

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

FRANCISLENE LAVOR BATISTA

**PRODUÇÃO DE LACASE E BIOCONVERSÃO DE
FLAVONÓIDES POR *Pycnoporus sanguineus*.**

Goiânia
2009

FRANCISLENE LAVOR BATISTA

**PRODUÇÃO DE LACASE E BIOCONVERSÃO DE
FLAVONÓIDES POR *Pycnoporus sanguineus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Valéria de Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Telma Alves Garcia

Goiânia
2009

"Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino de nossa civilização. E consideramos nossa tarefa é explicar incansavelmente essa verdade, ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo, e trabalhar, não para temporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, sabedoria, motivação em todos os momentos.

Meu pai João, in memoriam, que foi o primeiro e grande incentivador.

Aos familiares que em diversos momentos foram privados de atenção e cuidados, em detrimento da realização deste trabalho, principalmente minha mãe Iradi e minha irmã Jorgiany.

Fernando, obrigada pelo carinho, atenção e compreensão. Desejo sempre compartilhar alegrias e comemorar vitórias como esta ao seu lado.

A Prof^a Dr^a Valéria de Oliveira, Prof^a Dr^a Telma Alves Garcia, pela orientação e co-orientação respectivamente, pelo incentivo e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Goiás pelos conhecimentos adquiridos.

Aos membros da banca de qualificação pela disponibilidade em colaborar para a melhoria deste trabalho.

Os amigos (as) Lênis, Carla, Ana Carolina, Mirella, Marina, Marta, Cecília, Emmanuel, Dennys, pela amizade, apoio, força e companheirismo sempre prestados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A bioconversão é uma área da biotecnologia que tem crescido extensamente e inclui reações enzimáticas por meio de microrganismos. Dentre os microrganismos utilizados destacam-se os fungos filamentosos, que apresentam um sistema enzimático semelhante ao dos seres humanos, o citocromo P450 (CYP, P450), responsável pelo metabolismo dos fármacos. O *Pycnoporus sanguineus* é um basidiomiceto da família *Polyporaceae* produtor de lacase (EC 1.10.3.2), que é uma enzima da classe das oxidoredutases. Neste trabalho, foi avaliada a influência dos flavonóides naringina, naringenina e quercetina no crescimento de *P. sanguineus* e produção de lacase em diferentes meios de culturas. Foram utilizadas condições reacionais variadas como alteração de temperatura, agitação e o tempo de adição dos flavonóides. As reações de bioconversão de flavonóides por *P. sanguineus* foram realizadas por um período de 24 a 96 horas e monitoradas por CCD e CLAE para verificar a presença de possíveis metabólitos. Aplicou-se a lacase purificada do *P. sanguineus* para avaliar a participação desta enzima na produção dos metabólitos da naringina. O fungo cresceu nos meios de cultura testados. A naringenina e a naringina apresentaram a capacidade de induzir a produção de lacase pelo fungo, enquanto a quercetina inibiu a produção da mesma. Nas incubações com o meio PDSM não houve a produção de lacase. Nos ensaios de bioconversão foram detectados vários metabólitos nas incubações com microrganismo inteiro, sendo que nas incubações com quercetina foram obtidos catorze metabólitos diferentes. Nas incubações com naringenina foram produzidos nove metabólitos e a naringina levou à produção de oito metabólitos. No ensaio biocatalítico a 28°C e 150rpm na presença de naringina não foi evidenciada a presença de metabólitos.

PALAVRAS-CHAVE: bioconversão, flavonóides, lacase, *Pycnoporus sanguineus*.

ABSTRACT

The bioconversion is an area of the biotechnology that has increased in an expansive way, and it includes enzymatic reactions by microorganisms. These microorganisms that present enzymatic systems similar to those present in mammalian systems, it's the cytochrome P450 (CYP450). That's why the biotransformation an important alternative constitute as models for drug metabolism study. The *Pycnoporus sanguineus* is a filamentous fungi, basidiomycete of the *Polyporaceae* family and laccase producer (EC 1.10.3.2), an oxidoreductase enzyme. It was evaluated the influence of flavonoids naringin, naringenin, and quercetin in the growth of *P. sanguineus*, production of laccase in differents culture media. It was performed various conditions of reaction, such as temperature, agitation and the time of the flavonoids addition. The bioconversion processes were carried out for 24 up to 96 hours and monitored by TLC and HPLC to confirm the existence of potential metabolites. It was used purified laccase of the *Pycnoporus sanguineus* to evalute the participation of laccase in metabolites of naringin production. *Pycnoporus sanguineus* developed in differents culture media tested. Naringenin and naringin presented the capability to induce the laccase production by *P. sanguineus*, whereas quercetin and rutin inhibited the laccase production. The incubation using PDSM did not producted laccase. It was detected several of metabolites, whereas the incubations using quercetin acquired fourteen differents metabolites and the incubations using naringenin producted nine metabolites and naringin producted eight metabolites. In biocatalytic assay under 28°C and 150rpm using naringin it was not detected the presence of metabolites.

KEYWORDS: flavonoids, *Pycnoporus sanguineus*, laccase.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	IX
	LISTA DE TABELAS.....	XIII
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Bioconversão	1
1.2	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	3
1.3	Lacase.....	4
1.4	Flavonóides.....	15
2	OBJETIVOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Meios de cultura.....	25
3.2	Origem e manutenção do fungo.....	26
3.3	Incubações com os Flavonóides.....	26
3.4	Avaliação do efeito dos flavonóides no crescimento do <i>P. sanguineus</i> , produção de lacase e a presença de possíveis metabólitos.....	27
3.5	Extração.....	28

3.6	Técnicas cromatográficas.....	30
3.7	Caracterização dos derivados.....	31
3.8	Ensaio de biocatálise.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1	Crescimento do <i>Pycnoporus sanguineus</i>	34
4.2	Produção de lacase.....	37
4.3	Bioconversão.....	43
4.4	Caracterização dos derivados.....	53
4.5	Ensaio de biocatálise.....	57
5	CONCLUSÕES.....	60
6	PERSPECTIVAS.....	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos centros de cobre da lacase e Indicação das geometrias obtidas por cristalização. Durán <i>et al.</i> , 2002; Piontek <i>et al.</i> 2002).....	6
Figura 2	Ciclo catalítico da lacase (Gianfreda <i>et al.</i> , 1999; Durán <i>et al.</i> , 2002).....	7
Figura 3	Esquema geral do sistema mediador de lacase (Oudia, <i>et al.</i> , 2008)	8
Figura 4	Estruturas químicas de alguns mediadores (Fabbrini <i>et al.</i> , 2002)	9
Figura 5	Biotransformação do trans-resveratrol realizada por lacases dos fungos <i>Myceliophthora thermophyla</i> e do <i>Trametes pubescens</i> (Nicotra <i>et al.</i> , 2004).....	13
Figura 6	Reação de biotransformação sugerida durante a descolorização do corante Acid Blue 62 por <i>Pyconoporus sanguineus</i> (Vanhulle <i>et al.</i> , 2008).....	14
Figura 7	Estruturas química dos flavonóides.....	16
Figura 8	Estruturas da isoquercetrina e quercetrina (Danieli <i>et al.</i> , 1997)	21
Figura 9	Sulfatação da naringenina por <i>Cunninghamella elegans</i> (Ibrahim, 2000).....	21
Figura 10	Quercetina e vários metabólitos produzidos por cepas de fungos filamentosos do gênero <i>Beauveria</i> (Costa <i>et al.</i> , 2008).....	22
Figura 11	Etapas da extração realizadas após o término das incubações do <i>Pycnoporus sanguineus</i> com os flavonóides.....	29
Figura 12	“Pellets” pequenos de coloração creme das incubações com o meio de cultura PDSM (experimento C).....	35
Figura 13	Reação de seringaldazina (Sanchez-Amat & Solano, 1997)	38
Figura 14	Produção de lacase por <i>Pycnoporus sanguineus</i> na presença de naringenina nos meios MPL e Rama a 150rpm e 30°C.	39

Figura 15	Produção de lacase por <i>Pycnoporus sanguineus</i> na presença de naringina nos meios MPL e Rama a 150rpm e 30°C.....	40
Figura 16	Produção de lacase por <i>Pycnoporus sanguineus</i> após 96h da Adição dos flavonóides naringenina e naringina a 30°C e 150rpm aos meio MPL e Rama.....	41
Figura 17	Cromatoplaça das frações acetato de etila e cetônica do experimento A.....	43
Figura 18	Perfil cromatográfico da solução de quercetina em metanol (0,5 mg/mL), utilizando metanol/água(20:80) como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm), fluxo de 1,0mL/min, detecção a 260nm e tempo de corrida de 12 minutos.....	45
Figura 19	Perfil cromatográfico após a extração da fração acetato de etila De <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCT-4518 em meio PDSM com quercetina (0,5g/mL) a 200rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm), fluxo de 1,0mL/min, detecção a 260nm e tempo de corrida de 12 minutos.....	46
Figura 20	Perfil cromatográfico após a extração da fração cetônica de <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCT-4518 em meio PDSM com quercetina (0,5g/mL) a 200rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm), fluxo de 1,0mL/min, detecção a 260nm e tempo de corrida de 12 minutos.....	46
Figura 21	Perfil cromatográfico após a extração da fração acetato de etila de <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCT-4518 em meio MPL com quercetina (0,5g/mL) a 200rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm), fluxo de 1,0mL/min, detecção a 260nm e tempo de corrida de 12 minutos.....	47
Figura 22	Perfil cromatográfico após a extração da fração cetônica de <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCT-4518 em meio MPL com quercetina (0,5g/mL) a 200rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm),fluxo de 1,0mL/min, detecção a 260nm e tempo de corrida de 12 minutos.....	47
Figura 23	Cromatoplaça das frações cetônica do experimento D. Condições cromatográficas: fase móvel Acetato de etila/metanol (70:30) e diferentes reveladores.....	48

Figura 24	Perfil cromatográfico da solução de naringenina em metanol (0,5mg/mL), utilizando metanol/metanol/tampão 65:35 fosfato de potássio monobásico 0,02M como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm) fluxo de 1,0mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min.....	50
Figura 25	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação da naringenina (0,5mg/mL) com <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCT-4518 no meio Rama a 30°C e 150rpm, no tempo de 24 horas, utilizando metanol/metanol/tampão 65:35 fosfato de potássio monobásico 0,02M como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm) fluxo de 1,0mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min.....	51
Figura 26	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação da naringenina (0,5mg/mL) com <i>Pycnoporus sanguineus</i> CCT-4518 no meio Rama a 30°C e 150rpm, no tempo de 96 horas, utilizando metanol/metanol/tampão 65:35 fosfato de potássio monobásico 0,02M como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm) fluxo de 1,0mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min.....	51
Figura 27	Atividade da lacase em U/L, na presença de naringina, a 28°C e 150 rpm sobre o tempo de incubação em horas.....	57
Figura 28	Espectro de absorção do ensaio biocatalítico a 28°C e 150rpm, detecção de 200-800nm, evidenciando a amostra nos tempos: t= 0 (preto) e t= 24h (vermelho).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos experimentos realizados em diferentes condições de temperatura, agitação, tempo de coleta das alíquotas, meios de cultura, flavonóides e o tempo de adição dos flavonóides a incubação.....	28
Tabela 2	Caracterização morfológica e macroscópica do micélio do fungo <i>P. sanguineus</i> em diferentes meios líquidos na presença de flavonóides.....	36
Tabela 3	Avaliação da produção de lacase por <i>P. sanguineus</i> observada no espectrofotômetro ($\lambda= 525$ nm) em 48h de incubação no meio Rama no experimento C.....	37
Tabela 4	Fatores de retenção obtidos por CCD realizada com As Frações acetato de etila e cetônica em diferentes condições de cultivo com quercetina.....	44
Tabela 5	Fatores de retenção obtidos por CCD realizada com as Frações de acetato de etila, nos diferentes meios de cultura, com naringenina e naringina.....	48
Tabela 6	Avaliação do número de metabólitos obtidos nos diferentes meios de cultura, com naringenina, naringina e quercetina, sob variação das condições de cultivo por CCD.....	49
Tabela 7	Número de metabólitos detectados por CCD e por CLAE nas incubações de <i>Pycnopus sanguineus</i> na presença de quercetina no experimento A.....	52
Tabela 8	Número de metabólitos detectados por CCD e por CLAE nas incubações de <i>Pycnopus sanguineus</i> na presença de naringenina e naringina no experimento D.....	53
Tabela 9	Dados espectrais de RMN ¹ H (600 MHz) em DMSO-d ₆ para dos flavonóides naringenina e naringina obtidos na literatura.....	55
Tabela 10	Dados espectrais de RMN ¹ H (500 MHz) obtidos dos espectros realizados dos flavonóides naringenina e naringina padrão Sigma.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS	(2,2'-azino-bis (ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CYP450	Citocromo P450
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
HBT	Hidroxibenzotriazol
HPI	N-hidroxiftalimida
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
LaBioCon	Laboratório de Bioconversão
LiP	Lignina peroxidase
LMS	Sistema mediador de lacase
mM	Mili Molar
MnP	Manganês peroxidase
MPL	Meio de produção de lacase
m	Multiplete
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaCl	Cloreto de sódio
O ₂	Oxigênio molecular
PDSM	Meio Peptone Dextrose Soybean Meal
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RP	Fase reversa
rpm	Rotações por minuto

TPA	Trifenilamina
UV	Ultravioleta
VLA	Ácido violúrico
δ	Deslocamento químico

1 Introdução

1.1 Bioconversão

A bioconversão é uma área da biotecnologia que tem crescido extensamente e inclui reações enzimáticas por meio de microrganismos (Kaul *et al.*, 2004). O processo de isolamento, purificação e produção de uma enzima na maioria das vezes é trabalhoso e pode levar a perda da atividade. A utilização do microrganismo inteiro ao invés da enzima isolada, pode ser a primeira escolha na tentativa de se fazer a bioconversão da molécula (Holland, 1991; Zhou *et al.*, 2005).

Vários estudos consideram como maior prioridade a redução dos custos na produção enzimática. Deste modo, o aumento do rendimento enzimático e uma melhor desempenho da enzima tem sido alvo de pesquisas realizadas recentemente nos campos da microbiologia, tecnologia de fermentação e biotecnológica (Holland, 1991; Ikehata *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2007).

As enzimas são catalisadores muito eficientes. Os processos mediados por enzimas são acelerados, comparando a algumas reações não-enzimáticas correspondentes, como as observadas em catálise química. A velocidade das reações aumentam cerca de 10^8 - 10^9 , podendo exceder até 10^{12} , o que é muito além da aceleração observada por catalisadores químicos. Diferentes dos metais pesados, por exemplo, os biocatalisadores são completamente degradados no meio ambiente (Azerad, 1995; Faber, 2000; Das & Rosazza, 2006).

São várias as vantagens da utilização de enzimas à catálise química usualmente empregada. As condições brandas de análise, como por exemplo, temperatura entre 20 e 40°C, pH entre 5 e 8 e solvente aquoso; a versatilidade que apresentam como reagentes, são ambientalmente seguras e altamente seletivas. Além disso, as enzimas apresentam a capacidade de minimizar reações indesejáveis como decomposição, isomerização, racemização ou rearranjos inoportunos que frequentemente interferem nas metodologias químicas e também realizar reações que podem ser inviáveis ou até mesmo

impossíveis por síntese química (Azerad, 1995; Alarcón *et al.*, 2007; Woodley, 2008).

As enzimas atuam sob condições de incubação similares em diversas reações biocatalíticas propiciando a realização destas reações em um único recipiente e sem interferências entre elas, pois são específicas para cada reação. O mesmo não pode ser realizado por catálise química. Deste modo, as reações seqüenciais podem ser desenvolvidas usando sistemas multienzimáticos a fim de simplificar processos reacionais. São capazes de atuarem em uma grande variedade de substratos sintéticos não-naturais e realizar diversas reações biocatalíticas. Muitas delas apresentam elevada especificidade para um determinado tipo de reação e possuem uma ampla diversidade estrutural em seu substratos (Faber, 2000).

A biodiversidade enzimática dos fungos pode ser demonstrada pela geração de moléculas que podem apresentar atividade farmacológica diferente do fármaco original (Faber, 2000). Dentre os microrganismos utilizados em reações de bioconversão destacam-se os fungos filamentosos, formados por células eucarióticas. O uso de bactérias (organismos procarióticos) está limitado às cepas de Actinomicetos, como por exemplo, os gêneros: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Mycobacteria* e *Corynebacteria* (Azerad, 1999).

Os microrganismos utilizados na bioconversão apresentam um sistema enzimático semelhante ao dos seres humanos, o citocromo P450 (CYP450), por isso são considerados uma alternativa em estudos do metabolismo de fármacos e reduz o uso de animais nos experimentos (Ma *et al.*, 2007). O uso de culturas de microrganismos não está limitado apenas a bactérias ou fungos; algas unicelulares também têm sido empregadas em estudos de biotransformação, além de culturas de células de algumas plantas (Azerad, 1999).

Em estudos de bioconversão podem ser empregados diversos tipos de meios de cultura, desde de que atendam a uma composição mínima de nutrientes que possibilitem o crescimento fúngico. A agitação do meio deve ser constante, permitindo uma homogeneidade do sistema e a transferência de

calor e oxigênio por toda a biomassa dentro do recipiente de incubação. O oxigênio não é o único nutriente que pode tornar-se limitante devido a uma pobre agitação, mas é provavelmente o mais importante fisiologicamente, pois uma limitação de O₂ pode resultar na supressão ou até na inibição total da produção de metabólitos em fungos aeróbios (Gibbs *et al.*, 2000; Papagianni, 2004).

Uma agitação muito vigorosa durante a incubação pode afetar os microrganismos, causando, por exemplo, mudanças morfológicas, bem como, variações na taxa de crescimento e na formação do produto (Papagianni, 2004).

O pH do meio é um fator muito relevante, porém é frequentemente negligenciado e que pode afetar a morfologia fúngica. Diferentes valores de pH podem ser observados durante a incubação e podem estar relacionados ao transporte de nutrientes, à solubilização dos nutrientes, a reações enzimáticas produtos de excreção ou fenômenos de superfície. Os fungos podem crescer sob uma larga escala de pH, sendo que a maioria tolera uma escala de pH de 4 a 9, mas atingem o máximo crescimento e esporulação próximo da neutralidade (Papagianni, 2004).

A temperatura é um parâmetro ambiental facilmente controlável e que pode provocar mudanças em outras variáveis, como taxa de crescimento, oxigênio dissolvido e pH (Papagianni, 2004).

1.2 *Pycnoporus sanguineus*

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo filamentosos, basidiomiceto, da ordem *Polyporales* e família *Polyporaceae*. Encontra-se amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em regiões de clima mais ameno e em florestas tropicais como a amazônica. O *P. sanguineus* é conhecido popularmente como orelha-de-pau, sendo encontrado em madeira, onde fixam e se alimentam (Esposito *et al.*, 1993).

A degradação de lignina (polímero natural presente na estrutura de plantas superiores) por fungos de decomposição branca (*white-rot fungi*) tem sido estudada há mais de meio século. Foi somente no início dos anos 80,

entretanto, que uma melhor compreensão sobre o mecanismo da degradação da lignina foi conseguido. O processo envolve a ação de pelo menos três enzimas: LiP (lignina peroxidase), MnP (manganês peroxidase) e Lacase, sendo que as duas primeiras são consideradas mais importantes no processo de degradação (Cameron *et al.*, 2000). A lacase pode participar tanto da despolimerização quanto da polimerização (Schauer *et al.*, 2001).

1.3 Lacase

A primeira descrição da enzima lacase foi feita em 1883 por Yoshida (Yoshida, 1883 citado por Mayer & Staples 2002) originada de uma árvore japonesa *Rhus vernicifera* e em 1985 foi caracterizada como uma oxidase contendo metal por Bertrand (Bertrand 1985, citado por Mayer & Staples 2002).

A distribuição de lacase é bastante ampla sendo representada por dois grupos principais: as lacases extraídas de plantas superiores e as produzidas por fungos. Estes grupos apresentam claras diferenças (Mayer & Staples 2002), mas há relatos de sua presença até mesmo em insetos e procariontes (Riva, 2006). Uma lacase bacteriana que tem sido bastante estudada é a produzida por *Azospirillum lipoferum*, encontrada freqüentemente no solo (Gianfreda *et al.*, 1999).

A atividade da lacase tem sido demonstrada em mais de 60 cepas de fungos pertencentes às várias classes. Entre estas cepas encontra-se a presente na árvore *Rhus vernicifera* e no fungo *Trametes versicolor* que são as lacases que possuem um maior número de estudos em termos de propriedades moleculares e enzimáticas (Gianfreda *et al.*, 1999). Além dos fungos já citados podemos destacar o *Trametes pubescens*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus coccineus* (Ikehata *et al.*, 2004).

As funções biológicas da lacase nos microrganismos produtores ainda não estão muito claras. Em fungos há relatos sobre sua participação no rápido crescimento celular, controle da patogenicidade (Leonowicz *et al.*, 2001), controle da virulência (Mayer & Staples 2002), pigmentação de esporos (Leonowicz *et al.*, 2001, Mayer & Staples, 2002), esporulação (Gianfreda *et al.*, 1999) e degradação de lignina (Eggert *et al.*, 1996).

Lacases, *p*-difenol:dioxigênio oxiredutase (EC 1.10.3.2), fazem parte de um grupo de enzimas denominadas multicobre, que inclui entre outras a ácido ascórbico oxidase e ceruloplasmina. Oxidoredutases são enzimas que catalisam processos de oxidação e redução e constituem um grupo que compreende quase um quarto de todas as enzimas conhecidas, entre as quais estão lacases e peroxidases (Mayer & Staples 2002).

Lacase atua sobre uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos (Leonowicz *et al.*, 2001) e também espécies inorgânicas, incluindo íons Mn^{+2} (Bollag & Leowicz 1984). Catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos, especialmente fenóis e aminas aromáticas, enquanto que concomitantemente reduz o oxigênio molecular a água (Gianfreda *et al.*, 1999).

A lacase desencadeia a remoção de um elétron e um próton de grupos hidroxi-fenólicos ou amino-aromáticos formando seus respectivos radicais livres. Além disso, a lacase não somente oxida ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também os descarboxila e ataca seus grupos metoxila através de desmetilação ou desmetoxilação (Leonowicz *et al.*, 2001). O mecanismo geral de atuação das lacases é a oxidação do substrato através da abstração de um elétron de um composto fenólico gerando um radical fenoxila (Mayer & Staples 2002).

O sítio ativo da lacase é formado por quatro átomos de cobre (Figura 1), sendo estes divididos em três grupos, determinados em função de suas características espectroscópicas, que refletem seus diferentes papéis durante o processo enzimático. Por convenção, um cobre é designado do tipo 1 (T1), dois cobres são do tipo 3 (T3) e um quarto é do tipo 2 (T2) (Durán *et al.*, 2002; Piontek *et al.*, 2002).

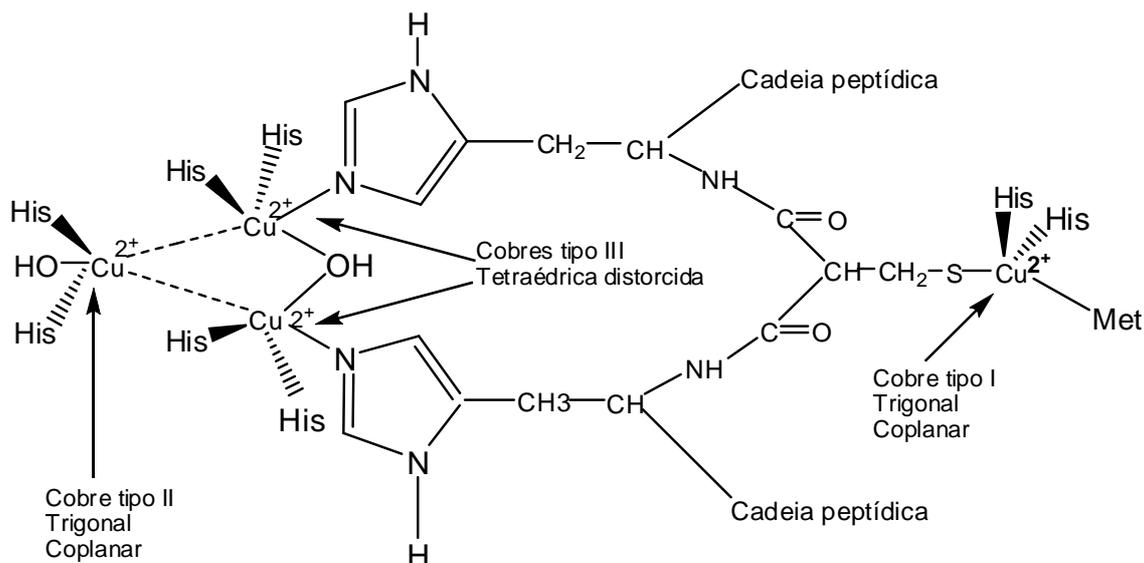


Figura 1: Representação esquemática dos centros de cobre da lacase e indicação das geometrias obtidas por cristalização (Durán *et al.*, 2002; Piontek *et al.*, 2002).

É na região do cobre T1 que ocorre a oxidação do substrato, sendo os elétrons recebidos por este cobre transferidos para o “cluster” trinuclear formado por dois átomos de cobre T3 e um cobre de T2, onde ocorre a redução do oxigênio molecular (Durán *et al.*, 2002; Piontek *et al.*, 2002).

O ciclo catalítico da lacase compreende três passos principais: a) redução do cobre tipo 1 pelo substrato; b) transferência de elétrons do cobre tipo 1 para os cobres tipo 2 e 3; c) redução de oxigênio molecular para água através de sua interação com os cobres de tipo 2 e 3 (Gianfreda *et al.*, 1999; Durán *et al.*, 2002) (Figura 2).

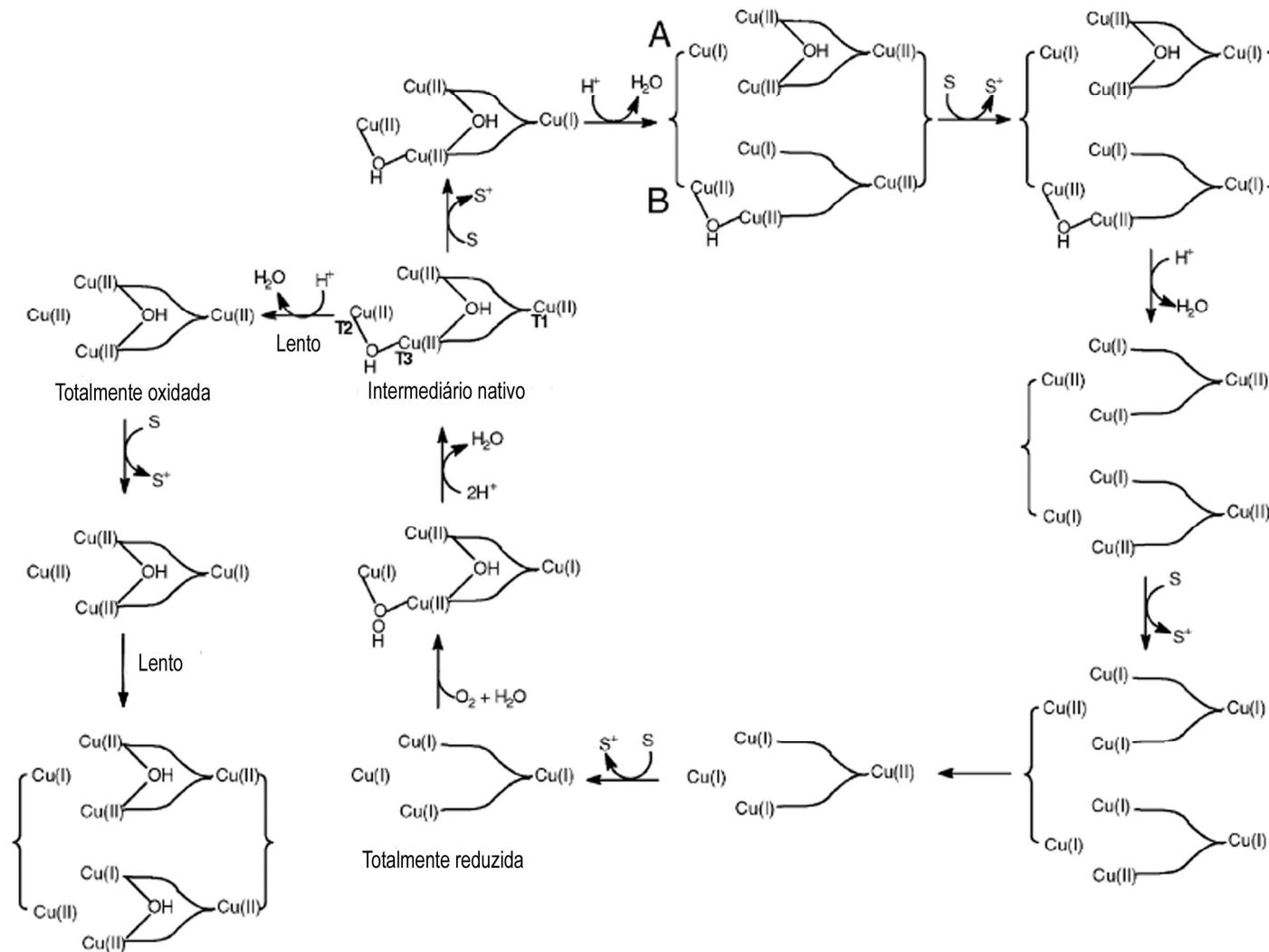


Figura 2: Ciclo catalítico da lacase (Gianfreda *et al.*, 1999; Durán *et al.*, 2002).

A oxidação enzimática de compostos aromáticos inertes em sistemas biológicos está intimamente relacionada com a ação de enzimas que possuem um potencial de oxidação muito alto. Enzimas como a lacase, com baixo potencial redox (cerca de 0,6-0,8V) estão restritas a reagir com substâncias facilmente oxidáveis, como fragmentos fenólicos de lignina, por exemplo (Have & Teunissen, 2001).

Como a lacase sozinha é incapaz de clivar ligações não fenólicas de lignina, esta enzima não era considerada como um componente significativo do sistema lignolítico, apesar de ser comum a secreção de uma quantidade considerável de lacase por fungos lignolíticos. Estudos mostraram que a lacase pode catalisar a oxidação de substratos não fenólicos na presença de um mediador (molécula que atua como carreador de elétrons) (Bourbonnais & Paice, 1990). A lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) possuem um potencial redox mais alto (Bourbonnais & Paice 1990, Eggert *et al.*, 1996).

A inclusão de substâncias oxidáveis apropriadas de baixo massa molecular, conhecidas como mediadores, expande a atividade catalítica da lacase frente a grupos funcionais mais difíceis de oxidar, incluindo álcoois ou éteres benzílicos e alílicos. Este procedimento é denominado LMS (Sistema Mediador de Lacase) (Figura 3) (Oudia *et al.*, 2008).

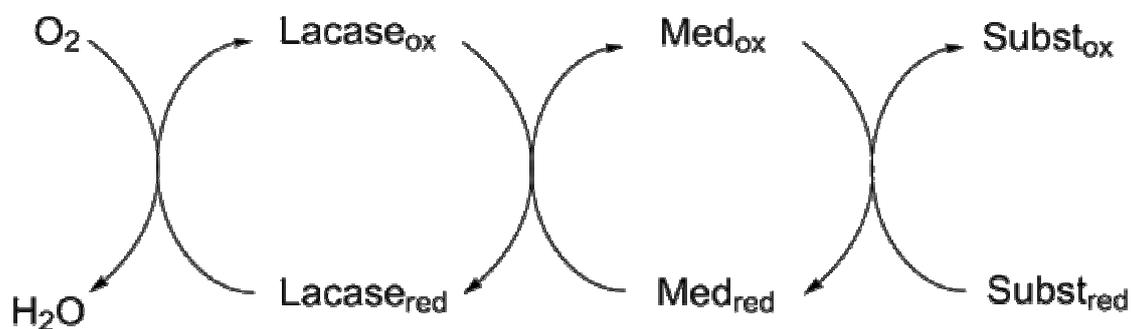


Figura 3: Esquema geral do sistema mediador de lacase (Oudia *et al.*, 2008).

As reações catalisadas por lacases na presença de mediadores têm significativo potencial na síntese de produtos que são inacessíveis através de

rotas químicas tradicionais como, por exemplo, a produção de benzaldeído a partir de tolueno, usando *Trametes versicolor* na presença de 2,2-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico (ABTS) (Figura 4) (Jonas *et al.*, 1998).

Um mediador atua como um tipo de carregador de elétrons. Após ser oxidado pela enzima, ele difunde-se para fora do sítio ativo e então oxida o substrato que, devido ao seu tamanho, não poderia entrar diretamente no sítio ativo da enzima. Este processo pode levar a um mecanismo de oxidação que não seria possível para a enzima sozinha, seja por parâmetros estéreos, como citados anteriormente, seja por parâmetros termodinâmicos, já que os mediadores podem apresentar potenciais de redução diferentes da enzima, estendendo portanto a faixa de substratos oxidáveis (Cantarella *et al.*, 2003).

Há muitos mediadores disponíveis e os mais comuns e eficazes são: HBT (Hidroxibenzotriazol), ABTS (2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), HPI (N-hidroxiftalmida), TPA (trifenilamina), VLA (ácido violúrico) (Figura 4) entre outros (Jonas *et al.*, 1998; Fabbrini *et al.*, 2002).

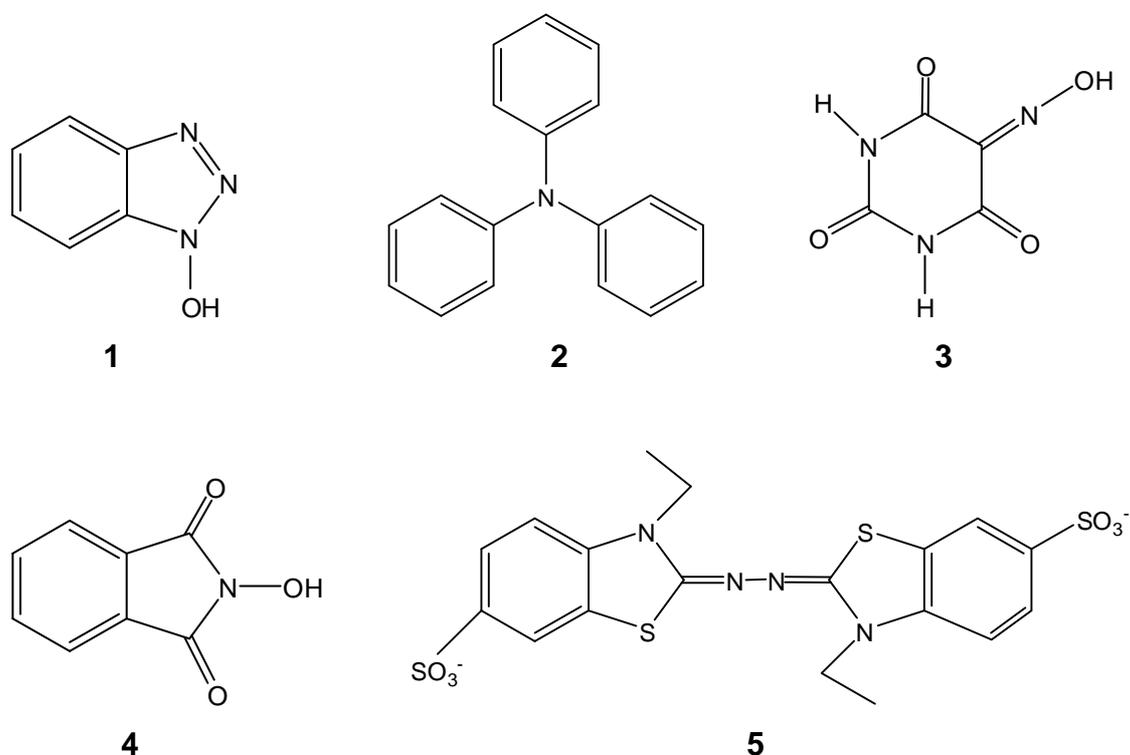


Figura 4: Estruturas químicas de alguns mediadores. 1 (HBT), 2 (TPA), 3 (VLA), 4 (HPI) e 5 (ABTS) (Jonas *et al.*, 1998; Fabbrini *et al.*, 2002).

Diversos fatores influenciam a produção de lacase e conseqüentemente a formação de produtos. Pode-se destacar entre outros: a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono/nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração (Ikehata *et al.*, 2004).

Vários grupos de pesquisadores procuram aperfeiçoar as condições de crescimento do fungo e a produção de lacase, tanto por métodos convencionais e/ou estatísticos, fazendo-se a combinação de diferentes fatores capazes de interferir na produção enzimática, para selecionar o método mais apropriado. Além disso buscam melhor entender as propriedades da enzima a nível molecular e cinético, bem como a identificação mais eficiente de fontes produtoras de lacase (Gianfreda *et al.*, 1999; Ikehata *et al.*, 2004).

A descoberta e a implementação de um processo de produção de enzimas ou utilização de biocatálise enzimática não depende unicamente da tecnologia envolvida, mas também de outras características do processo. Entre outros, podem destacar-se: o método ser reprodutível, custo mais acessível e principalmente otimizar o procedimento da produção enzimática e o isolamento com o objetivo de evitar uma grande perda da atividade enzimática (Gianfreda *et al.*, 1999; Ikehata *et al.*, 2004).

Como as aplicações biotecnológicas em escala industrial requerem grande quantidade de enzima, e normalmente lacases extracelulares são produzidas em pequenas quantidades, o que torna o processo de isolamento e purificação mais difícil e com um custo maior (Ikehata *et al.* 2004). Um estudo foi realizado para determinar a melhor condição para uma significativa imobilização estável da lacase em gel orgânico, demonstrou uma perda de atividade da lacase de 25-32 % utilizando o gel na concentração de 1,5-4 %. Há algumas lacases disponíveis comercialmente, porém ainda com o custo alto e dentre estas disponíveis, nenhuma delas é produzida por *Pycnoporus sanguineus* (Durán & Esposito, 2000).

A afinidade e especificidade da lacase pelo substrato pode variar com mudanças no pH. Para substratos cuja oxidação não envolve troca de prótons, por exemplo a ferrocianida, a atividade da lacase frequentemente diminui com

o aumento do pH. Considerando substratos cuja oxidação envolve troca de prótons, como exemplo o fenol, o pH ótimo se estende entre 3 e 7 para lacases fúngicas e pode aumentar para 9 para lacases de plantas (Bollag & Leowicz, 1984; Bourbonnais & Paice, 1992; Gianfreda *et al.*, 1999).

A produção de lacase é sensível à concentração de nitrogênio no meio de cultivo. Altos níveis de nitrogênio usualmente são exigidos para a obtenção de grandes quantidades de lacase. Altos níveis de lacase foram constatados quando *Lentinus edodes*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Rigidoporus lignonus* foram crescidos com o aumento de 24 para 26 mM de nitrogênio. Em contraste, para *Pycnoporus cinnabarius* e *Phlebia radiata* a limitação de nitrogênio no meio de cultura fez aumentar a produção de lacase (Gianfreda *et al.*, 1999).

Tensoativos não-iônicos ou catiônicos efetivamente aumentam a produção de lacase do *Pleurotus floridae*, dentre estes tensoativos podemos citar o Tween 80 (Gianfreda *et al.*, 1999).

Outro fator muito importante na produção de lacase é a presença ou ausência de indutores. Diversos compostos tem se mostrado indutores e melhorado a produção de lacase. Eles incluem principalmente compostos fenólicos relacionados estritamente à lignina ou derivados da lignina. Contudo existem compostos não lignolíticos de diferentes origens, que são eficientes indutores da produção de lacase (Gianfreda *et al.*, 1999).

Não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos, havendo grande variação do indutor. O efeito estimulante da 2,5-xilidina (2,5-dimetilfenilamina; 2,5-dimetilanilina) foi descrito primeiramente por Fahraeus e colaboradores em 1958 (citado por Leonowicz *et al.* 2001), sendo este um dos indutores de lacase mais citados, porém bastante tóxico. É considerado um dos melhores indutores para a produção de lacase por *P. sanguineus* (Garcia *et al.*, 2007). Outros compostos aromáticos utilizados são fenóis substituídos como: benzil álcool, resorcinol, orcinol e *p*-cresol (Gianfreda *et al.*, 1999).

Lacases são importantes para diversas aplicações biotecnológicas e por isso estas enzimas tem sido objeto de intensa investigação, buscando compreender tanto seu mecanismo catalítico como os determinantes

moleculares que modulam a extensa faixa de substrato. Tais informações são de importância fundamental para futura manipulação racional da enzima por engenharia genética para aplicações biotecnológicas específicas (Xu *et al.*, 1998; Mayer & Staples 2002).

Lacases são comumente vistas como enzimas com um grande interesse industrial. Dentre várias das aplicações da lacase podemos destacar: a descoloração de corantes têxteis, descoloração de polpa em indústrias de papéis e celulose (como clareador, potencial substituto do cloro, que é ambientalmente nocivo devido à geração de compostos clorados altamente tóxicos), síntese de polímeros, biossensores amperométricos para a detecção de fenol e também no processamento de alimentos e bebidas (Gianfreda *et al.*, 1999; Mayer & Staples 2002).

As lacases mostram ter um grande potencial para aplicações ambientais. O uso destas enzimas na biorremediação, ou seja, no tratamento de efluentes industriais como compostos de natureza aromática, ou remoção de poluentes do solo tem recebido uma atenção especial (Herrera & Couto, 2006; Riva, 2006).

Várias biotransformações já foram obtidas com o uso de lacases como: a lacase presente na *Rhus vernicifera* que oxidou a catequina em duas hidroquinonas (Das & Rosazza 2006); a biotransformação do resveratrol em *trans*-dehidrodímeros catalisada por lacases do *Myceliophthora thermophyla* e do *Trametes pubescens* (Nicotra *et al.*, 2004) (Figura 5).

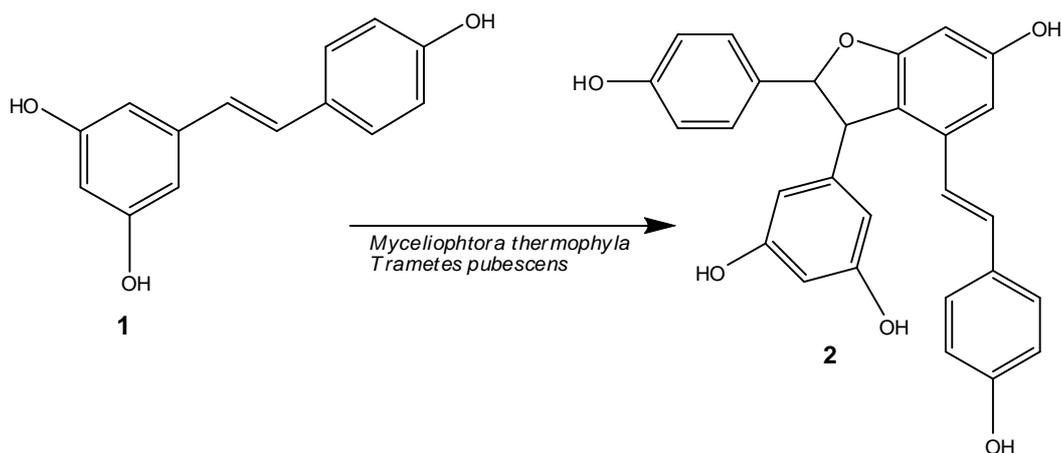


Figura 5: Biotransformação do trans-resveratrol (1) realizada por lacases dos fungos *Myceliophthora thermophyla* e *Trametes pubescens* em dímero ϵ -viniferina (2) (Nicotra *et al.*, 2004).

A oxidação da 8-hidroxiquinolina catalisada por lacase do *Trametes pubescens* (Ncanana *et al.*, 2006); a síntese da bis-lactona lignanas através da catálise de lacase dos fungos *Trametes versicolor*, *Agaricus bisporus* e *Melanocarpus albomyces*; a lacase do *Pycnoporus cinnabarinus* proporcionou a reação do ácido 3-(3,4-hidroxifenil)-propiónico com ácido 4-aminobenzóico formando o ácido 3-[6-(4-carboxifenil)-propiónico (Mikolasch *et al.*, 2002); a biotransformação do corante “Acid Blue 62”, utilizando o *Pycnoporus sanguineus* (Vanhulle *et al.*, 2008) (Figura 6).

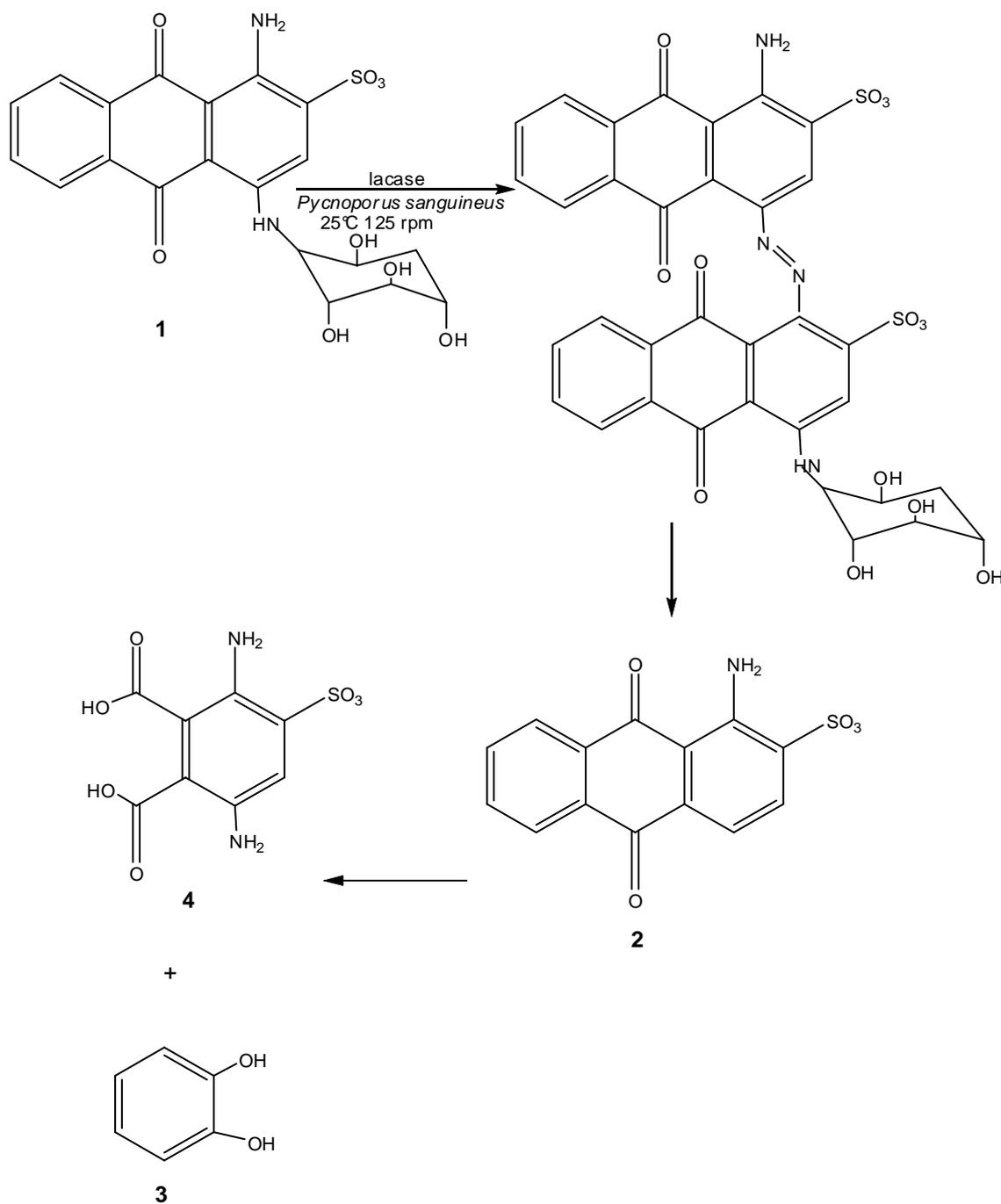


Figura 6: Reação de biotransformação sugerida durante a descolorização do corante Acid Blue 62 por *Pycnoporus sanguineus*. (1) corante Acid Blue 62; (2) ácido 1-aminoantraquinona-2-sulfônico; (3) catecol e (4) ácido 2,5-diamino-3,4-dicarboxi-benzenossulfônico (Vanhulle *et al.*, 2008).

1.4 Flavonóides

Em 1930 uma nova substância química foi isolada de laranjas e acreditava-se tratar de uma nova vitamina e essa substância foi designada como vitamina P. Estudos posteriores, demonstraram tratar-se de um flavonóide, a rutina (Figura 7). A partir desta descoberta, os flavonóides vêm sendo estudados extensivamente (Nijveldt *et al.*, 2001).

A estrutura dos flavonóides está baseada no núcleo *flavilium*, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel (A) é condensado ao terceiro anel (C) (Figura 7), que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. Devido ao fato do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas, auronas recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (Aherne & O'Brien, 2002; Heim *et al.*, 2002).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas estão: a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, agentes alelopáticos e inibição enzimática (Formica & Regelson, 1995; Heim *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2007).

Os flavonóides são compostos naturais que, em estudos recentes tem demonstrado diversas atividades fisiológicas e farmacológicas, tais como antioxidantes, antitumorais, antiúlcera, estrogênica, antiviral, antiinflamatória, inibidor da agregação plaquetária, antiisquêmica, antialérgica, antiespasmódica, inibição da angiogênese, entre outras (Formica & Regelson, 1995; Das & Rosazza, 2006).

Os flavonóides são capazes de inibir a atividade de enzimas como, por exemplo, lipoxigenases, cicloxigenases e monoxigenases (Day *et al.* 2000; Murota & Terao, 2003; Das & Rosazza 2006; Kostrzewa-Suslow *et al.* 2006; Lustosa *et al.*, 2008). Essas propriedades inibitórias que os flavonóides desempenham nos vários sistemas enzimáticos podendo-se incluir as hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácidos oxidases podem estar relacionadas as suas diversas atividades terapêuticas (Ferguson, 2001; Havsteen, 2002).

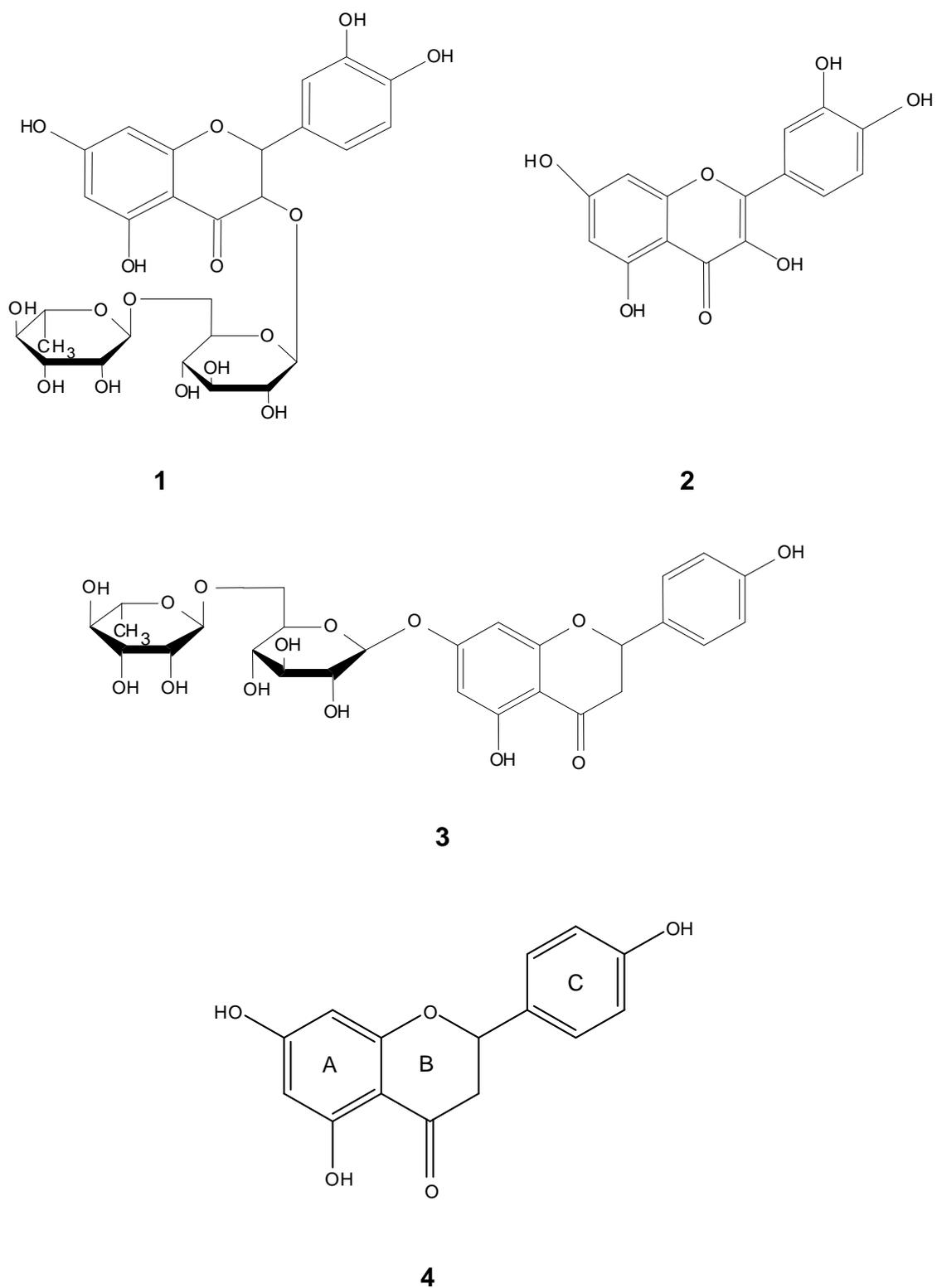


Figura 7: Estruturas químicas dos flavonóides: (1) Rutina, (2) Quercetina (Costa *et al.*, 2008), (3) Naringina (Fang *et al.*, 2006) e (4) Naringenina (Ibrahim, 2000).

Uma oxidoreductase que é inibida por ação de flavonóides é a hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA), enzima chave envolvida no processo de biossíntese do colesterol, mesma enzima que é inibida pelas estatinas, classe terapêutica mais utilizada no tratamento de hipercolesterolemia (Formica & Regelson, 1995; Havsteen, 2002).

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto e, em muitos casos ainda empírico. Mas em geral são considerados como benéficos. Alguns medicamentos são elaborados a partir de flavonóides, em particular para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator da vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides têm demonstrado a capacidade de interagir sobre a gênese do câncer, bloqueando o estágio de promoção, através da inibição da síntese da ornitina-descarboxilase (Day *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2007).

A própolis possui em sua composição química vários flavonóides, um deles é a quercetina, que tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antitumoral, imunomodulatória, hepatoprotetora, cicatrizante, antibacteriana, antiviral entre outras (Lustosa *et al.*, 2008).

Os flavonóides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ou radical peróxido, atuando por sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Alguns flavonóides são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres (Havsteen, 2002; Murota & Terao, 2003; Simões *et al.*, 2007; Das & Rosazza, 2006). Esta atividade é o resultado de um conjunto de propriedades, tais como atividade quelante do ferro, atividade sequestrante de radicais livres, inibição de enzimas como NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase. Assim, os flavonóides podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres. Alguns flavonóides são mais potentes antioxidantes do que o ácido ascórbico e os tocoferóis (Havsteen, 2002; ; Murota & Terao, 2003; Das & Rosazza, 2006).

A quercetina (Figura 7) é uma substância biossintetizada a partir da via dos fenilpropanóides e constitui uma importante classe de polifenóis presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários vegetais (Simões *et al.*, 2007).

Tem sido atribuída à quercetina a atividade antiviral contra vírus envelopados: vírus herpético simples do tipo 1, vírus respiratório sincicial, pseudo-raiva, parainfluenza 3, e ao derivado 3-O-metilado da quercetina foi atribuída atividade contra o vírus da poliomielite, inibindo umas das etapas da replicação viral. A 3-O-metilquercetina e a 3,3'-dimetilquercetina inibem a multiplicação do vírus da poliomielite do tipo 1, do coxsackievírus tipo B4 e do rinovírus, em cultura de células (Formica & Regelson, 1995; Simões *et al.*, 2007).

Estudos com a quercetina, descreveram a inibição da incidência de papilomas de pele em cobaias e a inibição de fibrossarcoma induzido em camundongos. Há relatos também que demonstram a inibição do crescimento de certas células cancerígenas em humanos como do cólon, ovário e do trato gastrointestinal (Formica & Regelson, 1995; Day *et al.*, 2000).

Alguns flavonóides, como a diosmina, hesperidina, quercetina e rutina, são comercializados como anti-hemorrágicos, para melhorar as funções capilares diminuindo os danos capilares e insuficiência venosa e para tratar hemorróidas (Simões *et al.*, 2007).

Naringina (Figura 7) é um flavonóide presente em frutas cítricas e é utilizada tradicionalmente na medicina chinesa como antiinflamatório e antioxidante, já sua aglicona naringenina (Figura 7) além dessas propriedades tem demonstrado capacidade de inibir a proliferação de células cancerosas (Fang *et al.*, 2006).

O mecanismo e a seqüência de eventos pelos quais os radicais livres interferem na função celular ainda não são completamente entendidos, mas um dos mais importantes eventos parece ser a peroxidação lipídica que resulta em danos à membrana celular. Esses danos celulares causam uma troca iônica na carga da membrana provocando mudanças de pressão osmótica que resultam em lise celular. Radicais livres podem agir sobre vários mediadores

inflamatórios contribuindo para uma inflamação geral responsável por danos aos tecidos (Nijveldt, 2001).

As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações. Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente com ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (Birt *et al.*, 2001).

Diversos estudos indicam que muitos microrganismos são capazes de apresentar uma extensa biotransformação dos flavonóides e suas estruturas modificadas têm sido encontradas. Isto ocorre principalmente nas células epiteliais do intestino e no fígado onde são formados metabólitos glicuronados, sulfatados e metilados, os quais atingem os órgãos periféricos por meio da circulação sanguínea (Day *et al.*, 2000; Heim *et al.*, 2002). Além disso, os flavonóides podem ser transformados por diferentes reações, sendo que hidroxilação, metilação, glicosilação e acetilação ocorrem com quase todas as classes de flavonóides (Aherne & O'Brien, 2002; Heim *et al.*, 2002; Stahl *et al.*, 2002).

Podem ocorrer também reações de acilação e ramnosilação, resultando em uma grande diversidade destes compostos na natureza. A atividade biológica depende da estrutura química e orientação relativa das diversas partes da molécula (Aherne & O'Brien, 2002; Heim *et al.*, 2002). Reações como sulfatação e prenilação, são mais restritas a certos grupos de flavonóides (Heller & Forkmann, 1988).

A quercetina e suas formas glicosiladas são absorvidas no intestino. As formas glicosiladas da quercetina e outros flavonóides são em sua maioria hidrolisadas, liberando a molécula de açúcar e sofrendo posterior conjugação com glicuronídeos e/ou sulfatos antes e durante o processo de absorção intestinal (Murota & Terao, 2003). O metabolismo principal desses compostos ocorre no fígado (Aherne & O'Brien, 2002; Heim *et al.*, 2002; O'Lery *et al.*, 2003).

A glicosilação, importante modificação de flavonóides, é capaz de aumentar a solubilidade dos mesmos e constitui reação fundamental para a

acetilação. Enzimas como as flavonóides-3-O-glicosiltransferases são responsáveis pela formação de alguns intermediários da biossíntese de antocianinas. Algumas dessas enzimas têm sido isoladas e purificadas de *Daucus carota*, *Picea abies*, *Hippeastrum sp.*, *Brassica oleraceae* e *Citrus paradisi* (Harbone, 1993).

Algumas glicosiltransferases específicas para grupos hidroxílicos são: a flavonóide-7-O-glicosiltransferase, flavonóide-3'-O-glicosiltransferase, flavonóide-4'-O-glicosiltransferase e flavonóide-5'-O-glicosiltransferase. Glicosiltransferases específicas para as posições 2' e 5' de flavonóides, parcialmente metilados foram encontradas no *Chrysosplenium americanum*. Outras transformações envolvendo a glicosilação de flavonóides estão relacionadas com a ação de glicuronosiltransferases, isoflavona-4'-O-glicosiltransferase e C-glicosilação de 2-hidroxi-flavanonas nas posições 6 e 8 (Heller & Forkmann, 1988).

Danieli *et al.* (1989) evidenciaram a capacidade de uma protease de acetilar isoquercitrina-D-glicopiranosídeo ao seu correspondente 6"-O-mono, 3"-O-mono e 3",6"-O-dibutanoil conjugados, enquanto que quercetrina-D-ramnopiranosídeo não foi afetada. Posteriormente, Danieli *et al.* (1997) demonstraram que uma lipase presente na *Candida antarctica* catalisou a acetilação de isoquercitrina a 3",6"-O-diacetato isoquercetrina, de quercetrina à 4"-O-acetato quercetrina e de rutina à 3",4"-O-diacetato rutina (Figura 7e 8).

O metabolismo bacteriano de flavonóides, principalmente no cólon, são relatados em estudos com animais e pode ser um passo limitante na biodisponibilidade de muitos flavonóides em humanos e animais. Bactérias da microflora do cólon são responsáveis pela hidrólise de flavonóides glicosilados e conjugados, gerando numerosos compostos fenólicos menores, ácido carboxílico assim como a produção de dióxido de carbono (Aherne & O'Brien, 2002; Heim *et al.*, 2002; Simmering *et al.*, 2002).

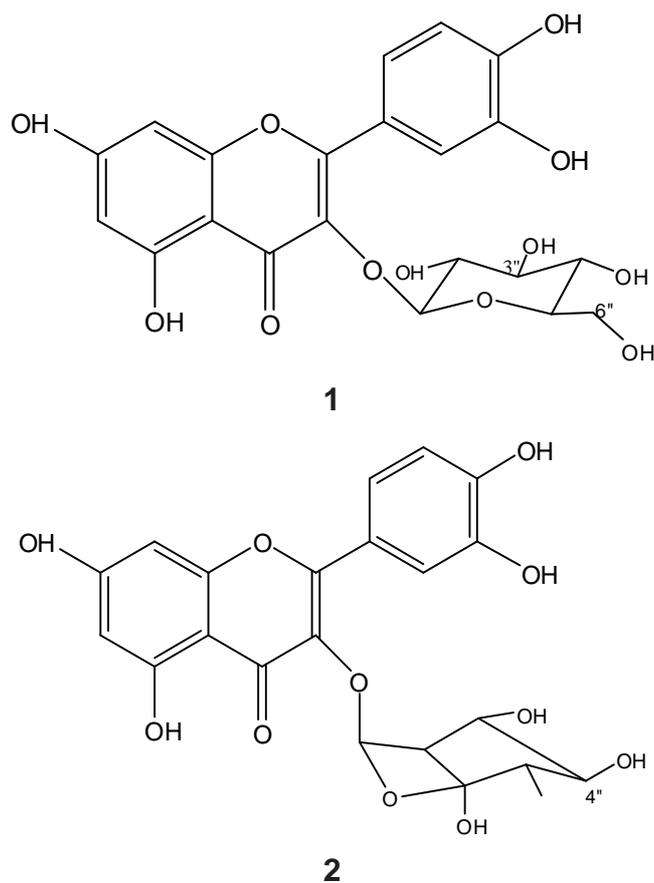


Figura 8: Estruturas da (1) isoquercetrina, (2) quercetrina (Danieli *et al.*, 1997).

Há alguns exemplos de bioconversão de flavonóides utilizando microrganismos, como a sulfatação da naringenina por *Cunninghamella elegans* (Ibrahim, 2000) (Figura 9).

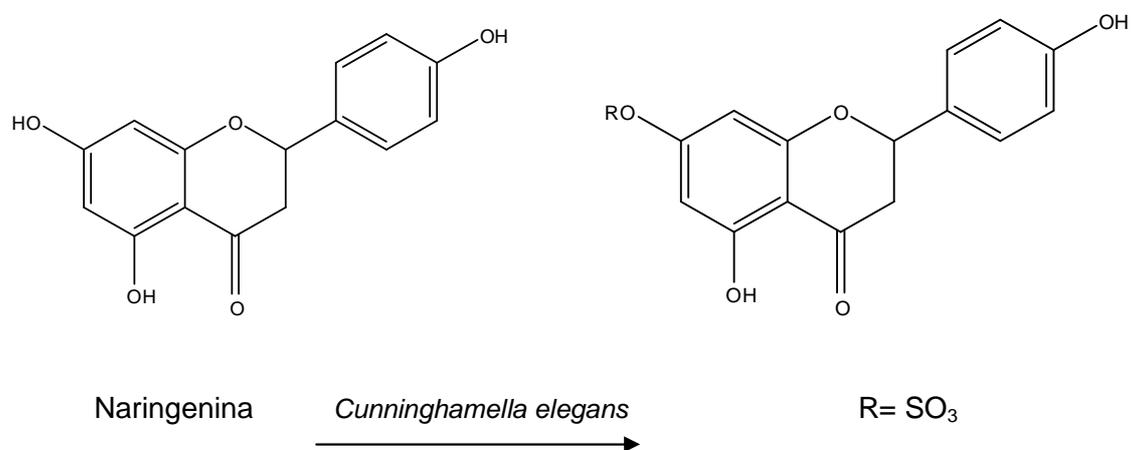


Figura 9: Sulfatação da naringenina por *Cunninghamella elegans* (Ibrahim, 2000).

Dez cepas de fungos filamentosos do gênero *Beauveria*, isolados na região central do Brasil, metabolizaram a quercetina, formando metabólitos semelhantes aos encontrados nos mamíferos, e diferentes metabólitos conjugados foram detectados simultaneamente: metilados, sulfatados, monoglicuronados e glicuronados (Costa *et al.*, 2008) (Figura 10).

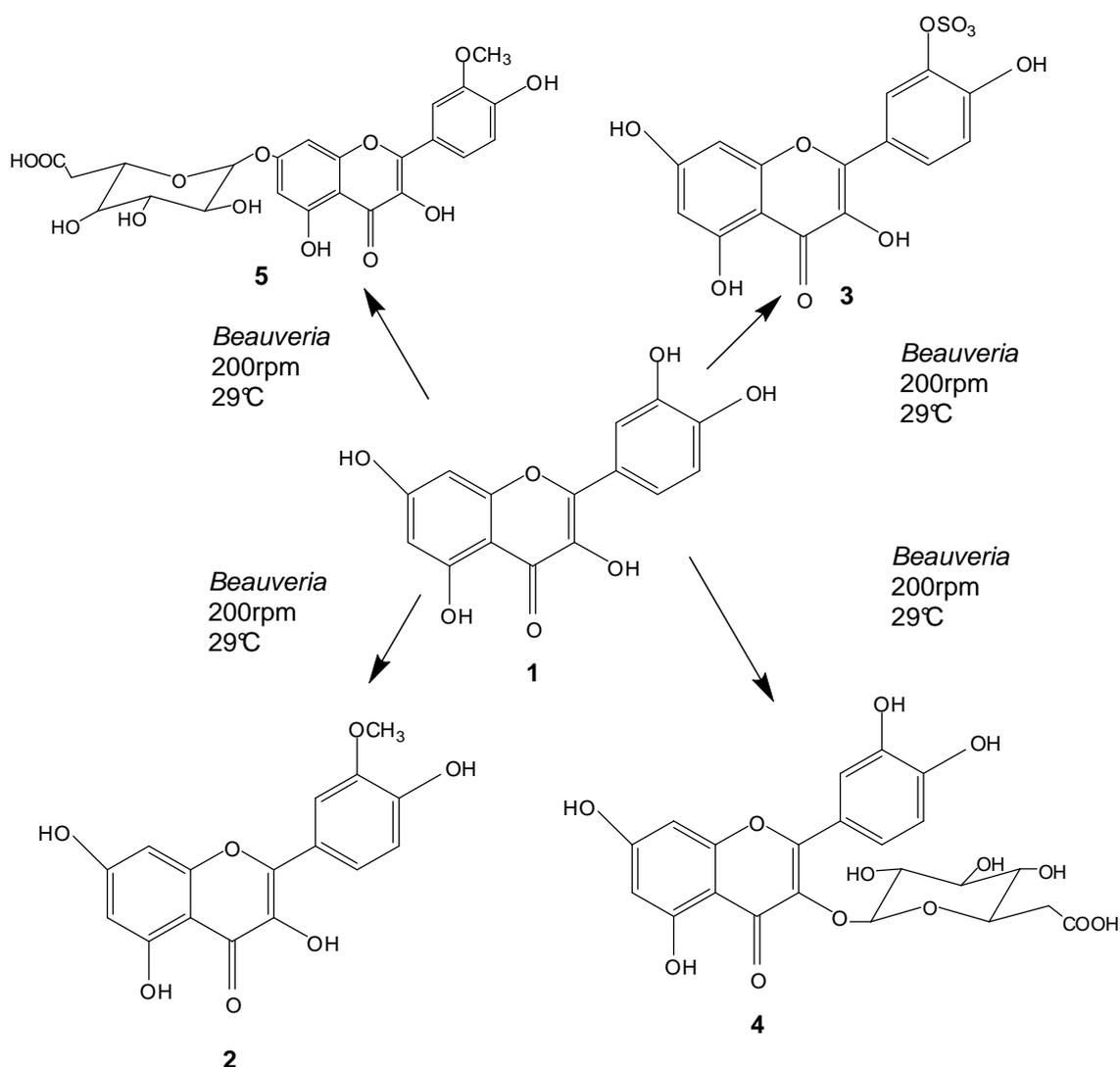


Figura 10: Quercetina (1) e vários metabólitos produzidos por cepas de fungos filamentosos do gênero *Beauveria*. 3'-O-metilquercetina (2), quercetina-3'-O-sulfato (3), quercetina-3'-glucoronideo (4) e 3'-O-metilquercetina-7-glucoronideo (Costa *et al.*, 2008).

O microrganismo *Bacillus cereus*, presente no rúmen de bovinos, consegue biotransformar a quercetina catalizando 3-O-glicosilação (3), formando a isoquercetina e ácido protocatequímico (Das & Rosazza 2006).

Em estudos recentes, mostrou-se que a naringina pode ser metabolizada e encontrada no plasma na forma de naringenina e naringenina glucoronídeo, sendo o último citado como principal metabólito existente no plasma dos ratos após a administração oral. A concentração de naringina na urina de humanos foi de aproximadamente 5 ng e de naringenina 1 ng e a análise por CLAE acoplada ao espectro de massas, não foi sensível o suficiente para detectar os metabólitos. A bioconversão pode proporcionar uma alternativa para a obtenção de maior rendimento destes metabólitos ou de novos derivados (Fang *et al.*, 2006).

Diante do potencial que os flavonóides apresentam frente as diversas atividades fisiológicas e farmacológicas, instiga-se a pesquisa de novas moléculas bioativas derivadas de modificações destes compostos naturais (Das & Rosazza, 2006). Até o presente momento não foram encontrados na literatura estudos sobre bioconversão de flavonóides realizados pelo fungo *Pycnopus sanguineus*.

2 Objetivos

- Avaliar o crescimento, morfologia do *Pycnoporus sanguineus* e a sua produção de lacase por na presença dos flavonóides: naringenina, naringina, quercetina, em diferentes meios de cultura.
- Bioconverter os flavonóides utilizando o *Pycnoporus sanguineus* e verificar a presença de possíveis metabólitos.
- Realizar o ensaio biocatalítico com a finalidade de avaliar a participação desta enzima na produção dos metabólitos da naringina.

3 Material e Métodos

3.1 Meios de cultura

Meio ágar batata dextrose (BDA)

Ágar batata (Acumedia [®])	39 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Meio de produção de lacase (MPL) (Garcia, 2006 modificado)

Extrato de malte	3,75 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
Água destilada q.s.p.	300 mL

Meio descrito por Rama (1998) modificado

Maltose	20 g
Tartarato de amônio	1,84 g
Tartarato de sódio	2,3 g
KH ₂ PO ₄	1,33 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,07 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,046 g
MnSO ₄ H ₂ O	0,035 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,007 g
Extrato de levedura	1 g
Água destilada q.s.p.	200 mL

Meio Peptone Dextrose Soybean Meal (PDSM) (Manosroi et al.1999):

Peptona bacteriológica	1,5 g
Lecitina de soja	1,5 g
Fosfato de potássio monobásico	1,5 g
NaCl	1,5 g
Dextrose	6 g
Extrato de Levedura	0,9 g
Água q.s.p.	300 mL

Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos. O pH $6,0 \pm 0,2$ foi medido com uma fita indicadora, à temperatura ambiente (25°C).

3.2 Origem e manutenção do fungo

A linhagem de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 (Linnaeus ex Fries) Murril utilizada neste trabalho foi obtida junto à Fundação André Tosello em Campinas/SP. O fungo foi mantido em meio ágar batata dextrose (BDA) a 4°C e repicado periodicamente para a manutenção das culturas. Para a realização dos experimentos, as culturas foram incubadas em placas de Petri com meio BDA à temperatura de 25°C, em ausência de luminosidade por 7 dias.

3.3 Incubações com os Flavonóides

Para o crescimento do fungo em meio líquido nas diferentes condições de cultivo, 10 discos de 6 mm de diâmetros, foram retirados da região mais recente de crescimento do fungo em meio BDA (zona periférica) e inoculados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido. Os experimentos foram feitos no mínimo em duplicata.

Os flavonóides naringenina, naringina e quercetina (Sigma) foram utilizadas na concentração de 0,5 g/L em cada Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura líquido para todos os experimentos. Os dois primeiros foram solubilizados em etanol absoluto e o último solubilizado em etanol absoluto e dimetilformamida na proporção de 50:50. O volume de 1 mL foi adicionado a cada Erlenmeyer após a solubilização dos substratos. Foram realizados dois

controles, sendo um composto do meio líquido e o *Pycnoporus sanguineus* e o outro o meio líquido mais o flavonóide.

3.4 Avaliação do efeito dos flavonóides no crescimento do *Pycnoporus sanguineus*, produção de lacase e a presença de possíveis metabólitos

Foram realizadas incubações com o *Pycnoporus sanguineus* na presença dos flavonóides em diferentes meios líquidos. Nas incubações variaram-se os parâmetros reacionais de temperatura, agitação e o tempo de adição dos flavonóides (simultâneo ao fungo ou após 65 h de incubação com o fungo) (Tabela 1).

Durante o período de incubação, alíquotas do sobrenadante de cada Erlenmeyer foram coletadas, centrifugadas em equipamento Fanem a 10000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi, então, congelado para posterior análise.

Avaliou-se o crescimento ou não do fungo *P. sanguineus* na presença dos flavonóides, a morfologia, a produção de lacase e a presença de possíveis metabólitos.

A incubação do fungo na presença dos flavonóides foi realizada seguindo os parâmetros reacionais de temperatura e agitação, descritos na Tabela 1, em Incubador Rotativo Tecnal.

Foram realizados dois tipos de controle (branco): um contendo o meio líquido e o *P. sanguineus* (controle 1) e o outro com o meio de cultura mais o flavonóide (controle 2).

Tabela 1: Descrição dos experimentos realizados em diferentes condições de temperatura, agitação, tempo de coleta das alíquotas, meios de cultura, flavonóides e o tempo de adição dos flavonóides a incubação.

Experimentos e Tempo de adição	Temperatura e Agitação	Tempo de coletas das alíquotas e Meios de culturas	Flavonóides
A Simultanea	27°C e 200 rpm	PDSM e MPL 24/24 h até 96 h	Quercetina
B Simultanea	29°C e 200 rpm	PDSM 24/24 h até 96 h	Quercetina
C Simultanea	30°C e 120 rpm	Rama PDSM e MPL 1, 2, 3, 24 e 48 h	Naringenina Naringina Quercetina
D Após 65 h	30°C e 150 rpm	Rama 24/24 h até 96 h	Naringenina Naringina

3.5 Extração

Ao término do tempo de incubação, o micélio contido nos Erlenmeyers foi separado por filtração à vacuo em funil de Büchner. O sobrenadante de incubação, por sua vez, foi supersaturado com cloreto de sódio (NaCl) e novamente filtrado à vácuo em um funil de Büchner, utilizando uma camada de Celite sobre o filtro de papel. Realizou-se, então, a extração desta fração aquosa resultante, que foi transferida para um funil de separação e extraída com três porções de acetato de etila (100 mL). À fração acetato de etila adicionou-se sulfato de magnésio anidro, para eliminar algum resquício de água, em seguida filtrou-se em funil de vidro sinterizado sob vácuo e, ao final,

o acetato de etila foi rotaevaporado. A fração aquosa foi armazenada em geladeira.

O micélio separado por filtração a vácuo foi em seguida extraído com acetona por 3 h em um agitador magnético. A massa fúngica foi, então, filtrada com o papel de filtro e o filtrado foi rotaevaporado.

O conteúdo das frações cetônica e acetato de etila foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a fim de pesquisar a presença de possíveis metabólitos (Figura 11).

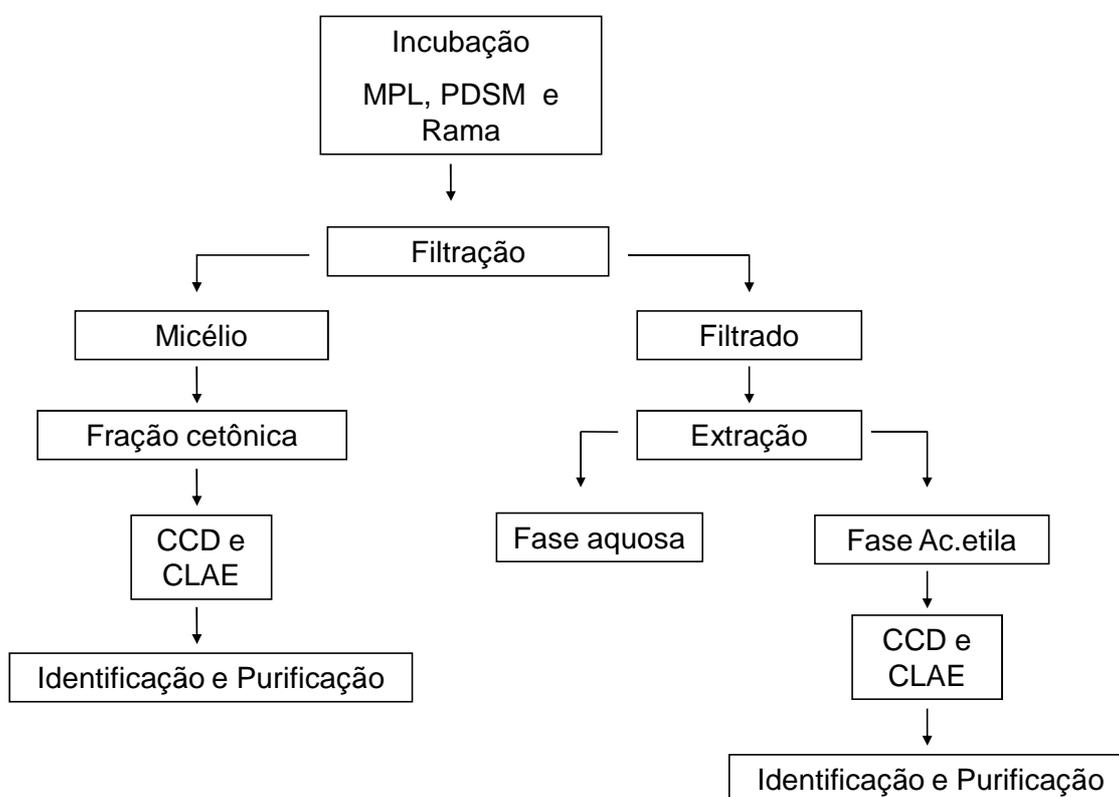


Figura 11: Etapas da extração realizadas após o término das incubações do *Pycnoporus sanguineus* com os flavonóides.

3.6 Técnicas cromatográficas

Cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram as metodologias analíticas empregadas no monitoramento das reações de bioconversão para a determinação de derivados funcionalizados a partir dos flavonóides naringenina, naringina, quercetina.

Na CCD foram utilizadas cromatofolhas ALUGRAM[®] (Macherey-Nagel, Germany) de sílica gel 60 F₂₅₄, espessura da camada de sílica 0,20 mm. As fases móveis utilizadas no monitoramento da bioconversão foram: acetato de etila/metanol (95:05) para os flavonóides quercetina e acetato de etila/metanol (70:30) para a naringenina e naringina. As placas cromatográficas foram visualizadas em luz UV a 254 nm e 365 nm, atmosfera de iodo, ácido fosfomolibdico e reagente sulfavanílico como reveladores. E os diferentes valores de R_fs foram determinados. O R_f é um índice de retenção de um composto. É definido como a razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente.

Para as análises, as alíquotas foram descongeladas a temperatura ambiente e saturadas com cloreto de sódio, seguindo-se a extração com acetato de etila. A fração orgânica resultante foi coletada para análise por CCD. As frações cetônica e acetato de etila, obtidas da extração realizada após o término do tempo de cada incubação foram analisadas por CCD.

Para o monitoramento por CLAE, utilizou-se um Cromatógrafo Gilson[®], equipado com duas bombas modelo 321 da Gilson[®], injetor manual Rheodyne com a capacidade de 20 µL, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK[®] (250 x 4 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, detecção UV a 260 nm para os flavonóides quercetina e 280 nm para naringenina e naringina. O tempo de corrida foi de 12 minutos para a quercetina e 6 minutos para naringenina e naringina e temperatura ambiente de 27°C. As fases móveis utilizadas foram metanol/água (20:80) e metanol/metanol-tampão fosfato de potássio monobásico 0,02 M (65:35), sendo a eluição isocrática (Schauer *et al.* 2001). Os cromatogramas,

apresentam os tempos de retenção dos prováveis derivados formados. Foram testadas as alíquotas dos sobrenadante das incubações e as frações acetato de etila e cetônicas obtidas da extração realizada após o término do tempo de incubação.

As fases móveis para CLAE foram preparadas utilizando água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore[®], São Paulo, Brasil), metanol grau HPLC (OminSolv, EMD[®], Canadá). Os solventes foram filtrados em membranas Millipore[®] de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, desgaseificado em banho de ultrassom Thornton T7 por 15 minutos, antes do uso.

A naringenina, naringina e quercetina foram solubilizados em metanol (Omnisolv[®], EMD, Canadá), sendo a última solubilizada no sonificador por 5 minutos, para obtenção de soluções padrões de concentrações 0,5 mg/mL. As alíquotas do meio líquido que foram retiradas durante o período de incubação e as frações cetônica e acetato de etila das extrações foram centrifugadas em equipamento Fanem[®] a 10000 rpm por 5 minutos e analisadas por CLAE.

3.7 Caracterização dos derivados

A recristalização das frações acetato de etila e cetônica foi o método empregado na separação e purificação dos derivados. Solventes de diferentes polaridades seguindo a série eluotrópica foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, éter, acetato de etila, acetona e metanol foram usados para separação dos produtos que foram monitorados por CCD e CLAE. Todas as frações de acetato de etila e cetônicas dos experimentos realizados, após serem rotaevaporadas, passaram pelo processo de recristalização. As frações coletadas foram analisadas por CCD, para constatar que apenas uma substância estava presente demonstrando assim a separação desta das outras contidas na fração.

Uma vez purificados por recristalização, os produtos obtidos foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C).

As análises de RMN foram realizadas a temperatura ambiente em espectrômetro Bruker Avance III, utilizando uma sonda inversa TBI de 5mm. Os deslocamentos químicos no RMN de ^1H (500 MHz) foram referenciados aos padrões internos TMS (tetrametilsilano; 0,0 ppm) para os solventes CDCl_3 , CD_3OD , MeD e D_2O .

3.8 Ensaio de biocatálise

Inicialmente foram feitos testes de solubilidade e estabilidade no tampão acetato de sódio 100 mM, utilizando os flavonóides naringenina, naringina, quercetina. E selecionado a naringina por apresentar uma solução límpida com o tampão o que viabilizaria o experimento.

Para o ensaio de biocatálise a mistura de reação continha 1,05 mg do flavonóide selecionado, solubilizado em etanol absoluto, 0,2U de lacase purificada (Lac 2) conforme descrito por Garcia *et al.* (2007), tampão acetato de sódio 100 mM, pH= 5,0. O ensaio foi realizado em tubo de ensaio, protegido da luz e mantido a 28°C e 150 rpm. Simultaneamente fez-se o controle no qual não foi adicionado a enzima, somente a naringina e o tampão. O volume final em cada tubo de ensaio foi de 2 mL. Alíquotas foram retiradas no tempo zero e após 3 h, 6 h, 12 h e 24 h para a avaliação de pH, atividade de lacase, determinação do perfil espectrofotométrico (Espectrofotômetro Varian[®] Cary 50) e a realização do monitoramento por CCD com fase móvel de Acetato de etila/metanol (70:30), reveladores UV, Iodo e Sulfavanílico para pesquisa de possíveis metabólitos (Mikolasch *et al.*, 2002; Ncanana & Burton, 2006; Tranchimand *et al.*, 2006). O ensaio foi realizado em duplicata.

3.9 Ensaio enzimático

A presença de lacase no meio reacional foi determinada pela oxidação da seringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído azina) (Sigma Chemical Company) a 525 nm ($\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), durante 5 minutos (Leoonowicz & Grzywnowicz 1981). O volume final da mistura foi de 1 mL, sendo 0,30 mL de

tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0; 0,6 mL de extrato enzimático diluído quando necessário e 0,1 mL de seringaldazina 1 mM solubilizada em etanol absoluto.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto (Leoonowicz & Grzywnowicz 1981), nas condições do ensaio. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. A leitura foi realizada no Espectrofotômetro UV-Vis Fento[®], modelo 700 Plus. A reação ocorreu em temperatura entre 25-30°C.

A atividade de lacase foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (Leoonowicz & Grzywnowicz 1981):

$$A = \frac{10^6 \Delta E}{\epsilon \Delta t}$$

onde: ϵ = coeficiente de extinção molar de cada substrato, conforme dados da literatura.

ΔE = aumento na absorbância no comprimento de onda específico.

Δt = tempo de reação em minutos.

As alíquotas foram pré-incubadas com enzima catalase por 30 minutos, antes do ensaio para atividade enzimática, a fim de eliminar qualquer peróxido de hidrogênio endógeno que pudesse estar presente, permitindo a distinção entre atividade de lacase e peroxidases, caso estas estivessem sido produzidas nas condições de cultivo estudadas. Utilizou-se para este fim a enzima comercial catalase da Sigma (C9322) solubilizada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH=6,8 na concentração de 500 U/50 μL (Mayer & Staples 2002).

A alíquota de 50 μL retirada do meio de incubação foi adicionada a 50 μL catalase, após 30 minutos adicionou-se 800 μL de tampão acetato 100 mM, pH= 6,8 e 100 μL seringaldazina. Para o teste controle, sem catalase, a 50 μL da alíquota adicionou-se 850 μL tampão e 100 μL seringaldazina. Os testes foram realizados em duplicata e as leituras foram realizadas no Espectrofotômetro UV-Vis Fento[®], modelo 700 Plus em 525 nm após 5 minutos de reação.

4 Resultados e Discussão

4.1 Crescimento do *Pycnoporus sanguineus*

Fungos filamentosos são microrganismos morfologicamente complexos que apresentam diferentes formas estruturais durante todo o ciclo de vida. Estas formas podem variar de filamentos miceliais dispersos a massa micelial densa conhecida como “pellets”. Essa forma não é determinada apenas pelo material genético da espécie, mas também pela natureza do inóculo bem como as condições químicas (constituintes do meio, concentração dos componentes) e físicas (temperatura, pH e agitação). A mudança na morfologia durante o crescimento afeta o consumo de nutrientes e a taxa de oxigênio na cultura submersa (Papagianni, 2004).

O fungo *Pycnoporus sanguineus* cresceu na presença dos flavonóides naringenina, naringina e quercetina, sob todas as condições de cultivo testadas: a 27°C e 200 rpm (experimento A), 29°C e 200 rpm (experimento B), 30°C a 120 rpm (experimento C) e 30°C a 150 rpm (experimento D). Todos os flavonóides testados permitiram um crescimento fúngico no meio PDSM, que em relação aos meios Rama e MPL, foi comparativamente maior. O meio MPL foi o meio líquido que apresentou menor crescimento fúngico.

Em relação às variações dos parâmetros reacionais, como temperatura e agitação, não observou-se influência no crescimento do *P. sanguineus* com a variação da temperatura de 27°C para 29°C em incubações de quercetina com o meio PDSM. O pH dos meios de cultura manteve-se estável (pH= 5,0) durante as incubações.

A adição do flavonóide concomitantemente ao fungo *P. sanguineus* não inibiu o crescimento fúngico, embora seja sugerido que a adição do substrato ocorra entre 60-70 h após a incubação do fungo nos processos de bioconversão (Azerad, 1999). No experimento D, a adição da naringenina ou naringina foi realizada 65 h após o inóculo do fungo, mas não ocorreu alteração no crescimento em relação às incubações em que o flavonóide foi adicionado concomitantemente ao fungo.

O *P. sanguineus* nos diferentes meios líquidos apresentou morfologia variada. Os aspectos morfológicos observados durante os experimentos foram: formação de “pellets” ou massa amorfa, o tamanho dos “pellets” quando formados e a presença de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer (crescimento durante o processo de incubação após a adição do substrato) (Papagianni, 2004; Moreira *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 2003).

Foi observada a coloração creme nos “pellets” e massa amorfa. Nos experimentos com o meio de cultura PDSM houve a formação de “pellets” pequenos (Figura 12) por ser um meio mais rico em nutrientes o *P. sanguineus* obteve um crescimento maior neste meio de cultura. No controle que contém o *P. sanguineus* e o meio PDSM (controle 1) obteve crescimento semelhante ao observado no meio líquido com os flavonóides.

Enquanto que nos meios MPL e Rama os “pellets” houve a formação de “pellets” pequenos, pequeníssimos, ausência de “pellets” e massa amorfa (Tabela 2). No experimento D com naringenina formaram-se “pellets” pequenos e no experimento C predominaram “pellets” pequeníssimos (Tabela 2).

A morfologia dos “pellets” produzidos é importante no processo de bioconversão, pois se forem pequenos oferecem uma menor barreira para a difusão de oxigênio e outros nutrientes apresentando rendimentos mais elevados do que quando compactos e grandes (Gibbs *et al.*, 2000).



Figura 12: “Pellets” pequenos de coloração creme das incubações com o meio de cultura PDSM com os flavonóides naringenina e naringina a 30°C e 120 rpm (experimento C).

Tabela 2: Caracterização morfológica e macroscópica do micélio do fungo *P. sanguineus* cultivado em diferentes meios líquidos na presença de flavonóides.

Flavonóides	Meios de cultura								
	Rama			MPL			PDSM		
	Tamanho Pellets	Massa amorfa	Halo	Tamanho Pellets	Massa amorfa	Halo	Tamanho Pellets	Massa amorfa	Halo
Naringenina	++/+*	+	+	+	+	-	++	-	+
Naringina	++	+	+	+	+	-	++	-	+
Quercetina	-	+	-	-	+	-	++	-	+

Tamanho dos "pellets": (++++), Grandes (0,5cm), (+++) Médios (0,3cm), (++) Pequenos (0,1cm), (+) Pequeníssimos (0,05cm) e (-) ausência de "pellets". Produção de massa amorfa e Halo: (+) presença e (-) ausência * (++) (incubação 150rpm e 30°C), (+) 120rpm e 30°C).

4.2 Produção de lacase

No experimento C, a incubação com o meio líquido Rama, em presença dos flavonóides individualmente, a produção de lacase se deu somente na presença de naringenina e naringina após 48 h de incubação simultânea, do *P. sanguineus* e os flavonóides, como mostram os resultados do ensaio enzimático (Tabela 3). O meio Rama contendo a naringina apresentou uma reação com a coloração mais intensa do que a naringenina o que indica uma concentração enzimática maior que é comprovada pela leitura no espectrofotômetro.

Tabela 3: Avaliação da produção de lacase por *P. sanguineus* observada no espectrofotômetro ($\lambda = 525$ nm) em 48h de incubação no meio Rama a 30°C e 120 rpm (experimento C).

Substratos	Lacase
Naringenina	+
Naringina	++
Quercetina	-

(++) coloração mais intensa, (+) presença e (-) ausência.

Não foi detectada a produção de lacase por *P. sanguineus* na presença de quercetina em nenhum dos meios de cultura e condições testadas, nem mesmo quando variou-se a temperatura 27°C, 29°C e 30°C ou a agitação 120, 150 ou 200 rpm. Mesmo aumentando a concentração de extrato enzimático para mais de 0,6 mL, no ensaio enzimático, não foi detectada a presença de lacase.

O *P. sanguineus*, nos meios MPL e Rama, produziu lacase em todos os experimentos com naringenina e naringina. Já no meio PDSM, o *P. sanguineus* não produziu lacase na presença destes flavonóides e nem mesmo no controle 1.

A produção de lacase na presença de naringina e naringenina não foi influenciada pela a adição do flavonóide concomitantemente ao fungo *P. sanguineus* ou após as 65 h de pré-incubação. No experimento C, com os flavonóides naringenina e naringina, a adição do flavonóide foi simultânea a do *P. sanguineus* e produziu lacase após 48 h de incubação (Tabela 2). No

experimento D, a adição do flavonóide foi após 65 h de incubação do fungo, na alíquota de 24 h a lacase estava presente, ou seja após 89 horas da incubação.

A atividade de lacase foi determinada (Leoonowicz & Grzywnowicz 1981) com a utilização da seringaldazina, um substrato específico para a identificação da lacase, desde que o peróxido de hidrogênio seja totalmente eliminado do meio de reação, uma vez que este composto é também oxidado por LiP e MnP.

A seringaldazina é um composto fenólico dimetoxilado contendo dois átomos de nitrogênio caracterizando um composto azo. A presença de lacase na alíquota gera inicialmente um radical livre. Em seguida ocorre a oxidação da seringaldazina formando uma quinona que é evidenciada pelo aparecimento de uma coloração púrpura intensa (Sanchez-Amat & Solano, 1997; Mayer & Staples, 2002) (Figura 13).

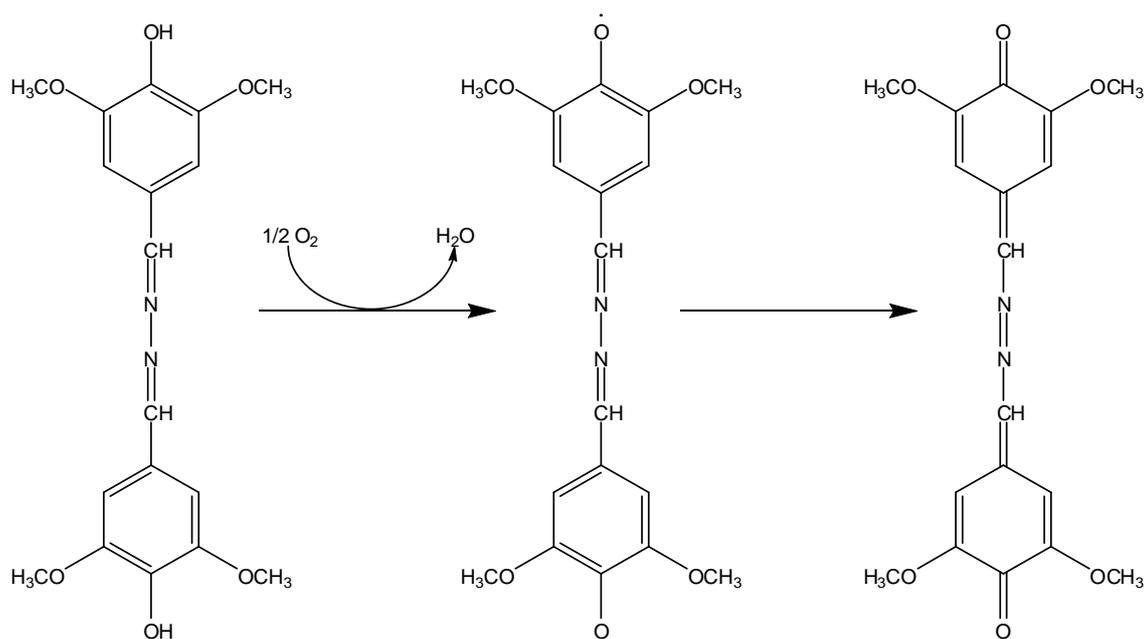


Figura 13: Reação de seringaldazina na presença de lacase (Sanchez-Amat & Solano, 1997; Mayer & Staples, 2002).

No ensaio enzimático do experimento D, observou-se que o fungo *P. sanguineus* produziu lacase na presença de naringenina e naringina nos meios de cultura MPL e Rama. Na presença de naringenina, houve produção em ambos os meios, destacando a atividade de 264,8 U/L e 248,2 U/L nos meios

MPL e Rama, respectivamente, após 96 horas da adição do flavonóide (Figura 14).

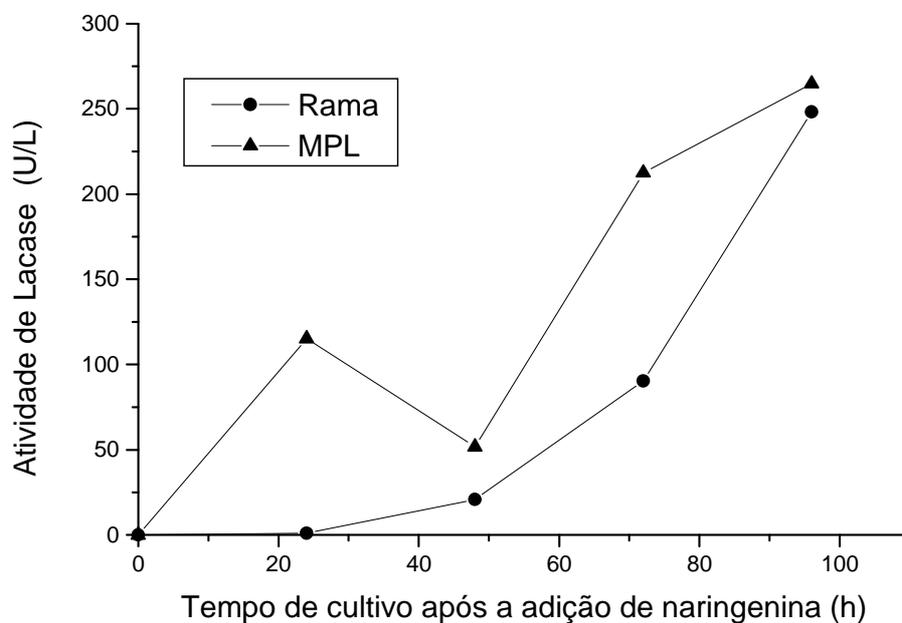


Figura 14: Produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus* na presença de naringenina nos meios MPL e Rama a 150 rpm e 30°C.

Observou-se um comportamento distinto na presença naringina, sendo a produção de enzima bem superior no meio Rama, onde alcançou um pico de atividade de 483,65 U/L após 72 horas de adição do flavonóide ao meio, sendo a maior produção em menor tempo. Enquanto que no meio MPL a maior atividade alcançada foi de 104,95 U/L após 96 horas (Figura 15).

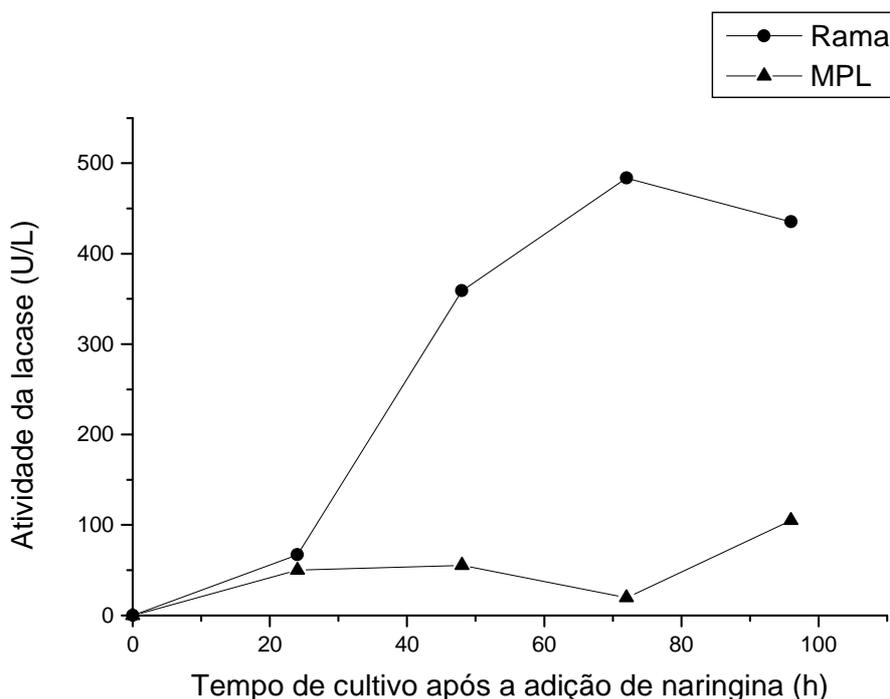


Figura 15: Produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus* na presença de naringina nos meios MPL e Rama a 150 rpm e 30°C.

A composição dos meios de cultura influenciou fortemente a produção de lacase. No meio PDSM não foi observada a presença de lacase na presença dos flavonóides como também no controle 1 (meio líquido e o *P. sanguineus*). Entre os meios estudados é o único que não contém em sua composição o cobre, um conhecido indutor de lacase, devido à presença deste metal do sítio ativo da enzima (Durán *et al.*, 2002; Piontek *et al.*, 2002; Iyer & Chatto, 2003).

O cobre presente nos meios MPL e Rama pode ter contribuído para a produção de lacase, pois alguns metais são essenciais para o metabolismo do fungo. Os metais necessários para o crescimento dos fungos de decomposição branca, como o *P. sanguineus*, são: cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco e níquel. Os não essenciais são: cromo, cádmio, chumbo, mercúrio e prata. Mesmo na presença dos metais essenciais é preciso ter cautela com a concentração utilizada no meio cultura, pois se utilizado em uma concentração maior pode ser tóxico ao fungo (Baldrian, 2003).

A utilização de cobre como indutor e regulador de lacase em culturas com *Magnaporthe grisea*, aumentou a produção de lacase em 8 vezes pela adição de

400 μM de CuSO_4 ao meio de cultura. Há diversos trabalhos em que o cobre está presente no meio de cultura, porém não há referência que sua presença ocasionou um efeito indutor da produção de lacase (Iyer & Chatto, 2003).

Os resultados obtidos, no ensaio enzimático mostraram que os flavonóides naringina e naringenina podem ser bons indutores de lacase. Enquanto que a rutina e a quercetina inibidores nas condições testadas, pois no controle (meio líquido e *P. sanguineus*) das incubações com estes flavonóides, houve a produção de lacase nos meios MPL e Rama.

No experimento D, em meio MPL a produção de lacase foi 9 vezes e 23 vezes maior que o controle 1 quando adicionou-se a naringina e naringenina respectivamente (Figura 16). No meio Rama a produção foi aumentada 26 vezes e 15 vezes quando adicionou-se naringina e naringenina ao meio respectivamente em relação ao controle 1 (Figura 16).

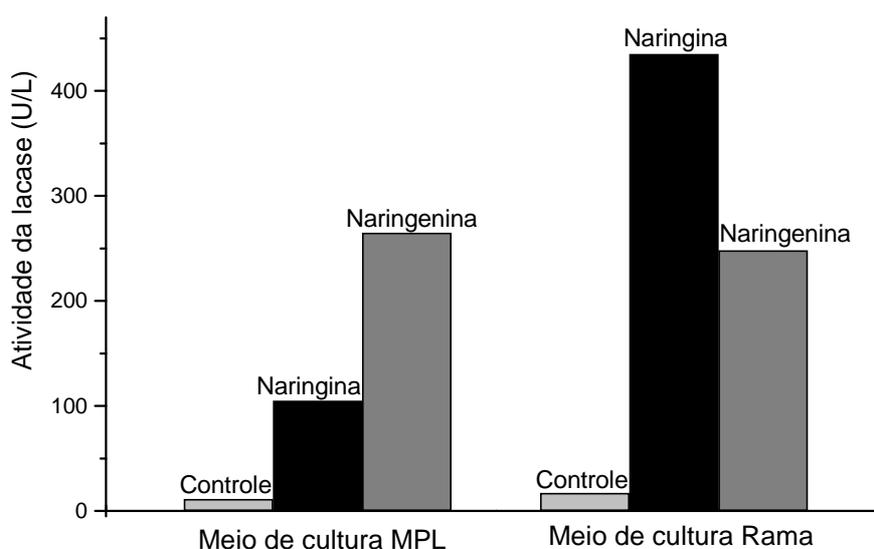


Figura 16: Produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus* após 96h da adição dos flavonóides naringenina e naringina a 30°C e 150 rpm nos meios MPL e Rama. Controle 1 (contendo o meio líquido e o *P. sanguineus*).

A produção da lacase é dependente de vários parâmetros, não apenas do tipo de cepa do fungo, mas também das condições de crescimento empregadas, isto é a presença ou ausência de indutores, tempo de indução, natureza e

composição do meio de cultura, temperatura, pH, aeração (Gianfreda *et al.*, 1999; Ikehata *et al.*, 2004; Meza *et al.*, 2006).

Vários compostos têm se mostrado indutores da produção de lacase. Eles incluem principalmente compostos aromáticos ou fenólicos relacionados estritamente à lignina ou derivados da lignina. Entretanto existem compostos ou extratos não lignolíticos de diferentes origens que foram eficientes indutores da produção de lacase (Gianfreda *et al.*, 1999; Meza *et al.*, 2006).

O ácido ferúlico foi utilizado como indutor de lacase no *Pycnoporus cinnabarinus* na concentração de 0,5 mM ao meio após 24 h de incubação no processo de biotransformação do benzopireno (Rama, 1998).

O aumento da produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus* com a adição de indutores tem sido investigada utilizando compostos fenólicos como: o ácido ferúlico, 2,5 xilidina, álcool veratrílico, e há também estudos sobre o uso do etanol (Ikehata *et al.*, 2004). Na presença de ácido ferúlico, a produção aumenta 4,5 vezes mais que a produção de lacase. Entretanto a maioria dos compostos aromáticos são tóxicos impedindo, por esta razão seu uso na aplicação industrial (Meza *et al.*, 2006).

O etanol pode ser mais adequado, diminui a toxicidade e é economicamente vantajoso para induzir a lacase (Meza *et al.*, 2006). Nos experimentos realizados por Meza *et al.* (2006), utilizou-se 2 % de etanol e conseguiu-se uma indução 6,1 em relação ao controle sem o etanol. Nos experimentos utilizou-se 1 % de etanol absoluto para solubilizar os flavonóides naringina e naringenina podemos inferir que o etanol pode ter auxiliado na estimulação da produção de lacase. Entretanto a influência pode ter sido pequena, pois o etanol também estava presente no controle. E a diferença na produção de lacase foi bem maior na presença de naringenina e naringina em relação ao controle 1, portanto sugere-se que o efeito indutor seja realmente dos flavonóides (Figura 16).

A quercetina mesmo utilizando 0,5 % de etanol, inibiu a produção de lacase. Na literatura não há estudos de indução da produção de lacase com flavonóides e *P. sanguineus*.

A lacase depende de O_2 para atuar, já a LiP (lignina peroxidase) e a MnP (manganês peroxidase) necessitam de H_2O_2 . Ao adicionar a catalase no ensaio para determinar a atividade da lacase, o peróxido de hidrogênio que porventura estivesse presente era eliminado, aumentando a confiabilidade do ensaio, pois a reação de oxidação da seringaldazina, na ausência de peróxido de hidrogênio, é típica para identificação de lacase (Mayer & Staples 2002).

Portanto, como os resultados obtidos foram semelhantes nos ensaios com a catalase e sem a catalase, pode-se inferir a ausência de LiP e MnP nas alíquotas e por isso estas peroxidases não podem estar relacionadas com a formação dos metabólitos que foram encontrados nos experimentos.

4.3 Bioconversão

O monitoramento das frações acetato de etila e cetônica por cromatografia de camada delgada (CCD) evidenciou a presença de metabólitos nos experimentos com a quercetina (Figura 17). As frações acetato de etila e cetônica 1 correspondentes as condições reacionais de 27°C e 200rpm no meio de cultura PDSM, as frações 2 são as mesmas condições citadas anteriormente, mas o meio de cultura utilizado foi o MPL e as frações 3 o meio de cultura foi o PDSM sob agitação de 200rpm e temperatura de 29°C (Tabela 4).

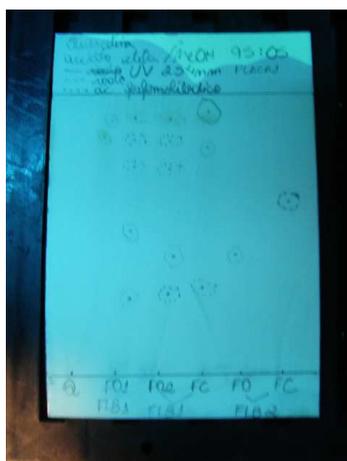


Figura 17: Cromatoplaça das frações acetato de etila e cetônica do experimento A. Condições cromatográficas: fase móvel Acetato de etila/metanol (95:05) e diferentes reveladores. Reveladores: UV (254nm) (365nm), Iodo, Ácido fosfomolibdico.

Tabela 4: Fatores de retenção obtidos por CCD realizada com as frações acetato de etila e cetônica em diferentes condições de cultivo com quercetina. Condições cromatográficas: fase móvel Acetato de etila/metanol (95:05) e diferentes reveladores.

Amostras/condições de cultivo	Fator de Retenção (Rf)
Fração Acetato de etila 1 PDSM 27°C 200rpm	0,73 (2)
	0,62 (5)
	0,50 (9)
	0,20 (12)
Fração Acetato de etila 2 MPL 27°C 200rpm	0,52 (7)
Fração Acetato de etila 3 PDSM 29°C 200rpm	0,54 (6)
Fração cetônica 1 PDSM 27°C 200rpm	0,72 (3)
	0,51 (8)
Fração cetônica 2 MPL 27°C 200rpm	0,64 (4)
Fração cetônica 3 PDSM 29°C 200rpm	0,82 (1)
	0,72 (3)
	0,45 (10)
	0,21 (11)

Reveladores: UV (254nm) (365nm), Iodo, Ácido fosfomolibdico. O número de identificação do metabólito está entre parênteses.

O fator de retenção da quercetina é 0,63. Analisando os Rfs encontrados, apenas o metabólito (3) se repetiu na fração cetônica 1 e 3, com Rf de valor 0,73.

Foi realizado método de monitoramento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os cromatogramas da análise dos experimentos com a quercetina, 27°C e 200 rpm nos meios PDSM e MPL, são apresentados nas figuras 18, 19, 20, 21 e 22.

Na figura 18, verificou-se a presença de um pico único em 2 minutos identificando a quercetina na concentração de 0,5 mg/mL em metanol. A análise por CCD apresentou um número maior de metabólitos em relação aos encontrados na análise por CLAE, pois o método não foi capaz de detectar e separar todos os picos dos metabólitos, levando em consideração também que a fase móvel da análise por CLAE foi diferente da utilizada por CCD.

O cromatograma da extração da fração acetato de etila da incubação com quercetina a 200 rpm e 27°C, evidencia a presença de três metabólitos, enquanto que por CCD são quatro (Figura 19). A extração da fração cetônica, desta mesma incubação, detectou por CCD dois metabólitos e por CLAE apenas um (Figura 20).

No cromatograma da fração acetato de etila, da incubação com quercetina a 27°C e 200 rpm em meio MPL, a análise por CLAE detectou um metabólito a mais (Figura 21). E na fração cetônica, desta mesma incubação, a análise por CLAE detectou apenas um metabólito, que coincidiu com a análise por CCD (Figura 22).

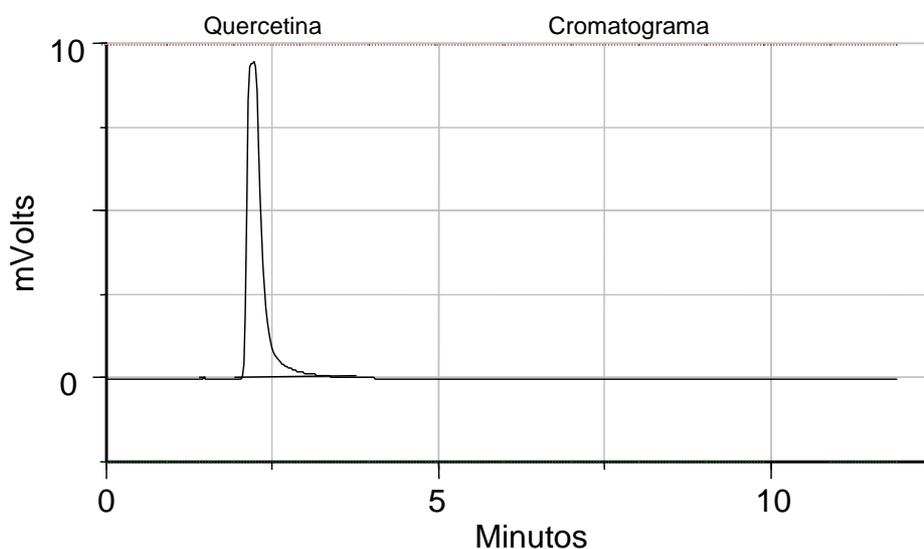


Figura 18: Perfil cromatográfico da solução de quercetina em metanol (0,5 mg/mL), utilizando metanol/água (20:80) como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 260 nm e tempo de corrida de 12 minutos.

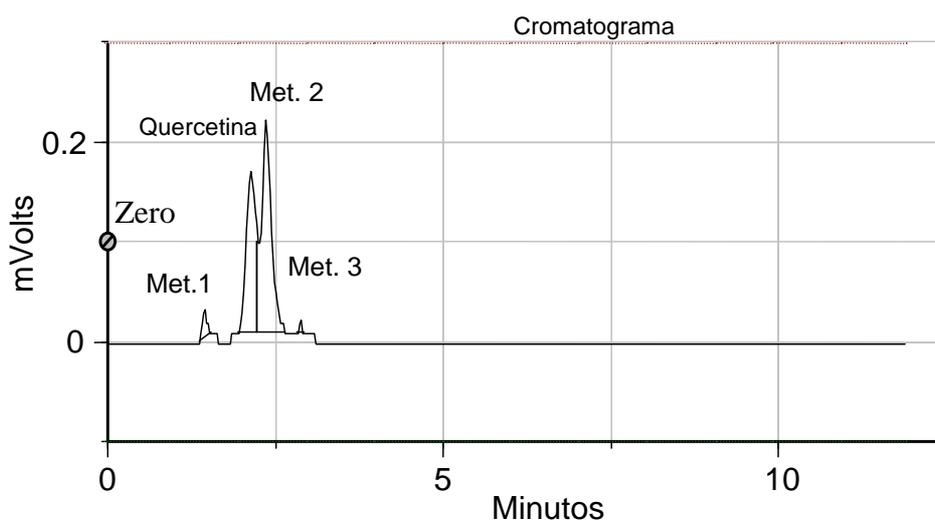


Figura 19: Perfil cromatográfico após a extração da fração acetato de etila de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 em meio PDSM com quercetina (0,5 g/mL) a 200 rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 260 nm e tempo de corrida de 12 minutos. *Met. Metabólito.

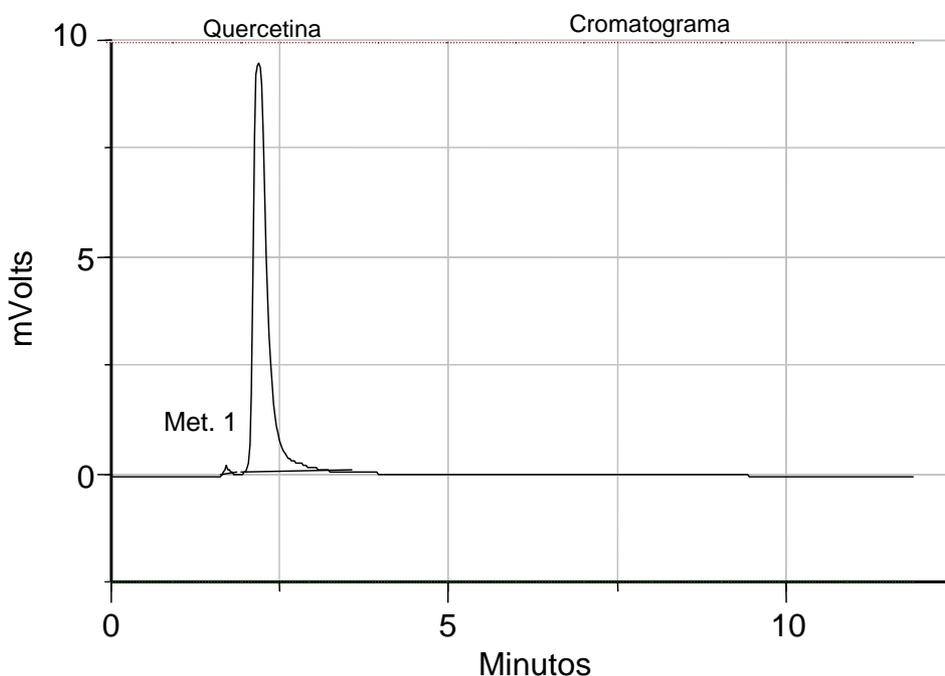


Figura 20: Perfil cromatográfico após a extração da fração cetônica de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 em meio PDSM com quercetina (0,5g/mL) a 200 rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 260 nm e tempo de corrida de 12 minutos. *Met. Metabólito.

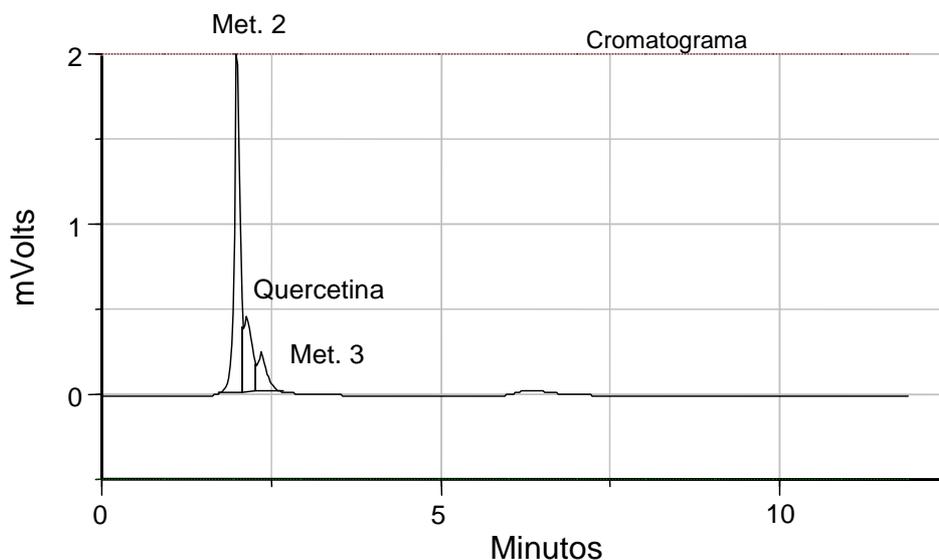


Figura 21: Perfil cromatográfico após a extração da fração acetato de etila de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 em meio MPL com quercetina (0,5 g/mL) a 200 rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 260 nm e tempo de corrida de 12 minutos. *Met. Metabólito.

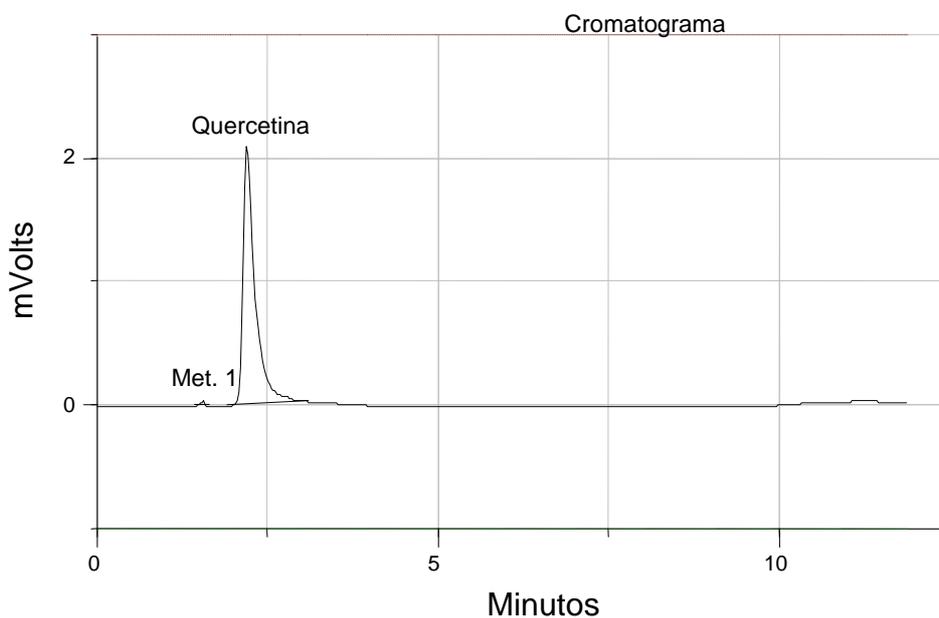


Figura 22: Perfil cromatográfico após a extração da fração cetônica de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 em meio MPL com quercetina (0,5 g/mL) a 200 rpm e 27°C, usando metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 260 nm e tempo de corrida de 12 minutos. *Met. Metabólito.

Nas culturas com naringenina e naringina, o monitoramento por CCD mostrou-se a presença de metabólitos (Figura 23), no experimento D. Os valores de Rfs estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Fatores de retenção obtidos por CCD realizada com as frações de acetato de etila, nos diferentes meios de cultura, com naringenina e naringina a 150 rpm e 30°C. Condições cromatográficas: fase móvel Acetato de etila/metanol (70:30) e diferentes reveladores.

Flavonóides	Fator de Retenção (Rf)		
	PDSM	MPL	Rama
Naringenina	0,83 (2')	0,75 (5')	0,83 (2')
	0,71 (7')	0,66 (8')	0,71 (7')
	0,66 (8')		0,66 (8')
	0,54 (10')		0,52 (11')
	0,19 (13')		0,50 (12')
			0,16 (15')
Naringina	0,84 (1')	0,82 (3')	0,84 (1')
	0,80 (4')	0,72 (6')	0,78 (5')
	0,71 (7')		0,71 (7')
	0,58 (9')		0,18 (14')

Reveladores: UV (254nm) (365nm), Iodo, Reagente Sulfavanílico. O número de identificação do metabólito está entre parênteses.

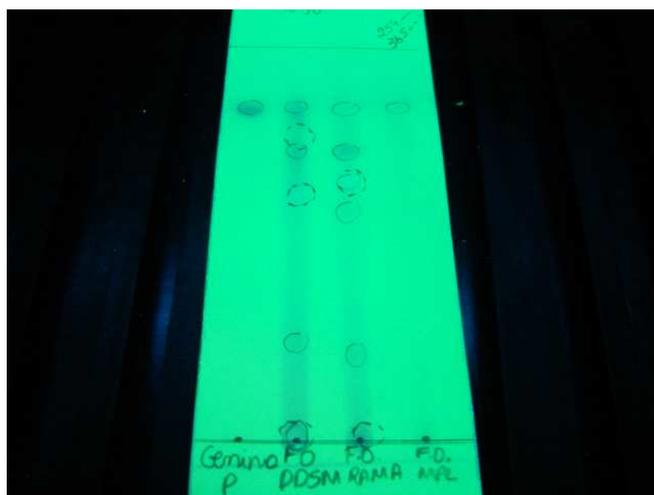


Figura 23: Cromatoplaça das frações cetônica do experimento D. Condições cromatográficas: fase móvel Acetato de etila/metanol (70:30) e diferentes reveladores.

O Rf da naringenina é 0,8 e da naringina 0,52. Ocorreu a formação de 14 metabólitos no total, sendo que a naringenina apresentou maior diversidade de metabólitos em relação a naringina. Considerando os Rfs da Tabela 5, podemos observar que houve a formação de metabólitos idênticos nos meios PDSM e Rama em incubação com o flavonóide naringenina no experimento D, os valores de Rf correspondentes à: 0,83, 0,71 e 0,66. Sendo que este último também foi encontrado no meio MPL.

Na incubação com a naringina foram formados metabólitos com os Rfs: 0,84 e 0,71 para os meios PDSM e Rama. O metabólito que mais se repetiu foi o de valor de Rf: 0,71 encontrado nas incubações com naringenina e naringina e nos meios de cultura PDSM e Rama.

A tabela 6 descreve a formação dos metabólitos nos diferentes meios e condições de cultura testados e tipos de flavonóides em análise por CCD. As condições que proporcionaram maior diversidade de metabólitos foram: no meio Rama 150 rpm e 30°C (experimento D) com o flavonóide naringenina e a 200 rpm e 27°C (experimento A) no meio PDSM, ambos produziram 6 metabólitos. O número correspondente a cada metabólito segue o que já foi pré-estabelecido nas tabelas 4 e 5.

Tabela 6: Avaliação do número de metabólitos obtidos nos diferentes meios de cultura, com naringenina, naringina e quercetina, sob variação das condições de cultivo por CCD.

Meios de cultura	Flavonóides						
	Naringenina		Naringina		Quercetina		
	120 rpm 30°C	150 rpm 30°C	120 rpm 30°C	150 rpm 30°C	200 rpm 27°C	200 rpm 29°C	120 rpm 30°C
PDSM	-	5	-	4	6	5	-----
Rama	-	6	-	4	-----	-----	-
MPL	-	2	-	2	2	-----	-----

(-) ausência de metabólito; ----- experimento não realizado.

O monitoramento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), apresentou um menor número de metabólitos em relação aos encontrados pela CCD. O método utilizado não foi capaz de detectar e separar todos os picos dos metabólitos, levando em consideração também que a fase móvel da análise por CLAE foi diferente da utilizada por CCD. Os cromatogramas da análise das alíquotas da incubação com naringenina do experimento D no meio Rama, são apresentados a seguir nas Figuras (24, 25 e 26). O metabólito detectado por CLAE teve o pico de concentração aumentado em 96 h em relação ao de 24 h, enquanto que o pico da naringenina diminuiu (Figuras 25 e 26).

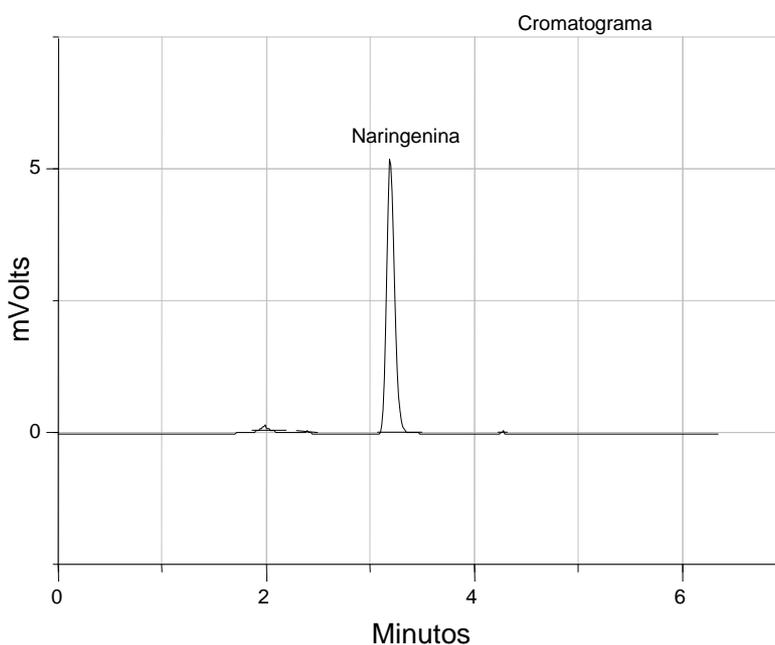


Figura 24: Perfil cromatográfico da solução de naringenina em metanol (0,5 mg/mL), utilizando metanol/metanol/tampão 65:35 fosfato de potássio monobásico 0,02M como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm) fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min.

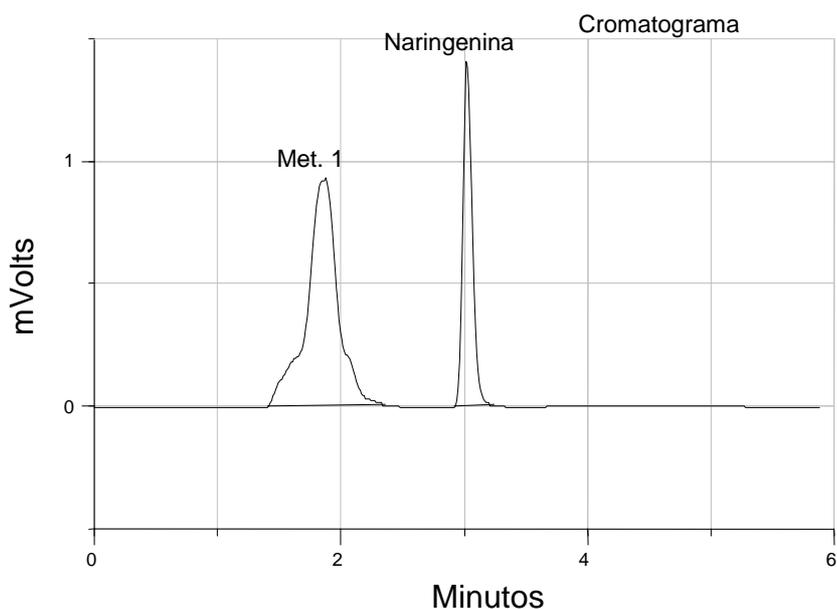


Figura 25: Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação da naringenina (0,5 mg/mL) com *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 no meio Rama a 30°C e 150 rpm, no tempo de 24 horas, utilizando metanol/metanol/tampão 65:35 fosfato de potássio monobásico 0,02 M como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm) fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min. *Met. Metabólito.

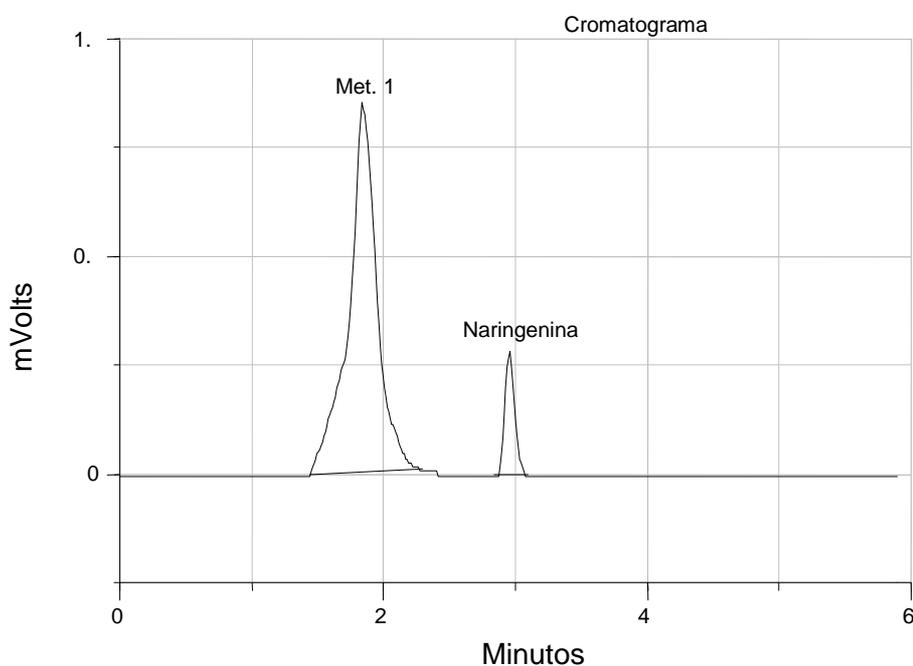


Figura 26: Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação da naringenina (0,5 mg/mL) com *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 no meio Rama a 30°C e 150 rpm, no tempo de 96 horas, utilizando metanol/metanol/tampão 65:35 fosfato de potássio monobásico 0,02 M como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4 mm x 5 µm) fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min. *Met. Metabólito.

mm x 5 µm) fluxo de 1,0 mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min. *Met. Metabólito.

O método de monitoramento das incubações do flavonóide naringina por CLAE não foi eficiente para separar os picos dos metabólitos do pico da naringina. Posteriormente pode ser feito a modificação dos parâmetros utilizados por CLAE na tentativa de identificar e separar os metabólitos formados, como a fase móvel, tempo de corrida entre outros. A Tabela 7 evidencia a comparação dos métodos de monitoramento por CCD e por CLAE nas incubações do experimento A com a quercetina e a Tabela 8 com os flavonóides naringenina e naringina no experimento D.

Tabela 7: Número de metabólitos detectados por CCD e por CLAE nas incubações de *Pycnoporus sanguineus* na presença de quercetina no experimento A.

Métodos de monitoramento

Frações	CCD	CLAE
Acetato de etila 1	4	3
Acetato de etila 2	1	2
Cetônica 1	2	1
Cetônica 2	1	1

Experimento A: 1 PDSM e 2 MPL. Condições cromatográficas por CCD: fase móvel Acetato de etila/metanol (95:05) e diferentes reveladores. Condições cromatográficas por CLAE: metanol/água 20:80 como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm), fluxo de 1,0mL/min, detecção a 260nm e tempo de corrida de 12 minutos.

Tabela 8: Número de metabólitos detectados por CCD e por CLAE nas incubações de *Pycnoporus sanguineus* na presença de naringenina e naringina no experimento D.

Métodos de monitoramento

Flavonóides	CCD	CLAE
Naringenina	9	1
Naringina	8	-----

----- Não detectado. Condições cromatográficas por CCD: fase móvel Acetato de etila/metanol (70:30) e diferentes reveladores. Condições cromatográficas por CLAE: metanol/metanol/tampão 65:35 fosfato de potássio monobásico 0,02M como fase móvel, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK® (250 x 4mm x 5µm) fluxo de 1,0mL/min, detecção a 280 nm e tempo de corrida de 6 min.

4.4 Caracterização dos derivados

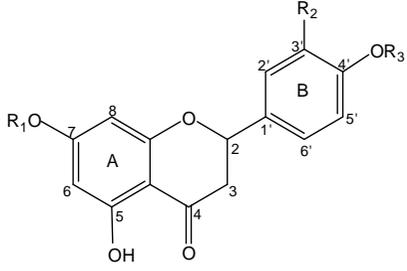
A atividade biológica dos flavonóides está relacionada com sua estrutura química, particularmente com os grupos hidroxil. A maioria dos experimentos “in vitro” utiliza como estudo a aglicona, entretanto, esses compostos geralmente estão glicosilados e com isso possuem um ótimo poder antioxidante. “In vivo” há uma desglicosilação e conjugação do grupo hidroxil com sulfatase e glicuronase ácida reduzindo ou eliminando os efeitos observados com a aglicona (Day *et al.*, 2000).

Estudos têm buscado elucidar a influência de modificações estruturais que ocorrem durante o metabolismo desses compostos, visando o desenvolvimento de produtos nutricionais ou semi-síntese de substâncias análogas que mantenham a capacidade antioxidante e efeitos adversos mínimos. Os estudos sobre biotransformação e atividades relativas dos metabólitos, os quais são determinantes para os efeitos biológicos não tem sido conclusivos em seres humanos, condição essencial para o emprego seguro desses com finalidade medicamentosa. Modificações de moléculas complexas

por métodos químicos podem ser difíceis, entretanto a utilização da bioconversão pode ser uma estratégia alternativa (Das & Rosazza 2006).

A maioria dos metabólitos encontrados neste trabalho foram obtidos em quantidade insuficiente para isolá-los e purificá-los para a realização do processo de identificação por RMN. Com os metabólitos Labiocon 100 (metabólito da naringenina) e Labiocon 102 (metabólito da naringina) foi possível realizar a análise de ressonância. A Tabela 9 mostra os deslocamentos encontrados na literatura para identificação da naringenina e naringina (Ibrahim, 1999; Maltese *et al.* 2009) e a Tabela 10 os deslocamentos encontrados no espectro realizado com a naringenina e naringina padrão (Sigma), a temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker Avance III, utilizando uma sonda inversa TBI de 5mm. Os deslocamentos químicos no RMN de ^1H (500 MHz) foram referenciados aos padrões internos TMS (tetrametilsilano; 0,0ppm) para os solventes CDCl_3 , CD_3OD , MeOD e D_2O .

Tabela 9: Dados espectrais de RMN ^1H (600 MHz) em DMSO-d_6 para dos flavonóides naringenina e naringina obtidos na literatura, representados por número dos hidrogênios ($n^\circ - \text{H}$), deslocamentos químicos (δ , ppm), e multiplicidade.

Naringenina/ Naringina	Nº - H	δ (ppm)	Multiplicidade	δ (ppm)	Multiplicidade
		Naringenina	Naringenina	Naringina	Naringina
	2	5,47 (1H)	dd	5,56	dd
	3	2,71 (2H)	dd	2,73	dd
	6	5,91 (1H)	dd	6,11	dd
	8	5,91 (1H)	s	6,10	d
	2'	7,35 (1H)	s	7,31	s
	3'	6,82 (1H)	d	6,80	d
	5'	6,82 (1H)	d	6,80	d
	6'	7,35 (1H)	d	7,31	d

$R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$, naringenina
 $R_1 = \text{ramanose (1} \rightarrow \text{2) glicosil}$,
 $R_2 = R_3 = \text{H}$, naringina

Tabela 10 : Dados espectrais de RMN ^1H (500 MHz) obtidos dos espectros realizados dos flavonóides naringenina e naringina padrão Sigma, foram referenciados aos padrões internos TMS (tetrametilsilano; 0,0ppm) para o solvente MeOD, representados por número dos hidrogênios ($n^\circ - \text{H}$), deslocamentos químicos (δ , ppm), e multiplicidade.

Naringenina/ Naringina	N $^\circ$ - H	δ (ppm) Naringenina	Multiplicidade Naringenina	δ (ppm) Naringina	Multiplicidade Naringina
<p> $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$, naringenina $R_1 = \text{rhamnose (1} \rightarrow \text{2) glicosil}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, naringina </p>	2	5,4 (1H)	dd	5,4	dd
	3	2,6 (2H)	dd	2,8	dd
	6	5,86 (1H)	dd	6,69	dd
	8	5,86 (1H)	s	6,47	d
	2'	7,27 (1H)	s	7,4	s
	3'	6,79 (1H)	d	6,63	d
	5'	6,79 (1H)	d	6,63	d
	6'	7,27 (1H)	d	7,4	d

4.5 Ensaio Biocatálise

Após os testes de solubilidade foi escolhido a naringina, pois esta apresentou uma solução límpida e que viabilizaria o experimento, pois é necessária esta condição para obter-se uma eficiente leitura no espectrofotômetro. Este ensaio foi realizado como objetivo de verificar se a lacase é a enzima do fungo *P. sanguineus* responsável pela formação dos metabólitos.

A lacase purificada (Lac 2) de *P. sanguineus* manteve-se estável por 10 h na presença de 1,05 mg de naringina, mas em seguida apresentou acentuada queda de atividade, mantendo apenas cerca de 20 % de sua atividade inicial no período final de incubação de 24 h (Figura 27).

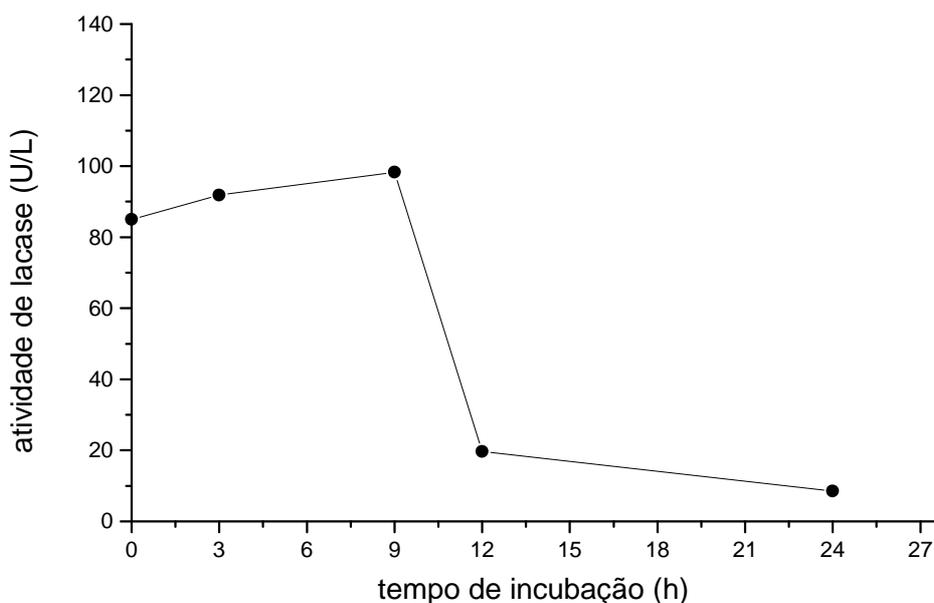


Figura 27: Atividade da lacase em U/L, na presença de naringina, a 28°C e 150 rpm sobre o tempo de incubação em horas.

Durante todo o período do experimento o pH do meio reacional manteve-se estável com o valor de 5,5 para o ensaio e de 4,5 para o controle. A análise de CCD não evidenciou a presença de metabólitos. Na análise do espectro de absorção do controle não houve alteração, o que indica que a naringina durante

o ensaio biocatalítico, permaneceu estável na presença do tampão. No perfil espectrofotométrico da amostra, não houve alteração até o período de 9h, mas em 12h de experimento ocorreu uma sutil mudança no espectro de absorção, que permaneceu constante em 24h (Figura 28).

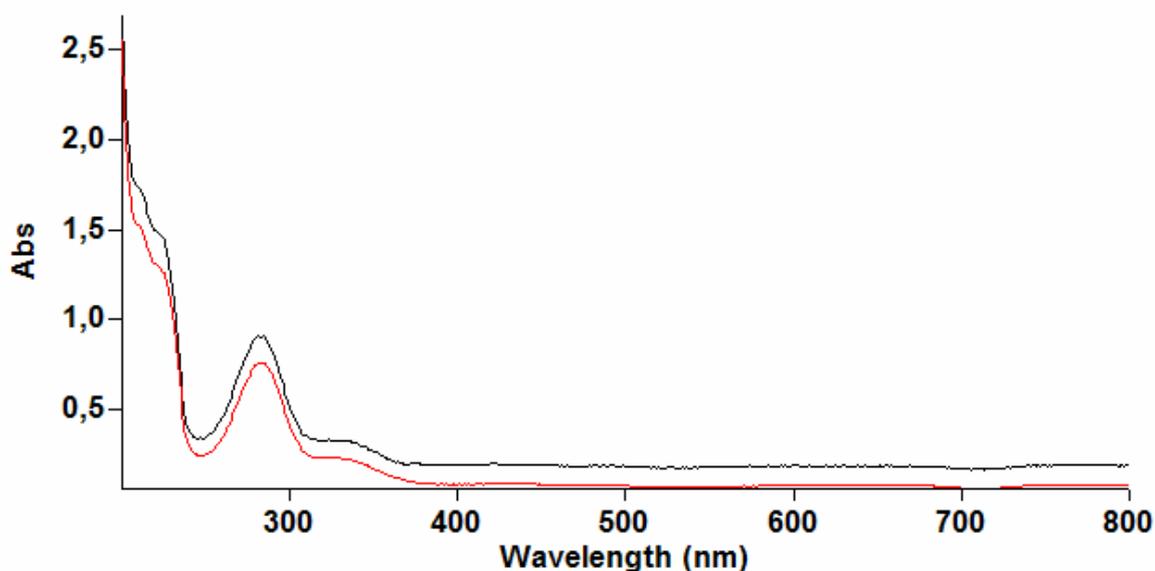


Figura 28: Espectro de absorção do ensaio biocatalítico a 28°C e 150rpm, detecção de 200-800nm, evidenciando a amostra nos tempos: t= 0 (preto) e t= 24h (vermelho).

Podemos observar através deste experimento que provavelmente não apenas a lacase, presente no *P. sanguineus*, pode atuar sobre os flavonóides testados, mas também outras enzimas presentes no microrganismo inteiro, para a formação de metabólitos. Nos experimentos com quercetina e naringenina, em meio PDSM, não houve a produção de lacase e ocorreu a formação de metabólitos.

Nas condições deste ensaio biocatalítico não foi possível estabelecer uma relação entre a enzima lacase e a bioconversão do flavonóide naringina. Quando utilizou-se o microrganismo inteiro foi possível detectar a formação de metabólitos nas incubações com a naringina nos três meios de culturas testados. E a formação destes ocorreu mesmo quando a lacase não estava presente, como por exemplo, nas incubações com meio PDSM.

Estes resultados nos leva a inferir que a formação de metabólitos independe da produção de lacase nas incubações com naringina e que a formação destes metabólitos pode estar ligada à presença de outras enzimas do fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Mas para descartarmos totalmente a participação da lacase no processo de bioconversão teríamos que repetir o ensaio biocatalítico, testando concentrações maiores de lacase purificada. O objetivo de um novo ensaio seria determinarmos se a concentração de enzima purificada, que foi utilizada para a bioconversão da naringina, não foi suficiente ou realmente a lacase não é uma enzima ou uma das enzimas responsáveis pela formação dos metabólitos encontrados.

5 Conclusões

- As incubações com os flavonóides propiciaram o crescimento do *Pycnoporus sanguineus*. Não observou-se influência no crescimento com a variação da temperatura na incubação.
- A adição simultânea dos flavonóides com o *Pycnoporus sanguineus* ou após 65h não influenciou o crescimento fúngico.
- A naringina e a naringenina induziram a produção de lacase nos meios Rama e MPL. E a quercetina inibiu a produção de lacase. No meio de cultura PDSM não foi observada a produção de lacase.
- A bioconversão dos flavonóides por *Pycnoporus sanguineus* produziram metabólitos no monitoramento por CCD e CLAE.
- A formação de metabólitos ocorreu mesmo quando a lacase não estava presente como nas incubações com o meio PDSM.
- No ensaio biocatalítico com a naringina não foi evidenciada a presença de metabólitos.

6. Perspectivas

- Variação dos parâmetros de incubação em presença de diferentes concentrações dos flavonóides, visando a obtenção de um maior rendimento dos metabólitos encontrados.
- Realização de ensaio biocatalítico com uma maior concentração da lacase pura, com a naringina e verificar se há a formação de metabólitos. Além da lacase, o fungo *P. sanguineus* possui outras enzimas como: as enzimas do sistema enzimático citocromo P450 (CYP450) (Azerad, 1999), tirosinase, xilanase e β -glucosidase (Esposito *et al.*, 1993; Halaouli *et al.*, 2006; Quiroga *et al.*, 1995), que também podem ser responsáveis pela formação de metabólitos.
- Desenvolver um método de monitoramento por CLAE eficiente para a identificação dos metabólitos formados.
- Isolar, purificar e elucidar as estruturas dos metabólitos produzidos.

7 Referências Bibliográficas

AHERNE, A. S. & O'BRIEN M. N. Dietary Flaconoids: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

ALARCÓN, J.; ÁGUILA, S.; CORNEJO, F.; ALDERETE, J. Biotranformations of 5- α -hydroxy-14-eudesm-11-em-3-one by *Rhizopus nigricans*, *Cunninghamella elegans* and *Mucor plumbeus*. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 23-27, 2007.

AZERAD, R. Application of biocatalysts in organic synthesis. **Bulletin de la Société Chimique de France**, v. 132, p.71-51, 1995.

AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 169-218, 1999.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Tecnology**, v. 32, p. 78-91, 2003.

BIRT, F. D; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 157-177, 2001.

BOLLAG, J. M. & LEONOWICZ, A. Comparative estudies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48 (4), p. 849-854, 1984.

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. Na expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 267, p. 99-102, 1990.

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthi-azoline-6-sulphonate). **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 823-827, 1992.

CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S. D. **Applied and Microbiology Biotechnology**. v. 54, p. 751-758, 2000.

CANTARELLA, G.; GALLI, C.; GENTILI, P. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems. Catalytic or stoichiometric procedures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 135–144, 2003.

COSTA, E. M. M. B.; PIMENTA, F. C.; LUZ, W. C.; OLIVEIRA, V. 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.

DANIELI, B.; DE BELLIS, P.; CARREA, G.; RIVA, S. Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides. Heterocycles. **Heidelberg**, v. 29, p. 2061-2064, 1989.

DANIELI, B.; LUISETTI, M.; SAMPOGNARO, G.; CARREA, G.; RIVA, S. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 193-201, 1997.

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

DAY, A. J., BAO, Y.; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON, G. Conjugation position of Quercetin glucuronides and effect on biological activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p.1234-1243, 2000.

DURÁN, N. & ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Application of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907-931, 2002.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D.; HENSON, J. M. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v. 391, p. 144-148, 1996.

ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; FERRAZ, A.; CANHOS, V. P.; DURAN, N. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain): applications. **Journal of Biotechnology**, v. 29, p. 219-228, 1993.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 231-240, 2002.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Germany, Springer, 2000, 420p.

FANG, T.; WANG, Y.; MA, Y.; SU, W.; BAI, Y.; ZHAO, P. 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, K-C.; ROU, T-M.; LIU, B-L.; TZENG, Y-M.; CHANG, Y-N. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 22-25, 2004.

FERGUSON, R. L. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89–111, 2001.

FORMICA, J. V. & REGELSON, W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F.; ULHOA, C. J. P. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 311-318, 2007.

GIANFREDA, S.; XU, F.; BOLLAG, J-M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3 (1), p. 1-25, 1999.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v 20, n. 1, p.17-48, 2000.

HALAOULI, S.; RECORD, E.; CASALOT, L.; HAMDY, M.; SIGOILLOT, J-C; ASTHER, M.; LOMASCOLO, A. Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pyconoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 580-589, 2006.

HARBONE, J. B. The flavonoids: advances in research since 1986. **London: Chapman and Hall**, p. 543, 1993.

HAVE, R. & TEUNISSEN, P. J. M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. **Chemical Review**, v. 101, p. 3397-3413, 2001.

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

HEIM, E. K; TAGLIAFERRO, R. A; BOBILYA, J. D. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HELLER, W. & FORKMANN, G. The Flavonoids: advances in research since 1980. **London: Chapman and Hall**, p. 399, 1988.

HERRERA, T. L. J. & COUTO, R. S. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500-513, 2006.

HOLLAND, L. H.; FINKELSTEIN, B. D.; BALL, C. Biotechnology of filamentous fungi. Edited by Buterworth Heinemann, 1991.158p.

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

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.; SMITH, D. W. Recent developmens in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Engineering and Science**, v. 3, p.1-19, 2004.

IYER, G. & CHATTO, B. B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 121-126, 2003.

JONAS, U.; HAMMER, E.; SCHAUER, F., BOLLAG, JEAN-MARC. Transformation of 2hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products. **Biodegradation**, v. 8, p. 321–328, 1998.

KAUL, P.; BANERJEE, A.; BANERJEE, U. C. Opportunities for the pharmaceutical industry: key biotransformation technologies of the future. **Drug Discovery World**, Spring Ed., p. 80-86, 2004.

KOSTRZEWA-SUSLOW, E.; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J.; BIALONSKA, A.; CIUNIK, Z.; RYMOWICZ, W. Microbial transformations of flavonone and 6-hydroxyflavanone by *Aspergillus niger* strains. **Journal Molecular Catalysis**, v. 39, p. 18-23, 2006.

LEONOWICZ, A. & GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 55–58, 1981.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**, v. 41 (3-4), p. 185 – 227, 2001.

LUSTOSA, R. S.; GALINDO, B. A.; NUNES, C. C. L.; RANDAU, P. K.; NETO ROLIM, J. P. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MA, X-C.; CUI, J.; ZHENG, J. GUO, DE-NA. Microbial transformation of three buafadienolides by *Penicillium aurantigriseum* and its application for metabolite identification in rat. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 42-50, 2007.

MALTESE, F.; ERKELENS, C.; KOOY, VAN DER F.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Identification of natural epimeric flavone glycosides by NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 116, p. 575-579, 2009.

MANOSROI, A.; ABE, M.; MANOSROI, J. Biotransformation of steroidal drugs using microorganisms screened from various sites in Chiang Mai, Thailand. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 67-73, 1999.

MAYER, A. M. & STAPLES, R. C. Review – laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

MEZA, J. C.; AURIA, R.; LOMASCOLO, A.; SIGOILLOT, J-C.; CASALOT, L. Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 162–168, 2007.

MIKOLASCH, A.; HAMMER, E.; JONAS, U.; POPOWSKI, K.; STIELOW, A.; SCHAUER, F. Synthesis of 3-(3,4-dihydrophenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase. **Tetrahedron**, v. 58, p. 7589-7593, 2002.

MOREIRA, . M. T.; SANROMÁN, A.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. Control of pellets morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow. Application to *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporum*, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 261-266, 1996.

MUROTA, K. & TERAO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

NCANANA, S. & BURTON, S. Oxidation of 8-hydroxyquinoline catalyzed by laccase from *Trametes pubescens* yields an antioxidant aromatic polymer. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 44, p. 66-71, 2006.

NICOTRA, S.; CRAMAROSSA, M. R.; MUCCI, A.; PAGNONI, U. M.; RIVA, S.; FORTI, L. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. **Tetrahedron**, v. 60, p.595-600, 2004.

NIJVELDT, J. R.; NOOD VAN, E.; HOORN VAN, C. E. D.; BOELEN, G. P.; NORREN VAN, K.; LEEUWEN VAN, M. A. P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

O'LEARY, A. K.; DAY, J. A.; NEEDS, W. P.; MELLON, A. F.; O'BRIEN, M. N.; WILLIAMSON, G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 479-491, 2003.

ODIA, A.; QUEIROZ, J.; SIMÕES, R. Potencial and limitation of *Trametes versicolor* laccase on biodegradation of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster* kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p.144-148, 2008.

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

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37663–37669, 2002.

QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A.; RODOLFO, A. Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1251, p.75-80, 1995.

RAMA, R.; MOUGIN, C.; BOYER, Francois-Didier.; KOLLMANN, A.; MALOSSE, C.; SIGOILLOT, Jean-Claude. Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 1101-1104, 1998.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 5, 2006.

SANCHEZ-AMAT, A. & SOLANO, F. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp.* Shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, p. 787-792, 1997.

SCHAUER, F.; FRANCKE, W.; HETZHEIM, A.; SPECHT, M.; SCHÄFER, A. Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 7693-7699, 2001.

SIMMERING, R.; PFORTE, H. JACOBSCH, G.; BLAUT, M. The growth of the flavonoid-degrading intestinal bacterium, *Eubacterium ramulus*, is stimulated by dietary flavonoids in vivo. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 40, p. 243-248, 2002.

SIMÕES, C. M. L., SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Organizadores) **Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento**, 5ª edição, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora UFSC, 2007. 577, 601-605p.

STAHL, W.; VAN DEN BERG, H.; ARTHUR, J.; BAST, A.; DAINY, J.; FAULKS, M. R.; GÄRTNER, C.; HAENEN, G.; HOLLMAN, P.; HOLST, B.; KELLY, J. F.; POLIDORI, C. M.; RICE-EVANS, C.; SOUTHON, S.; VAN VLIET, T.; VIÑA-RIBES, J.; WILLIAMSON, G.; ASTLEY, B. S. Bioavailability and metabolism. **Molecular aspects of medicine**, v. 23, p. 39-100, 2002.

TRANCHIMAND, S.; TRON, T.; GAUDIN, C.; IACAZIO, G. Synthesis of bis-lactone lignans through laccase catalysis. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 42, p. 27-31, 2006.

VANHULLE, S.; ENAUD, E.; TROVASLET, M.; BIOLLOTTET, L.; KNEIPE, L.; JIWAN, J-L. H.; CORBISIER, A-M.; MARCHAND-BRYNAERT, J. Coupling occurs before breakdown during biotransformation of Acid Blue 62 by white rot fungi. **Chemosphere**, v. 70, p. 1097-1107, 2008.

XU, F.; BERKA, R. M.; WAHLEITHNER, J. A.; NELSON, B. A.; SHUSTER, J. R.; BROWN, S. H.; PALMER, A. E.; SOLOMON, E. I. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. **Journal Biochemistry**, v. 334, p. 63-70, 1998.

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener- Review. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 321-327, 2008.

ZHOU, J.; HUANG, J.; XIAO, H.; LONG, S.; WU, Y.; ZHAO, J. Activity study of *Pycnoporus sanguineus* laccase. **Wuhan Ligong Daxue Xuebao**, v. 27(4), p. 23-25, 2005.