

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

JULIANA PENSO DA SILVEIRA

Aplicação do fungo filamentosso *Beauveria bassiana* spp. na produção de derivado potencialmente vasodilatador e antiproliferativo de naringenina.

Goiânia
2012

JULIANA PENSO DA SILVEIRA

**APLICAÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO *Beauveria bassiana* spp. NA
PRODUÇÃO DE DERIVADO POTENCIALMENTE VASODILATADOR E
ANTIPROLIFERATIVO DE NARINGENINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Valéria de Oliveira

Goiânia
2012

JULIANA PENSO DA SILVEIRA

**APLICAÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO *Beauveria bassiana* spp. NA
PRODUÇÃO DE DERIVADO POTENCIALMENTE VASODILATADOR E
ANTIPROLIFERATIVO DE NARINGENINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em ___/___/_____

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha
Universidade Federal de Goiás

Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira
Universidade Federal de Goiás

Prof^a. Dr^a. Marize Campos Valadares Bozinis (Suplente)
Universidade Federal de Goiás

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Silveira, Juliana Penso.

58 Aplicação do fungo filamentoso *Beauveria bassiana* spp.
7a na produção de derivado potencialmente vasodilatador e
antiproliferativo de naringenina. [manuscrito] / Juliana
Penso da Silveira. - 2012.

xv, 70 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Farmácia, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. *Beauveria bassiana*. 2. Naringenina – Vasodilatação.
3. Naringenina – Glicosilação. I. Título.

CDU:

615.1:582.28

*À minha mãe, pelo incentivo
e apoio incondicionais.*

Agradecimentos

Ao meu marido, Ricardo Guimarães de Arruda, por me apoiar sempre, me amar tão incondicionalmente e ser meu companheiro na vida.

A meus pais e irmãos, por serem esta família tão unida e amorosa da qual tenho tanto orgulho.

À minha orientadora, professora Dr^a. Valéria de Oliveira, por abrir as portas da Universidade Federal de Goiás para mim e contribuir para meu crescimento científico.

Ao professor Luiz Antonio Soares Romeiro, por despertar em mim o interesse pela ciência, pelo apoio sempre prestado e pela disponibilidade em contribuir neste trabalho participando da banca.

Ao professor Matheus Lavorenti Rocha, pelo apoio com os testes farmacológicos e pela disponibilidade para participar da banca.

À professora Marize Campos Valadares Bozinis, pelo apoio com os testes de citotoxicidade e pela disponibilidade.

À professora Carolina Horta Andrade, por ser professora e amiga. Inspirando-me como pessoa e como profissional desde o dia em que a conheci.

Ao professor Luciano Morais Lião, pela imensa contribuição com os espectros de RMN.

Ao Rodolpho Braga, pela amizade e contribuição para o meu crescimento científico.

À Juliana Cavaion, Kelly Frauzino, Telma de Mattos, Daniele Vinhal e Renata Bueno, a amizade e o apoio de vocês tornaram a passagem pela UFG muito mais alegre.

Às servidoras Fernanda Bellato e Ana por serem tão solícitas e dedicadas.

À professora Telma Alves Garcia e ao professor José Realino de Paula, pela contribuição prestada no exame de qualificação.

RESUMO

A bioconversão utiliza o arsenal enzimático presente em sistemas biológicos para modificar quimicamente compostos orgânicos. Este trabalho descreve a utilização de cepas do fungo filamentosso *Beauveria bassiana* spp. na produção de derivados da naringenina, flavonóide de elevado interesse farmacoterapêutico, e a avaliação das suas potenciais atividades vasodilatadora e antiproliferativa. Realizou-se uma seleção que incluiu, além da cepa de *Beauveria bassiana* ATCC 7149, diversas cepas de *Beauveria bassiana* spp. isoladas de amostras de solo do cerrado brasileiro e denominadas: IP3a, IP6, IP8, IP11, IP94, IP98, IP127, IP132, IP147 e IP153. A cepa da coleção ATCC mostrou melhor perfil de produção de derivados e foi utilizada para ensaio em escala semipreparativa. O meio de cultura líquido *Peptone Dextrose Soy Meal* (PDSM) foi utilizado para a bioconversão de naringenina na concentração de 0,5 mg/mL, a 27°C e 200 r.p.m. Após 96 horas da adição do substrato, o micélio foi removido por filtração, o sobrenadante extraído com acetato de etila e o micélio com acetona. A cromatografia em coluna das frações resultantes empregou sílica gel como fase estacionária e acetato de etila e metanol, na proporção 95:5, como fase móvel. Foi possível purificar um derivado com rendimento de 38%, que foi identificado por infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C como naringenina-7- β -O-glicosídeo. O derivado foi avaliado quanto ao seu potencial vasodilatador utilizando o modelo de aorta de rato isolada e mostrou capacidade vasodilatadora menor que a apresentada pela naringenina. Entretanto, a naringenina e seu derivado glicosilado parecem exercer seu efeito vasodilatador por mecanismos diferentes. O potencial antiproliferativo do derivado 7- β -O-glicosilado e da naringenina também foi avaliado, *in vitro*, pelo método de exclusão do azul de tripano em células Jurkat, derivadas de leucemia linfóide humana aguda. O derivado não apresentou vantagem em relação ao composto inicial quanto à atividade antiproliferativa. O método de bioconversão apresentado é útil na bioconversão de naringenina a naringenina-7- β -O-glicosídeo em bons rendimentos. O derivado apresenta potencial antiproliferativo e vasodilatador, embora tais potenciais não sejam maiores do que o apresentado pelo composto inicial.

Palavras-chave: Bioconversão. Naringenina. *Beauveria bassiana*. Glicosilação. Vasodilatação. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Biotransformation or biocatalysis encompasses the use of biological systems to catalyze the conversion of one compound to another. This work investigates the application of cultured cells of the filamentous fungi *Beauveria bassiana* spp. in the production of naringenin derivatives. Naringenin is a flavonoid that recently has been the subject of considerable scientific and therapeutic interest. Naringenin and the major derivatives were evaluated for their vasorelaxant and cytotoxic properties using *in vitro* models. Initially, a screening experiment including *B. bassiana* ATCC 7149 and other strains of *Beauveria bassiana* spp. isolated from Brazilian soil (IP3a, IP6, IP8, IP11, IP94, IP98, IP127, IP132, IP147 e IP153) was conducted and *B. bassiana* ATCC 7149 was chosen for preparative experiments. Naringenin (0,5 mg/mL) was biotransformed in Peptone Dextrose Soy Meal (PDSM) liquid medium at 27°C and 200 r.p.m for 96 hours. After incubation, mycelia was harvested by filtration, washed with water and exhaustively extracted with acetone. Aqueous solution was extracted with ethyl acetate. The resulting extracts were chromatographed on a silica gel column eluted with mixtures of methanol and ethyl acetate. Purification yielded one pure major derivative (38%) named LaBioCon 185, which was identified by infrared, mass spectroscopy, ¹H, ¹³C, HMBC and HSQC nuclear magnetic resonance as naringenin-7-O-β-glucoside. LaBioCon 185 was evaluated for its vasorelaxing potential using rat isolated aorta rings and was less effective than naringenin. Interestingly, LaBioCon 185 seems to exert its vasorelaxant effect by different pathways from those found for naringenin. Cytotoxicity was also evaluated using trypan blue exclusion assay, performed in Jurkat cells (derived from human acute lymphoid leukemia). LaBioCon 185 didn't show significant benefit over naringenin for cytotoxicity assay. The presented biotransformation method is useful to convert naringenin to its 7-β-O-glucoside in good yield. LaBioCon 185 presents vasorelaxant and cytotoxicity potential, although smaller than the one observed for naringenin.

Keywords: Biotransformation. Naringenin. *Beauveria bassiana*. Glycosylation. Vasodilation. Cytotoxicity.

Lista de Ilustrações

- Figura 1 – Hidroxilação régio e estereosseletiva da progesterona catalisada por *Rhizopus nigricans* 15
- Figura 2 – Sulfoxidação enantioespecífica do precursor de modafinil, difenilmetilsufinil, por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 17
- Figura 3 – Bioconversão de 1-aminoantraceno por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 17
- Figura 4 – Bioconversão do composto canflavina B por *Beauveria bassiana* ATCC 13144 18
- Figura 5 – Estrutura química básica dos subtipos de flavonóides mais comuns 20
- Figura 6 – Estrutura química da naringenina e seu glicosídeo mais comum, a naringina 21
- Figura 7 – Obtenção de derivado sulfatado de naringenina por bioconversão utilizando cultura de *Cunninghamella elegans* 23
- Figura 8 – Obtenção de derivados glicosilados por bioconversão de naringenina utilizando cultura de células de *Eucalyptus perriniana* 24
- Figura 9 – Obtenção de derivado metilado de naringenina por bioconversão com células geneticamente modificadas de *Escherichia coli* para expressão de O-metiltransferase de soja 25
- Figura 10 – Mecanismo geral para formação de ligação glicosídica 26
- Figura 11 – Mecanismo detalhado de formação de ligação glicosídica, evidenciando a participação do grupo adjacente ao carbono anomérico na seletividade anomérica da reação 27
- Figura 12 – Mecanismo bidirecional de formação de ligação glicosídica catalisada por glicosidase 28
- Figura 13 – Glicosilação de sesamol por culturas de células de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus perriniana* 30
- Figura 14 – Glicosilação de 3-hidróxilflavanona por cultura de células de *Cunninghamella echinulata* 31
- Figura 15 - Fluxograma da metodologia geral de bioconversão 33
- Figura 16 – Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional, resultando na formação das frações AcOEt e cetônica 36

Figura 17 – Aspecto morfológico das cepas de <i>Beauveria bassiana</i> spp. empregadas na seleção em meio inclinado, após sete dias de crescimento a 27° C em câmara B.O.D	42
Quadro 1 - Caracterização do aspecto morfológico das cepas de <i>Beauveria bassiana</i> spp. utilizadas na seleção em meio líquido PDSM	43
Figura 18 – Aspecto morfológico das cepas após 72 horas de crescimento em meio líquido PDSM	43
Quadro 2 - Derivados da naringenina encontrados em monitoramento por CCD produzidos por cepas de <i>Beauveria bassiana</i> spp. após 96 horas de incubação em meio líquido PDSM a 27°C e 200 r.p.m.	44
Figura 19 – Cromatograma de alíquota retirada do meio reacional no tempo zero	47
Figura 20 – Cromatograma de alíquota do branco, em que não foi inoculada a cepa de <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159, retirada do meio reacional logo após a adição do substrato	48
Figura 21 – Cromatograma de alíquota do meio reacional, retirada 48 horas após a adição do substrato.	48
Figura 22 – Cinética de formação do derivado II e consumo da naringenina por <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas	49
Figura 23 - Cinética de formação do derivado III e o consumo da naringenina por <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.	50
Figura 24 – Espectro de infravermelho do derivado LaBioCon 185, obtido em pastilhas de KBr por espectrômetro modelo Spectrum 400 FT-IR (Perkin-Elmer®) com varredura de 400 a 4000 cm ⁻¹	51
Figura 25 – Glicosilação de naringenina por <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 após 96 horas de incubação em meio líquido PDSM, 27°C e 200 r.p.m.	54
Figura 26 – Efeito vasodilatador de naringenina e LaBioCon 185 em aortas de rato pré-contraídas com fenilefrina.	55
Figura 27 – Efeito vasodilatador do derivado LaBioCon 185 (A) e da naringenina (B) em aortas de rato pré-contraídas com fenilefrina.	56
Figura 28 – Efeito antiproliferativo da naringenina e de seu derivado LaBioCon 185 após 24 horas de tratamento (0.0015-2.0 mM) em células Jurkat pelo método de exclusão do azul de tripano. O IC50 foi de 0.03712 e 0.2156 para naringenin e para o derivado, respectivamente	57

Figura 29 – Comparação entre os valores de CI50 da naringenina (0.03712mM) e de seu derivado LaBioCon 185 (0.2156 mM), mostrando um aumento de 6 vezes para o CI50 do derivado

Lista de tabelas

Tabela 1 – Proporção de adsorvente, diâmetro e altura da coluna utilizada conforme a massa da amostra	37
Tabela 2 – Resultados do monitoramento realizado por CCD das frações coletadas da coluna.	45
Tabela 3 – Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C da naringenina (500 Mhz, CD_3OD , com TMS como padrão interno)	52
Tabela 4 – Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C do LaBioCon 185 (500 Mhz, CD_3OD)	53

Lista de abreviaturas e siglas

AcOEt	Acetato de Etila
AGS	<i>Adenocarcinoma Gastric Stomach</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B.O.D	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.M.	Espectrometria de Massas
EPM	Erro Padrão Médio
GTases	Glicosiltransferases
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LaBioCon	Laboratório de Bioconversão
L-NAME	N'-nitro-L-arginina metil éster
MNNG	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NO	Nitric Oxide
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
p.p.m.	Partes Por Milhão
PBS -EDTA	<i>Phosphate buffered saline - Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
PDSM	<i>Peptone Dextrose Soy Medium</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Tcf	Fator celular T
TEA	Tetraetilamonio
TMS	Tetrametilsilano
u.m.a.	Unidades de Massa Atômica

Sumário

1	Introdução	14
1.1	BIOCONVERSÃO	14
1.1.1	<i>Utilização do fungo Beauveria bassiana para bioconversão</i>	16
1.2	BIOCONVERSÃO DE FLAVONÓIDES	18
1.2.1	<i>Flavonóides</i>	18
1.2.2	<i>Naringenina</i>	20
1.2.3	<i>Bioconversão da naringenina</i>	23
1.3	A BIOCONVERSÃO APLICADA A REAÇÕES DE GLICOSILAÇÃO	25
1.3.1	<i>Reações de glicosilação</i>	25
1.3.2	<i>Glicosilação por bioconversão</i>	29
2	Objetivos	32
3	Material e métodos	33
3.1	TÉCNICA GERAL DE BIOCONVERSÃO	33
3.1.2	<i>Manutenção e repique das cepas</i>	33
3.1.3	<i>Preparação do meio de cultura líquido</i>	33
3.1.4	<i>Inoculação dos microrganismos no meio de cultura líquido (PDSM)</i>	34
3.1.5	<i>Adição do substrato</i>	34
3.1.6	<i>Amostragem do meio reacional</i>	35
3.1.7	<i>Monitoramento da bioconversão</i>	35
3.1.8	<i>Extração</i>	35
3.1.9	<i>Purificação das frações</i>	36
3.2	SELEÇÃO	37
3.3	BIOCONVERSÃO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA	38
3.4	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DOS DERIVADOS E CONSUMO DE NARINGENINA	38
3.5	IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO	38
3.5.1	<i>Infravermelho</i>	39
3.5.2	<i>Espectroscopia de massas</i>	39
3.5.3	<i>Ressonância magnética nuclear</i>	39
3.6	AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS DERIVADOS	39
3.6.1	<i>Avaliação da atividade vasodilatadora in vitro</i>	39
3.6.2	<i>3.6.2 Avaliação do potencial antiproliferativo in vitro através do</i>	40

	<i>método de exclusão com azul de tripano</i>	
4	Resultados e discussão	42
4.1	AVALIAÇÃO DO ASPECTO MORFOLÓGICO DAS CEPAS	42
4.2	SELEÇÃO	44
4.3	ENSAIO SEMIPREPARATIVO COM <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	45
4.4	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DOS DERIVADOS E CONSUMO DE NARINGENINA	46
4.5	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO DERIVADO OBTIDO	50
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASODILATADORA IN VITRO	55
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i>	57
5	Conclusões	58
6	Perspectivas	59
	Referências bibliográficas	60
	Anexos	64

1 Introdução

1.1 BIOCONVERSÃO

O ser humano usufrui da capacidade catalítica dos microrganismos há milhares de anos. A primeira transformação química realizada por microrganismos de que se tem notícia é a conversão de etanol em ácido acético por cepas de *Acetobacter* que, provavelmente, foram desenvolvidas concomitantemente pelos povos ancestrais da Babilônia, Egito e Sudão cinco mil anos antes da era Cristã. Curiosamente, este processo também foi o primeiro deste tipo a ser empregado em escala industrial (LERESCHE; MEYER, 2006).

O processo em que são realizadas modificações químicas de substratos por meio de sistemas biológicos é chamado de bioconversão. Os sistemas biológicos empregados podem ser células intactas ou enzimas isoladas dessas células (LERESCHE; MEYER, 2006; GHISALBA et al., 2010). Cada uma dessas possibilidades apresenta suas vantagens e limitações.

O uso de microrganismos inteiros preserva as condições naturais de funcionamento da enzima e previne mudanças conformacionais que poderiam levar à diminuição da atividade enzimática, além de dispensar a adição de co-fatores. Além disso, a utilização de microrganismos inteiros costuma ser mais vantajosa em reações de bioconversão que necessitam de mais de uma modificação do substrato, já que uma cepa única pode produzir ampla gama de enzimas intra e extracelulares dependendo das condições de crescimento empregadas. No entanto, o substrato deve ser capaz de atravessar a membrana celular no caso de utilização de enzimas intracelulares, o que pode diminuir a eficácia da bioconversão. Nos processos que utilizam microrganismos inteiros, também existe a possibilidade de ocorrência de reações laterais devido à expressão de outras enzimas, além daquelas desejadas (CARVALHO, 2011).

Já a utilização de enzimas isoladas diminui a chance de reações colaterais e não exige a passagem do substrato pela membrana celular. No entanto, o isolamento, purificação e a adição de co-fatores podem ser etapas dispendiosas e laboriosas. Apesar de exigirem, via de regra, uma faixa estreita de pH e temperatura para funcionamento ideal, enzimas podem manter sua capacidade funcional, mesmo que em menor proporção, *in vitro*. Dessa forma, enzimas isoladas podem catalisar reações em condições que seriam inviáveis ao crescimento celular, permitindo a

realização de reações de bioconversão em condições mais extremas de pH e temperatura (CARVALHO, 2011).

O interesse industrial farmacêutico pelo uso de métodos de bioconversão para a obtenção de derivados funcionalizados foi impulsionado na década de 50, quando Peterson e Murray (1952) conseguiram realizar a hidroxilação régio e estereosseletiva da progesterona utilizando uma cepa de *Rhizopus nigricans* (Figura 1). A dificuldade de obtenção da 11- α -hidroxiprogesterona pelos métodos químicos convencionais com bons rendimentos apresentava-se, à época, como um grande obstáculo à síntese de esteróides.

Figura 1- Hidroxilação régio e estereosseletiva da progesterona catalisada por *Rhizopus nigricans*



Fonte: Adaptada de Peterson e Murray (1952).

A bioconversão apresenta diversas vantagens em relação à química orgânica clássica. Os biocatalisadores são completamente degradados pelo meio-ambiente, ao contrário do que ocorre com outros tipos de catalisadores, como os metais pesados, por exemplo. Outra vantagem da bioconversão é a sua realização em meio aquoso e condições brandas de reação, como temperatura e pH, tornando o processo mais sustentável e ecologicamente adequado. Além disso, reações de bioconversão, em geral, apresentam elevada quimio, régio e enantioseletividade (FABER, 2000; GHISALBA et al., 2010).

A quimio e regioseletividade podem ser explicadas pela estrutura tridimensional complexa característica das enzimas, que podem distinguir grupos idênticos com diferente localização espacial em um substrato. A estereosseletividade ocorre porque enzimas são formadas por L-aminoácidos e são consideradas catalisadores quirais, gerando, via de regra, substratos enantiomericamente puros (FABER, 2000; GHISALBA et al., 2010).

Em alguns casos, a bioconversão não só é mais adequada como é a única alternativa conhecida, a exemplo da hidroxilação seletiva de carbonos não ativados (CARVALHO, 2011).

A bioconversão, no entanto, também apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade de se encontrar microrganismos ou enzimas adequados a uma reação específica, exigindo etapas de seleção. Outro ponto a ser considerado é que enzimas, isoladas ou presentes nos microrganismos, são enantiosseletivas e não é possível inverter a sua quiralidade (AZERAD, 1999; FABER, 2000).

1.1.1 Utilização do fungo *Beauveria bassiana* para bioconversão

A espécie *Beauveria bassiana* pertence à família *Moniliaceae* de fungos filamentosos e se apresenta na natureza como um fungo entomopatogênico utilizado no controle biológico de pragas como substituto de pesticidas orgânicos (PURWAR; SACHAN, 2006). A cepa de *B. bassiana* disponível no ATCC (*American Type Culture Collection*) sob código de identificação 7159 é frequentemente utilizada em reações biocatalíticas (GROGAN; HOLLAND, 2000; OSORIO-LOZADA et al, 2008; ŚWIZDOR et al, 2011).

O fungo em questão foi originalmente isolado como contaminante laboratorial e inicialmente classificado como *Sporotrichum sulfurescens*. Esta classificação foi mudada posteriormente para *Beauveria sulfurescens* e, mais recentemente, para *B. bassiana* (GROGAN; HOLLAND, 2000).

A grande utilização de *B. bassiana* no campo da bioconversão se deve à ampla gama de reações que este microrganismo é capaz de realizar, como hidroxilações, reduções, oxidações (inclusive as de Baeyer-Villiger) e conjugações (GROGAN e HOLLAND, 2000; IBRAHIM et al., 2010; ŚWIZDOR et al., 2011).

A aplicação de *B. bassiana* pode ser exemplificada pela utilização de cepa ATCC 7159 por Olivo e colaboradores (2005) na sulfoxidação de um precursor sintético do modafinil (Stavigile®), um composto psicoestimulante aprovado para uso em pacientes que apresentam sonolência diurna excessiva e com potencial utilização em casos de déficit de atenção. O precursor do modafinil, difenilmetilsufinil, foi sulfoxidado (Figura 2) com alto rendimento (99%) e enantioespecificamente, resultando no enantiômero (S). Esta bioconversão pode ser

bastante útil na síntese enantioespecífica do modafinil e posterior estudo das atividades farmacológicas e toxicológicas do enantiômero (S) em sua forma pura.

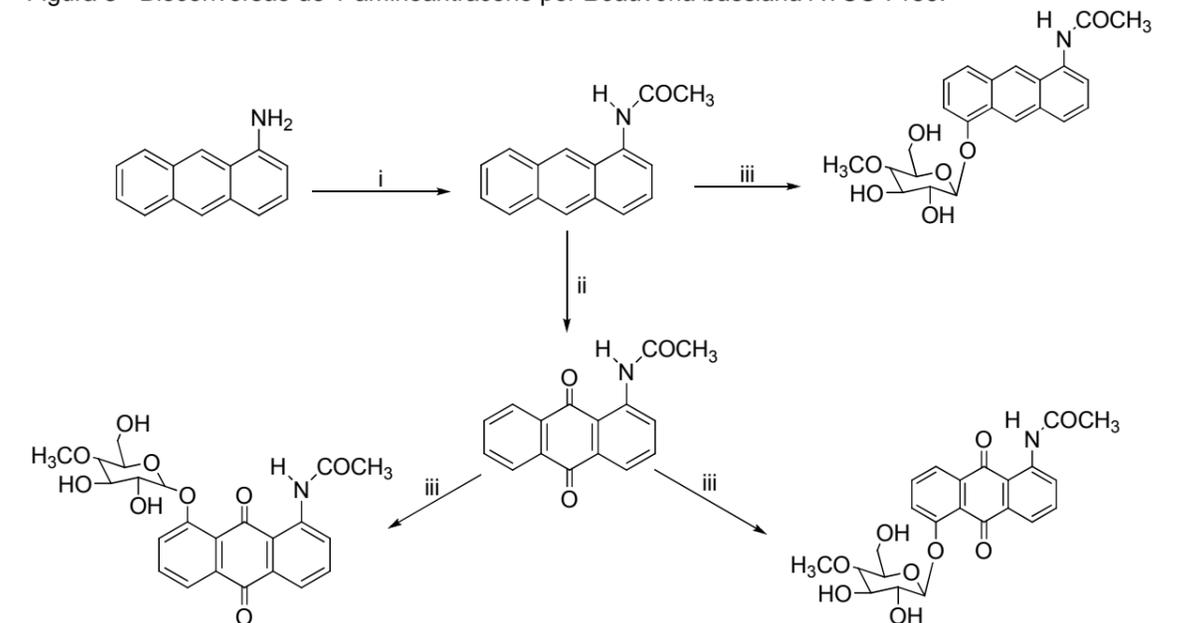
Figura 2 - Sulfoxidação enantioespecífica do precursor de modafinil, difenilmetsulfonil, por *Beauveria bassiana* ATCC 7159.



Fonte: Olivo e colaboradores (2005).

A eficiência biocatalítica de *B. bassiana* também foi demonstrada pela bioconversão do 1-aminoantraceno, que resultou na formação de 5 diferentes derivados (ZHAN; GUNATILAKA, 2008). A cepa de *B. bassiana* ATCC 7159 foi capaz de realizar reações de acetilação, oxidação, hidroxilação e metil-O-glicosilação, como demonstrado na Figura 3.

Figura 3 - Bioconversão de 1-aminoantraceno por *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

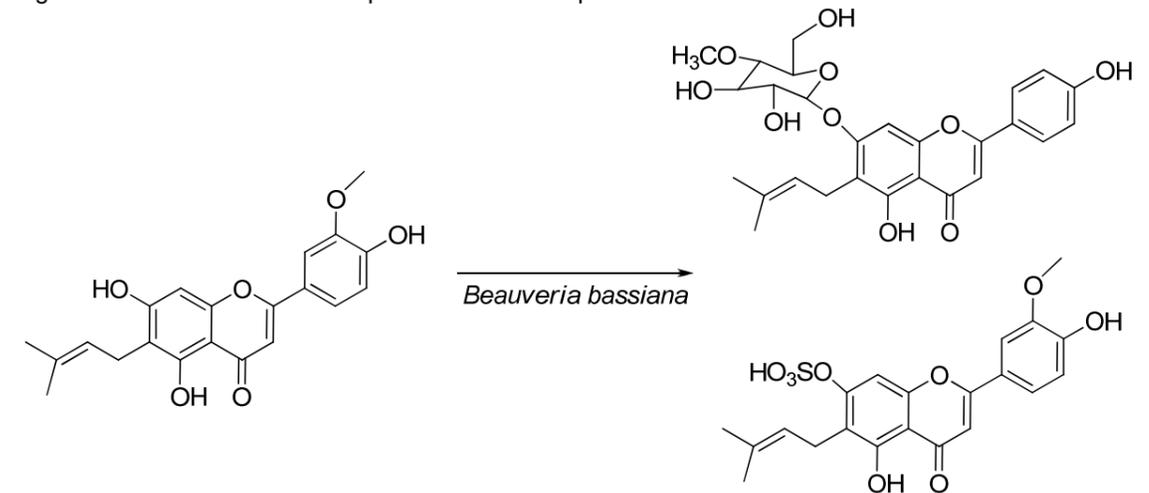


Legenda: (i) acetilação; (ii) oxidação; (iii) hidroxilação seguida de O-metil-glicosilação.
Fonte: Adaptada de Zhan e Gunatilaka (2008).

A aplicação de *B. bassiana* também pode ser exemplificada pela bioconversão do composto canflavina B, uma flavona metilada e prenilada com potencial atividade leishmanicida que é unicamente encontrada na espécie *Cannabis sativa* (IBRAHIM et al., 2010). Após seleção realizada com 41 cepas, *B. bassiana* ATCC 13144

apresentou a maior eficiência na bioconversão do composto e foi utilizada para estudo em escala semipreparativa produzindo dois derivados, sendo um deles sulfatado e o outro glicosilado e, posteriormente, metilado (Figura 4).

Figura 4 - Bioconversão do composto canflavina B por *Beauveria bassiana* ATCC 13144.



Fonte: Adaptado de Ibrahim e colaboradores (2010).

1.2 BIOCONVERSÃO DE FLAVONÓIDES.

1.2.1 Flavonóides

Os flavonóides são pigmentos ubíquos às plantas que, geralmente, são responsáveis pelas cores exuberantes vistas nas pétalas. Várias funções celulares importantes também são atribuídas aos flavonóides nas células vegetais, como regulação do crescimento e indução de expressão gênica. O interesse por esta classe, no entanto, ocorre muito mais pelos efeitos exibidos sobre outros tipos de células: eles inibem o crescimento de várias bactérias, destroem alguns protozoários, inibem enzimas virais e apresentam diversas ações sobre linhagens celulares de mamíferos em ensaios *in vitro* (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonóides foram descobertos na década de 30 por Albert Szent-Gyorgyi, ganhador do prêmio Nobel, como substâncias de elevado poder antioxidante. Em adição, preparações ricas em flavonóides, como o mel e a própolis, são utilizadas com finalidade terapêutica há milênios. Como estas substâncias também estão presentes em diversas frutas e vegetais, o consumo humano diário de flavonóides é estimado em 1 a 2 gramas por dia. Todos estes fatores levaram a um enorme

interesse científico e terapêutico pela classe nas últimas três décadas (HAVSTEEN, 2002; HODEK et al., 2002).

O grupo dos flavonóides engloba diversos polifenóis, cuja estrutura básica deriva da benzo- γ -pirona (cromona) e consiste no núcleo flavânico, estrutura de 15 carbonos de esqueleto $C_6-C_3-C_6$ (Figura 5). A presença de oxigênio heterocíclico, hidroxilas, metilas, isoprenilas, metoxilas e insaturações, além da diferença na posição do anel B dão origem às diferentes classes de flavonóides (HAVSTEEN, 2002; HODEK et al., 2002).

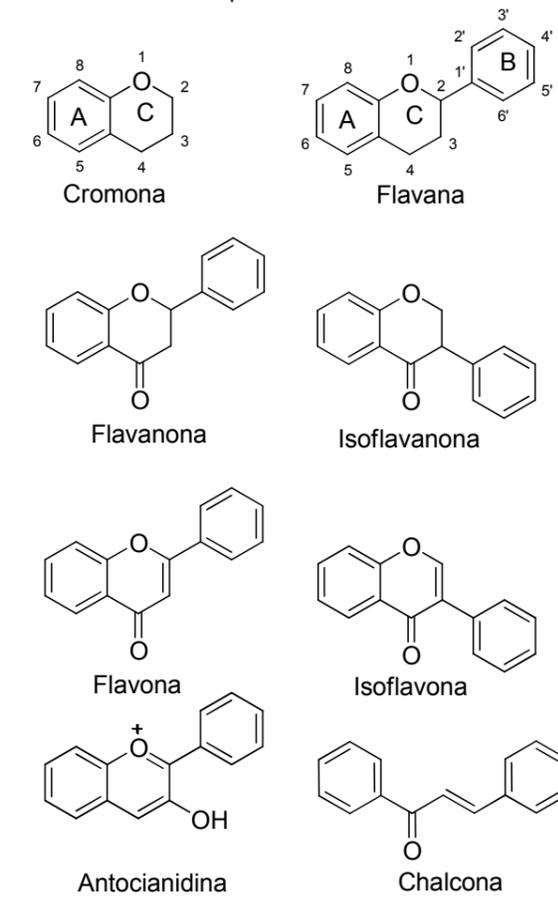
Os flavonóides com estrutura mais próxima àquela do núcleo flavânico, são denominados flavanas. A adição de um grupamento oxo na posição 4, resulta na formação de flavanonas e isoflavanonas, dependendo da posição do anel B. Uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C pode estar presente, conferindo aos compostos propriedades semelhantes àsquelas das quinonas. Também dependendo da posição do anel B, estes flavonóides são chamados de flavonas ou isoflavanonas. A presença de uma dupla ligação adicional no anel C, leva à formação das antocianidinas. Chalconas, compostos bicíclicos contendo o anel C aberto, também são considerados flavonóides. A Figura 5 ilustra, além dos diferentes tipos de flavonóides citados, a numeração da cadeia carbônica usualmente empregada para a classe (HODEK et al., 2002; DAS; ROSAZZA, 2006).

A maioria dos flavonóides ocorre na natureza na forma de glicosídeos, que são formados pela adição de mono ou dissacarídeos aos grupamentos hidroxila da aglicona, mais frequentemente nas posições 3 e 7. Os açúcares mais comuns nesses glicosídeos são a D-glicose e a L-ramnose (ERLUND, 2004).

Mais de 8000 flavonóides são conhecidos, sendo o grande número de compostos devido à ampla gama de combinações possíveis entre substituições de grupamentos hidroxila e metoxila ao núcleo flavânico, além das conjugações a diferentes carboidratos (HODEK et al., 2002).

Como a estrutura química e algumas atividades dos flavonóides são semelhantes às do estrógeno, eles são frequentemente referidos como fitoestrógenos, mas diversas outras atividades farmacológicas são atribuídas a tais compostos, a maioria delas derivada de seu potencial antioxidante, incluindo o relato de atividades vasodilatadora, antialérgica, antilipoperoxidante, antitumoral, antiplaquetária, anti-isquêmica e anti-inflamatória (HODEK et al., 2002).

Figura 5 - Estrutura química básica dos subtipos de flavonóides mais comuns.

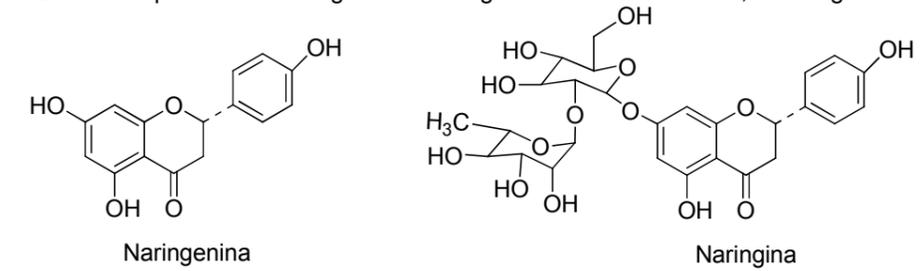


Fonte: Hodek e colaboradores (2002).

1.2.2 Naringenina

A naringenina é uma flavanona de ocorrência quase exclusiva em espécies do gênero *Citrus*. As concentrações mais elevadas são encontradas nos tecidos sólidos dos frutos, mas centenas de miligramas por litro estão presentes no suco destes frutos. Baixas concentrações de naringenina também estão presentes no tomate e em seus derivados industrializados. Na *grapefruit*, o glicosídeo mais comum de naringenina, a naringina (4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo), é responsável pelo gosto azedo da fruta e chega a perfazer 10% do peso seco do fruto (UENG et al, 1999). A medicina tradicional chinesa emprega preparações contendo naringina e naringenina (Figura 6) com finalidade anti-inflamatória (ERLUND, 2004; FANG et al, 2006).

Figura 6 - Estrutura química da naringenina e seu glicosídeo mais comum, a naringina.



Fonte: Fang e colaboradores (2006).

A naringenina tem sido intensamente investigada quanto à sua potencial aplicação farmacoterapêutica e diversas atividades têm sido sugeridas a partir de estudos *in vitro*. Entre elas, há relatos de que a naringenina melhora a resistência a insulina (HORIBA, 2010), tem efeito antioxidante (SHIMODA et al., 2010) e anti-inflamatório (BODET et al., 2008).

Herrera e colaboradores (1996) foram os primeiros a avaliar o efeito vasodilatador da naringenina em modelo de aorta isolada de rato. Neste ensaio, o mecanismo da ação vasodilatadora foi estudado pela adição de nitroprussiato de sódio, um vasodilatador potente que atua como doador de óxido nítrico (NO). O efeito vasodilatador da naringenina foi potencializado pelo nitroprussiato, indicando que também há participação deste mediador na vasodilatação realizada pela naringenina.

O mesmo efeito foi relatado por Ajay e colaboradores (2003) em ensaio que avaliou a potencial atividade vasodilatadora de diversos flavonóides em modelo de aorta isolada de rato com contração induzida por fenilefrina. A naringenina apresentou capacidade de vasodilatação concentração-dependente e, na concentração máxima testada (0,3 mM) foi capaz de provocar entre 70 a 80% de vasodilatação. Para verificar se o mecanismo de vasodilatação mediado pela naringenina tem participação das prostaciclinas do endotélio vascular, o ensaio foi novamente realizado; desta vez, na presença de indometacina, um inibidor potente da ciclooxigenase (COX), que é a enzima responsável pela produção de prostaciclinas. A atividade vasodilatadora foi inibida, sugerindo envolvimento das prostaciclinas na vasodilatação causada pela naringenina. O óxido nítrico (NO) também está envolvido no mecanismo vasodilatador fisiológico e para testar seu envolvimento na vasodilatação provocada pela naringenina, um inibidor da síntese

de NO, *N*-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), foi adicionado e também houve inibição da vasodilatação induzida pelo flavonóide.

Além do potencial vasodilatador já citado, a naringenina também é frequentemente apontada como um composto com propriedades úteis ao tratamento e prevenção de diversos tipos de câncer.

Foi demonstrado que a naringenina inibe, *in vitro*, a β -catenina e a sinalização por fator celular T (Tcf) em células de câncer gástrico humano da linhagem AGS (*adenocarcinoma gastric stomach*). A β -catenina é uma proteína que exerce funções importantes em células epiteliais, como a ativação da actina presente no citoesqueleto, promovendo o ajuste funcional das junções celulares. A β -catenina também pode atuar no núcleo celular, associada ao Tcf, ativando a transcrição de diversos genes envolvidos na formação e progressão tumorais. Desse modo, a ativação da β -catenina e a sinalização por Tcf têm sido relacionadas ao mecanismo de carcinogênese de diversos tipos de câncer, incluindo o colorretal, melanoma, hepatocarcinoma e carcinoma gástrico (LEE et al., 2005).

Um estudo realizado por Ekambaram e colaboradores (2008) demonstrou que a naringenina apresentou papel protetor na carcinogênese gástrica induzida por N-metil-N'-nitro-N nitrosoguanidina (MNNG) *in vivo*. O tratamento com naringenina foi capaz de reduzir a perda de peso dos animais e o tamanho do tumor gástrico induzido. A perda de peso no câncer está associada a um prognóstico ruim e à diminuição na sobrevivência dos pacientes.

Sabarinathan e Vanisree (2010) avaliaram o efeito da naringenina no crescimento de células C6 de glioma ou tumor glial, que são o tipo celular mais comum em tumores cerebrais. O efeito da adição de naringenina sobre a proliferação celular após 24 horas foi verificado pelo ensaio de redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), que verificou a supressão do crescimento celular de maneira concentração-dependente. O IC₅₀ para a linhagem de células C6 foi de 30 μ g, enquanto o valor encontrado para uma linhagem de células não malignas (*Vero Cells*) foi de 75 μ g. Com a intenção de verificar o potencial da naringenina de paralisar ou estabilizar o ciclo celular, as células tratadas com este flavonóide foram avaliadas por citometria de fluxo. Após 24 horas da suplementação celular com 20 a 30 μ g de naringenina, houve diminuição significativa da proporção de células na fase G₀/G₁, indicando apoptose com diminuição de células C6 na fase G₁. O material genético das células tratadas com a

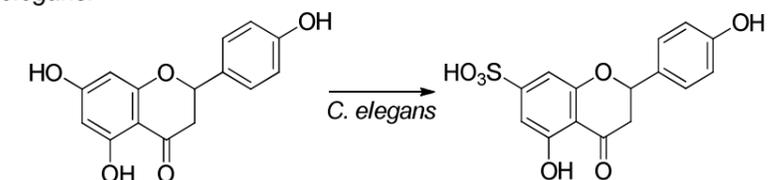
mesma quantidade de naringenina após 24 horas também foi submetido à eletroforese em gel de agarose e verificou-se marcante fragmentação do material genético celular, reforçando a hipótese de indução de apoptose pela naringenina.

1.2.3 Bioconversão da naringenina

A produção de derivados de naringenina por bioconversão tem sido pesquisada, prioritariamente com a intenção de melhorar as propriedades do composto inicial.

O primeiro relato encontrado de bioconversão de naringenina foi realizado por Ibrahim (2000) utilizando uma cultura de *Cunninghamella elegans* padronizada sob numeração 1392 pela Northern Regional Research Laboratory (NRRL) e produziu um derivado com rendimento de 23%. O autor, pela análise da literatura sobre a capacidade de bioconversão de *C. elegans*, esperava um derivado sulfatado ou glicuronado. A análise do derivado realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) não apresentou sinais de ácido glicurônico. Dessa forma, a confirmação de que se tratava de derivado sulfatado (Figura 7) foi realizada pela hidrólise do derivado com ácido a temperatura ambiente. A fração aquosa da hidrólise ácida foi tratada com BaCl₂, resultando em um precipitado branco que presumiu-se ser BaSO₄. A presença do conjugado sulfato também foi confirmada pelo tratamento do derivado com uma aril sulfatase extraída de *Helix pomatia* e obtenção do mesmo precipitado.

Figura 7 - Obtenção de derivado sulfatado de naringenina por bioconversão utilizando cultura de *Cunninghamella elegans*.

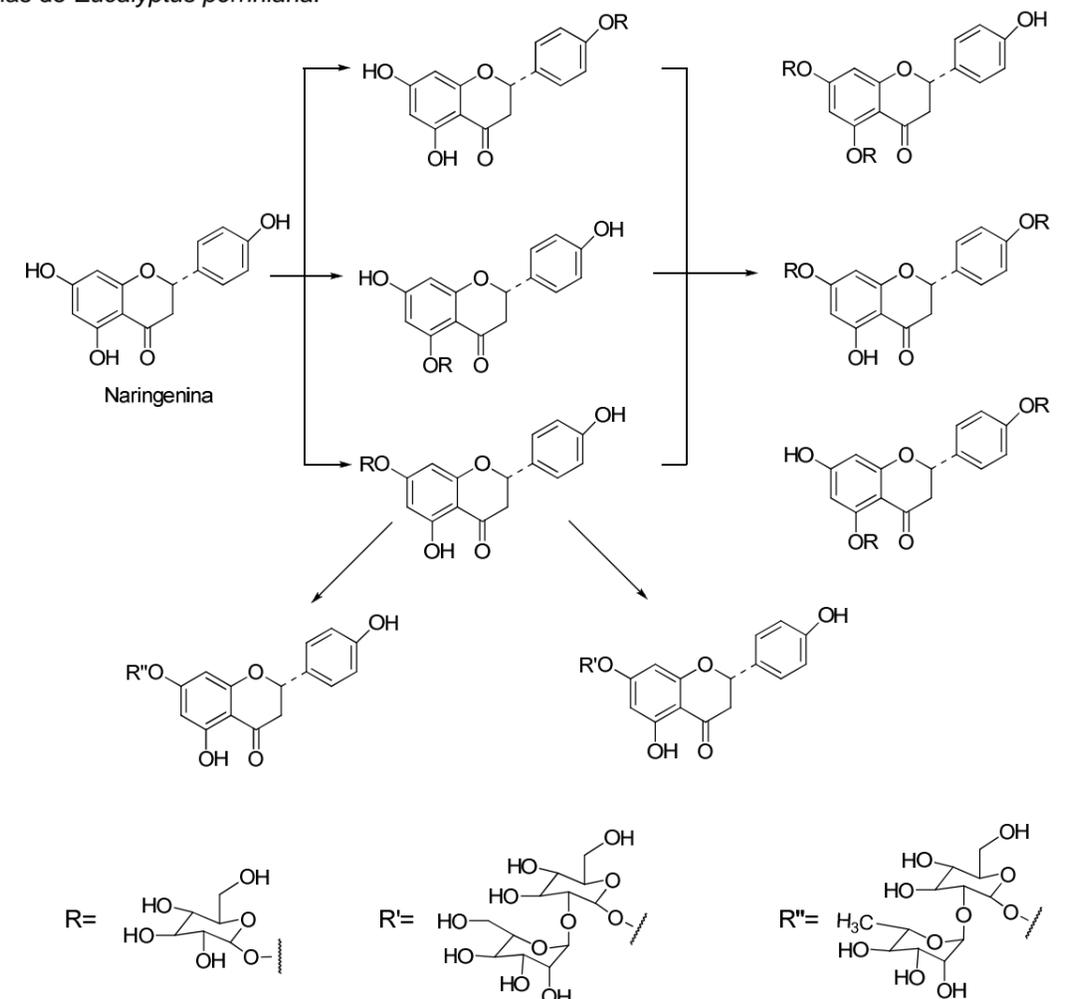


Fonte: Ibrahim (2000).

Já Shimoda e colaboradores (2010) utilizaram células de *Eucalyptus perriniana* na bioconversão de naringenina e obtiveram oito derivados glicosilados, sendo que o derivado glicosilado nas posições 5 e 4' é inédito (Figura 8).

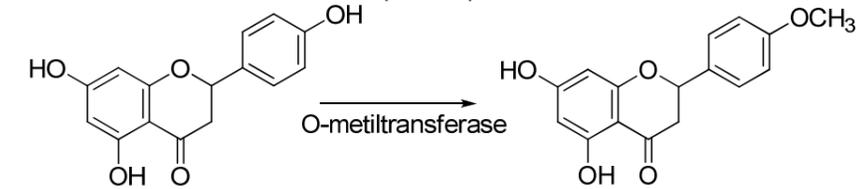
A metilação regioespecífica da naringenina foi obtida pela expressão de uma o-metiltransferase da soja em *Escherichia coli*. A O-metilação de flavonóides altera a reatividade química do grupamento fenólico e aumenta a sua lipossolubilidade, melhorando a compartimentalização celular e a atividade antimicrobiana do composto. A bioconversão de naringenina com a cultura de *E. coli* geneticamente modificada resultou, após apenas 18 horas, na formação de um derivado metilado na posição 4' (Figura 9) (KIM et al, 2005).

Figura 8 - Obtenção de derivados glicosilados por bioconversão de naringenina utilizando cultura de células de *Eucalyptus perriniana*.



Fonte: Shimoda e colaboradores (2010).

Figura 9 - Obtenção de derivado metilado de naringenina por bioconversão com células geneticamente modificadas de *Escherichia coli* para expressão de o-metiltransferase de soja.



Fonte: Kim e colaboradores (2005).

1.3 A BIOCONVERSÃO APLICADA A REAÇÕES DE GLICOSILAÇÃO

1.3.1 Reações de glicosilação

A glicosilação é reconhecida há longo tempo como um mecanismo eficaz para aumentar a hidrofiliabilidade de compostos lipofílicos, contribuindo para melhoria de seu perfil farmacocinético (LIM, 2005).

Os carboidratos podem ser encontrados na natureza como monômeros, oligômeros e polímeros, ou conjugados a outras substâncias importantes. A classe compõe o grupo de substâncias naturais mais abundante e tem papel essencial como recurso energético e na formação de esqueletos biológicos. Além disso, os glicosídeos e glicoconjugados estão envolvidos no reconhecimento molecular e transmissão biológica de informações, desenvolvendo papel essencial em processos como fertilização, embriogênese, desenvolvimento neuronal, atividade hormonal, proliferação celular e organização tecidual (PELLISSIER, 2005; PALCIC, 2011).

Deste modo, a presença de glicosídeos pode modificar radicalmente as propriedades de diversos fármacos. Os conjugados glicosídicos podem controlar aspectos farmacocinéticos e desempenhar papel essencial no mecanismo de ação de fármacos, por participarem de uma variedade de processos como transporte de membrana ativo, estabilização protéica e inibição enzimática. A aglicona, em si, não tem atividade em vários casos, como foi demonstrado para alguns antibióticos e antitumorais, a exemplo da eritromicina e daunomicina. (PELLISSIER, 2005).

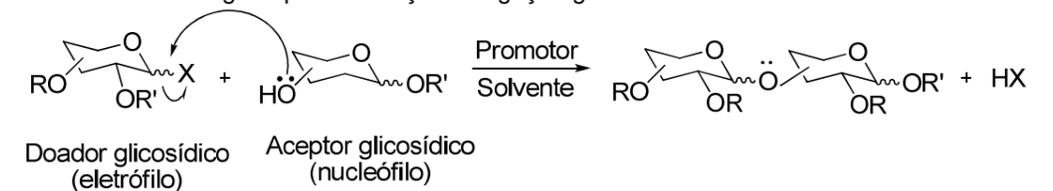
O grande desenvolvimento no conhecimento sobre o papel biológico de glicoconjugados, inclusive sobre a sua utilização terapêutica, gerou uma grande demanda de novas fontes de obtenção dos conjugados existentes na natureza e de sua diversificação química (WEIJERS et al., 2008; PALCIC, 2011).

Diante dessa demanda, grandes esforços foram realizados nas últimas décadas para o desenvolvimento de metodologias eficientes e estereoseletivas de glicosilação (PALCIC, 2011).

A síntese química de oligossacarídeos e conjugados é possível; mas, apesar dos avanços realizados nas últimas décadas, o processo ainda é bastante laborioso por exigir diversos passos de proteção e desproteção de grupos funcionais e purificação. As reações de glicosilação envolvem a formação de uma ligação glicosídica entre um resíduo de carboidrato proveniente de um carboidrato ativado a uma molécula aceptora (WEIJERS et al., 2008; PALCIC, 2011).

O mecanismo geral de formação dessa ligação na grande maioria das reações de glicosilação conhecidas segue aquele descrito para o método proposto por Koenigs e Knorr, em 1901. Essa ligação é formada pela substituição nucleofílica de um grupo abandonador (X) ligado ao carbono anomérico de um carboidrato por um grupamento alcoila de um álcool (R-OH) ou um açúcar parcialmente protegido. A taxa de reação será aumentada na presença de um ativador, geralmente um ácido de Lewis, que é chamado de “promotor” (Figura 10). O papel deste promotor é auxiliar a saída do grupo abandonador X (PELLISSIER, 2005; WEIJERS et al., 2008).

Figura 10 - Mecanismo geral para formação de ligação glicosídica.

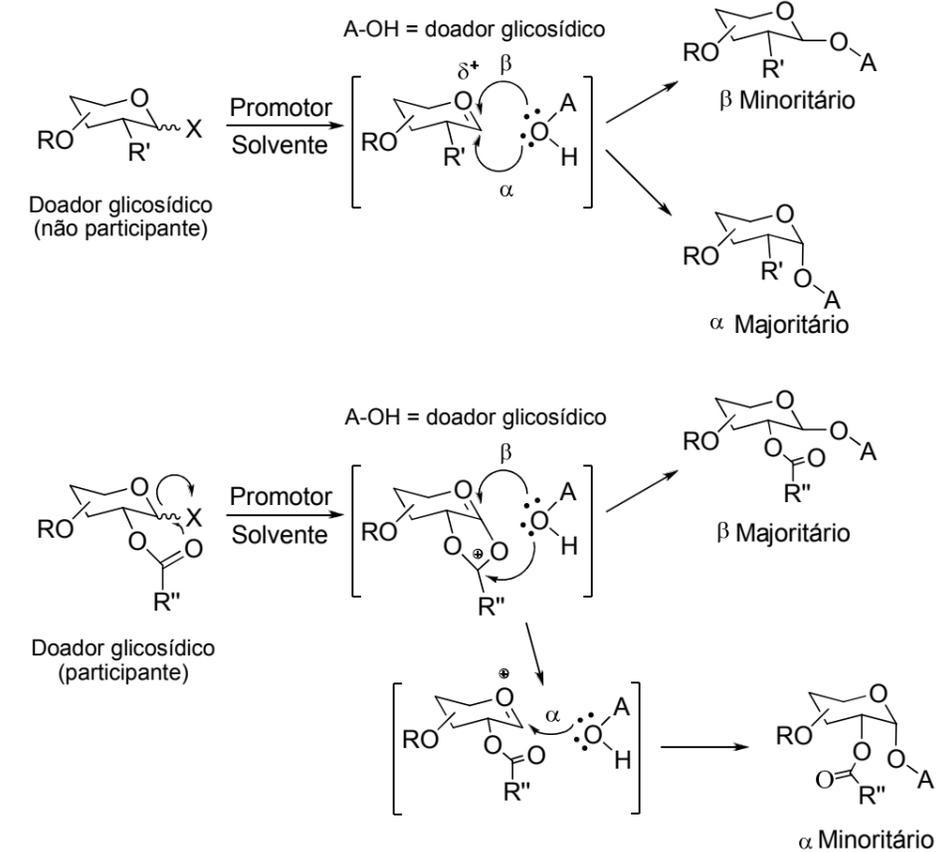


Fonte: Weijers e colaboradores (2008).

O mecanismo geral ilustrado na Figura 10 está detalhado na Figura 11. O sucesso da reação de conjugação depende da reatividade e do tipo de substituinte presente no aceptor e no doador, além da eficácia do promotor. A seletividade anomérica é determinada pela natureza do grupo presente no carbono adjacente ao anomérico. Quando o oxigênio deste grupo está protegido por um grupamento não participante, alquil ou benzil, por exemplo, o efeito anomérico predomina e o anômero α é formado. Por outro lado, quando o carbono adjacente está ocupado por um grupo participador, como um grupamento éster, ocorre a formação de um cátion

intermediário após a saída do grupo X (Figura 11) e o ataque nucleofílico subsequente levará predominantemente a formação de ligações do tipo β . A participação do solvente também interfere fortemente na estereosseletividade (PELLISSIER, 2005; WEIJERS et al., 2008).

Figura 11 - Mecanismo detalhado de formação de ligação glicosídica, evidenciando a participação do grupo adjacente ao carbono anomérico na seletividade anomérica da reação.



Fonte: Weijers e colaboradores (2008).

Além dos desafiantes ajustes para direcionar a estereosseletividade mencionados, os químicos orgânicos têm que lidar com a questão da diferenciação entre os grupos hidroxila eventualmente presentes na molécula aceptora para obtenção do produto desejado. Este processo geralmente é difícil e envolve trabalhosas etapas de proteção e desproteção dos grupamentos, aumentando a rota sintética (PELLISSIER, 2005; WEIJERS et al., 2008).

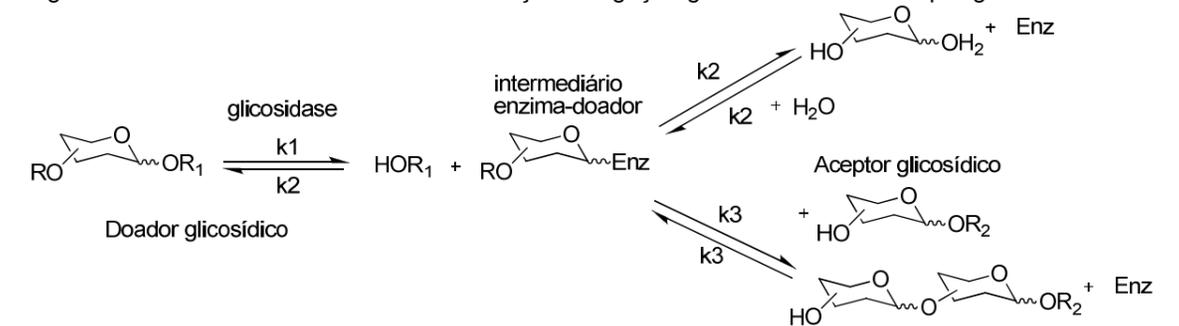
As ferramentas usadas pela natureza para catalisação de ligações glicosídicas são as enzimas glicosiltransferases e glicosidasas. Ambas apresentam enorme

potencial para a síntese de estruturas relevantes que contenham carboidratos (WEIJERS et al., 2008).

As glicosidases, ou glicosil hidrolases, compõe um grupo de enzimas que, primariamente, realizam a função de clivagem de ligações glicosídicas. No entanto, como as glicosidases catalisam uma reação bi-direcional, elas podem ser empregadas para a formação de ligações glicosídicas. São conhecidas aproximadamente 100 famílias de glicosidases, que englobam uma variada gama de proteínas estruturalmente diversas cujos sítios catalíticos são bastante semelhantes. O doador glicosídico pode ser um mono ou oligossacarídeo, ou ainda, um glicosídeo ativado; todos doadores glicosídicos de baixo custo (WEIJERS et al., 2008; SCHMALTZ et al., 2011).

O mecanismo de reação envolve a formação de um intermediário glicosídeo-enzima que, ao ser interceptado por um acceptor glicosídico, forma uma nova ligação glicosídica. O intermediário também pode ser hidrolisado na presença de água (Figura 12) (WEIJERS et al., 2008).

Figura 12 - Mecanismo bidirecional de formação de ligação glicosídica catalisado por glicosidase.



Fonte: Weijers e colaboradores (2008).

As glicosidases são alternativas sintéticas atrativas porque geralmente são tolerantes a diferentes solventes orgânicos, além de utilizarem doadores glicosídicos de baixo custo. Além disso, as glicosidases são estereoseletivas e podem ser utilizadas para inverter ou para manter a estereoquímica da ligação glicosídica. No entanto, a ação dessas enzimas pode gerar regioisômeros, dependendo da estrutura do acceptor (WEIJERS et al., 2008; SCHMALTZ et al., 2011).

Os baixos rendimentos obtidos são a maior limitação na utilização das glicosidases, obstáculo recentemente superado pelo desenvolvimento de enzimas mutantes, chamadas de 'glicosintases', que perderam a capacidade bidirecional de

reação e não são capazes de hidrolizar as ligações glicosídicas (WEIJERS et al., 2008; SCHMALTZ et al., 2011).

Outra classe de enzimas capaz de catalisar a formação de ligações glicosídicas, as glicosiltransferases (GTases), também se apresentam como uma alternativa sintética útil na produção de oligossacarídeos e conjugados glicosídicos. *In vivo*, tais enzimas são responsáveis pela formação da maioria dos conjugados glicosídicos de superfície celular. As GTases são uma super classe de enzimas com mais de 90 famílias. A classe foi organizada na base de dados CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) e está disponível em <http://www.cazy.org> (WEIJERS et al., 2008; WANG, 2009).

Elas catalisam a formação da ligação glicosídica pela transferência de um sacarídeo, tipicamente um monossacarídeo, de um doador ativado, para uma substância aceptora (WEIJERS et al., 2008; PALCIC, 2011; SCHMALTZ et al., 2011).

Os aceptores variam de substâncias complexas como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos a outros monossacarídeos e produtos naturais; tornando as GTases uma das classes de enzimas de maior diversidade conhecida de substratos (WEIJERS et al., 2008; PALCIC, 2011; SCHMALTZ et al., 2011).

Assim como as glicosidases, as GTases podem manter ou inverter a estereoquímica da ligação anomérica. Deste modo, a maior vantagem de utilização das GTases na síntese química reside na sua elevada régio e estereoespecificidade, além dos ótimos rendimentos alcançados com a utilização de derivados do amido (WEIJERS et al., 2008; PALCIC, 2011; SCHMALTZ et al., 2011).

Apesar das várias vantagens apresentadas, o uso de GTases está, necessariamente, vinculado à utilização de açúcares conjugados a nucleotídeos. Uma vez que estes compostos apresentam custo elevado e muitos não estão comercialmente disponíveis em grandes quantidades, a utilização destas enzimas em larga escala torna-se inviável. Uma alternativa utilizada para contornar esta limitação é a utilização de sistemas de regeneração dos doadores *in situ*, mas o custo permanece elevado (WEIJERS et al., 2008).

1.3.2 Glicosilação por bioconversão

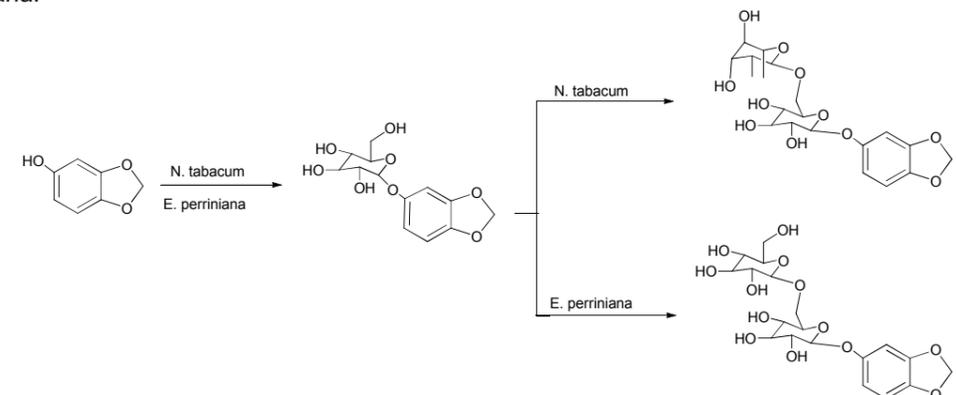
As células de plantas sintetizam uma variedade de derivados secundários glicosilados. A glicosilação, nessas células, aumenta a solubilidade e estabilidade dos compostos, facilitando seu armazenamento e acúmulo nas células vegetais. Deste modo, culturas de células de planta podem ser empregadas para biotransformar substâncias em seus derivados glicosilados (WANG, 2009).

Num exemplo já citado, Shimoda e colaboradores (2010) empregaram uma cultura de células de *E. perriniana* para glicosilar a naringenina (Figura 8), obtendo oito derivados glicosilados, incluindo dois inéditos.

Três derivados glicosilados também foram preparados por Shimoda e colaboradores (2009) a partir do sesamol utilizando culturas de *Nicotiana tabacum* e *E. perriniana* (Figura 13). O sesamol é o componente principal do óleo extraído de sementes de *Sesamum indicum*, utilizado pela medicina tradicional chinesa como um agente capaz de prevenir o envelhecimento. O emprego farmacológico do sesamol, no entanto, é limitado pela baixa solubilidade em água e fotossensibilidade. Ambas as culturas de células foram submetidas às mesmas condições de incubação e produziram um derivado mono- β -glicosilado em comum. No entanto, as culturas apresentaram derivados dissacarídeos distintos; enquanto *N. tabacum* produziu o β -gentiobiosídeo, a cultura de *E. perriniana* produziu o β -rutinosídeo.

A hesperidina, um flavonóide de grande potencial farmacoterapêutico e baixíssima solubilidade em água, foi glicosilada por culturas de células de *Ipomoea batatas* e *E. perriniana* formando seis produtos glicosilados após 5 dias de incubação. Destes compostos, três são inéditos e todos apresentaram aumento da solubilidade em água (SHIMODA et al., 2008).

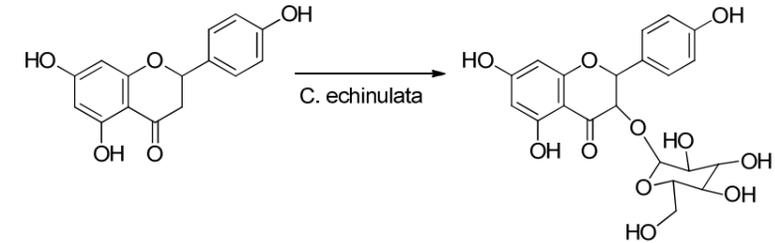
Figura 13 – Glicosilação de sesamol por culturas de células de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus perriniana*.



Fonte: Shimoda et al., 2009.

Células de fungos e bactérias também são frequentemente empregadas para glicosilação. Miyakoshi e colaboradores (2010) empregaram uma cultura de células de *Cunninghamella echinulata* na glicosilação da 3-hidroxi-flavanona (Figura 14). Após 72 horas da adição do substrato, o produto 3-O-β-glicosilado foi obtido com rendimento de 99%.

Figura 14 – Glicosilação de 3-hidroxi-flavanona por cultura de células de *Cunninghamella echinulata*



Fonte: Miyakoshi et al., 2010.

Outro exemplo recente de glicosilação por bioconversão é a utilização de uma cultura de células de *Nocardia Corallina* para glicosilação do ácido echinocístico, um composto com relatos importantes de atividade citotóxica. A biotransformação foi realizada com o intuito de diversificação estrutural e gerou, após sete dias, 3 derivados, dois quais um foi oxidado e dois, glicosilados (FENG et al., 2010).

Diante da grande demanda para síntese produtos glicosilados, do potencial farmacológico dos flavonóides e da aplicação da bioconversão nas reações de glicosilação, justifica-se a busca por novos métodos de bioconversão para diversificação estrutural e glicosilação de flavonóides.

2 Objetivos

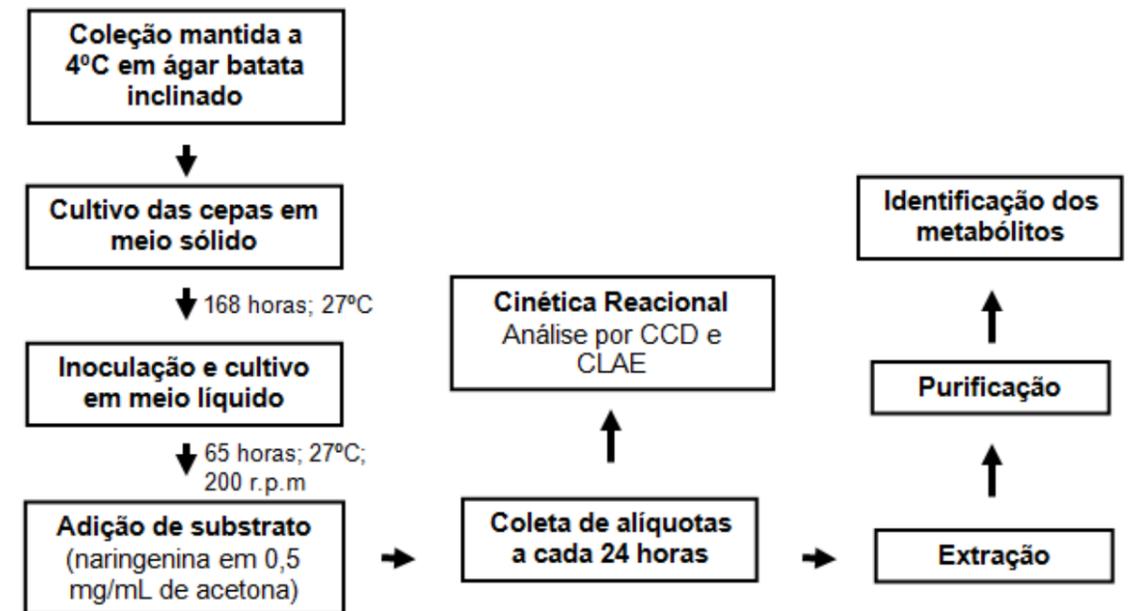
- Selecionar fungos filamentosos da espécie *Beauveria bassiana* spp. capazes de realizar a bioconversão da naringenina;
- Obter, por bioconversão, derivados de naringenina utilizando diferentes cepas do fungo filamentoso *Beauveria bassiana* spp;
- Purificar e caracterizar os derivados obtidos;
- Realizar a avaliação das potenciais atividades vasodilatadora e antiproliferativa dos derivados obtidos e comparar com a atividade da naringenina.

3 Material e Métodos

3.1 TÉCNICA GERAL DE BIOCONVERSÃO

Todos os experimentos de bioconversão foram realizados de acordo com a técnica geral apresentada na Figura 15. Os procedimentos que compõe esta técnica estão pormenorizados nas seções a seguir.

Figura 15 - Fluxograma da metodologia geral de bioconversão.



Fonte: Autor

3.1.2 Manutenção e repique das cepas

Os microrganismos foram mantidos em ágar batata inclinado entre 2 e 4°C e repicados periodicamente com solução de glicerol estéril 25% (v/v). Sub-culturas dessas cepas foram preparadas antes de cada experimento e mantidas a 27°C em câmara germinativa do tipo *Biochemical oxygen demand* (B.O.D) (Modelo TE 401 Tecna[®]) por 7 a 15 dias para crescimento. Ao final deste período, foi realizada a análise macroscópica da colônia com a finalidade de verificar se houve crescimento adequado e descartar a possibilidade de contaminação.

3.1.3 *Preparação do meio de cultura líquido*

O meio de cultura líquido em que foram realizadas as reações de bioconversão utilizado neste estudo foi o *Peptone Dextrose Soy Medium* (PDSM) (COSTA et al., 2008). Cada 1000 mL do meio contém: 5 g de peptona bacteriológica, 20 g de glicose, 5 g lecitina de soja, 5 g de fosfato de potássio monobásico, 5 g de cloreto de sódio e 3 g de extrato de levedura. A lecitina de soja foi solubilizada em quantidade suficiente de água separadamente.

Com o auxílio de uma proveta, foram medidas porções de 100 mL de meio de cultura, as quais foram transferidas para erlenmeyers de vidro de 250 mL com boca larga. As porções de meio de cultura foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos.

3.1.4 *Inoculação dos microrganismos no meio de cultura líquido (PDSM)*

Uma solução estéril de glicerol 25% (v/v) foi utilizada para transportar os esporos dos microrganismos cultivados em meio sólido após 7 dias de crescimento. A cada erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de PDSM autoclavado foi adicionada uma gota da suspensão de esporos formada com glicerol. Após a inoculação, os erlenmeyers foram incubados sob agitação de 200 r.p.m a 27°C ± 2 em agitador rotativo (Modelo TE 424, Tecnal®) por um período de 72 horas. Um erlenmeyer, que serviu como controle negativo, não foi inoculado, sendo mantido sob as mesmas condições de incubação que os demais.

3.1.5 *Adição do substrato*

A naringenina, com grau de pureza igual a 95% (Sigma Aldrich®), foi o substrato utilizado para bioconversão em todas as etapas deste estudo.

O substrato foi pesado em balança semianalítica digital e solubilizado em etanol para a obtenção de uma solução com concentração de 50 mg/mL.

Após 72 horas da inoculação do microrganismo, os erlenmeyers (inclusive o controle não inoculado) foram retirados da incubadora e, com o auxílio de uma pipeta graduada previamente desinfetada em álcool 70%, 1,0 mL de solução etanólica de naringenina 50 mg/mL foi adicionada a cada erlenmeyer. A

concentração final de substrato no meio reacional foi 0,5 mg/mL. Um erlenmeyer inoculado, que serviu como controle negativo, não recebeu substrato.

Os erlenmeyers foram novamente incubados no agitador rotativo a 200 r.p.m e $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, onde foram mantidos pelo tempo necessário para a bioconversão completa do substrato, até o tempo máximo de 96 horas.

3.1.6 *Amostragem do meio reacional*

Para monitoramento da reação de bioconversão e determinação da cinética de formação dos derivados obtidos, foram retiradas alíquotas de 2 mL do meio reacional a cada 24 horas, até o consumo completo do substrato ou até 96 horas.

As alíquotas empregadas para monitoramento foram utilizadas imediatamente (ver 3.1.7). Já as alíquotas destinadas à determinação da cinética de bioconversão foram armazenadas em tubos *ependorf* e mantidas a -4°C para análise posterior (ver 3.4).

3.1.7 *Monitoramento da bioconversão*

Para monitoramento da reação de bioconversão, as alíquotas (2 mL) foram saturadas com cloreto de sódio, adicionadas de 1 mL de acetato de etila (AcOEt) e levadas ao vórtex (Modelo MS1, Ika®).

Com o auxílio de um capilar, as frações AcOEt resultantes foram aplicadas sobre cromatoplasmas de alumínio cobertas com camada de sílica gel 60 marcadas com F_{254} de espessura 0,25 cm (Whatman®). A fase móvel utilizada para corrida cromatográfica foi AcOEt:MeOH, na proporção 95:5 (CUNHA, 2008). As placas cromatográficas foram visualizadas em câmara de luz ultravioleta a 254 nm e reveladas por vapor de iodo.

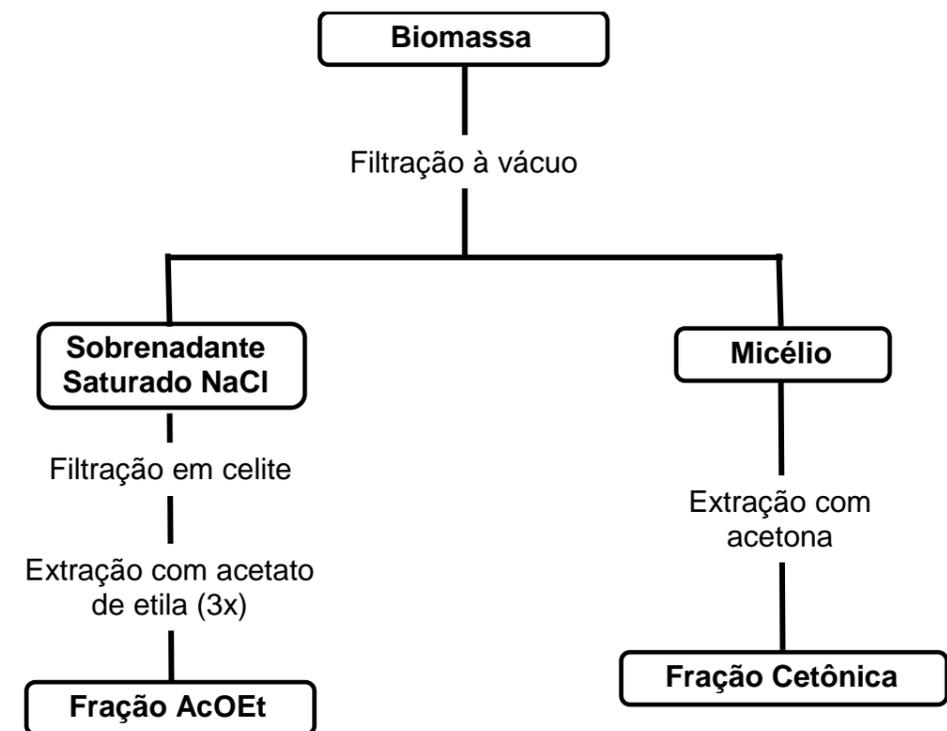
3.1.8 *Extração*

Ao final do período de incubação, o conteúdo dos erlenmeyers foi filtrado e lavado com quantidade suficiente de água sob vácuo em funil de Buchner, utilizando tiras de gaze em cruz. O micélio retido no funil foi extraído com cerca de 300 mL de

acetona em agitador magnético por aproximadamente 40 minutos, quando a mistura foi filtrada em papel de filtro.

A solução obtida da primeira filtração foi supersaturada em cloreto de sódio e novamente filtrada em funil de Buchner contendo camada de celite. A solução resultante foi extraída em funil de separação com três porções de 300 mL de AcOEt. As frações AcOEt e cetônica foram concentradas sob vácuo em evaporador rotativo até completa evaporação do solvente (SL 125, Solab®). A metodologia utilizada para extração está ilustrada na Figura 16.

Figura 16 - Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional, resultando na formação das frações AcOEt e cetônica.



Fonte: Autor

3.1.9 Purificação das frações

As frações AcOEt e cetônica obtidas na extração foram submetidas à cromatografia de adsorção em coluna. Fase móvel AcOEt:MeOH, na proporção 95:5, ou AcOEt 100% e fase estacionária sílica gel 0,063 – 0,200 mm foram empregadas para separação. A quantidade de sílica, o comprimento e diâmetro da coluna foram

escolhidos conforme a massa das frações, seguindo as proporções apresentadas na Tabela 1 (PAVIA, 1990).

Tabela 1: Proporção de adsorvente, diâmetro e altura da coluna utilizada conforme a massa da amostra.

Amostra	Adsorvente	Diâmetro	Altura
(g)	(g)	(mm)	(mm)
0,01	0,3	3,5	0
0,10	3,0	7,5	60
1,0	30,0	16,0	130
10,0	300,0	35,0	280

Fonte: Pavia, 1990.

As frações que não foram totalmente solúveis na fase móvel AcOEt:MeOH (95:5), foram incorporadas em pequena quantidade de sílica para aplicação na coluna.

O monitoramento da purificação em coluna foi feito por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), seguindo a metodologia apresentada na seção 3.1.7. Os produtos purificados tiveram o solvente evaporado a pressão reduzida e foram armazenados em dessecador sob vácuo por 24 horas antes da pesagem.

3.2 SELEÇÃO

Com o objetivo de encontrar o microrganismo mais adequado para bioconverter a naringenina, foi realizada uma seleção com várias cepas de *Beauveria bassiana* spp.

Além da cepa de *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram utilizadas cepas de *Beauveria bassiana* spp., isoladas de amostras de solo do cerrado, identificadas pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP), são elas: IP3a, IP6, IP8, IP11, IP94, IP98, IP127, IP132, IP147 e IP153 (COSTA, 2011).

No ensaio de seleção, cada cepa foi utilizada para inocular um erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido PDSM. O experimento foi realizado conforme procedimento geral de bioconversão (seção 3.1).

3.3 BIOCONVERSÃO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA

Após avaliação dos resultados da seleção e definição da cepa que melhor metabolizava a naringenina, foi realizado um ensaio em escala semipreparativa.

Neste ensaio, 9 erlenmeyers de 250 mL, cada um contendo 100 mL de meio de cultura líquido, foram inoculados com a cepa escolhida e 50 mg de naringenina foram adicionadas a cada erlenmeyer; resultando na bioconversão de 450 mg de naringenina, conforme procedimento descrito na seção 3.1.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DOS DERIVADOS E CONSUMO DE NARINGENINA

Após purificação dos derivados, uma análise da sua cinética de formação foi realizada com auxílio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As alíquotas do meio reacional obtidas conforme procedimento da seção 3.1.6 foram centrifugadas em microcentrífuga (Micro Fanem[®] modelo 243) a 60.000 r.p.m. por 5 minutos e 20 µL do sobrenadante foram utilizados para injeção em cromatógrafo Varian[®], injetor manual Rheodyne com loop fixo de 20 µL, coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK[®] (250 x 4,6 mm x 0,5µm). A fase móvel empregada foi metanol (MeOH): tampão fosfato de potássio monobásico 0,02 M, na proporção 65:35 e fluxo de 0,6 mL/min. Esta metodologia foi empregada por Cunha (2008) utilizando fluxo 0,8 mL/min. Para preparo da fase móvel foi utilizada água destilada purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]), fosfato de potássio monobásico P.A e metanol grau HPLC. O metanol foi filtrado em membrana hidrofóbica antes da utilização.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS OBTIDOS

Os produtos purificados em quantidade suficiente tiveram sua estrutura química elucidada com o auxílio das técnicas no Infravermelho, Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C), e ressonância magnética nuclear de duas dimensões: *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation* (HMBC) e *Heteronuclear Single-Quantum Correlation* (HSQC).

3.5.1 *Infravermelho*

Os espectros no infravermelho foram obtidos na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Para obtenção dos espectros de infravermelho foi utilizado um espectrômetro modelo Spectrum 400 FT-IR (Perkin-Elmer®) com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} . Pastilhas de KBr foram preparadas utilizando 2 mg de amostra para 300 mg de KBr previamente dessecado em estufa a 120°C.

3.5.2 *Espectrometria de massas*

As análises de EM da naringenina e do derivado foram realizadas por meio da injeção direta das amostras (MeOH:H₂O (1:1, v/v) e ácido fórmico 0,1%) no espectrômetro de massas 1200L triplo-quadrupole MS/MS (Varian®). Os espectros de massas foram obtidos no modo positivo com ionização por electrospray e parâmetros otimizados para o íon molecular protonado, utilizando nitrogênio como gás de colisão e diferentes energias de colisão (30–60 eV).

3.5.3. *Ressonância magnética nuclear*

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. O espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o ¹H e 75,46 MHz para o ¹³C), equipado com sonda HR-MAS de 4 mm foi utilizado. As análises foram feitas em metanol ou clorofórmio deuterado utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.6 AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS DERIVADOS

3.6.1 *Avaliação da atividade vasodilatadora in vitro*

O substrato e os derivados com rendimento suficiente foram submetidos a estudos *in vitro* para avaliação da potencial ação vasodilatadora e comparação à da naringenina.

Para a avaliação da atividade vasodilatadora, ratos Wistar machos foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os procedimentos

foram realizados em acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Goiás. As aortas foram rapidamente removidas e dissecadas, removendo-se todo o tecido conjuntivo e adiposo, e cortadas em anéis de 4 mm de comprimento. Os anéis aórticos foram imediatamente fixados em cubas de órgão isolado conectadas a transdutor de força isométrico contendo 10 mL de solução de Krebs com a composição a seguir (mM): NaCl 130, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 14,9, glicose 5,5, CaCl₂ 1,6. A solução foi mantida em pH 7,4, à temperatura de 37°C e aerada com 95% (v/v) O₂ e 5% (v/v) CO₂. As respostas foram armazenadas com auxílio de um sistema computadorizado e WinDaq Resource (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA)

Os anéis foram inicialmente mantidos sob tensão de 1 grama-força por um período de estabilização de 60 min antes de realizar os protocolos experimentais. Após o período de estabilização, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (0,1 μmol/L) para verificar a resposta contrátil da preparação. A presença de endotélio funcional, nos anéis pré-contraídos com fenilefrina, foi certificada pela adição de acetilcolina (1 μmol/L).

Após equilíbrio e pré-contracção com fenilefrina (0,1 μM, EC₅₀ previamente determinado no laboratório) curvas concentração-resposta cumulativas foram obtidas para naringenina (0,5 a 500 μM), para o derivado (0,5 a 500 μM) e para o veículo (DMSO) nas mesmas quantidades.

Em outra série de experimentos, o mesmo protocolo foi repetido na presença (20 min) do bloqueador não seletivo de canais de K⁺, tetraetilamônio (TEA, 1mM).

3.6.2 Avaliação do potencial antiproliferativo in vitro através do método de exclusão com azul de tripano

Para a realização deste teste, a suspensão de células da linhagem Jurkat (ATCC TIB-152), derivada de leucemia linfóide humana aguda, foi distribuída (2x10⁶ cels/mL; 100 μL/poço) em microplaca de 96 poços contendo meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e tratado com diferentes concentrações (0,0015 – 2,0 mM) de naringenina e dos derivados com rendimento suficiente por 24 horas em incubadora a 5% de CO₂. Após o período de tratamento, uma alíquota de 20 μL da suspensão de células foi retirada e diluída em 180 μL de

azul de tripano a 0,2%. As células foram observadas por suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer.

O percentual de inibição celular, na presença das substâncias em estudo, foi calculado considerando a média do número de células viáveis do controle como 100%.

Foram realizados dois experimentos independentes e cada concentração foi experimentada em triplicata. O CI_{50} foi determinado por regressão não linear e a comparação entre a naringenina e os derivados foi feita pelo teste *Student t test*.

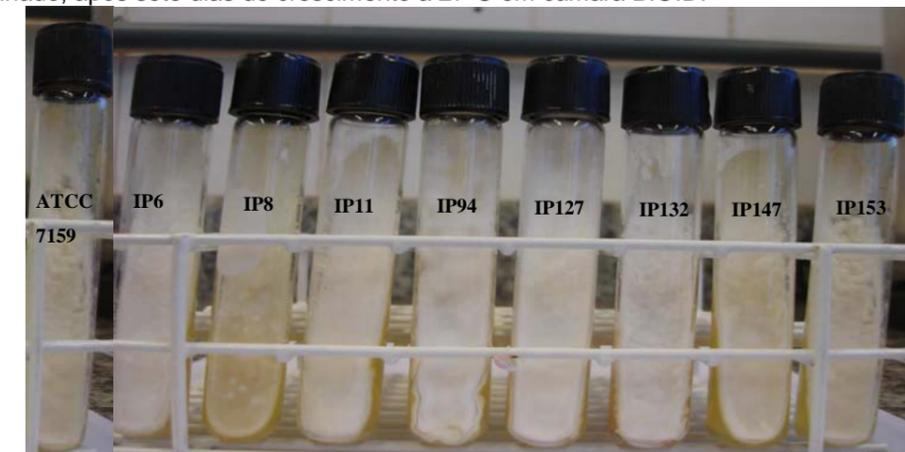
4 Resultados e discussão

4.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CEPAS EM MEIO PDSM

O sucesso na utilização do metabolismo fúngico requer conhecimento detalhado sobre as características de crescimento e a fisiologia do fungo em questão. A produção de derivados específicos pode requerer condições de cultivo diferentes e cada fungo é único em sua morfologia e fisiologia. Deste modo, a morfologia e as condições de cultivo empregadas em cada processo envolvendo fungos filamentosos precisam ser muito bem estabelecidas (PAPAGIANI, 2004).

Todas as cepas de *Beauveria bassiana* spp. (IP6, IP8, IP11, IP94, IP127, IP132, IP147, IP153 e *B. bassiana* ATCC 7159) utilizadas neste estudo apresentaram crescimento satisfatório, avaliado visualmente, em ágar batata inclinado, no período de 7 a 15 dias, o que pode ser observado na Figura 16. As culturas apresentaram aspecto algodinoso e coloração esbranquiçada. O meio utilizado mostrou-se eficaz para manutenção dos microrganismos.

Figura 17 - Aspecto morfológico das cepas de *Beauveria bassiana* spp. empregadas na seleção em meio inclinado, após sete dias de crescimento a 27°C em câmara B.O.D.



Fonte: Autor

Para o cultivo em meio líquido, foi escolhido o caldo PDSM. Este meio é de fácil preparo, baixo custo e se mostrou eficaz em estudos de bioconversão anteriores realizados no Laboratório de Bioconversão (LaBioCon) da Universidade Federal de Goiás (CIRILO, 2006; GOMES, 2007; PAZINI et al., 2010). Neste estudo, o meio PDSM também mostrou eficácia para o crescimento das cepas utilizadas na seleção e foi utilizado posteriormente no ensaio em escala semipreparativa.

Após 72 horas de crescimento em meio de cultura líquido PDSM a 200 r.p.m. e 27°C +/- 2° C as cepas testadas apresentaram aspecto morfológico bastante variado. Para a descrição do aspecto morfológico neste estágio foram consideradas as características: cor, forma de crescimento (amorfa ou pellets), presença ou ausência de halo e viscosidade (+; ++; +++). Os resultados são apresentados no Quadro 1 e podem ser observados na Figura 18.

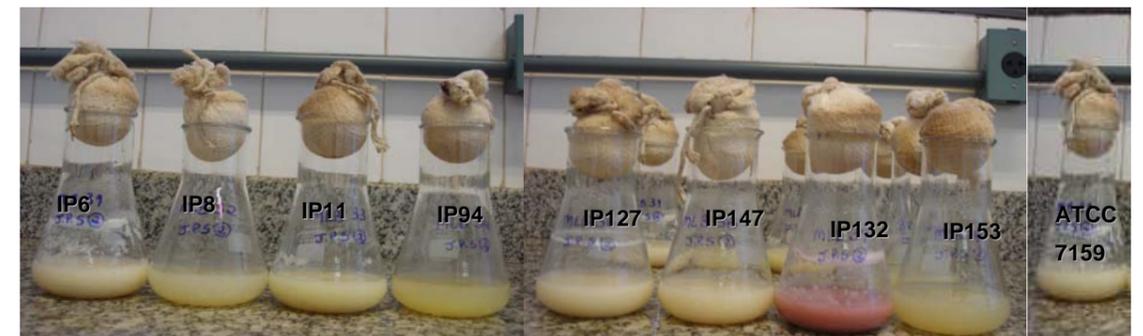
A forma de crescimento é um fator de importância notória, pois apresenta grande impacto da reologia do meio de cultura, afetando a taxa de consumo de oxigênio e o consumo de nutrientes (PAPAGIANI, 2004).

Quadro 1 - Caracterização do aspecto morfológico das cepas de *Beauveria bassiana* spp. utilizadas na seleção em meio líquido PDSM.

Cepa	Cor	Forma de Crescimento	Halo	Turbidez
<i>B. bassiana</i> ATCC 7159	Rosado	Amorfo	Presente	+++
<i>B. bassiana</i> IP6	Amarelado	Amorfo	Presente	++
<i>B. bassiana</i> IP8	Amarelado	Amorfo	Ausente	+
<i>B. bassiana</i> IP11	Amarelado	Amorfo	Ausente	++
<i>B. bassiana</i> IP94	Amarelado	Amorfo	Ausente	+
<i>B. bassiana</i> IP127	Amarelado	Amorfo	Presente	++
<i>B. bassiana</i> IP132	Rosado	Amorfo	Presente	++
<i>B. bassiana</i> IP8147	Amarelado	Amorfo	Ausente	+++
<i>B. bassiana</i> IP8153	Amarelado	Amorfo	Ausente	+

Fonte: Autor

Figura 18 - Aspecto morfológico das cepas após 72 horas de crescimento em meio líquido PDSM



4.2 SELEÇÃO

Durante o procedimento de seleção com as cepas de *B. bassiana* spp., alíquotas foram retiradas do meio reacional a cada 24 horas para monitorar a presença de derivados e do substrato. Este monitoramento foi realizado por CCD com fase móvel acetato de etila/metanol, na proporção 95:5.

Todas as cepas de *Beauveria bassiana* spp. testadas foram eficazes na metabolização da naringenina, de forma que apenas uma das cepas (IP11) não consumiu totalmente o substrato após 96 horas de incubação. Quatro diferentes derivados puderam ser observados no monitoramento da seleção realizado por CCD. Os produtos obtidos foram numerados em ordem decrescente de acordo com fator de retenção apresentado. O Quadro 2 apresenta os resultados da seleção.

Quadro 2 - Derivados da naringenina encontrados em monitoramento por CCD produzidos por cepas de *Beauveria bassiana* spp. após 96 horas de incubação em meio líquido PDSM a 27°C e 200 r.p.m.

Microrganismo	Deriv. I Rf: 0,86	Deriv. II Rf: 0,43	Deriv. III Rf: 0,26	Deriv. IV Rf: 0,20	Subs. Rf: 0,67
<i>B. bassiana</i> IP6	+	-	-	-	-
<i>B. bassiana</i> IP8	-	+	+	-	-
<i>B. bassiana</i> IP11	-	+	+	-	+
<i>B. bassiana</i> IP94	-	+	+	-	-
<i>B. bassiana</i> IP127	-	+	+	-	-
<i>B. bassiana</i> IP132	-	+	-	-	-
<i>B. bassiana</i> IP147	-	+	+	-	-
<i>B. bassiana</i> IP153	-	-	-	+	-
<i>B. bassiana</i> ATCC 7159	-	+	+	-	-

Legenda: Os símbolos (+) e (-) indicam presença ou ausência dos derivados, respectivamente. Na coluna denominada substrato, (+) indica que o substrato não foi totalmente consumido e (-) indica consumo total do substrato. A CCD empregou fase móvel AcOEt:MeOH, na proporção 95:5 e fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,25 cm de espessura.

Fonte: Autor.

As reações de bioconversão, via de regra, geram produtos mais polares que o substrato. No entanto, no caso da cepa IP6, o derivado observado possui menor polaridade que a naringenina na fase móvel empregada para análise. Os derivados II e III foram produzidos pela maioria das cepas e possuem fator de retenção próximo ao do substrato e, como é esperado um derivado funcionalizado e de estrutura próxima à do substrato, despertaram maior interesse. O derivado IV foi

produzido apenas pela cepa IP153 e apresentou polaridade bastante diferente do substrato, levantando a hipótese de ser pouco promissor.

Os derivados II e III, considerados mais promissores para estudos posteriores, foram igualmente produzidos pelas cepas IP8, IP11, IP94, IP127, IP147 e ATCC 7159. Como nenhuma vantagem no uso das cepas isoladas do cerrado pode ser observada, optou-se por utilizar a cepa ATCC nos ensaios em escala semipreparativa. Esta decisão baseou-se, ainda, na literatura, que aponta *Beauveria bassiana* ATCC 7159 como um dos fungos mais empregados em reações de bioconversão por ser capaz de realizar diversos tipos de modificações estruturais como reduções, oxidações e hidrólises (GROGAN, 2000).

4.3 ENSAIO SEMIPREPARATIVO COM *Beauveria bassiana* ATCC 7159

A cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foi utilizada para bioconversão em escala semipreparativa, em que foram empregadas as mesmas condições de incubação descritas para o procedimento da seleção. As frações AcOEt e cetônica, obtidas após extração do meio reacional, foram analisadas por CCD e, devido à similaridade, foram reunidas, resultando numa fração única de 1,2 gramas. A amostra foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de vidro, utilizando fase móvel AcOEt 100%. As frações coletadas foram numeradas e o monitoramento foi realizado por CCD das frações que receberam numeração par. A fase móvel empregada no monitoramento foi AcOEt/MeOH, 95:5. O resultado deste monitoramento está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados do monitoramento realizado por CCD das frações coletadas da coluna.

Frações	Derivado II (Rf.: 0,43)	Derivado III (Rf.: 0,26)
2 a 24	+	-
26 a 32	+	+
34 a 46	+	-

Fonte: Autor. Condições cromatográficas: coluna de vidro 26,5 x 2 cm, fase estacionária sílica gel 60 0,063-0,200 mm e fase móvel AcOEt 100%; CCD: fase estacionária sílica gel e fase móvel AcOEt/MeOH 95:5.

O derivado II foi purificado facilmente, já o derivado III não pode ser purificado por esta técnica, uma vez que todas as frações eluídas da coluna que continham o derivado III também apresentavam o derivado II. Foram realizadas duas novas

tentativas de purificação por cromatografia de adsorção em coluna de vidro, sob as mesmas condições, com sub-frações da primeira coluna, mas apenas o derivado II, denominado LaBioCon 185, foi isolado com sucesso. As frações contendo o derivado II foram, então, lavadas com hexano para remoção de eventuais ácidos graxos provenientes metabolismo fúngico e o rendimento global obtido para o derivado LaBioCon 185 foi de 38%.

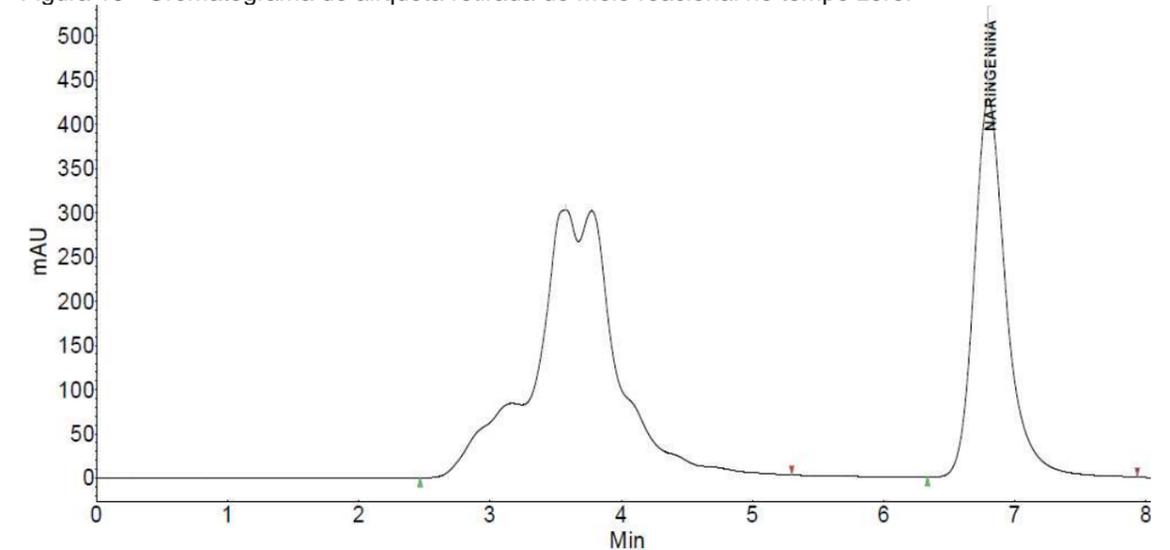
4.4 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DOS DERIVADOS E CONSUMO DE NARINGENINA

Para determinação da cinética de reação, amostras do meio reacional foram retiradas a cada 24 horas e preparadas conforme procedimento descrito na seção 3.4 para injeção em CLAE.

Inicialmente, a metodologia de análise por CLAE desenvolvida no LaBioCon por Cunha (2008), para análise de amostras contendo naringenina foi testada para a análise das amostras e determinação da cinética. Esperava-se, com base na análise de trabalhos anteriores realizados no LaBioCon (CIRILO, 2006; GOMES, 2007; PAZINI, 2010), a separação cromatográfica de, pelo menos, dois picos, um referente à naringenina e outro referente à sobreposição do meio de cultura líquido PDSM e do inóculo. A metodologia descrita não demonstrou separação adequada dos componentes da amostra.

Na tentativa de aprimorar a metodologia, o fluxo foi alterado para 0,6 mL/min enquanto todos os outros parâmetros permaneceram inalterados. A mudança no fluxo permitiu a separação adequada de dois picos. A injeção anterior de solução de 0,5 mg/mL de naringenina em metanol, permitiu a identificação da substância com tempo de retenção 6,8 minutos como naringenina; o componente da amostra com tempo de retenção 3,7 minutos poderia ser atribuído ao meio de cultura PDSM, ao inóculo de *B. bassiana* ATCC 7159, ou à sobreposição do PDSM e do inóculo (Figura 19).

Figura 19 - Cromatograma de alíquota retirada do meio reacional no tempo zero.



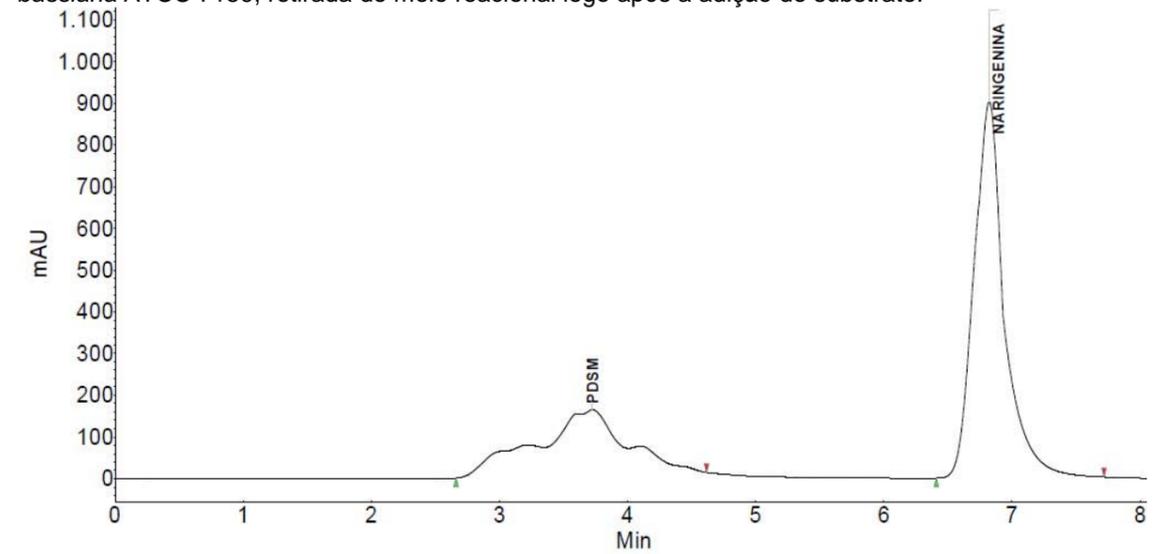
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Varian®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK® (250 x 4,6 mm x 0,5µm) e fase móvel metanol:tampão fosfato de potássio monobásico 0,02 M, na proporção 65:35 com fluxo 0,6 mL/min.

A fim de verificar estas possibilidades, uma amostra do branco não inoculado, contendo apenas meio de cultura e naringenina, foi analisada (ver seção 3.1.4). Novamente, apenas duas substâncias foram observadas no cromatograma; no entanto, a substância com tempo de retenção de 3,7 minutos, apresentou uma área sob a curva bastante reduzida (Figura 20) em relação ao cromatograma anterior (Figura 19). Deste modo, foi possível confirmar a sobreposição dos picos referentes ao meio de cultura PDSM e ao inóculo de *B. bassiana*.

Os derivados II e III que haviam sido identificados na análise por CCD, também foram detectados na análise por CLAE. O cromatograma representado na Figura 21 corresponde à análise de uma alíquota retirada após 48 horas da adição do substrato e evidencia, além dos picos referentes ao PDSM e a naringenina, os picos referentes aos derivados, com tempos de retenção iguais a 4,7 e 5,5 minutos.

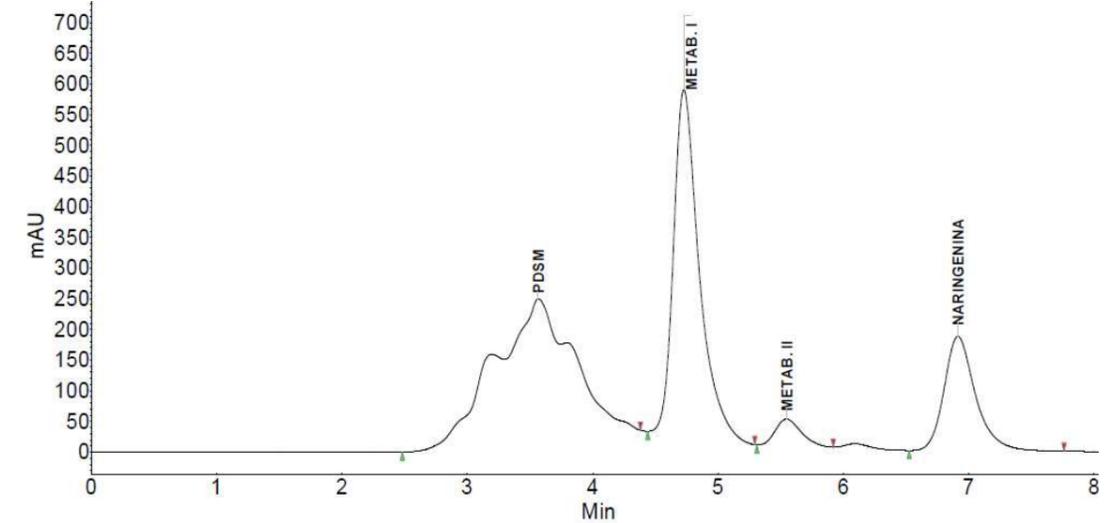
A injeção de solução metanólica do derivado II (LaBioCon 185), previamente purificado por cromatografia de adsorção em coluna de vidro (seção 4.3), permitiu a determinação do seu tempo de retenção como 4,7 minutos. Deste modo, inferiu-se que o tempo de retenção de 5,5 minutos corresponde ao derivado III.

Figura 20 - Cromatograma de alíquota do branco, em que não foi inoculada a cepa de *Beauveria bassiana* ATCC 7159, retirada do meio reacional logo após a adição do substrato.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Varian®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK® (250 x 4,6 mm x 0,5µm) e fase móvel metanol:tampão fosfato de potássio monobásico 0,02 M, na proporção 65:35 com fluxo 0,6 mL/min.

Figura 21 - Cromatograma de alíquota do meio reacional, retirada 48 horas após a adição do substrato.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Varian®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK® (250 x 4,6 mm x 0,5µm) e fase móvel metanol:tampão fosfato de potássio monobásico 0,02 M, na proporção 65:35 com fluxo 0,6 mL/min.

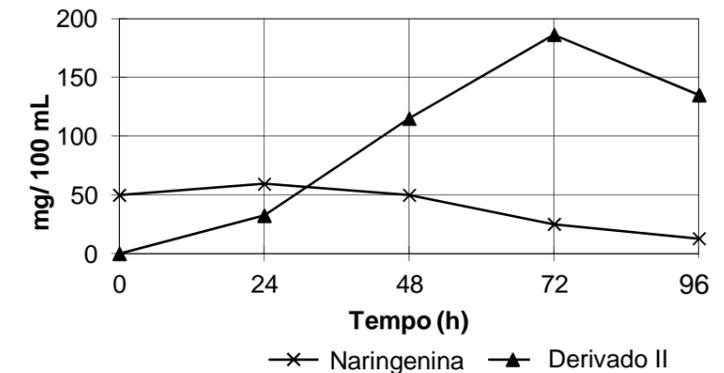
Ajustada a metodologia de análise por CLAE, foram realizadas as injeções das amostras coletadas do meio reacional a cada 24 horas, até o tempo de 96 horas. Para construção da cinética de formação dos derivados e consumo do substrato, a área sob a curva de cada derivado e do substrato foi obtida em cada

tempo e os valores foram transferidos para uma planilha no *software* Excel® (Pacote Office, Microsoft®), configurada para plotar a quantidade dos produtos, em miligramas, em função do tempo, em horas.

A formação do derivado II pode ser observada a partir da alíquota coletada após 24 horas da adição do substrato (Figura 22). A concentração do derivado II aumenta até o tempo de 72 horas e sofre uma leve queda na alíquota coletada após 96 horas da adição do substrato. Esta queda pode ser creditada à degradação do derivado no meio reacional. O derivado II também pode ter sido internalizado pelas células fúngicas ou ficado adsorvido à superfície dessas, dificultando a detecção, uma vez que a análise foi realizada com o sobrenadante de incubação.

É pertinente observar que a detecção de naringenina na alíquota de 24 horas é superior à detecção obtida na coleta de zero hora, o que pode ser devido a erro analítico ou à solubilização inadequada de naringenina no meio reacional antes da coleta da primeira alíquota.

Figura 22 – Cinética de formação do derivado II e consumo da naringenina por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas

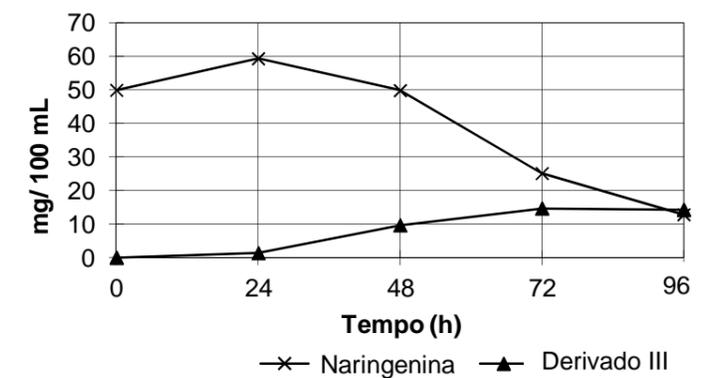


Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Varian®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK® (250 x 4,6 mm x 0,5µm) e fase móvel metanol:tampão fosfato de potássio monobásico 0,02 M, na proporção 65:35 com fluxo 0,6 mL/min.

A Figura 23 representa a cinética de formação do derivado III e o consumo da naringenina, ambos obtidos nos mesmos cromatogramas utilizados para construção da cinética de formação do derivado II. A formação do derivado III é observada a partir de 24 horas após a adição do substrato e aumenta até o tempo de 72 horas.

Para ambos os derivados, a observação da cinética de formação permite determinar que o melhor tempo para interromper a incubação em experimentos posteriores é de 72 horas após a adição do substrato.

Figura 23 - Cinética de formação do derivado III e o consumo da naringenina por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Varian®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP 18 MERCK® (250 x 4,6 mm x 0,5 μm) e fase móvel metanol:tampão fosfato de potássio monobásico 0,02 M, na proporção 65:35 com fluxo 0,6 mL/min.

4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO DERIVADO OBTIDO

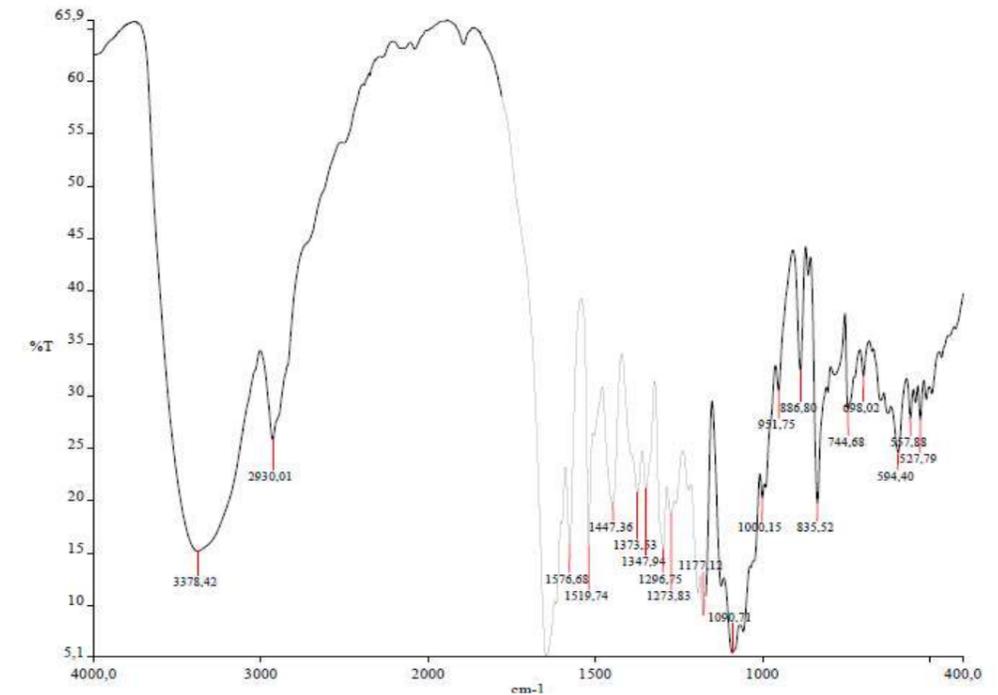
O derivado obtido, LaBioCon 185, foi caracterizado por IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC.

Na análise do espectro no infravermelho, as bandas características da naringenina (Anexo A) são: 3410 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação O-H; 1658 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C=O; 1618 cm^{-1} , referente ao estiramento das ligações C-C e 1520 cm^{-1} , referente à vibração do tipo *bending* entre os átomos C-H (UNZALAN et al., 2009). No espectro de infravermelho do derivado, a diferença mais marcante (Figura 24) é o aumento da intensidade da banda larga na faixa de 3200 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento da ligação O-H. Uma banda de intensidade alta em aproximadamente 1590 cm^{-1} , e outra em 1090 cm^{-1} também podem ser observadas. O espectro do derivado ampliado pode ser observado no Anexo B.

O espectro de massas obtido para o derivado LaBioCon 185 apresentou íon molecular com razão massa carga (m/z) 435 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e íon base com m/z 273. A massa perdida, de 162 u.m.a, corresponde a de uma hexose e sugere uma

glicosilação do composto. Pela análise dos fragmentos observados no espectro de massas, nenhuma evidência sobre o eventual sítio de glicosilação pôde ser obtida.

Figura 24- Espectro de infravermelho do derivado LaBioCon 185, obtido em pastilhas de KBr por espectrômetro modelo Spectrum 400 FT-IR (Perkin-Elmer®) com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} .



Fonte: Autor.

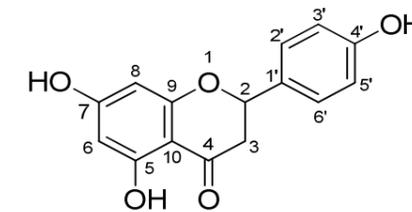
Os espectros de RMN foram registrados em CD_3OD , com TMS como padrão interno em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o ^1H e 75,46 MHz para o ^{13}C). O espectro de RMN do substrato foi registrado para fins de comparação como o espectro do derivado e os dados obtidos foram confrontados àqueles encontrados na literatura (SHIMODA et al., 2010). As atribuições dos deslocamentos químicos obtidos do espectro de RMN ^1H e ^{13}C da naringenina podem ser observadas na Tabela 3.

No espectro de RMN ^1H do derivado LaBioCon 185 (Anexos C, D, E e F), além dos sinais obtidos no espectro da naringenina, foram encontrados sinais adicionais na região de 3,0 a 3,5 p.p.m., que sugerem a presença de um carboidrato. O sinal correspondente ao próton anomérico aparece como um dubleto em 4,94 p.p.m. com acoplamento de $J = 7,8$ Hz, que é característico de ligação do tipo β . Este resultado vai ao encontro daquele obtido na análise de E.M, que havia sugerido uma glicosilação. Todos os sinais dos anéis A e B apresentaram duplicidade no espectro

do derivado. A presença de sinais com esta característica se deve a formação de um par de enantiômeros. Como o substrato utilizado não era enantiomericamente puro, a glicosilação da naringenina levou à formação de um par de enantiômeros, cuja proporção na amostra foi determinada pela proporção entre os sinais na RMN ^1H . Este resultado pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 3- Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C da naringenina (500 Mhz, CD_3OD , com TMS como padrão interno).

Naringenina			
Nº átomo	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	
2	5.34 (<i>dd</i> , 12.9, 3.0)	79.0	
3a	3.11 (<i>dd</i> , 17.1, 12.9)	42.6	
3b	2.70 (<i>dd</i> , 17.1, 3.0)	42.6	
4	-	196.4	
5	-	163.7	
6	5.90 (<i>d</i> , 2.2)	96.4	
7	-	166.9	
8	5.88 (<i>d</i> , 2.2)	95.5	
9	-	163.3	
10	-	102.3	
1'	-	129.4	
2', 6'	7.31 (<i>d</i> , 8.7)	128.7	
4'	-	158,1	
3', 5'	6.82 (<i>d</i> , 8.7)	115.7	



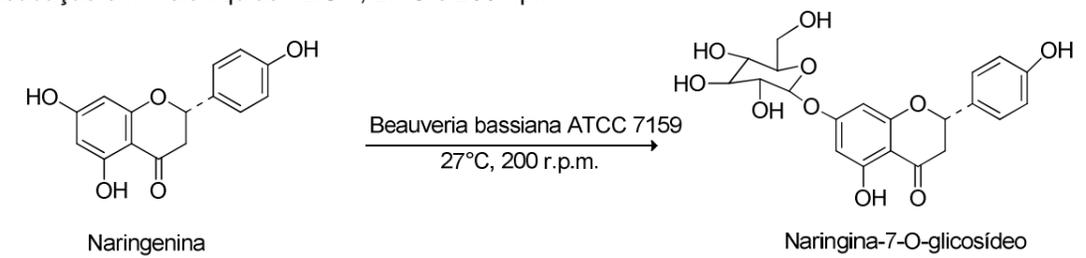
Legenda: RMN ^1H e ^{13}C baseados em ^1H - ^{13}C HMBC. Dados obtidos em CD_3OD em 500 MHz e 125 MHz.

Fonte: Autor.

A observação dos sinais duplicados e de perturbações nos ambientes químicos dos átomos do anel A e B levaram a hipótese de que o sítio de glicosilação encontrava-se em um destes anéis.

No experimento HMBC, a correlação do tipo 3J entre o próton anomérico ($\delta^1\text{H}$ 4,97) e o C-7 ($\delta^{13}\text{C}$ 165,3) foi observada e permitiu a atribuição do sítio de glicosilação como 7-OH (Figura 25). O espectro HMBC pode ser visualizado no Anexo G.

Figura 25 - Glicosilação de naringenina por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 após 96 horas de incubação em meio líquido PDSM, 27°C e 200 r.p.m.



Fonte: Autor.

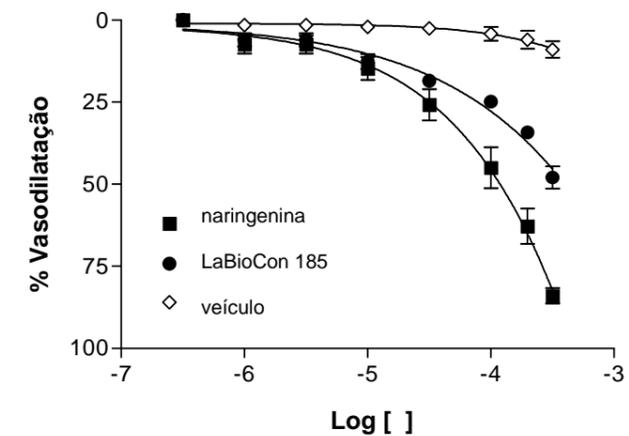
O composto encontrado neste estudo também foi obtido por Yamamoto e colaboradores (2004). A bioconversão de naringenina por uma cultura de células de *Sophora flavescens produziu*, entre outros derivados, o composto naringenina 4,7-di-O- β -D-glicosídeo. A hidrólise deste composto e a posterior separação cromatográfica dos produtos resultantes permitiu o isolamento e identificação de naringenina 4-O- β -D-glucopiranosídeo e naringenina 7-O- β -D-glucopiranosídeo, com rendimento menor que 2%.

A glicosilação de naringenina na posição 7 também foi realizada pela expressão de uma glicosiltransferase de *Bacillus cereus* (BcGT-1) expressa em células de *E. coli*. Foram obtidos dois produtos identificados como produtos glicosilados pela análise do espectro de massas, que mostrou um aumento de 162 Da em relação à massa da naringenina. Um dos produtos foi presumido como naringenina-7-O-glicosídeo pela comparação de seu padrão de absorção de ultravioleta ao padrão de absorção de uma substância química de referência. A elucidação da posição de glicosilação do outro produto glicosilado não foi possível (KO et al., 2006).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASODILATADORA *IN VITRO*

A naringenina, ou seu derivado 7- β -O-glicosilado (LaBioCon 185), adicionados cumulativamente (0,5 a 500 μ M) à solução de Krebs contendo anéis de aorta com endotélio funcional e pré-contraídas com 0,1 mM de fenilefrina, produziram vasodilatação concentração-dependente. Verificou-se que tanto o derivado LaBioCon 185, quanto a naringenina apresentaram atividade vasodilatadora, mas o derivado foi menos efetivo (Figura 26). A resposta máxima provocada por naringenina foi de $84,1 \pm 2,2\%$ (n=5) e a resposta máxima produzida pelo LaBioCon 185 foi $48,0 \pm 3,3\%$, (n=5). Ou seja, a resposta produzida pela naringenina foi aproximadamente 36% maior (P<0,001) que aquela provocada pelo derivado. O efeito máximo produzido pelo veículo, dimetilsulfóxido (DMSO) foi de $8,2 \pm 3,1\%$ (n=5). A naringenina e seu derivado apresentaram a mesma potência medida como pD2 (-log EC₅₀: $4,26 \pm 0,08$ e $4,05 \pm 0,14$, respectivamente, P>0,05).

Figura 26 - Efeito vasodilatador de naringenina e LaBioCon 185 em aortas de rato pré-contraídas com fenilefrina.



Fonte: Autor. Cada ponto representa a média \pm o Erro Padrão Médio (EPM) para 5 replicatas.

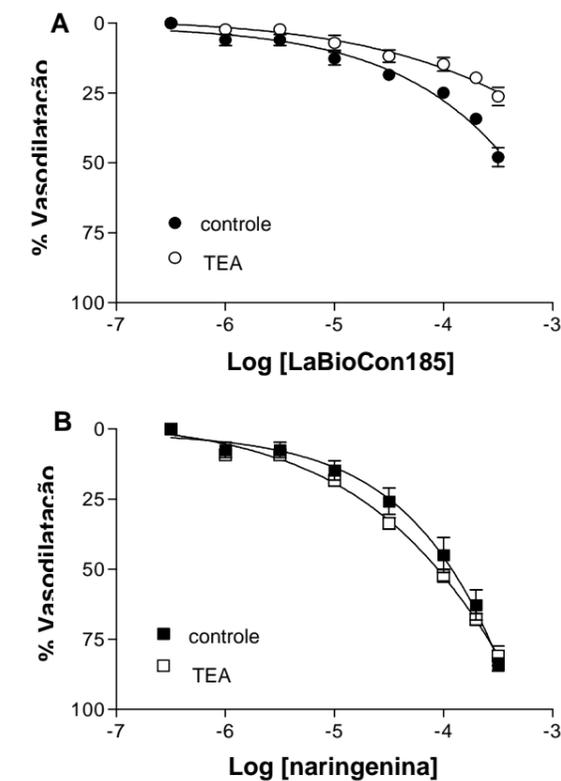
Muitos tipos de canais de K^+ já foram identificados na membrana do músculo liso vascular. A abertura dos canais de K^+ hiperpolariza a membrana, o que reduz a excitabilidade celular e inativa os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, promovendo relaxamento muscular (QUAST, 1993).

Para investigar o possível envolvimento dos canais de K^+ na vasodilatação promovida por naringenina, os anéis de aorta foram pré-tratados com tetraetilamônio

(TEA), um bloqueador não-seletivo de canais de K^+ . A adição do TEA reduziu de $48,0 \pm 3,3\%$ para $26,3 \pm 3,2\%$ ($P < 0,001$) o efeito vasodilatador promovido pelo derivado LaBioCon 185. Para a naringenina, não foram observadas diferenças no efeito máximo e potência na presença de TEA (Figura 27). Desse modo, os canais de K^+ parecem ser um alvo molecular da atividade vasodilatadora do derivado LaBioCon 185, mas não parecem estar envolvidos na vasodilatação provocada pela naringenina.

O resultado encontrado no ensaio está de acordo com aquele encontrado por Orallo e colaboradores (2005) em que os ensaios demonstraram um efeito vasodilatador mediado pela naringenina em células de músculo liso que não foi modificado pela presença de TEA.

Figura 27 - Efeito vasodilatador do derivado LaBioCon 185 (A) e da naringenina (B) em aortas de rato pré-contraídas com fenilefrina.



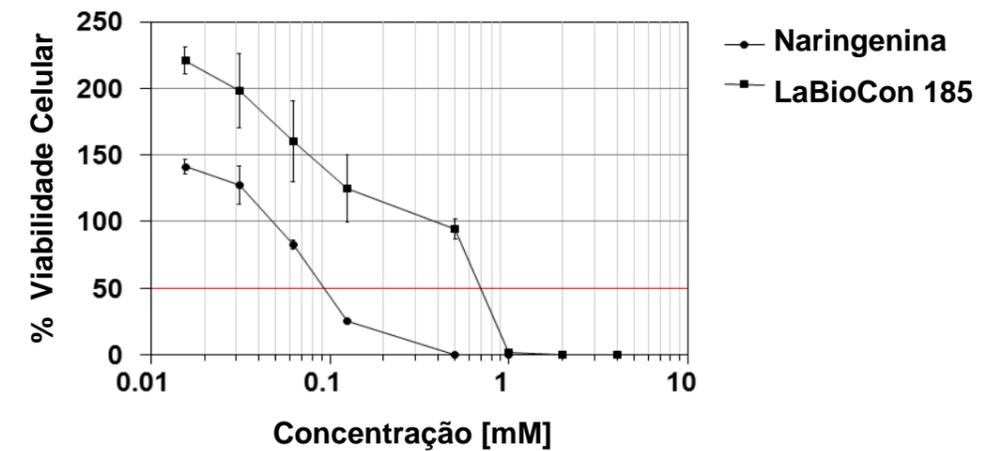
Fonte: Autor. Cada ponto representa a média \pm EPM para 5 replicatas.

No entanto, vários outros mecanismos podem estar envolvidos na vasodilatação produzida por naringenina e mais testes seriam necessários para elucidar o mecanismo de ação correto do derivado.

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

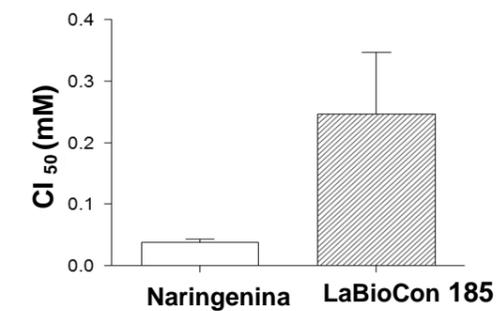
Utilizando o método de exclusão do azul de tripano, investigamos o efeito da naringenina e do derivado LaBioCon 185, em diferentes concentrações (0,0015- 2,0 mM) sobre a integridade da membrana de células Jurkat (ATCC TIB-152), derivadas de leucemia linfóide humana aguda, em cultura por 24 horas. Neste ensaio, os resultados demonstraram efeito antiproliferativo concentração-dependente. Os valores da concentração inibitória 50% (CI_{50}), obtidos nas curvas de concentração-resposta, foram de 0,03712 mM para a naringenina e de 0,2156 mM para o derivado LaBioCon 185 (Figura 28). A CI_{50} obtida para o derivado LaBioCon 185 foi 6 vezes maior que aquela obtida para a naringenina (Figura 29).

Figura 28 – Efeito antiproliferativo da naringenina e de seu derivado LaBioCon 185 após 24 horas de tratamento (0,0015-2,0 mM) em células Jurkat pelo método de exclusão do azul de tripano. O IC_{50} foi de 0,03712 e 0,2156 para naringenin e para o derivado, respectivamente.



Fonte: Autor

Figura 29 – Comparação entre os valores de CI_{50} da naringenina (0,03712mM) e de seu derivado LaBioCon 185 (0,2156 mM), mostrando um aumento de 6 vezes para o CI_{50} do derivado.



Fonte: Autor

5 Conclusões

- Todas as cepas de *Beauveria bassiana* spp. Testadas apresentam potencial bioconversor para naringenina e podem ser alvo de estudos posteriores;
- O fungo filamentoso *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foi capaz de bioconverter a naringenina, produzindo dois derivados;
- Foi possível identificar apenas um dos derivados obtidos pela bioconversão semipreparativa com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (LaBioCon 185), já que o outro derivado não pôde ser purificado pela metodologia empregada;
- O fungo filamentosos *Beauveria bassiana* ATCC 7159 é capaz de glicosilar a naringenina no carbono 7 com bom rendimento (38%), de modo que a metodologia apresentada é útil na produção de naringenina-7-O-glicosídeo;
- O derivado LaBioCon 185 apresenta atividade vasodilatadora, embora esta seja menor que aquela apresentada pela naringenina;
- O derivado LaBioCon 185 exerce seu efeito vasodilatador por um mecanismo diferente daquele apresentado pela naringenina.
- O derivado LaBioCon 185 apresenta potencial antiproliferativo.

6. Perspectivas

- Purificar e identificar os derivados I, III e IV;
- Realizar o ensaio semipreparativo com as demais cepas de *Beauveria bassiana* que produziram o derivado II (LaBioCon 185) para verificar o rendimento da reação;
- Elucidar o mecanismo de reação da glicosilação pela adição de inibidores e indutores da glicosidase e da glicosiltransferase;
- Estudar a influência das condições de reação como pH, temperatura e agitação sobre o rendimento do produto;
- Prosseguir os estudos sobre a atividade vasodilatadora apresentada pelo derivado LaBioCon 185;
- Prosseguir os estudos sobre a atividade antiproliferativa apresentada pelo derivado LaBioCon 185;

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.
- BODET, C., V. D., EPIFANO, F., GRENIER, D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. **Journal of Periodontal Research**, v.43, p. 400-407, 2008.
- CARVALHO, C.C.C.R. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 75–83, 2011.
- CIRILO, Hérica Núbia Cardoso. **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
- COSTA, E. M. M. B. et al. *Beauveria bassiana*: quercetinase production and genetic diversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p.12-21, 2011.
- CUNHA, C. R. M. **Bioconversão: avaliação da capacidade de fungos filamentosos em metabolizar os substratos grandisina, naringina e naringenina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- DAS, S.; ROSAZZA, J. P. N.; Microbial and Enzymatic Transformations of Flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 499-508, 2006.
- EKAMBARAM, G. et al. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine–induced gastric carcinogenesis in rats. **Nutrition Research**, v. 28, p. 106–112, 2008.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, p. 851–874, 2004.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Germany, Springer. 2000. 420 p.
- FANG, T. et al. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p.454-459, 2006.

FENG, X. et al. Microbial oxidation and glucosidation of echinocystic acid by *Nocardia corallina*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 219–223, 2010.

GHISALBA, O. et al. Industrial biotransformation. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, edited by Michael C. Flickinger Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Inc. 2010

GOMES, Tatiana Caixeta Ferreira. **Bioconversão do derivado N-fenilpiperazínico LASSBio 579, um potencial candidato a protótipo de fármacos**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

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

HAVSTEEN, H. B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HERRERA, M. D. et al. Effects of Flavonoids on Rat Aortic Smooth Muscle Contractility: Structure-Activity Relationships. **General Pharmacology**, v. 27, p. 273-277, 1996.

HODEK, P. et al. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 13, p. 1–21, 2002.

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. K. et al. Microbial metabolism of cannflavin A and B isolated from *Cannabis sativa*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1014–1019, 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.

KO et al. Glycosylation of favonoids with a glycosyltransferase from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, p. 263–268, 2006.

LEE, J. H. et al. Negative regulation of *b*-catenin/Tcf signaling by naringenina in AGS gastric cancer cell. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, p. 771–776, 2005.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. P. Chemocatalyses and biocatalyses (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. **Organization Process Research Development**, v. 3, n. 10, p. 572-580, 2006.

LIM, E. K. Plant Glycosyltransferases: Their Potential as Novel Biocatalysts. **Chemistry: A European Journal**, v. 11, p. 5486 – 5494, 2005.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S.; KUZUYAMA, T. Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110(3), p. 320–321, 2010.

OLIVO, H. F. et al. Microbial oxidation/amidation of benzhydrylsulfanyl acetic acid. Synthesis of (+)-modafinil. **Tetrahedron: Asymmetric**, v. 16, p. 3507–3511, 2005.

ORALLO, F. et al. Implication of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition in the vasorelaxant activity of the citrus-fruits flavonoid (+/-)-naringenin. **Planta Medica**, v. 71, p. 99-107, 2005.

OSORIO-LOZADA, A. Biotransformation of *N*-piperidinylacetophenone with *Beauveria bassiana* ATCC-7159. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, p. 30–36, 2008.

PALCIC, M. M. Glycosyltransferases as biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 226–233, 2011.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PAVIA, Donald (Org.). **Introduction to Organic Laboratory Techniques**. 10th ed. Philadelphia: Saunders College Pub., 1990.

PAZINI, F., et al. Design of new dopamine D2 receptor ligands: Biosynthesis and pharmacological evaluation of the hydroxylated metabolite of LASSBio-581. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 2888–2891, 2010.

PELLISSIER, H. Use of O-glycosylation in total synthesis. **Tetrahedron**, v. 61, p. 2947–2993, 2005.

PETERSON, D. H. e MURRAY, H. C. Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. **Journal of American Chemical Society**, v. 74 (7), p. 1871-1872, 1952.

PURWAR, J.R.; SACHAN, G.C. Insect pest through entomogenous fungi: A review. **Journal of Applied Biosciences**, v. 32 (1), p. 1-26, 2006.

QUAST, U. Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? **Trends in pharmacological sciences**, v. 14, p. 332–337, 1993.

SABARINATHAN, D., VANISREE, A. J. Naringenin, a flavanone alters the tumorigenic features of C6 glioma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. IN PRESS. 2010.

SCHMALTZ, R. M. et al. Enzymes in the Synthesis of Glycoconjugates. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 4259–4307, 2011.

SHIMODA, K. et al. Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1135–1140, 2008.

SHIMODA, K. et al. Glycosylation of sesamol by cultured plant cells. **Phytochemistry**, v. 70, p. 207–210, 2009.

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

ŚWIZDOR et al. Microbial Baeyer–Villiger oxidation of steroidal ketones using *Beauveria bassiana*: Presence of an 11 α -hydroxyl group essential to generation of D-homo lactones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1811, p. 253–262, 2011.

UENG, Y. F. et al. *In vitro* and *in vivo* effects of naringenin on cytochrome P450-dependent monooxygenase in mouse liver. **Life Sciences**, v. 65, n. 24, p. 2591-2602, 1999.

UNSANLAN, O; ERDOGDU, Y; GULLUOGLU, M. T. FT-Raman and FT-IR spectral and quantum chemical studies on some flavonoid derivatives: Baicalein and Naringenin. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 40, p. 562–570, 2009.

WANG, X. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. **FEBS Letters**, v. 583, p. 3303–3309, 2009.

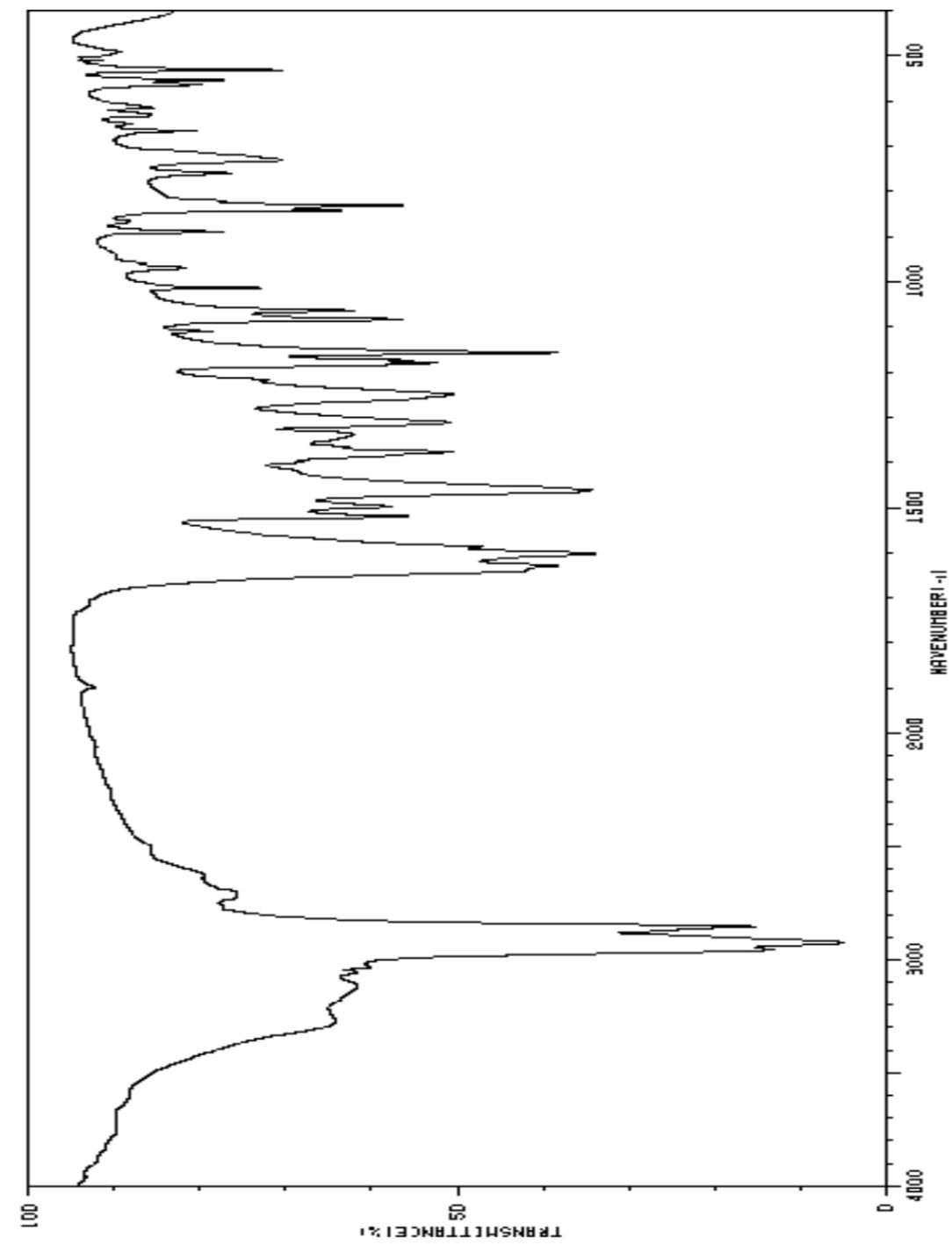
WEIJERS C. A. G. M et al. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 436–456, 2008.

YAMAMOTO, H. et al. Metabolism of administered (2*RS*)-naringenin in flavonoid producing cultured cells of *Sophora flavescens*. **Plant Biotechnology**, v. 21(5), p. 355–359, 2004.

ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial metabolism of 1-aminoanthracene by *Beauveria bassiana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5085–5089, 2008.

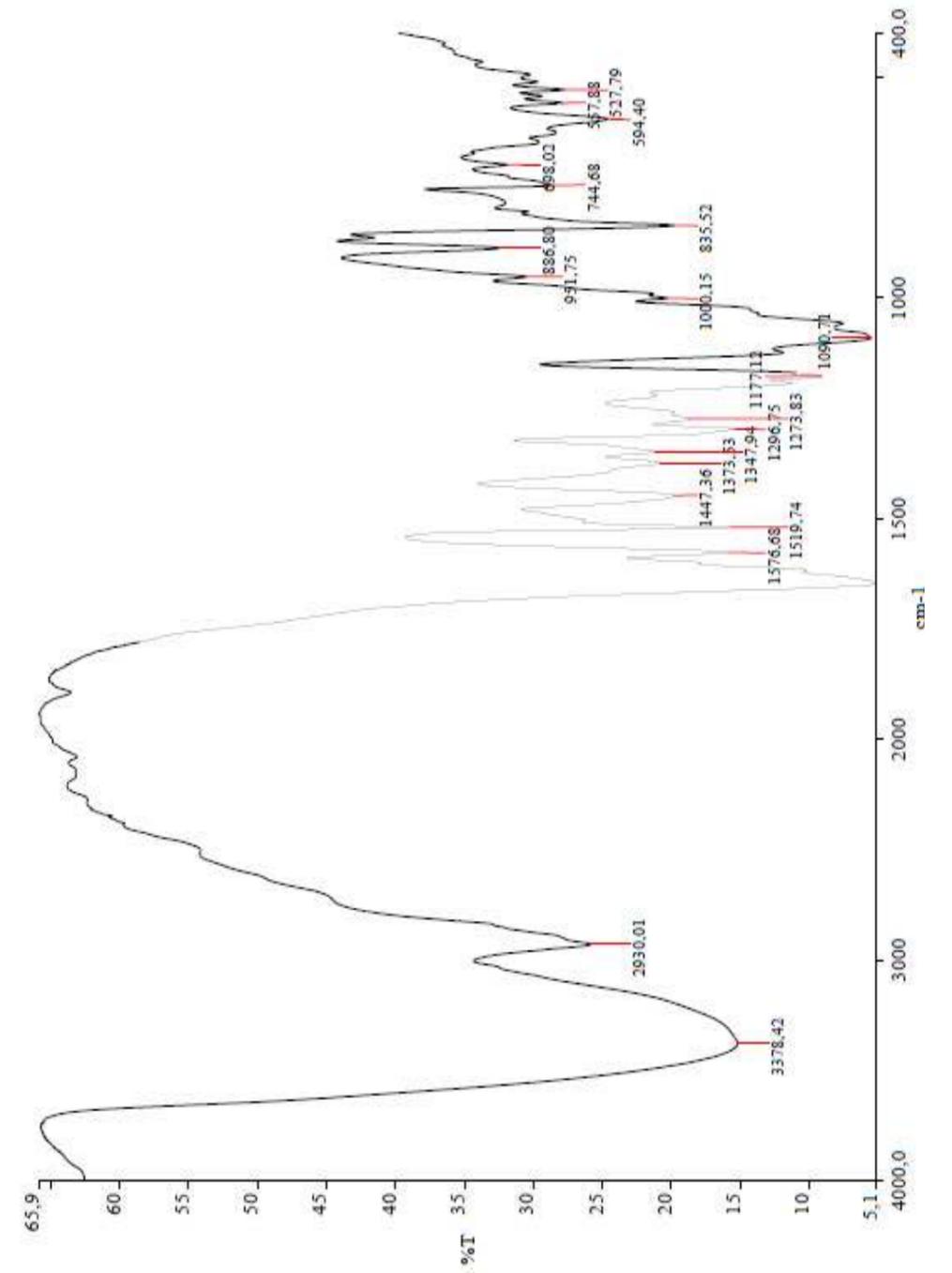
ANEXOS

ANEXO A – Espectro da naringenina obtido em Spectrômetro Nicolet 170SX ou JASCO FT/IR-410.



Fonte: Integrated Spectral Database System of Organic Compounds.

ANEXO B - Espectro de infravermelho do derivado LaBioCon 185, obtido em pastilhas de KBr por espectrômetro modelo Spectrum 400 FT-IR (Perkin-Elmer®) com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} .

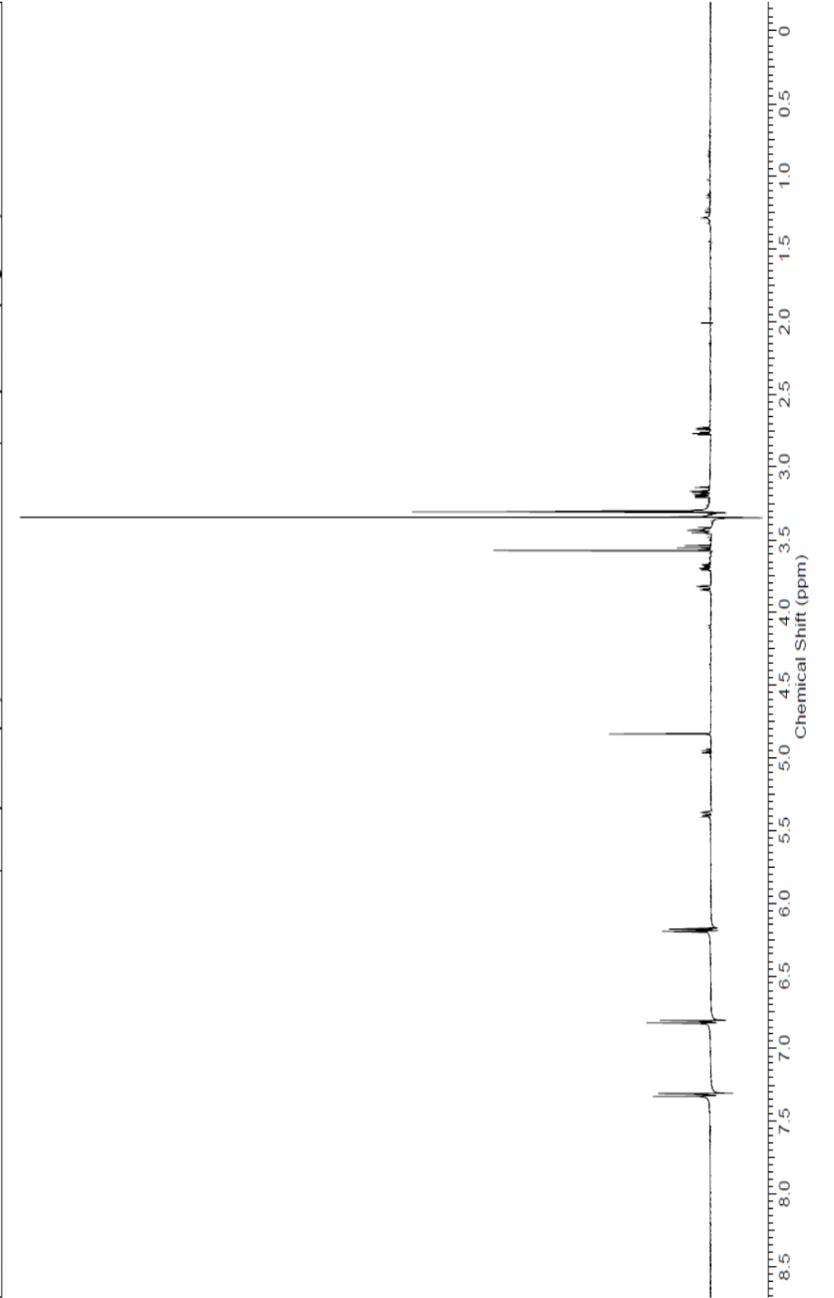


Fonte: Autor

ANEXO C - Espectro de RMN ¹H do derivado LaBioCon 185, obtido em metanol deuterado sem TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).

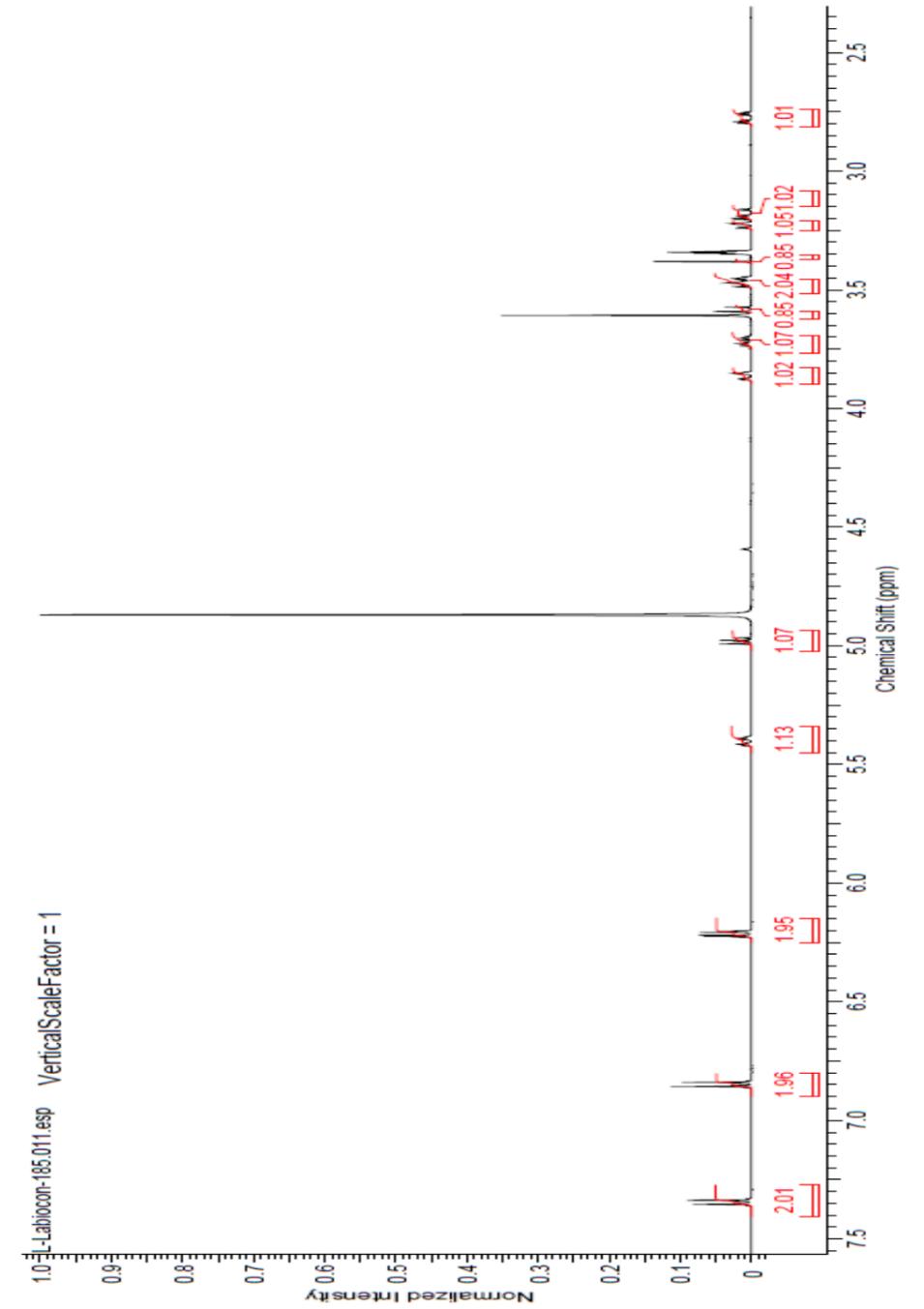
28 Sep 2011

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	Juliana - Labiocon-185 meod
Date	17 Aug 2010 18:35:44		
File Name	C:\Documents and Settings\usuario\Desktop\Juliana Penso\RMN\Labiocon-185 H\Labiocon-185 H_0130000.fid		
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	¹ H
Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	10330.58
		Pulse Sequence	zgpgpr
		Temperature (degree C)	28.160



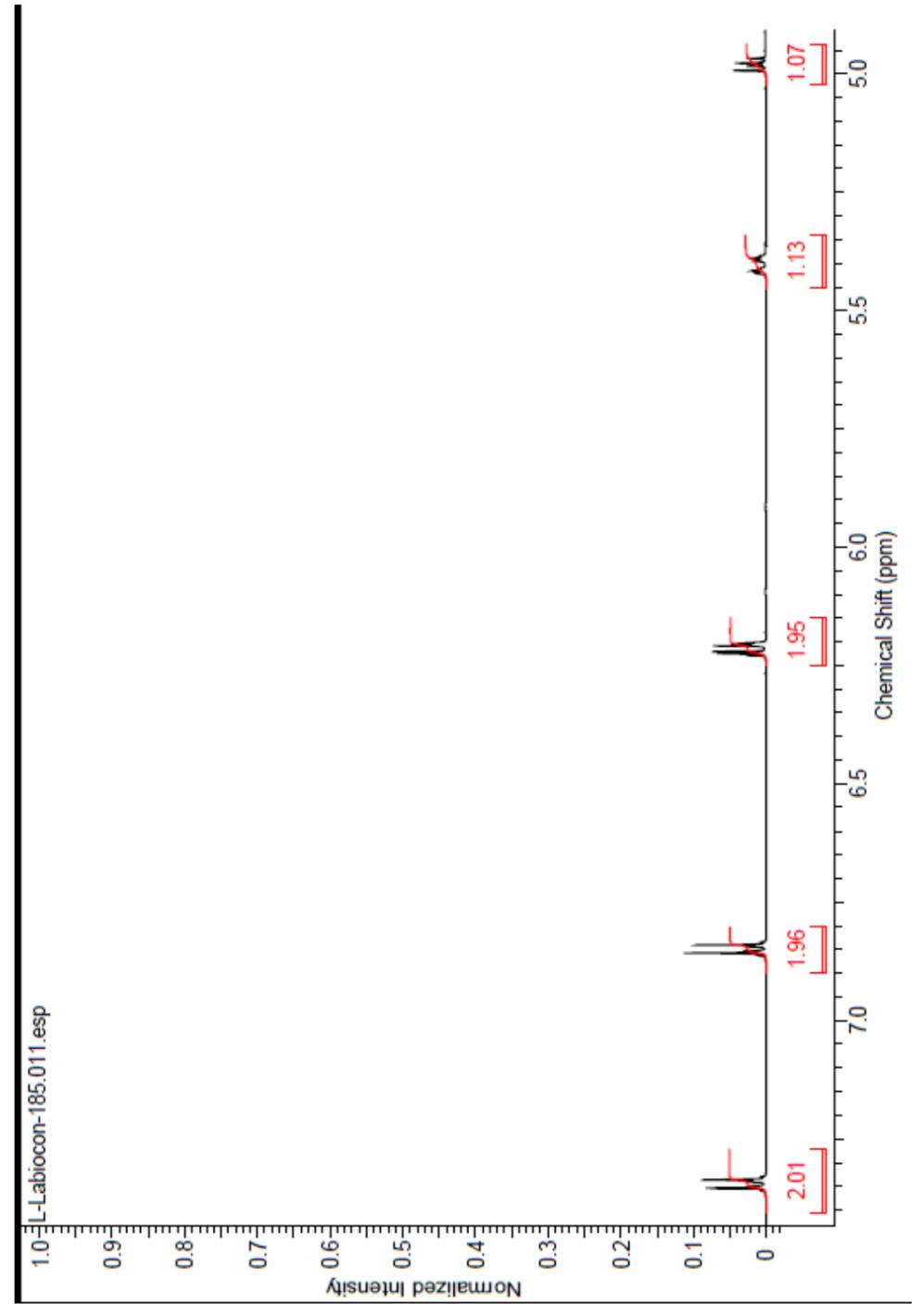
Fonte: Autor

ANEXO D - Espectro integrado de RMN ¹H do derivado LaBioCon 185, obtido em metanol deuterado sem TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



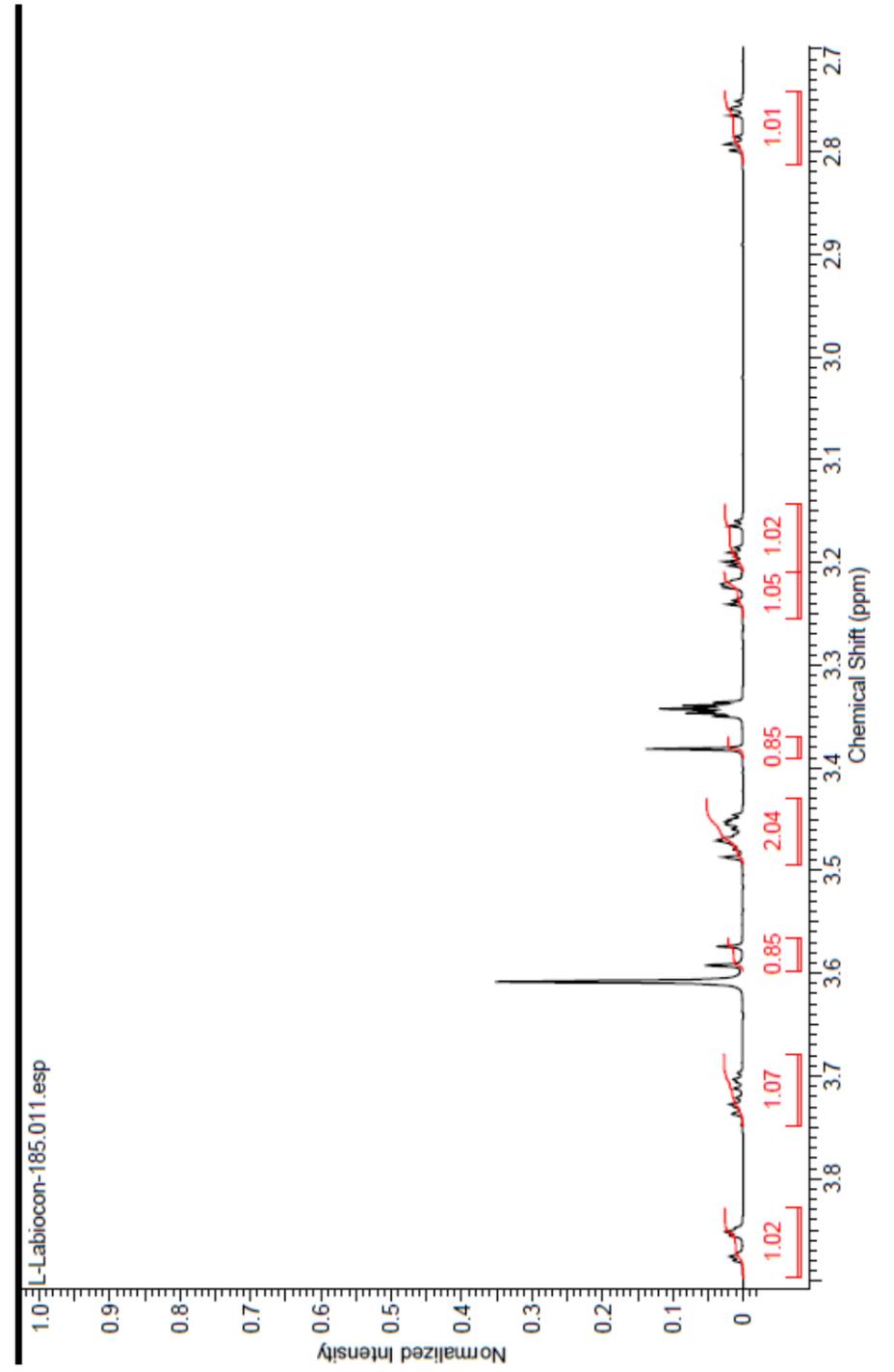
Fonte: Autor

ANEXO E - Espectro ampliado (7.5 a 4.8 p.p.m.) de RMN ^1H do derivado LaBioCon 185, obtido em metanol deuterado sem TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



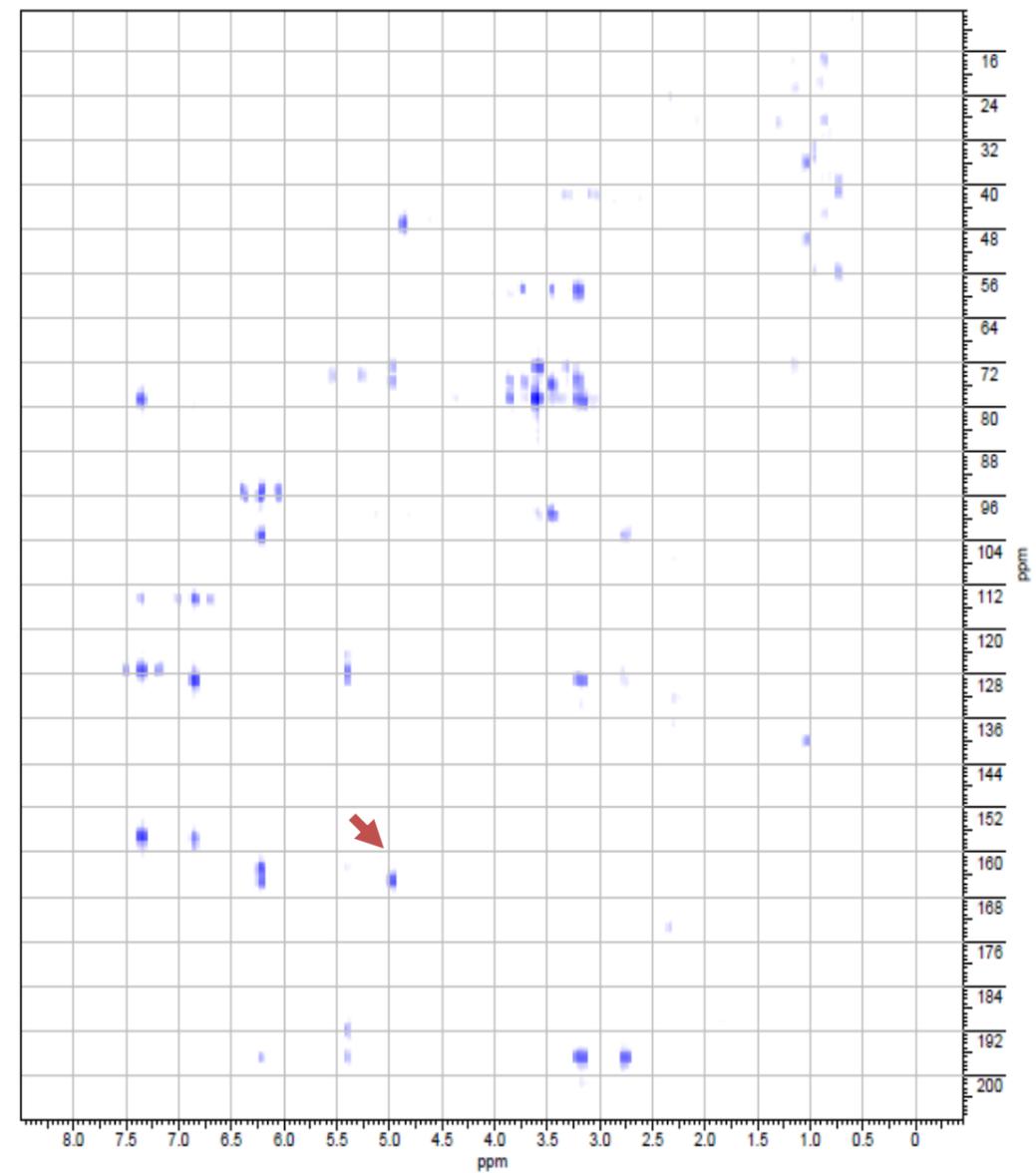
Fonte: Autor

ANEXO F - Espectro ampliado (7.5 a 4.8 p.p.m.) de RMN ^1H do derivado LaBioCon 185, obtido em metanol deuterado sem TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



Fonte: Autor

ANEXO G - Espectro do HMBC do derivado LaBioCon 185, onde é possível verificar a correlação entre o próton anomérico (□ H 4.97) e o C-7 (□ 165.3).



Fonte: Autor