



## BIOCONVERSÃO: UMA ALTERNATIVA SINTÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS DA NARINGINA E NARINGENINA

CUNHA, Carla Rosane Mendanha<sup>1</sup>, ALENCAR, Rodrigo Gomes<sup>2</sup>; DE OLIVEIRA, Valéria<sup>3</sup>

Palavras-chave: Flavonóides, Naringina, Naringenina, Bioconversão.

### 1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides constituem uma classe de polifenóis utilizados no cotidiano e possuem atividades biológicas bastante diversificadas, dentre essas as mais importantes são a capacidade antioxidante e antitumoral. Existe um consenso que estabelece que essas propriedades possuam correlação com a capacidade dos flavonóides de serem quelantes do ferro e seqüestradores de radicais livres, além de serem capazes de inibirem oxidases como a fosfolipase A2 (TRUEBA, 2005).

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

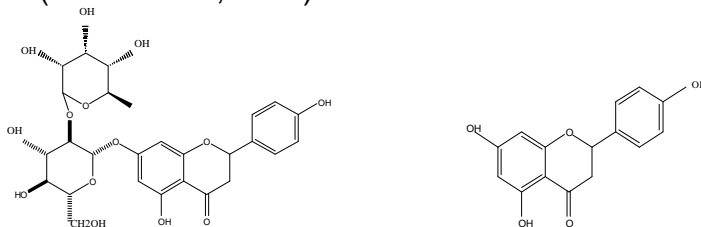


FIGURA1: Estrutura Química dos Flavonóides Naringina e Naringenina respectivamente

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 e ROSAZZA, 2006).

## 2. METODOLOGIA

Um  $\% \text{screening}$  de microrganismos da ordem *Mucorales* M4, M6, M8, M16, M18 e M20, pertencentes à coleção do Laboratório de Bioconversão foram mantidos em Ágar Batata (ACUMEDIA) a 4°C, e repicado em meio líquido  $\% \text{Batata Dextrose Soy Médium}$  (PDMS) composto por: Peptona (Synth), Dextrose (CRQ), Lecitina de soja (Inlab),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Synth), NaCl (Dinâmica), extrato de levedura (Vetec) e Água Destilada. Após a inoculação foram incubados sob agitação de 200 rpm e temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  em agitador rotativo por 65 horas. Naringina e Naringenina foram adicionados ao meio reacional dissolvido em etanol na concentração de 50mg/ml e manteve-se a incubação por 96h. Após 24, 48, 72 e 96 horas da adição da solução do substrato ao meio de cultura, alíquotas foram coletadas e o monitoramento foi realizado para avaliação da cinética de bioconversão por Cromatografia líquida de alta eficiência, no cromatográfico Gilson, com injetor Rheodyne de 20 l, coluna Lichrospher 100 RP 18 de 250 X 4mm com partículas de 5 m de diâmetro (MERCK), método gradiente utilizando Metanol : metanol/tampão Fosfato 0,02M 65:35, fluxo 0,8 mL/min , detector UV no  $\lambda$  de 280nm e cromatografia em camada delgada utilizando placas contendo sílica Alugram® Sil G/UV como fase estacionária e AcOEt/MeOH 70:30 como fase móvel e sendo reveladas por iodo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as cepas foram capazes de bioconverterem a Naringina e Naringenina em um período de 96h, produzindo quantidades variáveis de 1 a 6 metabólitos, detectados por CLAE e/ou CCD na análise do sobrenadante de incubação como apresentado no quadro 01A e B:

QUADRO 01A e B: Metabólitos da Naringina e Naringenina observados por CCD (utilizando placas cromatográficas contendo sílica Alugram® Sil G/UV como fase estacionária e AcOEt/MeOH 70:30 nas amostras do sobrenadante de 72 horas como fase móvel e como revelador Iodo e UV) .

### A

	Metabólito I	Metabólito II	Metabólito III	Naringina
LaBiocon M4	++	-	++	+++
LaBiocon M6	-	-	++	+
LaBiocon M8	-	-	++	+
LaBiocon M16	+++	++	++	+++
LaBiocon M18	-	-	++	+++
LaBiocon M20	-	-	++	+++

A bioconversão da naringina em 1 a 2 metabólitos foi observada utilizando as cepas acima. LaBiocon M16 foi capaz de produzir 3 compostos e apresentou uma cor alaranjada intensa no meio reacional. Por isso foi selecionada para o estudo em escala semi-preparativa.

### B

	Met I	Met II	Met III	Met IV	Met V	Met VI	Naringenina
LaBiocon M4	+	++	+++	-	-	-	+++
LaBiocon M6	-	++	+++	+	-	-	-

LaBiocon M8	-	++	+++	-	-	+	+++
LaBiocon M16	-	++	+++	-	+	-	++
LaBiocon M18	-	-	+++	-	-	+	++
LaBiocon M20	-	-	+++	-	-	-	++

Todas as cepas foram capazes de bioconverterem a naringenina de 1 a 3 metabólitos tendo um total de 6 compostos, mas que a cepa LaBiocon M6 foi a única capaz de metabolizar o substrato completamente em um período de 96h.

As cinéticas de formação dos metabólitos majoritários obtidos utilizando as cepas selecionada após estudo de bioconversão foram estabelecidas:

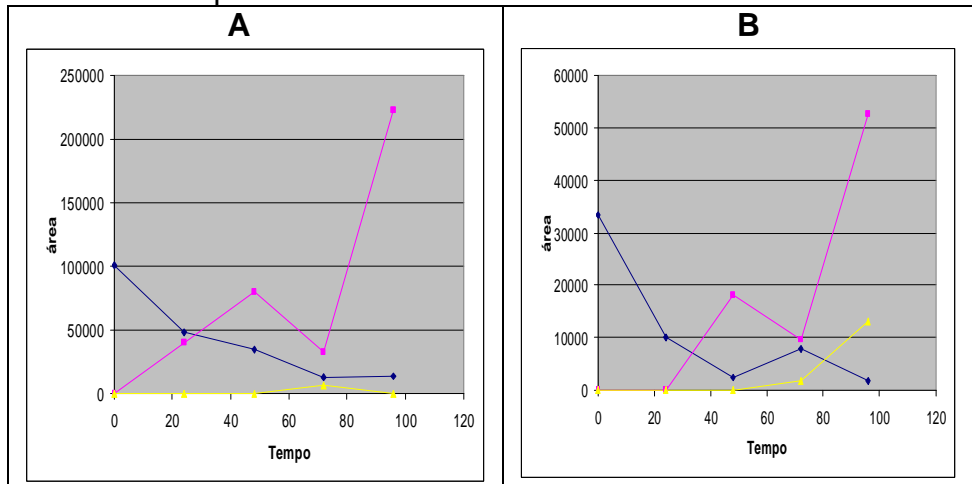


FIGURA 2: **A** Cinética de formação dos metabólitos da Naringina e **B** da Naringenina sendo o substrato está caracterizado em azul e os 2 principais metabólitos obtidos após a análise por CLAE coluna Lichrospher 100 RP 18-Merck(250X4,6mmX0,5 $\mu$ ) detecção no UV 280nm e fase móvel MetOH:MetOH/Tampão (65:35) estão representados em rosa e amarelo.

Um metabólito tanto da Naringina quanto da Naringenina foi observado apenas quando analisados por CCD em um comprimento de onda diferente dos demais metabólitos, não possibilitando estabelecer uma cinética de biotransformação para esses.

Fungos filamentosos vêm demonstrando serem capazes de promoverem funcionalização e/ou hidroxilação em flavonóides e produtos hidroxilados da naringina vêm apresentando atividade como agente anticâncer o que justifica a tentativa de sínteses por microrganismo de análogos hidroxilados da naringina.

#### 4. CONCLUSÃO

A bioconversão com as cepas LaBiocon M6 e M16 mostrou-se uma alternativa promissora para a produção de análogos da Naringina e Naringenina.

#### 5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

DAY et al. Conjugation position of Quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology & Medicine*. v.29, p.1234-1243, 2000.

FANG et al. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.40, p.454-459, 2006.

TRUEBA, R. P. Los Flavonoides: antioxidante e prooxidante. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. v.22, 2005.

<sup>1</sup> Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/ LaBiocon/ Faculdade de Farmácia/UFG, [carlarosane@yahoo.com.br](mailto:carlarosane@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Bolsista PIBIC/ LaBiocon/ Faculdade de Farmácia/UFG

<sup>3</sup> Orientador/Labiocon/ Faculdade de Farmácia/UFG, [valeria@farmacia.ufg.br](mailto:valeria@farmacia.ufg.br)