naringenina diluída em 1 mL de acetona. Após adição do substrato, as culturas foram novamente incubadas sob as mesmas condições. O controle consistiu de um meio de cultura contendo substrato e sem microrganismo. Alíquotas (2 mL) de cada cultura foram retiradas a cada 24 horas, até 96 após a adição do substrato. As amostras foram saturadas com cloreto de sódio, extraídas com acetato de etila e centrifugadas a 3000 g por 10 minutos. As amostras resultantes foram aplicadas sobre placas de sílica gel GF254 (Whatman, 0.25 mm de espessura) e desenvolvidas em acetato de etila:metanol (95:5). As placas cromatográficas desenvolvidas foram visualizadas sob fluorescência a 254 nm. Culturas contendo padrões cromatográficos semelhantes foram agrupadas antes da extração. Para isto, os meios fermentados foram filtrados em gaze e o micélio foi lavado com 20mL de água destilada. O filtrado foi saturado com cloreto de sódio e extraído com volumes iguais de acetato de etila. O micélio foi extraído com acetona. Os extratos resultantes foram tratados com sulfato de sódio anidro e concentrados em rotoevaporador. Os metabólitos foram purificados utilizando-se *flash* cromatografia, em coluna de sílica gel (2cm × 22cm) eluída com acetato de etila:metanol (95%:5%). A análise de massas foi realizada em um Varian 1200L triplo-quadrupole MS/MS e os experimentos de RMN em um Bruker Avance III - 500.

Resultados e Discussão

Todas as cepas de *Beauveria* sp. Converteram a naringenina a um metabólito majoritário, que foi identificado como naringenina-O-glicosídeo. As estruturas dos produtos foram elucidadas a partir de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, incluindo ESI-MS/MS, ¹H e ¹³C RMN, HSQC e HMBC. Os espectros de RMN foram

registrados em CD3OD, com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O metabólito majoritário foi identificado como naringenina 7-O- glicosídeo. O sítio de glicosilação foi determinado como 7-OH (Fig. 2) com a ajuda do experimento HMBC, no qual a correlação entre o próton anomérico (δ H 4.97) e o C-7 (δ 165.3) foi observada.

O controle do experimento, que tinha sido tratado com naringenina, foi submetido aos mesmos procedimentos de extração e análise. A naringenina foi adequadamente detectada, enquanto nenhum metabólito pôde ser encontrado.

O rendimento da biotransformação foi de 38%, significativamente melhor do que os relatados anteriormente (Shimoda et al, 2010; Yamamoto et al, 2004).

Conclusões

O método de biotransformação apresentado é útil na conversão de naringenina ao seu derivado 7-O-glicosilado. Estudos sobre a habilidade de culturas de *Beauveria* sp. em conjugar carboidratos a flavonóides estão sendo conduzidos.

Referências Bibliográficas

AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v.74, p. 603-612, 2003.

AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 169-216, 1999.

BREINHOLT et al, In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 609-616, 2002.

CIRILO, H.N.C. **Bioconversão de derivados N-acilidrazônicos sintetizados a partir do safrol**. 2006. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

COSTA et al. Selection of filamentous fungi of the *Beauveria* genus able to metabolize Quercetin like mammalian cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 405-408, 2008.

DAS, S. & ROSAZZA, J. P. N.; Microbial and Enzymatic Transformations of Flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 499-508, 2006.

FURA, A. et al. Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 18, p. 4339-4351, 2004.

GAO, K. et al. The citrus flavonoids naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 89-95, 2006.

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

HORIBA, T. et al. Naringenin chalcone improves adipocyte functions by enhancing adiponectin production. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, p. 208-214, 2010.

IBRAHIM, A. R. S. Sulfation of naringenin by *Cunninghamella elegans*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 209-212, 2000.

KIM et al. Regiospecific methylation of naringenin to ponciretin by soybean O-methyltransferase expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 155–162, 2005.

SHIMODA, K. et al. Biotransformation of naringenin by cultured *Eucalyptus perriniana* cells. **Phytochemistry**, v. 71, p. 201-205, 2010.