



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

Eula Maria de Melo Barcelos Costa

Metabolização da quercetina e produção
de quercetina 2,3-dioxigenase por
***Beauverias bassianas* isoladas da região**
Centro-Oeste do Brasil

Goiânia
2009

EULA MARIA DE MELO BARCELOS COSTA

**Metabolização da quercetina e produção de
quercetina 2,3-dioxigenase por *Beauverias
bassianas* isoladas da Região Centro-Oeste do
Brasil**

**Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, da Universidade
Federal de Goiás, como requisito
para a obtenção do grau de
doutor.**

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta
Co-orientadora: Profa. Dra. Valéria de Oliveira

**Goiânia
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

BANCA EXAMINADORA

Aluna: Eula Maria de Melo Barcelos Costa

Orientadora: Fabiana Cristina Pimenta

Co-orientadora: Valéria de Oliveira

Composição:

Profa. Dra. Valéria de Oliveira – Presidente

Profa. Dra. Telma Alves Garcia - Membro

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - Membro

Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza – Membro

Prof. Dr. André Kipnis - Membro

Profa. Dra. Clévia Ferreira Duarte Garrote - Suplente

Profa. Dra. Silvana Petrofeza – Suplente

Data: Goiânia, 25 de março de 2009

**Dedico este trabalho à minha família
pela compreensão pelas ausências e
pelo apoio.**

**A Deus, que me deu força, firmeza e
persistência para seguir em frente.**

AGRADECIMENTOS

À orientadora Profa. Fabiana Cristina Pimenta pelos ensinamentos, pelo exemplo de esforço, pela confiança e por acreditar na minha capacidade para desenvolver este trabalho.

À co-orientadora Profa. Valéria de Oliveira, pessoa fundamental na minha iniciação à ciência, muito obrigado pelo incentivo e apoio.

À Profa. Silvana Petrofeza pelo acolhimento, pela competência profissional, pela parceria e colaboração direta no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Christian Luz pela colaboração nos cedendo os isolados fúngicos estudados neste trabalho.

À Profa. Clévia Ferreira Duarte Garrote pela serenidade e incentivo.

Aos colaboradores, Profa. Maria do Rosário Rodrigues Silva, Xisto Sena Passos, Laurine Lacerda, Eneida Ferreira da Costa, Clélia Froes Camarano, Lucas Breseghelo do Nascimento, Elda Bueno e Marília Oliveira que tornaram possível a execução de algumas técnicas para o enriquecimento desta pesquisa.

Aos membros das bancas pelas observações e sugestões para a melhoria desta tese.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

De forma especial, agradeço a minha família, pelo apoio às minhas decisões, com a qual compartilho esta vitória.

Pela oportunidade, pela minha família, pelo meu trabalho, pela esperança, pela felicidade, por tudo que tenho e que ainda terei, agradeço a Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ASPECTOS GERAIS DE <i>Beauveria bassiana</i>	12
1.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA	13
1.3 BIOTRANSFORMAÇÃO	15
1.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITOS	18
1.4.1 Obtenção de metabólitos para estudos	19
1.5 MODELOS MICROBIANOS	19
1.5.1 <i>Beauveria bassiana</i>	21
1.6 FLAVONÓIDES	23
1.6.1 Processos de biotransformação da quercetina	25
1.7 QUERCETINASE	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.1.1 Objetivos específicos	30
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
4. PUBLICAÇÃO	
Artigo 1: SELECTION OF FILAMENTOUS FUNGI OF THE <i>BEAUVERIA</i> GENUS ABLE TO METABOLIZE QUERCETIN LIKE MAMMALIAN CELLS	39
5. MANUSCRITO 1: <i>Beauveria bassiana</i> : QUERCETINASE PRODUCTION AND GENETIC DIVERSITY	45
6. MANUSCRITO 2: Quercetin 2,3-dioxygenase gene expression and quercetin biotransformation in <i>Beauveria bassiana</i>	64
7. RESULTADOS	76
8. CONCLUSÕES	78
9. PERSPECTIVAS	80
10. ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Números cumulativos de processos de biotransformação iniciados em escala industrial até o ano de 2007. 21

Figura 2: Estrutura geral dos flavonóides. 23

Figura 3: Biotransformação microbiana da quercetina por diferentes espécies de microrganismos. 26

Figura 4: Catabolismo da quercetina pela enzima quercetinase. 28

Artigo 1 – SELECTION OF FILAMENTOUS FUNGI OF THE *BEAUVERIA* GENUS ABLE TO METABOLIZE QUERCETIN LIKE MAMMALIAN CELLS

Figure 1: Quercetin (1) and various metabolites; (2)= 3’O-methylquercetin; (3) quercetin-3’-O-sulphate; (4) quercetin-3’-glucuronide and (5)= 3’O-methylquercetin-7-glucuronide. 42

Manuscrito 1 – *Beauveria bassiana*: QUERCETINASE PRODUCTION AND GENETIC DIVERSITY

Figure 1: Analysis of extracellular production of quercetinase activity available in supernatant of incubation by *Beauveria bassiana*. (A) Time course curves of quercetinase activity produced by different isolates of *B. bassiana* during growth after induction using 0.5 g/L quercetin; (B) Quercetinase activity assay 24 h post-induction with quercetin. Group I – isolates presenting the highest level of quercetinase production; Group II – isolates presenting an intermediary level of quercetinase production; and Group III – isolates presenting the lowest level of quercetinase production. Each data point is the average of three independent experiments and bars represent the standard deviation from the mean. 53

Figure 2: (A) Agarose electrophoresis showing the random amplified polymorphic DNA (RAPD) banding patterns amplified with six of the arbitrary primers used in this study: (A) Primer OPE 02; (B) Primer OPE 07; (C) Primer OPE 11; (D) Primer OPE 12; (E) Primer OPE 14; (F) Primer OPE 18. Lane 1 represents *B. bassiana* ATCC 7159 and lanes 2 to 11 represent the isolates of *B. bassiana*, IP3a, IP6, IP8, IP11, IP94, IP98, IP129, IP132, IP147, IP153, respectively; MM – molecular marker: *Eco* RI and *Hind* III digested phage λ DNA; (B) Dendrogram constructed with UPGMA clustering method among 10 isolates of *B. bassiana* and *B. bassiana* ATCC 7159. Similarities were computed from 164 random amplified polymorphic DNA loci. The scale in the dendrogram is the genetic similarity coefficient calculated according to Jaccard. Numbers where the notes represent 1.000 replications were bootstrap-generated using the program WinBoot. 55

Figure 3: Neighbor-joining tree generated by Clustal X for the 11 partial sequences ITS1-5.8S-ITS2 regions of *Beauveria bassiana*. The sequences have been deposited in the GenBank.

56

Manuscripto 2: Quercetin-2,3-dioxygenase gene expression and quercetin biotransformation in *Beauveria bassiana*

Figure 1: Quercetin oxidation by quercetin 2,3-dioxygenase.

67

Figure 2: (A) Quercetinase activity available in supernatant of incubation by *Beauveria bassiana* IP132 isolate cultivated on PDSM and basic medium. Quercetinase activity was determined every 24 h for 4 days after induction using quercetin 0.5 g/L and the maximum activity occurred 24 h post-induction. Each data point is the average of three independent experiments (experimental variation < 5%); (B) Time course of quercetin biotransformation and metabolite formation available in supernatant of incubation by *Beauveria bassiana* IP132 isolate cultivated on PDSM. Met I = Metabolite I; Met II = Metabolite II; Querc = Quercetin.

70

Figure 3: Expression analysis of the *Beauveria bassiana* gene encoding quercetinase in response to quercetin induction. (A) Ethidium bromide-stained (RT)-PCR products showing the expression pattern of quercetinase gene (*querc*) and the amplification of rDNA 28S fragment used as internal control during *Beauveria bassiana* IP132 isolate growth under induction conditions. Samples were collected every 24 h for 4 days (lanes 2–5) after induction using 0.5 g/L quercetin; (B) The quantitative analysis of gene expression was performed by image densitometry and the *querc* transcript levels were calculated by normalization against the rDNA 28S fragment (internal control).

72

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTAB	Brometo de cetil trimetilamônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAse	Desoxiribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI/MS	Electrospray ionisation-mass spectrometric
¹ HNMR	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ITS	Internal Transcribed Space
MAP-Kinases	Proteínas quinases ativada por mitógenos
MM	Molecular Marker
<i>m/z</i>	Razão massa carga
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Potato Dextrose Agar
PDSM	Potato Dextrose Soybean Médium
PHYLIP	Phylogeny inference package
PI3-Kinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
2,3 QD	Quercetina 2,3-dioxigenase
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso
RNA	Ácido ribonucléico
RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição
UDPGA	Ácido uridinodifosfoglicurônico
UGT	Uridinoglicuroniltransferase
UPGMA	Unweighted pair-grouped method by arithmetic average

RESUMO

Metabolização da quercetina e produção de quercetina 2,3-dioxigenase por *Beauveria bassiana* isoladas da Região Centro-Oeste do Brasil

Considerando-se a vasta aplicabilidade biotecnológica descrita para *Beauveria bassiana*, a versatilidade que a biotransformação microbiana apresenta, as importantes atividades biológicas atribuídas ao flavonóide quercetina, as perspectivas quanto ao seu uso terapêutico e ainda a atividade da enzima quercetina 2,3-dioxigenase sobre a quercetina, pretendeu-se avaliar a metabolização da quercetina pela cepa *B. bassiana* ATCC 7159 e por isolados de *B. bassiana* obtidos na Região Centro-Oeste do Brasil. Os objetivos específicos do presente estudo foram: avaliar o potencial da cepa *B. bassiana* ATCC 7159 e dos isolados em produzir metabólitos da quercetina; investigar a produção de quercetina 2,3-dioxigenase pela cepa *B. bassiana* ATCC 7159 e pelos isolados; determinar a variabilidade genética entre os isolados de *B. bassiana* e estabelecer possíveis correlações entre dados moleculares e produção de quercetina 2,3-dioxigenase. Todos os isolados e a cepa *B. bassiana* ATCC 7159 foram capazes de metabolizar a quercetina formando compostos descritos nos estudos da metabolização deste flavonóide em mamíferos e o isolado IP 94 produziu um número maior de compostos quando comparado aos demais. *B. bassiana* ATCC 7159 e os isolados IP 94, IP 98, IP 129, IP 147 geraram metabólitos metilados, enquanto os isolados IP 8, IP 11 e IP 94 geraram metabólitos monoglicuronados. Todos os isolados estudados geraram metabólitos sulfatados e metabólitos metilados e glicuronados simultaneamente e foram capazes de sintetizar a enzima quercetina 2,3-dioxigenase. A síntese de quercetina 2,3-dioxigenase no meio de cultivo PDSM, utilizado para a biotransformação microbiana da quercetina, foi superior à obtida em meio mínimo. *B. bassiana* ATCC 7159 e os isolados IP 11 e IP 132 apresentaram maior atividade da quercetina 2,3-dioxigenase, enquanto os isolados IP 153 e IP 3a apresentaram as mais baixas. A formação dos metabólitos da quercetina e a produção de quercetina 2,3-dioxigenase não se relacionaram com a origem geográfica dos isolados. A análise da variabilidade genética por meio de RAPD permitiu dividir os isolados em três grupos distintos e mostrou elevada diversidade genética entre eles; porém, a análise por meio de RFLP-PCR da região ITS não permitiu diferenciar os isolados. A análise da sequência da região ITS confirmou a identidade dos fungos como *B. bassiana*. Os resultados obtidos permitiram concluir que: a biotransformação microbiana da quercetina por meio do fungo *B. bassiana* constitui alternativa ao uso de métodos químicos e sistemas biológicos para a produção de metabólitos da quercetina, sendo necessário otimizar o processo de biotransformação para a obtenção de quantidades expressivas dos metabólitos; *B. bassiana* é capaz de produzir a enzima extracelular quercetina 2,3-dioxigenase, sendo necessários estudos mais detalhados para elucidar sua via de produção, regulação e mecanismo de ação.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, biotransformação microbiana, quercetina, quercetina 2,3-dioxigenase, variabilidade genética.

ABSTRACT

Quercetin biotransformation and quercetin 2,3-dioxygenase production by *Beauveria bassiana* isolated from the Midwestern Region of Brazil

Considering the vast biotechnological applicability described for *Beauveria bassiana*, the versatility microbial biotransformation exhibits, the important biological activities attributed to the flavonoid quercetin, the therapeutic perspectives of its use, and the activity the enzyme quercetin 2,3-dioxygenase has on quercetin, we intended to evaluate quercetin biotransformation by *B. bassiana* ATCC 7159 and isolates of *B. bassiana* collected in the Midwestern Region of Brazil. The objectives of this study were: evaluate the potential of *B. bassiana* isolates and *B. bassiana* ATCC 7159 to produce metabolites of quercetin; investigate quercetin 2,3-dioxygenase production by the isolates and *B. bassiana* ATCC 7159; determine the genetic variability among the isolates of *B. bassiana* and establish possible correlations between molecular data and quercetin 2,3-dioxygenase production. All isolates and *B. bassiana* ATCC 7159 were capable of metabolizing quercetin and form compounds described in mammalian quercetin biotransformation studies and isolate IP 94 produced a higher number of metabolites compared with the others. *B. bassiana* ATCC 7159 and isolates IP 94, IP 98, IP 129, IP 147 produced methylated metabolites, while isolates IP 8, IP 11, and IP 94 produced glucuronidated metabolites. All the isolates produced sulphated metabolites and methylated and glucuronidated metabolites simultaneously and were capable to synthesize quercetin 2,3-dioxygenase. Quercetin 2,3-dioxygenase synthesis on PDSM, used in its biotransformation process was higher than on basic medium. *B. bassiana* ATCC 7159 and the isolates IP 11 and IP 132 presented the highest quercetin 2,3-dioxygenase activity, whereas the isolates IP 153 and IP 3a presented the lowest ones. Quercetin metabolites formation and quercetin 2,3-dioxygenase production were not correlated with the geographic origin of the isolates. Genetic variability analysis by RAPD allowed the separation of the isolates into three distinct groups and showed high genetic diversity among them; however, the RFLP-PCR of ITS region did not provide characteristic markers to differentiate the isolates. The ITS region sequencing confirmed the identity of the isolates as *B. bassiana*. The results obtained can lead to the following conclusions: *B. bassiana* constitutes an interesting alternative to the use of chemical methods and biological systems to produce quercetin metabolites, but is necessary to optimize the biotransformation process in order to obtain a more expressive amount of metabolites; *B. bassiana* is able to produce quercetin 2,3-dioxygenase, although more detailed studies are needed to explain its production pathway, regulation, and mechanism of action.

Key words: *Beauveria bassiana*, microbial biotransformation, quercetin, quercetin 2,3-dioxygenase, genetic variability.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DE *Beauveria bassiana*

Investigações científicas têm indicado o potencial dos fungos do gênero *Beauveria* (sub-divisão Ascomycotina, família Clavicipitaceae) em biotecnologia principalmente no controle biológico de insetos, buscando-se diminuir o uso de pesticidas químicos (DEVI et al, 2006).

Estes fungos encontram-se amplamente distribuídos em todas as regiões do mundo podendo ser isolados de insetos, ácaros, solo e plantas. Apresentam grande variação genética entre isolados e, a patogenicidade e a virulência são variáveis (ALVES et al., 2002; CASTRILLO et al., 2004). No gênero *Beauveria* encontram-se duas principais espécies patogênicas para insetos: *Beauveria bassiana* e *Beauveria brongniartii*, sendo que, a maioria dos estudos desenvolvidos tem sido relativos à *B. bassiana* (ALVES et al., 2002; CASTRILLO et al., 2004).

Muitos isolados de *B. bassiana* têm sido estudados devido ao seu potencial uso como bioinseticida, no controle de insetos causadores de doenças. Esse fungo apresenta capacidade de sobrevivência no ambiente de seus hospedeiros, capacidade para resistir às barreiras físico-químicas do tegumento e da hemolinfa do hospedeiro e, posteriormente causar sua morte rapidamente (ATHAYDE et al., 2001). Os conídios deste fungo germinam e forçam o tubo germinativo através da cutícula de insetos suscetíveis em combinação com a ação enzimática e pressão física. Desta forma, a multiplicação do fungo dentro do inseto causa a morte deste (ALVES et al., 2002; MURO et al., 2003).

Formulações contendo esporos de isolados de *B. bassiana* tem sido registradas como produtos comerciais. Em alguns países esse fungo tem sido empregado em escala comercial, entre eles os Estados Unidos, México e Brasil (FARIA & MAGALHÃES, 2001). O produto soviético Boverin[®], formulação que contém 6×10^9 conídios/g do fungo *B. bassiana* tornou-se conhecido internacionalmente. Consiste de uma combinação dos conídios com os produtos químicos malathion e trichlorphon (ALVES, 1998).

Para utilização de fungos como agente em controle biológico é importante investigar as variações genéticas, como complemento às informações biológicas

requeridas para o registro como bioinseticida (WANG et al., 2004; CASTRILLO et al., 2004).

1.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA

A caracterização de microrganismos pode ser realizada pela identificação de aspectos morfológicos, fisiológicos, comportamentais e genéticos (SOSA-GÓMEZ et al., 1998).

O estudo da variabilidade genética permite se obter além de informações sobre a variação genética, informações sobre relações taxonômicas e filogenéticas. Até meados dos anos 60 a variabilidade era observada somente por meio de caracteres morfológicos, aspectos comportamentais e virulência. A partir dos anos 80, passou-se a utilizar marcadores bioquímicos como isoenzimas e técnicas moleculares o que viabilizou a diferenciação precisa entre isolados fúngicos pertencentes a espécies taxonômicas próximas e expandiu o conhecimento da variabilidade intra-específica (SOSA-GÓMEZ et al., 1998).

O desenvolvimento de métodos de análises do DNA ofereceu a possibilidade de diferenciação em nível genético com maior poder discriminatório. Estes métodos baseiam-se no princípio de que diferentes isolados de um mesmo microrganismo apresentam padrão de DNA idêntico, enquanto, cepas não relacionadas, apresentam padrões distintos. Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para detecção de variabilidade genética do DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético propiciando diferentes tipos de marcadores moleculares (JEFFREYS et al., 1985).

O evento que possibilitou a tecnologia do DNA recombinante foi a descoberta das enzimas de restrição por Arber e Linn (1969). Tais enzimas são produzidas pelas bactérias como um mecanismo de defesa contra os fagos, cortando o DNA dos fagos, inativando-o. Já foram identificadas diversas enzimas de restrição com especificidades diferentes. Elas clivam o DNA em seqüências alvo específicas que existem ao acaso no DNA de outros organismos, o que constitui uma das características principais que as tornam adequadas à manipulação do DNA (GRIFFITH et al., 2002).

A separação de fragmentos resultantes da digestão de parte ou de todo o DNA cromossômico ou plasmidial em um campo elétrico, produz padrões únicos que podem

ser considerados “impressão digital” ou perfil genético dos microrganismos (GRIFFITH et al., 2002).

A partir de meados dos anos 80 com o advento da técnica da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) reação em cadeia da polimerase (MULLIS & FALOONA, 1987) estudos moleculares foram grandemente facilitados e se tornaram mais rápidos em função da versatilidade e sensibilidade que essa técnica apresenta, sendo possível a obtenção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA.

Investigações sobre variações genéticas em *B. bassiana*, vem sendo realizadas por meio de técnicas diversificadas a exemplo de: perfil isoenzimático, cariotipagem, polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), DNA polimórfico amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD), microssatélites, tendo sido observadas variações genéticas consideráveis nesse fungo (WANG et al., 2003; ESTRADA et al., 2007).

Por RFLP (GRODZICKER et al., 1974) entende-se o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA por enzimas de restrição. Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA (mapas de restrição) de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas. A análise de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) é baseada na amplificação termocíclica de DNA empregando uma gama de oligonucleotídeos como iniciadores. Seqüências de DNA genômico são amplificadas ao acaso a partir de “primers” de seqüência aleatória. Esta técnica permite a geração de um perfil de bandas do DNA após amplificação e eletroforese em gel sendo evidenciado o polimorfismo pela presença ou ausência das bandas.

A seqüência de nucleotídeos do DNA ribossomal (rDNA) apresenta-se constituída de repetições em tandem dos genes: 18S, 5,8S e 28S. Estes são separados por regiões denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Inter Genic Spacer*). O rDNA apresenta regiões altamente conservadas e outras variáveis o que tem permitido a análise de variações de diferentes níveis taxonômicos. As regiões ITS evoluem rapidamente sendo apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou variabilidade genética em uma mesma espécie. Na técnica da PCR-RFLP para estudos do rDNA somente a região coberta pela sonda é amplificada o que resulta em redução na detecção do polimorfismo original. Isto pode ser recuperado por meio da clivagem dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição. Assim é possível identificar

perdas ou ganhos de sítios em função, principalmente, de mutações de ponto que possam ter ocorrido ao longo do processo evolutivo na região do rDNA.

O uso de diferentes técnicas associadas vem sendo empregado em estudos de fungos entomopatogênicos e a associação com o sequenciamento de nucleotídeos do rDNA tem resultado em maior eficiência para a diferenciação de espécies e ainda para diferenciar subgrupos dentro espécies (ZHANG et al., 1997; ESTRADA, CAMACHO e BENITO, 2007).

A identificação precisa de isolados microbianos além de ser de grande valor para o conhecimento da biodiversidade de espécies e para o reconhecimento de cepas, é essencial para aplicações biotecnológicas, e tornou-se um pré-requisito para o registro e a obtenção da patente de um produto comercial. A caracterização de isolados fúngicos é um requisito importante para sua utilização em controle biológico e para o desenvolvimento de mico-inseticidas (KOUVELIS et al., 2008).

1.3 BIOTRANSFORMAÇÃO

Um aspecto essencial no estudo de compostos visando seu emprego como fármaco ou a obtenção e posterior desenvolvimento de medicamentos refere-se à elucidação de sua metabolização, incluindo sua biotransformação *in vivo*. Biotransformação compreende a metabolização de xenobióticos entendidos como fármacos e/ou outras substâncias químicas estranhas ao organismo. Engloba reações de oxidação, redução, hidrólise e/ou conjugações. Dificilmente um composto orgânico resiste à ação catalítica dos diversos sistemas enzimáticos presentes em células de organismos vivos e as alterações promovidas em sua estrutura química podem resultar em mudanças consideráveis em sua ação farmacológica (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Modelos microbianos para estudos de biotransformações vêm sendo empregados há, aproximadamente, trinta anos desde que Smith & Rosazza (1979) estabeleceram o conceito de que fungos possuem um sistema enzimático muito similar ao de mamíferos e, em conseqüência, o metabolismo de ambos é muito semelhante. Existe correlação entre estudos realizados utilizando modelos microbianos e estudos realizados em mamíferos (RATHBONE & BRUCE, 2002).

Uma variedade de microrganismos tem sido empregada em processos de biotransformações de produtos naturais. Dessa forma, tem se conseguido obter metabólitos já conhecidos, novos metabólitos e, por vezes, metabólitos difíceis de serem sintetizados por métodos químicos, em virtude de ser complexa a obtenção de estereoespecificidade em reações químicas (LACROIX et al., 1999; MANOSROI & MANOSROI, 1999). A biotransformação microbiana provê além de metabólitos para estudos do metabolismo animal (ORABI, 2001), uma diversidade de moléculas. Estas moléculas podem servir de substratos para a semi-síntese na preparação de compostos orgânicos, em associação aos métodos convencionais da química orgânica (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984), com potencial para o desenvolvimento de novos compostos bioativos. Manosroi & Manosroi (1999), chamaram a atenção também quanto à utilização de microrganismos e salientaram como vantagens a obtenção de produtos mais específicos e poucos efeitos secundários como a geração de resíduos químicos.

Microrganismos filamentosos tais como *Cunninghamella*, *Beauveria*, *Streptomyces*, têm sido freqüentemente empregados em reações de biotransformações. Biotransformações microbianas têm despertado interesse e se tornado relevante frente aos resultados obtidos com esta metodologia (HOLLAND, 1981; FABER & FRANSEN, 1993; AZERAD, 1995; RATHBONE & BRUCE, 2002). Diversos estudos têm demonstrado o potencial de *B. bassiana* em promover diferentes reações químicas incluindo oxidações, reduções e hidrólise de uma grande variedade de substratos. Essa habilidade apresenta-se como uma ferramenta importante para os processos de biotransformação microbiana de diversos substratos, podendo fazer contribuições significativas em sínteses orgânicas. Devido à diversidade de reações que é capaz de promover *B. bassiana* ATCC 7159 encontra-se, entre as cepas mais freqüentemente utilizadas em biocatálise sendo superada apenas pelo fungo *Aspergillus niger* (GROGAN & HOLLAND, 2000).

Nos processos de biotransformações inicialmente procede-se a escolha do microrganismo e do meio de cultivo a serem utilizados. Após a inoculação do microrganismo no meio de cultivo, o experimento é mantido sob agitação e temperatura constantes por um período pré-estabelecido. Em seguida, adiciona-se a substância a ser biotransformada e retiram-se alíquotas do sobrenadante da cultura, em intervalos definidos, para monitoramento da cinética reacional. Ao término do período de incubação separa-se a biomassa por filtração sendo o filtrado submetido aos

procedimentos de extração, purificação e identificação de metabólitos formados (AZERAD, 1999).

Biotransformações microbianas se constituem em um poderoso arsenal em face da não exigência de condições como pH e temperatura extremos, da diminuição de resíduos tóxicos e, principalmente, por propiciar a obtenção de produtos de maneira mais rápida e em quantidades suficientes para identificação e estudos toxicológicos e farmacológicos em comparação métodos químicos (RATHBONE & BRUCE, 2002).

Reações de biotransformação constituem um mecanismo de defesa contra substâncias xenobióticas, incluindo fármacos. Em seres humanos o intestino e o fígado são reconhecidos como os principais órgãos responsáveis por processos de biotransformação (BARREIRO & FRAGA, 2001, ZHANG, 2007). Em sua grande maioria, os produtos de biotransformação são mais solúveis do que as moléculas das substâncias que lhes deram origem, sendo, dessa forma mais facilmente excretados (FURA, 2006).

Fármacos biotransformados podem originar metabólitos ativos cujos efeitos farmacológicos sejam superiores aos de seu precursor ou que podem até desencadear reações tóxicas. Na maioria das vezes, a ação farmacológica que é atribuída aos metabólitos ativos é similar a aquela apresentada pela substância precursora. Existem casos em que os metabólitos ativos podem ser alvo de modificações estruturais, com a finalidade de otimizar suas ações farmacológicas e convertê-los em novos medicamentos (BARREIRO & FRAGA, 2008; FURA, 2006).

Exemplos de metabólitos farmacologicamente ativos que vem sendo utilizados como medicamentos incluem: atorvastatina (Lipitor[®]) (WILLIAMS & FEELY, 2002), simvastatina (Zocor[®]) (WILLIAMS & FEELY, 2002), fluoxetina (Prozac[®]) (CHEER & GOA, 2001) e fexofenadina (Alegra[®]) (GOLIGHTLY & GREOS, 2005).

O conhecimento das vias metabólicas e das estruturas dos metabólitos formados são essenciais no processo de desenvolvimento de medicamentos (TUKEY & STRASSBURG, 2000). Este processo, se encontra dividido em etapas de pesquisa e de estudos pré-clínicos e clínicos (MARRER & DIETERLE, 2007). O reconhecimento de metabólitos ativos de forma precoce favorece a interpretação de dados farmacodinâmicos observados na etapa pré-clínica. Os dados obtidos nesta etapa, desenvolvida em modelos animais, podem ser extensivos aos seres humanos (FURA et al., 2004; MARRER & DIETERLE, 2007), facilitando a proposição adequada de

estudos clínicos e ainda, o estudo do metabolismo pode também trazer dados importantes sobre a segurança ou toxicidade dos fármacos.

As reações de biotransformação responsáveis pela formação de metabólitos são divididas em duas categorias, designadas reações de fase I e reações de fase II.

Reações de fase I são reações de funcionalização que introduzem novos grupos químicos polares ou modificam grupos já existentes através de reações de oxidação, redução ou hidrólise, obtendo na maioria das vezes produtos mais polares. São mediadas por enzimas como os citocromos P450, monooxigenases, esterases e amidases (BARREIRO & FRAGA, 2008).

Nas reações de fase II pequenas moléculas polares endógenas como o ácido glucurônico (derivado do co-fator ácido glucurônico uridino-difosfato – UDPGA) se conjugam com grupos funcionais formados durante reações de fase I como: hidroxilas, aminas, sulfidrilas e ácido carboxílico. Conjugações diretas, sem a ocorrência da fase I podem acontecer se o composto já contém algum grupo funcional apropriado (TUKEY & STRAUSSBURG, 2000; PATTEN, 2006; ZHANG, 2007). As reações de conjugação são mediadas por enzimas como a glucuroniltransferase (UGT), a sulfotransferase e a *N*-acetiltransferase (FURA, 2006). Elas podem catalizar a biotransformação de substratos hidrofóbicos para metabólitos hidrofílicos diretamente, sem o pré-requisito da fase I, facilitando sua eliminação (mecanismo de detoxificação) ou ainda promover a bioativação de compostos (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Exemplos de reações de biotransformação de fase II que formam metabólitos ativos incluem: a 6-*O*-glucuronidação da morfina (RITTER, 2000), a sulfatação da morfina e da codeína para formar a morfina-6-sulfato e a codeína-6-sulfato (ZUCKERMAN et. al., 1999) respectivamente, a sulfatação do minoxidil (agente antihipertensivo e indutor de crescimento capilar na alopecia androgênica) (ANDERSON et. al., 1998) e a acetilação da procainamida (usada para o tratamento de contração ventricular prematura) (OKUMURA et. al., 1997).

1.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITOS

Métodos analíticos modernos como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas ou à ressonância magnética nuclear constituem os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (LOPES &

FASCIO, 2004). Apresentam alta relevância na determinação da pureza e quantificação de metabólitos com, grande sensibilidade, especificidade e rapidez (WATT et. al., 2003), através de análises “on-line”. Além da redução no tempo de análise, essas técnicas permitem a obtenção de informações qualitativas e quantitativas simultaneamente, dos metabólitos formados e dos substratos, através de amostras obtidas *in vivo* ou *in vitro*. Outra vantagem é que necessitam de pequenas quantidades de amostras (LI et. al. 2005).

Na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas a detecção de picos com massa igual à massa do substrato ou de um metabolito de fase I, acrescida de 176 unidades de massa (massa do ácido glicurônico) é indicativa de glicuronidação (PATTEN, 2006) e 80 unidades de massa (massa do SO₃) é indicativa de sulfatação.

1.4.1 Obtenção de metabólitos para estudos

Métodos químicos ou biológicos podem ser utilizados para a obtenção de metabólitos visando investigações de suas atividades biológicas. Métodos biológicos incluem a incubação do substrato com frações celulares como microsomas, células inteiras como hepatócitos ou parte de tecidos. Metabólitos também podem ser obtidos através de coletas *in vivo* de bile, urina e plasma de animais experimentais e seres humanos, após a administração de compostos em estudo. Quando quantidades maiores de metabólitos são necessárias para as pesquisas, modelos microbianos se constituem em alternativas importantes (FURA et al., 2004; FURA, 2006), capazes de suprir essa necessidade.

1.5 MODELOS MICROBIANOS

Modelos microbianos aqui nominados como biotransformações microbianas, constituem uma alternativa admirável para investigações científicas, devido ao grande potencial das reações microbianas para gerar diversidade molecular ou para produzir metabólitos secundários, similares a metabólitos produzidos por mamíferos (AZERAD, 1999; ISHIGE et al., 2005). A utilização deste método apresenta outra grande vantagem,

que é contribuir para a diminuição da demanda por animais de laboratório. Pesquisas utilizando animais de laboratório, além de envolver custos mais elevados, envolvem questões éticas como a toxicidade dos compostos em estudo (AZERAD, 1999) e possíveis sofrimentos físicos ou mentais dos animais. Foi aprovado recentemente no Senado Federal um projeto que dispõe sobre a utilização de animais para fins científicos e cria o Conselho Nacional de Experimentação Animal (Concea). O Concea terá a atribuição de monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam o uso de animais no ensino e nas pesquisas científicas (Projeto de Lei 03/98 aprovado em 14/09/2008).

Tanto enzimas isoladas de microrganismos, quanto células inteiras de microrganismos tem sido utilizadas em indústrias farmo-químicas (ISHIGE et. al., 2005; PANKE & WUBBOLTS, 2005). O uso de células inteiras apresenta vantagens como redução de custos por não necessitar de isolar, purificar e estabilizar as enzimas (MULINACCI et. al., 2005) e permite a obtenção de derivados com estereo e régio-seletividade (KEPPLER et. al., 2005) aliada a condições menos agressivas ao ambiente se comparadas às sínteses químicas.

A utilização de biotransformações microbianas, empregando células inteiras, vem sendo ampliada para além da biorremediação, sendo usada em biossíntese na química fina, em substituição a sínteses químicas convencionais que envolvem procedimentos demorados constituídos de várias etapas (KEPPLER et. al., 2005).

O processo de biotransformação microbiana utilizando células inteiras tem atraído cada vez mais, a atenção das indústrias químicas. Na indústria farmacêutica, um exemplo importante a ser citado dessa utilização, é seu emprego em parte do processo de produção das estatinas, substâncias redutoras da síntese do colesterol (PANKE & WUBBOLTS, 2005), utilizadas por milhões de pessoas no mundo todo.

Uma análise de processos de biotransformação realizados por indústrias em escala comercial mostrou que, seu número total aumentou em mais de 100% nas últimas décadas (Fig. 1).

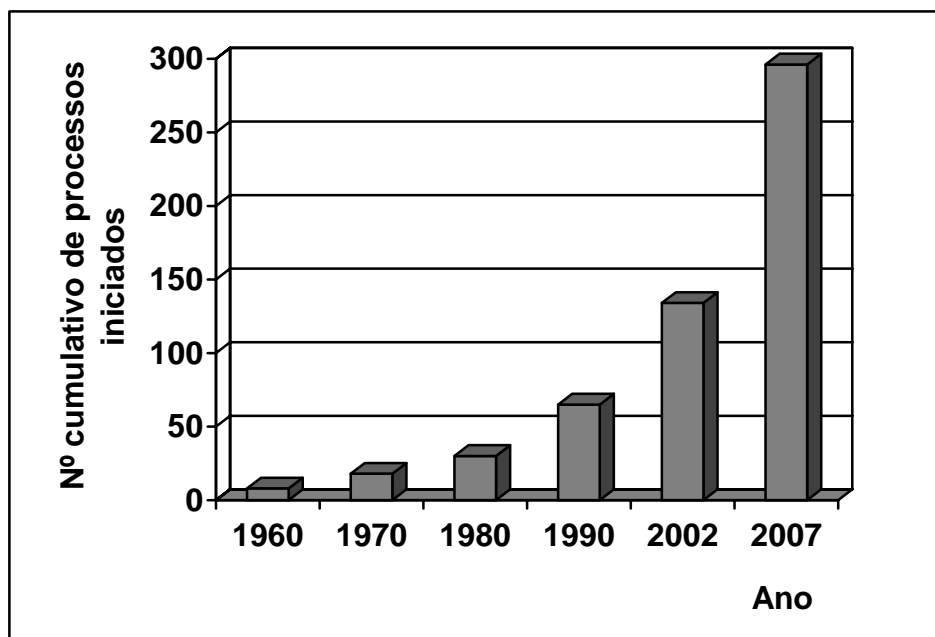


Figura 1- Números cumulativos de processos de biotransformação iniciados em escala industrial até o ano de 2007 – adaptado de Straathof et al., 2002 e atualizado pelo Sci Finder Scholar.

A maioria dos processos citados tem aplicação no setor farmacêutico e em geral a utilização de células inteiras, livres, predomina sobre a utilização de células ou enzimas imobilizadas. Essa tendência se deve em parte à tendência em utilizar células inteiras quando se deseja promover reações de redução/oxidação. Nesse caso, é necessária a presença de oxigênio para manter a atividade metabólica e a imobilização é evitada para prevenir a limitação da difusão do oxigênio (STRAATHOF et al., 2002).

Diversos microrganismos com habilidade catalítica rara, têm sido encontrados através de triagens intensivas e utilizados em processos biotecnológicos devido ao fato de serem capazes de catalizar reações que geram enantiômeros puros e de promover a biossíntese de metabólitos complexos (ISHIGE et al., 2005; PANKE & WUBBOLTS, 2005).

1.5.1 *Beauveria bassiana*

Fungos entomopatogênicos secretam substâncias tóxicas que estão relacionadas com sua capacidade de infectar e posteriormente levar o hospedeiro à morte (ALVES, 1998). Nesses fungos, tem sido descrita a produção de proteínas tóxicas como

beauvericina e oosporeina (HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1995). Investigações científicas têm ressaltado o uso de *B. bassiana*, no controle biológico contra insetos (PURWAR & SACHAN, 2006) e Quesada-Moraga (2004) ao investigar a produção de toxinas pela cepa *B. bassiana* EABb 90/2-Dm, relatou a produção da substância bassiacridina e a atividade de 19 enzimas detectadas pelo sistema API-ZYM (BioMeyrieux, Marcy l'Étoile, France): fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, α -quimiotripsina, fosfatase ácida, fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -glucosaminidase, α -manosidase e α -fucosidase.

Grogan & Holland (2000), realizaram uma revisão bibliográfica em 109 artigos científicos que tratam da utilização de *Beauveria* sp com ênfase em biotransformações e relataram diversas reações catalisadas por *B. bassiana* ATCC7159.

Processos de biotransformação de mais de 300 substratos diferentes, utilizando células inteiras de *B. bassiana*, resultaram em uma diversidade de reações, entre elas, hidroxilações de carbonos saturados e de carbonos aromáticos (HOLLAND et al. 1999).

A capacidade de *B. bassiana* para hidroxilar uma variedade de amidas, anéis lactâmicos, carbamatos, azidas e sulfonamidas tem sido extensivamente explorada exemplificando-se o uso de substratos como benzamida e p-toluenosulfonamida, obtendo-se rendimentos entre 25% a 60% (produtos hidroxilados). O fungo *Beauveria* tem sido utilizado com sucesso para a hidroxilação de uma variedade de produtos naturais, compostos aromáticos e hidrocarbonetos. Tais reações têm apresentado alta régioselectividade e baixa especificidade de substrato. O perfil das hidroxilações sugere a possibilidade da existência, nesse microrganismo, de enzimas hidroxilases distintas. Da mesma forma outras oxidações, oxidação de heteroátomos, oxidações tipo Baeyer-Villiger (transformação da progesterona para testosterona) por várias cepas, N – acetilação, hidrólise de epóxidos, hidrólise de ésteres, atividade óxidoreductase são relatadas (Grogan & Holland, 2000).

Nesses processos de biotransformação, algumas vezes têm sido reportada glicosilação subsequente, a exemplo da hidroxilação do herbicida Protham[®] seguida de glicosilação e da bioconversão do anticoagulante Warfarin em um metabólito 3', 4'-dihidroxiwarfarin 4-metoxiglicosídeo. Estudos bioquímicos sugerem que as reações de hidroxilação sejam mediadas por citocromos P450 e que, a obtenção de derivados glicosilados indica a possibilidade do emprego de *B. bassiana* em modelos microbianos

para o estudo de metabolismo, fase II (GROGAN & HOLLAND, 2000; HAUFE et al., 2002; OLIVO et al., 2003).

Herat et al. (2006) utilizaram *B. bassiana* (ATCC 13144) para investigar o metabolismo microbiano do composto 3-hidroxiavona e *B. bassiana* (ATCC 7159) para investigar o metabolismo microbiano do composto 7-hidroxiavona. Obtiveram quatro metabólitos do primeiro composto citado e dois metabólitos do segundo composto, ambos em quantidades suficientes para estudos posteriores.

1.6 FLAVONÓIDES

Flavonóides são compostos polifenólicos presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários das plantas. São encontrados em frutas, vegetais, grãos, sementes, flores, chás e vinho. Constituem um grupo de produtos naturais utilizados em alguns países como medicamentos e em outros como alimentos funcionais. São compostos aromáticos divididos em vários grupos (antocianidinas, catequinas, flavononas, isoflavonas, flavonas e flavonóis) com base no grau de oxidação do anel C (AHERNE & O'BRIEN, 2002). Os diversos grupos possuem a mesma estrutura primária (Fig. 2) e, apresentam algumas atividades biológicas semelhantes (HAVSTEEN, 2002). Cada grupo de flavonóide pode apresentar modificações em sua molécula como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação ou ramnosilação, resultando em uma grande diversidade destes compostos na natureza (HAVSTEEN, 2002).

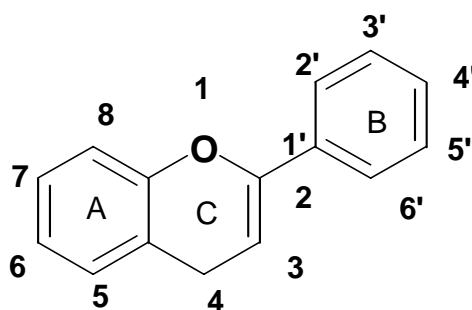


Figura 2 - Estrutura geral dos flavonóides. Fonte: Heim et al. (2002).

Os flavonóides interferem no metabolismo celular das plantas e atuam juntamente com hormônios regulando o seu crescimento (JIANG et al., 1999). Interferem também na transferência de elétrons durante a fosforilação oxidativa que ocorre no cloroplasto além de desempenhar um papel importante na fixação do nitrogênio (MORTENSON & THORNELEY, 1979).

A estes compostos, tem sido atribuída uma vasta gama de efeitos benéficos na saúde humana e na prevenção de doenças crônicas e doenças degenerativas como: doenças cardiovasculares, doenças cerebrovasculares, mal de Parkinson e doença de Alzheimer (HAVSTEEN, 2002). A atividade biológica dos flavonóides depende da estrutura química e orientação relativa das diversas partes da molécula (AHERNE & O'BRIEN, 2002; HEIM et al., 2002).

Em mamíferos, existem evidências de que muitos efeitos celulares exercidos pelos flavonóides estejam relacionados a interações com vias protéicas específicas (WALLE, 2004; WILLIAMS et al., 2004) como as MAP-Kinases. Flavonóides são substratos para várias uridino-difosfoglicuronil transferases (UGTs) e alguns tem sido identificados como capazes de induzir a expressão gênica das mesmas (ZHANG et al., 2007). A indução de UGTs por flavonóides pode acelerar a detoxificação de toxinas exógenas como: substâncias carcinogênicas e pesticidas, e também acelerar a metabolização de medicamentos que sejam substratos de UGTs (ZHANG et al., 2007).

Dados da literatura indicam que a ingestão, a distribuição e a metabolização de alguns flavonóides, têm sido caracterizadas em mamíferos (HOSNY et al., 2001). A grande maioria dos estudos é relativa à quercetina, provavelmente, em função das diversas atividades biológicas atribuídas a este flavonóide pertencente ao grupo flavonol (MANACH et al., 1998; WALLE et al., 2001). Estas, provavelmente, ocorram em função da semelhança entre a estrutura química da quercetina com moléculas intrínsecas ao metabolismo de células animais, a exemplo das bases de ácidos nucléicos, coenzimas, hormônios esteróides e neurotransmissores. Isto responde, em parte, pelos efeitos deste composto e de outros flavonóides sobre enzimas, ligação em receptores e indução de genes (HAVSTEEN, 2002).

A maioria dos estudos sobre metabolismo de flavonóides tem sido realizados *in vitro* e estes nem sempre são extrapoláveis para situações *in vivo*. Em seus estudos, Walle (2004), relatou as dificuldades para quantificar metabólitos de flavonóides em fluídos biológicos e para estabelecer estudos clínicos destas substâncias em seres

humanos, o que justifica a busca por outras metodologias capazes de superar tais dificuldades.

1.6.1 Processos de biotransformação da quercetina

A quercetina e outros flavonóides provenientes da dieta, se encontram em sua maioria na forma glicosilada. Estudos de pesquisadores como Day et al. (2001), Heim et al. (2002), Walle (2004) e Zhang (2007) indicaram uma extensa biotransformação dos flavonóides, principalmente nos enterócitos e nos hepatócitos. Quando ingerida, ao atingir o intestino delgado a molécula da quercetina glicosilada será hidrolisada por β -glicosidases de bactérias intestinais havendo a liberação da quercetina. A quercetina livre poderá ser absorvida como componente de micelas formadas por lipídeos e sais biliares e atingir a circulação entero-hepática (DAY et al., 2001; HEIM et al., 2002; MUROTA & TERA0 2003; WALLE, 2004).

A quercetina glicosilada não hidrolisada, poderá penetrar nas células intestinais através dos transportadores de glicose dependentes de sódio -SGLT1 (MUROTA & TERA0, 2003), momento em que será hidrolisada pela ação de β -glicosidases contidas nestas células, resultando na separação da porção aglicona da molécula do monossacarídeo (AHERNE & O'BRIEN, 2002; O'LEARY et al., 2003; WALLE, 2004). No interior destas células ou posteriormente no fígado, a quercetina passará pelo processo de biotransformação sendo conjugada com compostos endógenos pela ação de enzimas como a uridinodifosfo-glucuroniltransferase (UGT), a sulfotransferase ou a catecol-*o*-metiltransferase formando metabólitos glicuronados, sulfatados ou metilados, que poderão atingir os órgãos periféricos por meio da circulação sanguínea (MUROTA & TERA0, 2003; ZHANG et al. 2007).

Estudos recentes enfatizaram a bioatividade dos flavonóides através da modulação de sinalizadores celulares como fosfatidilinositol-3-Kinase (PI3-kinase) e indução de expressão gênica (WILLIAMS et al., 2004; ZHANG, 2007). Indicaram que, células expostas à quercetina apresentam concentrações elevadas de enzimas de fase I e que este composto esteja envolvido na ativação da transcrição de enzimas do grupo dos citocromos P450 (HAVSTEEN, 2002). Tem sido proposto que baixas concentrações de quercetina podem levar à expressão de enzimas de fase II, como a UDP-glucuronosiltransferase (WILLIAMS et al., 2004). A quercetina tem sido reportada

como indutora de UGT 1A em linhagens celulares Caco-2 (ZHANG, 2007). Em contraste, existem estudos que indicaram que altas concentrações de flavonóides são capazes de ativar MAP kinases podendo resultar na indução de apoptoses (WILLIAMS et al., 2004).

Biotransformações microbianas da quercetina por microrganismos dos gêneros *Bacillus*, *Aspergillus* e *Streptomyces* originaram metabólitos provenientes de reações de hidroxilação, glicosilação ou metilação (Fig. 3). Nas biotransformações citadas, apenas o *Streptomyces griseus* parece ser capaz de simular, parcialmente, o metabolismo da quercetina em mamíferos, propiciando a metilação da quercetina. Os demais apresentaram um padrão de metabolização da quercetina similar ao observado em plantas (DAS & ROSAZZA, 2006).

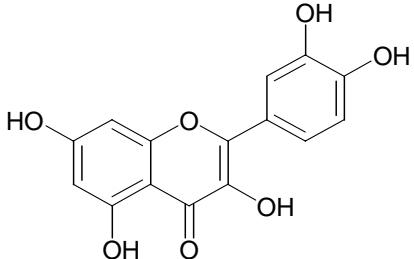
 <p style="text-align: center;">Quercetina (3, 3', 4', 5, 7 pentahidroxi flavona)</p>		
Ref.	Microrganismos	Metabólitos
Hosny et. al, 2001	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 13273	Hidroxilado e metilado
Rao & Weiner, 1981	<i>Bacillus cereus</i>	Glicosilado (isoquercitrina e ácido protocatequico)
Masri et. al, 1959	<i>Aspergillus flavus</i>	Monóxido de carbono e 2,3 ácido carboxílico protocatequilfloroglucinol

Figura 3 - Biotransformação microbiana da quercetina por diferentes espécies de microrganismos.

1.7 QUERCETINASE

Dioxigenases são enzimas extracelulares capazes de oxidar substratos pela inserção de átomos de oxigênio molecular nos mesmos. São secretadas por microrganismos como fungos, leveduras ou bactérias e desempenham um papel importante na degradação de compostos aromáticos. Uma dessas enzimas, a quercetina 2,3-dioxigenase (2,3QD – EC.1.13.11.24) ou quercetinase encontra-se envolvida na degradação de flavonóides, especificamente pertencentes ao grupo flavonol (IACAZIO, 2004; TRANCHIMAND et al., 2005).

Diversos experimentos, têm sido desenvolvidos no sentido de aperfeiçoar a produção de quercetinase para fins de estudos de caracterização bioquímica e molecular e ainda para elucidar sua ação sobre compostos aromáticos (TRANCHIMAND et al., 2008). A secreção da enzima ocorre ao se inocular o microrganismo em meio de cultura enriquecido ou mesmo em meio mínimo, acrescido de uma ou mais molécula orgânica (cromóforo) que se constituirá em fator de estresse, tendo-se como resultado a indução enzimática. A enzima será secretada e a substância indutora será posteriormente alvo (substrato) de sua atividade (SCHAAB et al., 2006; MERKENS & FETZNER, 2009).

Iacasio (2004) investigou a produção de quercetinase por *Penicillium olsonii* em meio mínimo em diferentes condições e verificou que a presença e a concentração de extrato de levedura são fatores fundamentais para intensificar a produção. Tranchimand et al. (2005) investigaram o efeito de dez compostos fenólicos e dois açúcares (glucose e rhamnose) como indutores da quercetinase. Observaram que os flavonóides rutina e quercetina e o composto ácido carboxílico floroglucinol são efetivos na indução da quercetinase.

A quercetinase catalisa a oxidação da quercetina para um composto denominado ácido carboxílico protocatequilfloroglucinol com a formação concomitante de monóxido de carbono (Fig. 4). O mecanismo de ação da enzima consiste no rompimento da ligação carbono-carbono da posição 3 da molécula da quercetina e inserção de oxigênio molecular no substrato, captado do meio (IACAZIO, 2004; SCHAAB et al., 2006; TRANCHIMAND et al., 2005; TRANCHIMAND et al., 2008).

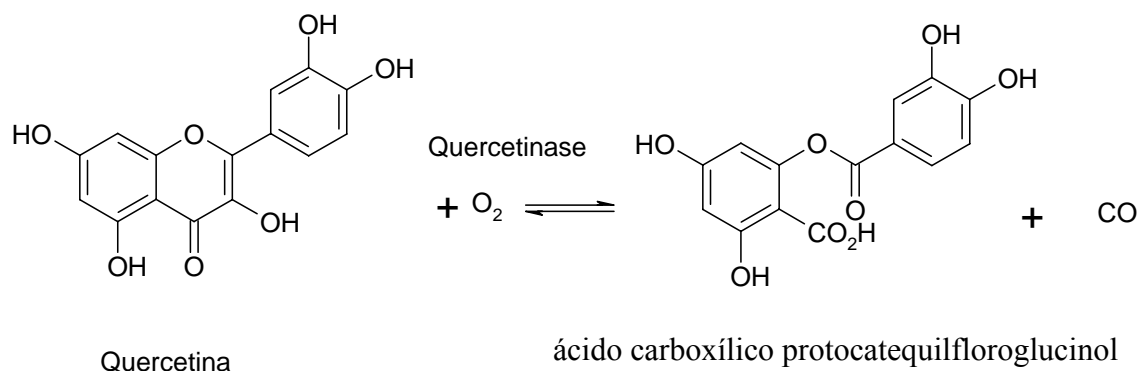


Figura 4 - Catabolismo da quercetina pela enzima quercetinase

Estudos espectroscópicos e sobre a cinética enzimática também tem sido realizados, no sentido de otimizar a produção da quercetinase (BARNEY et al., 2004; SCHAAB et al., 2006). Existem patentes registradas, visando o emprego de quercetinases como aditivo a detergentes, para eliminar manchas, a exemplo das produzidas por vinho. Sua ação se dá durante o processo de lavagem de têxteis, devido a sua capacidade de oxidar cromóforos complexos que compõem as manchas, diminuindo a intensidade da cor dos mesmos (van der HELM et al., 1997).

Quercetinases tem sido obtidas de *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus flavus*, *Diapotha eres*, *Neurospora crassa*, *Diplodia gossypin*, *Penicillium minioluteum*, *Penicillium roquefortii*, *Penicillium olsonii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus soyae* e *Aspergillus oryzae* e ainda de *Bacillus subtilis* (SCHAAB et al., 2006; TRANCHIMAND et al., 2008).

Considerando-se o potencial biotecnológico descrito para a *B. bassiana*, a versatilidade que a biotransformação microbiana apresenta, as importantes atividades biológicas atribuídas ao flavonóide quercetina e as perspectivas quanto ao seu uso terapêutico, pretendeu-se avaliar a metabolização da quercetina por isolados de *B. bassiana* obtidos da região centro-oeste do Brasil e pela cepa *B. bassiana* ATCC7159.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a metabolização da quercetina e a produção da enzima quercetina 2,3-dioxigenase por fungos da espécie *B. bassiana* isolados da região Centro-Oeste do Brasil.

2.1.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar os isolados de *Beauveria bassiana* e a cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 quanto a potencial capacidade para metabolizar a quercetina;
- 2- Investigar a produção de quercetinase pelos isolados de *Beauveria bassiana* e pela cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159;
- 3- Determinar a variabilidade genética entre os isolados de *Beauveria bassiana*;
- 4- Estabelecer possíveis correlações entre os dados moleculares, a produção de quercetinase e a origem geográfica dos isolados.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*, 2002, 18:75-81.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. FEALQ, São Paulo, 1998, pp 289-315.

ALVES, S.B.; ROSSI, L.S.; LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2002, 81:70-77.

ANDERSON, R.J.; KUDLACEK, P.E.; CLEMENS, D. L. Sulfation of minoxidil by multiple cytosolic sulfotransferases. *Chemico-Biological Interactions* 1998, 109:53-67.

ARBER, W.; LINN, S.. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry* 1969, 38:467-500.

ATHAYDE, A.C.R.; FERREIRA, U.L.; LIMA, E.A.L.A. Fungos Entomopatogênicos: uma alternativa para o controle do carrapato bovino – *Boophilus microplus*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 2001, 21:12-15.

AZERAD, R. Application of biocatalysts in organic synthesis. *Bulletin Society Chimistry*, 1995, 132: 17-51.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1999, 63:163 – 218.

BARNEY, B.M., SCHAAB, M.R. et al. Evidence for a new metal in a known active site: purification and characterization of iron-containing quercetin-2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 2004, 35(1):131-41.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*. Artmed, Porto Alegre, 2008.

CASTRILLO, L.A.; GRIGGS, M.H.; VANDENBERG, J.D. Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: likelihood of recombination in the field. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, 86:26-37.

CHEER, S.M.; GOA, K.L.. Fluoxetine: a review of its therapeutic potential in the treatment of depression associated with physical illness. *Drugs*, 2001, 61:81-110.

DAS, S.; ROSAZZA, J.P.N. Microbial and Enzimatic Transformations of Flavonoids. *Journal of Natural Products*, 2006, 69:499-508.

DAY, A.J.; MELLON, F.A.; BARRON, D.; SARRAZIN, G.; MORGAN, M.R.; WILLIANSO, G. Metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radical Research*, 2001, 35:941-952.

DEVI, K.U; REINEKE, A.; RAO REDDY, N.N.; RAO, C.U.M.; PADMAVANTHI, J. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Genome*, 2006, 41(5):495-504.

ESTRADA, M.E.; CAMACHO, M.V.; BENITO, C. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. As assessed using inter-microsatellites (ISSRs). *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2007, 12:240-252.

FABER, K.; FRANSSEN, M.C.R. Prospects for the increased application of biocatalysts in organic transformations. *TIBTECH*, 1993, 11:461-470.

FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2001, 22:18-21.

FURA, A.; SHU, YUE-ZHONG; Z, M.; HANSON, R.L.; ROONGTA, V.; HUMPHREYS, W.G. Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, 47:4339-4351.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drugs discovery and development. *Drug Discovery Today*, 2006, 11:133-142.

GOLIGHTLY, L.K.; GREOS, L.S. Second-generation antihistamines: actions and efficacy in the management of allergic disorders. *Drugs*, 2005, 65:341-384.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. *Introdução à genética*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2002.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, 1974, 39: 439-446.

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

HAUFE, G.; WÖLKER, D.; FRÖHLICH, R. Selectivity of biohydroxylation with *Beauveria bassiana* of trans-2-fluorocycloalkyl N-phenylcarbamates. *Journal of Organic Chemistry*, 2002, 67(9):3022-3028.

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

HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*, 1995, 13(3):445-490.

HEIM, K.E.; TAGILAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13:572 – 584.

HERATH, W.; MIKEL, J.R.; HALE, A.L; FERREIRA, D.; KHAN, I.A. Microbial metabolism. Metabolites of 3- and 7-Hydroxyflavones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(3), 320-324.

HOLLAND, H.L. Microbial and in vitro enzymic transformation of alkaloids. In: Manske RHF, Rodrigo RGA. *The Alkaloids*. Academic Press, New York, 1981, 323-400.

HOLLAND, H.L.; TERENCE, A.M.; PHILLIP, J.N; MIRJANA, Z. A New Paradigma for Biohydroxylation by *Beauveria bassiana* ATCC7159. *Tetrahedron*, 1999, 55:7441-7460.

HOSNY, M.; DHAR, K.; ROSAZZA, J.P.N.. Hidroxylations and methylations of quercetin, fisetin and catechin by *Streptomyces griseus*. *Journal of Natural Products*, 2001, 64:462-465.

IACAZIO, G. Increased quercetinase production by *Penicillium olsonii* using fractional factorial design. *Process Biochemistry*, 2005, 40:379-384.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9:174-180.

JEFFREYS, A.J; WILSON, V.; THEIN, S. Individual specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 1985, 316:76-79.

JIANG, Z.; SWEM, L.R.; RUSHING, B.G.; DEVANATHAN, S.; TOLLIN, G.; BAUER, C.E. Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science*, 1999, 285:406–409.

KOUVELIS, V.N.; GHIKAS, D.V.; EDGINGTON, M.A.; TYPAS, M.A.; MOORE, D. Molecular characterization of isolates of *Beauveria bassiana* obtained from overwintering and summer populations of Sunn Pest (*Eurygaster integriceps*). *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46:414-420.

LACROIX, I.; BITON, J.; AZERAD, R. Microbial models of drug metabolism: microbial transformations of trimegestone[®] (RU27987), a 3-Keto-^{4,9(10)}-19-norsteroid. *Drug Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999, 7:2329-2341.

LI, A.C.; ALTON, D.; BRYANT, M.S.; SHOU, W.Z. Simultaneously quantifying parent drugs and screening for metabolites in plasma pharmacokinetic samples using selected reaction monitoring information-dependent acquisition on a QTrap instrument. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19:1943-1950.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, 2004, 27:670-673.

MANACH, C.; MORAN, C.; CRESPI, V.; DEMIGNI, C.; TEXIER, O.; REGERAT, F.; REMESY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters*, 1998, 426:331–336.

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

MARRER, E.; DIETERLE, F. Promises of biomarkers in drug development – a reality check. *Chemical Biology & Drug Design*, 2007, 69:381-394.

MASRI, M.S.; BOOTH, A.W.; DeEDS, F. The metabolism and acid degradation of quercetin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 85:284-286.

MERKENS, H.; FETZNER, S. Transcriptional analysis of the queD gene coding for quercetinase in *Streptomyces* sp. FLA. *FEMS Microbial Letters*, 2009, 287:100-107.

MORTENSON, L.E.; THORNELEY, R.N. Structure and function of nitrogenase. *Annual Reviews of Biochemistry*, 1979, 48:387–418.

MULINACCI, N.; la MARCA, G.; INNOCENTI, M.; VINCIERI, F.F.; CRESPI-PERELLINO, N.; MINGHETTI, A. Cell cultures of *Ajuga reptans* L. to bioconvert emodin and aloe-emodin: an HPLC/ESI/MS investigation. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36:399-408.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 1987, 55:335-350.

MURO, A.M.; MEHTA, S.; MOORE, D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 229:249-257.

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

KEPPLER, A.F.; PORTO, A.L.M.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; COMASSETO, J.V.; ANDRADE, L.H. Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36:967-975.

OKUMURA, K.; KITA, T.; CHIKAZAWA, S.; KOMADA, F.; IWAKAWA, S.; TANIGAWARA, Y. Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1997, 61:509-517.

O'LEARY, K.A.; DAY, A.J.; NEEDS, P.W.; MELLON, F.A.; O'BRIEN, N.M.; 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*, 2003, 65:479-491.

OLIVO, H.F.; PEEPLES, T.L.; RIOS, M.Y.; VELAZQUEZ, F.; KIM, J.W.; NARANG, S. Microbial C-hydroxylation and β -4-*O*-methylglucosidation of methylbenzamide 7-azanorbomane ethers with *Beauveria bassiana*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 21:97-105.

ORABI, K.Y. Microbial epoxidation of the sesquiterpene presilphiperfolane angelate ester. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2001, 56c:223-227.

PANKE, S.; WUBBOLTS, M. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9:188-194.

PATTEN, C.J. New technologies for assessing UDP-glucuronosyltransferase (UGT) metabolism in drug discovery and development. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2006, 3:73-78.

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

QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 2004, 108(4):441-452.

RAO, K.V.; WEISNER, N.T. Microbial transformation of quercetin by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42(3):450-452.

RATHBONE, D.A.; BRUCE, N.C. Microbial transformation of alkaloids. *Ecology and Industrial Microbiology*, 2002, 5:274-281.

RITTER, J.K. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chemico-Biological Interactions*. 2000, 129:171-193.

SALARIASLANI, F.S.; ROSAZZA, J.P.N. Biocatalysis in natural product chemistry. *Enzyme Microbiology and Technology*, 1984, 6:242-253.

SCHAAB, M.R.; BARNEY, B.M.; FRANCISCO, W.A. Kinetic and spectroscopic studies on the quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 2006, 45:1009-1016.

SMITH, R.V.; ROSAZZA, J.P. Microbial models of mammalian metabolism. *Applied Microbiology*, 1979, 25:169-208.

SOSA-GOMEZ, D.R.; TIGANO, M.S.; ARANTES, O.M.N. Caracterização de entomopatógenos. In: Alves SB. Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ vol 4. 1998.

STRAATHOF AJJ; PANKE S; SCHMID A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13:548-556.

TRANCHIMAND, S.; TRON, T.; GAUDIN, C.; IACAZIO, G. Evaluation of phenolics and sugars as inducers of quercetinase activity in *Penicillium olsonii*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 253:289-294.

TRANCHIMAND, S.; ERTEL, G.; GAYDOU, V.; GAUDIN, C.; TRON, T.; IACAZIO, G. Biochemical and molecular characterization of a quercetinase from *Penicillium olsonii*. *Biochimie*, 2008, 90(5):781-789.

TUCKEY, R.; STRASSBURG, G. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease. *Annual Review in Pharmacology and Toxicology*, 2000, 40:581-616.

van der HELM, M.; van der HAIDEN, M.; HONDMANN, D.H.; SMITS, A.; SWARTHOFF, T.; VERRIPS, C.T. Enzymatic bleach composition. United States Patent: 6107264, 1997, page:1-7.

WALLE, T., WALLE, U.K., HALUSKA, P.V.. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *Journal of Nutrition*, 2001, 131:2648-2652.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoid. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, 36:829-837.

WANG, C.; SHAH, F.A.; PATEL, N.; LI, Z.; BUTT, T.M.. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10):908-915.

WANG, C.; FAN, M.; LI, Z.; BUTT, T.M. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96:861-870.

WATT, A.P.; MORTISHIRE-SMITH, R.J.; GERHARD, U.; THOMAS, S.R. Metabolite identification in drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2003, 6:57-55.

WILLIAMS, D.; FEELY, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetic*, 2002, 41:343-370.

WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18:6531-6535.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, 36:838-849.

ZHANG, L.; ZOO, Z; LIN, G. Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, 2007, Vol.4, 6:833-845.

ZHANG, W.; WENDEL, J.F.; CLARK, L.G. Bamboozled again: inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (*Poacea bambusoideae*). *Molecular phylogenetic and Evolution*, 1997, 8(2):205-217.

ZUCKERMAN, A.; BOLAN, E.; de PAULIS, T.; SCHMIDT, D.; SPECTOR, S.; PASTERNAK, G.W. Pharmacological characterization of morphine-6-sulfate and codeine-6-sulfate. *Brain Research*, 1999, 842:1-5.

PUBLICAÇÃO

Artigo 1

SELECTION OF FILAMENTOUS FUNGI OF THE *BEAUVERIA* GENUS ABLE TO METABOLIZE QUERCETIN LIKE MAMMALIAN CELLS

Autores:

Eula Maria de Melo Barcelos Costa

Fabiana Cristina Pimenta

Wolf Christian Luz

Valéria de Oliveira

Revista: Brazilian Journal of Microbiology

Situação: publicado

SELECTION OF FILAMENTOUS FUNGI OF THE *BEAUVERIA* GENUS ABLE TO METABOLIZE QUERCETIN LIKE MAMMALIAN CELLS

Eula Maria de M. B. Costa¹; Fabiana Cristina Pimenta²; Wolf Christian Luz²; Valéria de Oliveira^{1*}

¹Laboratório de Bioconversão, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil; ²Laboratório de Bacteriologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

Submitted: June 04, 2007; Returned to authors for corrections: November 02, 2007; Approved: February 21, 2008.

ABSTRACT

Microbial biotransformations constitute an important alternative as models for drug metabolism study in mammals and have been used for the industrial synthesis of chemicals with pharmaceutical purposes. Several microorganisms with unique biotransformation ability have been found by intensive screening and put in commercial applications. Ten isolates of *Beauveria* sp genus filamentous fungi, isolated from soil in the central Brazil, and *Beauveria bassiana* ATCC 7159 were evaluated for their capability of quercetin biotransformation. Biotransformation processes were carried out for 24 up to 96 hours and monitored by mass spectrometry analyses of the culture broth. All strains were able to metabolize quercetin, forming mammalian metabolites. The results were different from those presented by other microorganisms previously utilized, attracting attention because of the great diversity of reactions. Methylated, sulphated, monoglucuronidated, and glucuronidated conjugated metabolites were simultaneously detected.

Key-words: *Beauveria bassiana*, Biotransformation, Quercetin.

INTRODUCTION

Beauveria sp belong to the Moniliaceae family and *Beauveria bassiana* is the most common species. This species is an entomopathogenic fungus that performs many complex conversions (15) and investigations underlined its potential use as a biological control agent for insect pests, as an alternative to harmful chemical insecticides (14).

B. bassiana ATCC 7159 has been used as a model for different substrates biotransformation. Biochemical evidences showed that the reactions are often mediated by cytochrome P450 and phase II metabolism enzymes (3,5,12).

The biotransformation process using the microorganism whole cell has attracted more attention for the production of pharmaceutical derivatives. One of the advantages to use the intact cell is the reduced cost. Therefore it is not necessary to isolate, purify and stabilize the enzyme (9). The derivatives preparation with high stereo and regio-selectivity under

environmental conditions constitute an alternative to chemical reagents (7). The microorganism whole cells also could be employed for bioremediation, biomonitoring, or in the targeted biosynthesis of fine chemicals that are otherwise difficult to manufacture *via* conventional chemical means that involve complicated procedures (7). An important example of this versatile process for manufacturing a complex pharmaceutical ingredient is the synthesis of statins, which are cholesterol-lowering drugs (13).

The approval of a substance for human use depends on the evaluation of its metabolism. In some cases the drug metabolism results in metabolites with raised pharmacological activity and potential toxicity. Metabolic studies are carried out in animal models, perfused organs or cellular cultures (1). The microbial biotransformation constitute an important alternative, because mimics the mammalian metabolism. Moreover, the high potential of microbial reactions can be used for the creation of molecular diversity (1). These methodologies have the advantage of a

*Corresponding Author. Mailing address: Laboratório de Bioconversão, Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás, 1ª Avenida esquina com Praça Universitária, S/N. Caixa Postal 131, Setor Universitário - CEP: 74.605-220. Goiânia - GO, Brasil. Tel.: (+5562) 3209-6044 R- 221. Fax: (+5562) 3209-6037. E-mail: valeria@farmacia.ufg.br

reduced animals demand, and permit to obtain higher concentrations of metabolites that facilitate structural identification and toxicological and pharmacological studies, without chemical synthesis (1).

Microbial biotransformations that mimic mammalian metabolism are well understood (8,15), and they include oxidation, reduction (similar to hepatic phase I in animal metabolism) or conjugation (phase II in animal metabolism) reactions. *Beauveria bassiana* constitute a reliable and efficient alternative to the use of animals or synthetic chemistry and are frequently used in microbial conversion processes (1).

Flavonoids are polyphenolic metabolites of plants and have been proposed to exert a wide range of beneficial effects in human health, preventing chronic and degenerative diseases such as cardiovascular, cerebrovascular, Parkinson's and Alzheimer's diseases (5). Evidences suggest that flavonoids exercise cellular effects, many of which are linked to their interactions with specific proteins pathways (16,17). Quercetin, a flavonoid compound, inhibits protein kinases, DNA topoisomerase, regulates gene expression and has been involved in the transcriptional activation of cytochrome P450 enzymes (5). It is possible that cells exposed to quercetin have higher levels of phase I detoxification enzymes (5). Low concentrations of quercetin could lead to expression of survival and defensive genes, including those related to phase II detoxifying enzymes, such as UDP-glucuronosyltransferase (17).

In this study, ten strains of *Beauveria* sp and *Beauveria bassiana* ATCC 7159 were explored for their biotransformation potential, specially for their capability to produce metabolites similar to those produced by mammalian cells or new compounds with interesting biological activities.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Quercetin was purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO (USA).

Microorganisms

Beauveria sp strains (IP3a, IP6, IP8, IP11, IP94, IP98, IP129, IP132, IP147 and IP153) were isolated from soil samples of central Brazil and belong to the fungal culture collection of the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública of the Universidade Federal de Goiás. All strains were cultured in potato agar.

Culture and biotransformation

Aliquots of 0.5 mL of each *Beauveria* sp and *Beauveria bassiana* ATCC 7159 conidia suspensions, prepared after seven days of culture, were transferred to Erlenmeyer flasks with 100 mL of liquid peptone dextrose soybean meal - PDSM (peptone 5 g, dextrose 20 g, soybean meal 5 g, dihydrogen potassium phosphate 5 g, sodium chloride 5 g, yeast extract 3 g in 1 L of distilled water). The flasks were maintained in shaker under 200

rpm at $29 \pm 2^\circ\text{C}$ for 72 hours. Substrate was added to the cultures at a final concentration of 0.5 g/L and incubated in the same conditions. Aliquots (1.0 mL) of the supernatant were taken every 24 hours, up to 96h. The samples were saturated with sodium chloride, extracted with ethyl acetate, and centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min. The organic phases were dried on MgSO_4 , evaporated and then added to 500 μL of HPLC-grade methanol before injection into ESI/MS.

Chromatographic procedures

Analytical reverse-phase HPLC was carried out using Gilson pumps, a Gilson 321 sample injector equipped with a 20 μL loop and a UV detector. A Lichospher 100 RP 18 column (0.5 μm , 250 mm x 4.6 mm) was used. The analyses were carried out at room temperature. Detection was set at 254 nm. The flow rate was 1.0 mL/min. A gradient elution of methanol-water (65:35) was used over 9 min. Calibration was performed using previously prepared standard solutions of quercetin and their metabolites, purified and characterized by ^1H and ^{13}C NMR and LC-MS (data not shown).

ESI-MS analysis

This analysis was carried out in an Atmospheric Pressure Ionization 1200L quadrupole MS/MS instrument (VARIAN, inc.) at 400°C , nebulizer pressure 23-24 psi, capillary voltage 40V, needle 5000V, and shield 600V, using the previously described reverse-phase chromatographic method, substituting the gradient system with water by methanol in isocratic conditions at flow rate 0.5 mL/min. The flow rate of the electrospray solutions to the ion source was 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. and nitrogen was used as collision gas. The analyses were carried out in the positive ionization mode and were recorded in scan mode in the mass range from 250 to 1000 Th. A VARIAN® Workstation system software was used for data acquisition and processing.

RESULTS AND DISCUSSION

The molecular ions of relevant quercetin metabolites, showed in *Beauveria* sp biotransformation were: m/z (315-316), m/z (380-383), m/z (477-479 and m/z (491-492). These ions corresponded to the metabolites 2, 3, 4 and 5 (Fig. 1) reported in previous studies on quercetin metabolism by various biological systems (10,11,18).

ESI-MS spectrum revealed that quercetin was extensively metabolized by fungal enzymes and irrelevant differences were observed in the distribution of quercetin derivatives after substrate contact. The time courses of metabolites accumulation were similar and the biotransformation produced conjugated metabolites. In general, the conjugates formed the molecular ion (m/z 383) suggesting quercetin sulphatation, m/z (479) monoglucuronidation and m/z (492) monoglucuronidation and sulphatation. The molecular ions (m/z 315) and (m/z 303

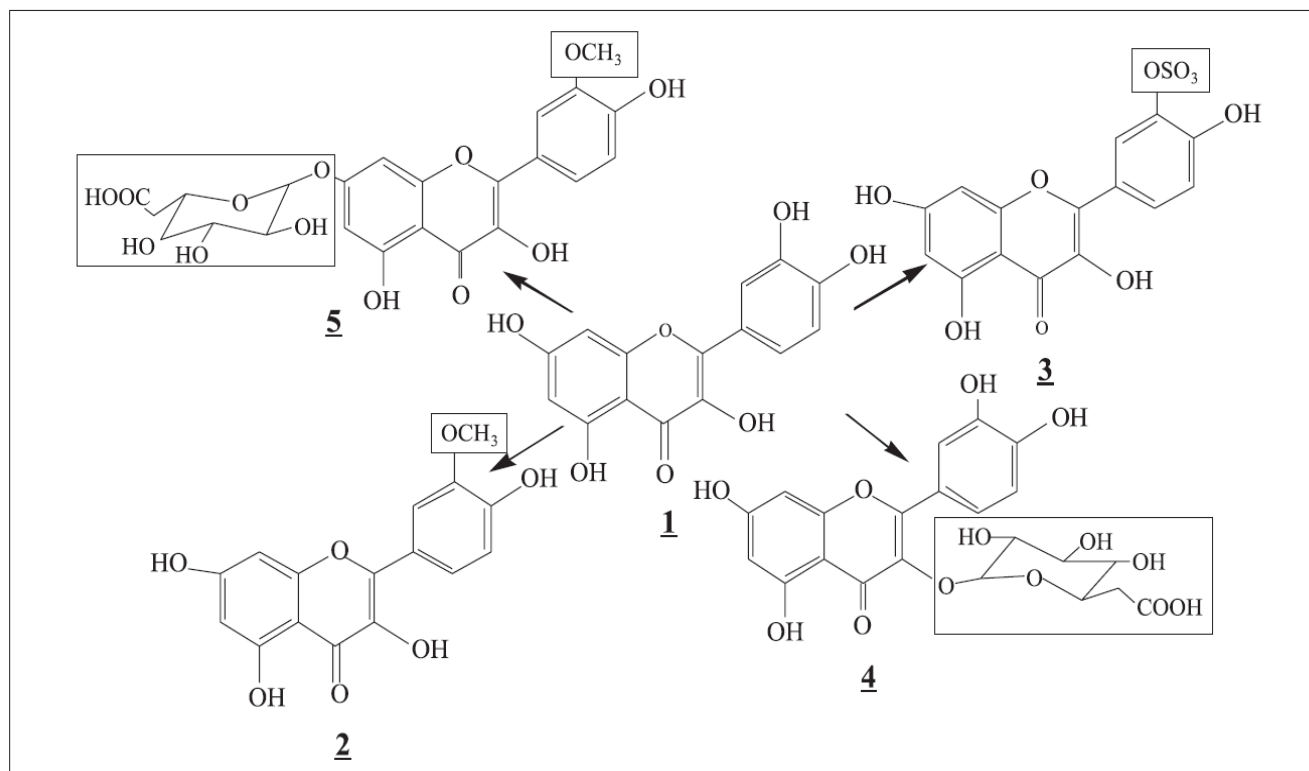


Figure 1. Quercetin (**1**) and various metabolites; (**2**) = 3'-O-methylquercetin; (**3**) quercetin-3'-O-sulphate; (**4**) quercetin-3'-glucuronide and (**5**) = 3'-O-methylquercetin-7-glucuronide (10,11,18).

[MP⁺1]) corresponded to a methylation and quercetin aglycone, respectively. Table 1 shows the metabolites detected in the supernatant after incubation of each isolate for 72 hours. Five strains (IP 94, IP 98, IP 129, IP 147 and *B. bassiana* ATCC 7159) produced methylation, three isolates (IP 8, IP 11 and IP 94) produced monoglucuronidation and all strains produced sulphatation and methylation and monoglucuronidation simultaneously. The strain IP 94 produced all reactions types.

Species of *Bacillus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* and *Penicillium* transformed quercetin into numerous metabolites by hydroxylation, glucosylation and methylation (2). Only *Streptomyces griseus* appear to mimic mammalian metabolism, mediating methylation of quercetin. The other fungi simulate metabolic patterns observed in plants (2).

Comparing the ESI-MS profiles to previous studies on the enzymatic derivatization of flavonoids, it was possible to confirm that reactions occurred on the aglycone structure. The hydroxyl groups of quercetin were targets for conjugation reactions such as glucuronidation, sulphation and methylation. As reported by different authors, conjugations are the most common final step reactions in mammalian metabolism of intact flavonoids. After absorbed and metabolized in the intestine, they are further metabolized in the liver to yield various conjugated forms (6, 10, 11, 18). Several flavonoids such as quercetin, naringin, and

genistein are observed commonly in mammal's urine or bile as glucuronide or sulfate conjugates or methyl ethers (2).

The molecular ions observed in the ESI-MS results are in consonance with LC-MS analysis and H Nuclear Magnetic Resonance (HNMR) data reported by Oliveira & Watson (11) and O'Leary *et al.* (10). Woude *et al.* (18) also detected 14 different phase II mono and mixed conjugates of quercetin in various biological systems such as rat liver microsomes, human hepatic microsomes, rat small intestine, human small intestine, rat plasma and human plasma. These authors concluded that the plasma phase II metabolic pattern in mammals is a result of interplay of different organs with metabolizing capacity, specially the liver and the small intestine. The same pattern was observed by Herath *et al.* (6) in experiments with *Beauveria bassiana* ATCC 7159, for 3- and 7-hydroxyflavones.

Glucuronidation, sulphatation and methylation were the most common metabolic pathways in quercetin biotransformation, indicating that the screened fungi express phase II metabolic enzymes when exposed to these xenobiotics.

The investigation leads to the conclusion that the tested filamentous fungi presented phase II biotransformation patterns. They offer significant potential for use in microbial models to mimic mammalian metabolism and represent powerful biotechnological research tools for biotransformation of

Table 1. Biotransformation of quercetin by strains of *Beauveria* sp and *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

Strains	Metabolites			
	(2) m/z (315-316)	(3) m/z (380-383)	(4) m/z (477-479)	(5) m/z (491-492)
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	+	+	-	+
IP 3a	-	+	-	+
IP 6	-	+	-	+
IP 8	-	+	+	+
IP11	-	+	+	+
IP 94	+	+	+	+
IP 98	+	+	-	+
IP 129	+	+	-	+
IP 132	-	+	-	+
IP 147	+	+	-	+
IP 153	-	+	-	+

(+) presence, (-) absence; Metabolites pattern fragmentation detected by ESI-MS in the supernatant at 72 hours after incubation. Analysis conditions: mobile phase, methanol, drying gas temperature 400°C, flow rate 0.5 mL/min, nebulizer pressure 23-24 psi, capillary voltage 40V, needle 5000V, and shield 600V. The flow rate of the electrospray solutions to the ion source was 5 µL/min.

quercetin, specially the strain IP 94, that presented the largest reaction diversity.

RESUMO

Seleção de fungos filamentosos do gênero *Beauveria* capazes de metabolizar quercetina de forma semelhante aos mamíferos

Biotransformações microbianas constituem uma alternativa importante como modelo para o estudo do metabolismo de medicamentos em mamíferos e são empregadas em processos sintéticos industriais com propósitos farmacêuticos. Diversos microrganismos com potencial para biotransformação têm sido encontrados através de *screening* intensivo e aplicados comercialmente. Dez cepas de fungos filamentosos do gênero *Beauveria*, isolados na região central do Brasil, e a cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram avaliadas quanto à capacidade de biotransformação da quercetina. As reações de biotransformações foram realizadas por um período de 24 a 96 horas, e monitoradas através de espectrometria de massas do meio reacional. Todas as cepas foram capazes de metabolizar a quercetina, formando metabólitos encontrados nos mamíferos. Os resultados foram diferentes dos resultados apresentados por outros

microrganismos utilizados anteriormente e chamam a atenção devido à diversidade das reações evidenciadas. Diferentes metabólitos conjugados foram detectados simultaneamente: metilados, sulfatados, monoglicuronados, e glicuronados.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, Biotransformação, Quercetina.

REFERENCES

- Azerad, R. (1999). Microbial Models for Drug Metabolism. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 63, 163-218.
- Das S.; Rosazza, J.P.N. (2006). Microbial and Enzymatic Transformations of Flavonoids. *J. Nat. Prod.*, 69, 499-508.
- Grogan, G.J.; Holland, H.L. (2000). The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 9, 1-32.
- Haufe, G.; Wölker, D.; Fröhlich, R. (2002). Selectivity of biohydroxylation with *Beauveria bassiana* of trans-2-fluorocycloalkyl N-phenylcarbamates. *J. Org. Chem.*, 67 (9), 3022-3028.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96, 67-202.
- Herath, W.; Mikell, J.R.; Hale, A.L.; Ferreira, D.; Khan, I.A. (2006). Microbial Metabolism of metabolites of 3- and 7-Hydroxyflavones. *Chem. Pharm. Bull.*, 54 (3), 320-324.
- Keppler, A.F.; Porto, A.L.M.; Schoenlein-Crusius, I.H.; Comasseto, J.V.; Andrade, L.H. (2005). Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 967-975.
- Ma Xiao-chi; Ye Min; Wu Li-jun; Guo De-an. (2006). Microbial transformation of curdione by *Mucor spinosus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 367-371.
- Mulinacci, N.; la Marca, G.; Innocenti, M.; Vincieri, F.F.; Crespi-Perellino, N.; Minghetti, A. (2005). Cell cultures of *Ajuga reptans* L. to bioconvert emodin and aloe-emodin: an HPLC/ESI/MS investigation. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 399-408.
- O'Leary, K.A.; Day, A.J.; Needs, P.W.; Mellon, F.A.; O'Brien, N.M.; Williamson, G. (2003). Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glycuronides 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. *Biochem. Pharmacol.*, 65, 479-491.
- Oliveira, E.J.; Watson, D.G. (2000). In vitro glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT1A9 microsomes. *FEBS Lett.*, 471, 1-6.
- Olivo, H.F.; Peeples, T.L.; Rios, M.Y.; Velazquez, F.; Kim, J.W.; Narang, S. (2003). Microbial C-hydroxylation and β -4-O-methylglucosidation of methylbenzamide 7-azanorbomane ethers with *Beauveria bassiana*. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 21, 97-105.
- Panke S.; Wubbots M. (2005). Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, 188-198.
- Purwar, J.R.; Sachan, G.C. (2006). Insect pest through entomogenous fungi: A review. *J. Appl. Bioscience*, 32 (1), 1-26.
- Van den Brink, H.J.M.; van Gorcom, R.F.M.; van den Hondel, C.A.M.J.J.; Punt, P.J. (1998). Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 23, 1-17.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoid. *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 829-837.
- Williams, R.J.; Spencer, J.P.E.; Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 838-849.
- Woude, H. van der; Boersma, M.G.; Vervoot, J.; Rietjens, I.M.C.M. (2004). Identification of 14 Quercetin Phase II Mono and Mixed Conjugates and Their Formation by Rat and Human Phase II in Vitro Model Systems. *Chem. Res. Toxicol.*, 17, 1520-1530.

MANUSCRITO - 1

***Beauveria bassiana*: QUERCETINASE
PRODUCTION AND GENETIC DIVERSITY**

Autores:

Eula Maria de Melo Barcelos Costa

Fabiana Cristina Pimenta

Christian Luz

Valéria de Oliveira

Marília Oliveira

Elda Bueno

Silvana Petrofeza

Situação: a ser submetido

MANUSCRITO - 2

Quercetin 2,3-dioxygenase gene expression and quercetin biotransformation in *Beauveria bassiana*

Autores:

Eula Maria de Melo Barcelos Costa

Fabiana Cristina Pimenta

Christian Luz

Valéria de Oliveira

Marília Oliveira

Elda Bueno

Silvana Petrofeza

Situação: submetido

RESULTADOS

7. RESULTADOS

- O isolado IP 94 produziu um número maior de metabólitos da quercetina quando comparado com os demais isolados.
- A cepa *B. bassiana* ATCC 7159 e os isolados IP 11 e IP 132 apresentaram atividade da quercetinase mais intensa.
- Os isolados IP 153 e IP 3a apresentaram atividade de quercetinase mais baixa.
- Todos os isolados foram capazes de sintetizar a enzima quercetinase em meio mínimo.
- No meio de cultivo PDSM utilizado para a biotransformação, a síntese de quercetinase foi superior em relação à síntese em meio mínimo.
- A formação dos metabólitos da quercetina e a produção de quercetinase aparentemente não estão relacionadas com a origem geográfica dos fungos estudados.
- A análise da variabilidade genética por meio de RAPD permitiu dividir os isolados em 03 grupos distintos e explicitou alta diversidade genética entre os isolados.
- A RFLP-PCR da região ITS demonstrou não ser um bom marcador para diferenciar os isolados.
- A análise da sequência da região ITS confirmou a identidade dos isolados como *Beauveria bassiana*.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- Isolados de *Beauverias bassianas* da região Centro-Oeste do Brasil constituem uma alternativa ao uso de métodos químicos e sistemas biológicos para a obtenção de metabólitos da quercetina.
- Isolados de *Beauverias bassianas* da região Centro-Oeste do Brasil são capazes de produzir metabólitos da quercetina similares aos metabólitos da quercetina produzidos por mamíferos.
- Isolados de *Beauverias bassianas* da região Centro-Oeste do Brasil são capazes de produzir a enzima querctinase.

PERSPECTIVAS

9. PERSPECTIVAS

- Otimização do modelo microbiano para aumentar o rendimento da formação de metabólitos da quercetina utilizando *B. bassianas* isoladas da região Centro-Oeste.
- Obtenção da enzima quercetinase visando sua utilização industrial.
- Estudos mais detalhados para elucidação da via de produção, regulação e mecanismo de ação da quercetinase em *B. bassiana*.
- Pesquisa da produção de outras enzimas pelos isolados.