

Bioconversão de flavonóides por *Pycnoporus sp.* e avaliação dos parâmetros reacionais para produção de lacase

BATISTA, Francislene Lavor¹; **GARCIA**, Telma Alves²; **DE OLIVEIRA**, Valéria.¹

1. *LaBiocon/Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Faculdade de Farmácia-UFG, CP131, CEP 74605-220*

2 *Laboratório de Enzimologia, Faculdade de Farmácia-UFG, CP131, CEP74605-220, Goiânia-GO*

e-mail: francislanelavor@gmail.com

palavras-chave: *Pycnoporus sp*, lacase, flavonóides

1. Introdução

A bioconversão ou biotransformação é um campo da biotecnologia que tem crescido extensamente. É um processo que inclui biocatálises enzimáticas por meio de microrganismos, e que tem tido grande progresso por meio do isolamento, do “screening” e da caracterização dos microrganismos e de suas enzimas (KAUL *et al.*, 2004).

Os flavonóides são compostos naturais que, em estudos recentes, apresentaram diversas atividades tais como antioxidantes, antitumorais entre outras (ROSAZZA, 2006). Naringina é um flavonóide presente em frutas cítricas e é utilizada tradicionalmente na medicina chinesa como antiinflamatório e antioxidante, já a aglicona naringenina inibe a proliferação de células cancerosas (FANG *et al.*, 2006).

O *Pycnoporus sp.* é um basidiomiceto da família Polyporaceae e, assim como outros fungos lignolíticos, é bastante estudado principalmente pela produção de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase (ESPOSITO, 1993). O objetivo deste trabalho é avaliar a influência dos flavonóides na produção de lacase por *Pycnoporus sp.* em diferentes meios de cultura.

2. Material e Métodos

2.1 Meios de cultura

Meio de produção de lacase (MPL) : Extrato de malte 1,25 % (p/v), CuSO₄.5H₂O 0,0005 % (p/v) e água destilada q.s.p.

Meio ágar batata dextrose (BDA) : Foi utilizado o meio de cultura sólido comercial Acumedia à temperatura ambiente (25 °C) – Meio de manutenção do fungo.

Meio descrito por RAMA, 1998: Maltose 20g, Tartarato de amônio 1,84g, Tartarato de sódio 2,3g, KH_2PO_4 1,33g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,046g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,035g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,007g, Extrato de levedura 1g e água destilada q.s.p.200mL.

Peptone Dextrose Soybean Meal (PDSM): Peptona bacteriológica 1,5g, Lecitina de soja 1,5g, Fosfato de potássio monobásico 1,5g, NaCl 1,5g, Dextrose 6g, Extrato de Levedura 0,9g e água destilada q.s.p. 300mL.

2.2 Ensaio enzimático

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação da seringaldazina (Sigma Chemical Company) a 525 nm ($\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), durante 5 min. (LEONOWICZ & GRZYWNOWICZ, 1981). A mistura de reação conteve em 1mL: 0,30 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0; 0,6 mL de extrato enzimático diluído quando necessário e 0,1 mL de seringaldazina 1 mM. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto.

2.3 Experimento 1

Para investigar o efeito dos flavonóides no crescimento do fungo e produção de lacase pelo mesmo, o *Pycnoporus sp.* (10 discos retirados da região mais recente de crescimento do fungo em meio BDA, com o auxílio da pipeta de Pasteur) foi inoculado em 8 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura descrito por Rama, 1998. Foram avaliados os 4 flavonóides na concentração de 0,5g/L. A inoculação do *Pycnoporus sp.* e dos flavonóides foram simultâneas, sendo feito em duplicata para cada um dos flavonóides. O meio líquido foi mantido a 30 °C sob agitação constante de 120rpm.

Foram retiradas alíquotas após 1h, 2h, 3h, 24h e 48h de incubação. Foi realizada uma mini-extração.

2.3.1 Experimento 2

Foram avaliados os três meios de cultura: MPL, PDSM e o meio descrito por (RAMA, 1998). Utilizou-se os flavonóides naringina e naringenina na concentração de 0,5g/L que foram inoculados após 65h de incubação do *Pycnoporus sp.* As condições reacionais foram de 30 °C e 120rpm.

Foram retiradas alíquotas de 24, 48, 72 e 96h. Após 96h foi realizada a extração. Primeiramente o micélio foi separado por filtração à vácuo. Em seguida o micélio foi extraído com acetona por 3h. .

O sobrenadante de incubação foi supersaturado com NaCl. Em seguida filtrado à vácuo utilizando-se uma camada de celite sobre o filtro de papel. Realizou-se então a extração desta fração aquosa com acetato de etila.

O conteúdo das frações cetônica e acetato de etila foram analisadas por CCD, utilizando placas de sílica gel ALUGRAM® SIL G/UV Macherey-Nagel, tendo acetato de etila/metanol como fase móvel (95:05 ou 70:30), luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm como detector, atmosfera de iodo, ácido fosfomolibdico e reagente sulfavanílico como reveladores.

A atividade de lacase será determinada pela oxidação do substrato (seringaldazina), sendo essa oxidação acompanhada por 5 minutos. Sendo a oxidação do substrato acompanhada espectrofotometricamente a 525nm.

2.3.2 Experimento 3

Foi realizada uma escala semi-preparativa com o meio descrito por Rama utilizando apenas o flavonóide naringina. As condições reacionais foram de 30°C e 120rpm. Adição do flavonóide foi após 65h de incubação e a concentração de 0,5g/L.

2.3.3 Experimento 4

Foram utilizados o MPL, PDSM e o meio descrito por Rama. As condições reacionais foram de 30°C e 150rpm. A adição do substrato foi após 65h. Os flavonóides utilizados neste experimento foram a naringina e naringenina.

3. Resultados e Discussão

Os três meios de cultura propiciaram o crescimento do *Pycnoporus sp.* A morfologia do fungo variou de “pellets” pequenos a pequeníssimos e massa amorfa. Houve a produção de lacase e metabólitos. A produção de lacase foi mais evidenciada no meio descrito por (RAMA, 1998) e no MPL.

4. Conclusões

- Os três meios propiciaram o crescimento do *Pycnoporus sp.*
- O *Pycnoporus sp.* formou possíveis metabólitos.
- A produção de lacase foi mais evidenciada no meio descrito por (RAMA, 1998) e no MPL.

5. Referências Bibliográficas

- ESPOSITO, E., INNOCENTINI-MEI, L. H., FERRAZ, A., CANHOS, V. P. & DURAN, N. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain): applications. **Journal of Biotechnology**. 29:219-228, 1993.
- 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.
- GARCIA, T. A. Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*. Brasília, 2006, p.21. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- KAUL, P.; BANERJEE, A.; BANERJEE, U. C. Opportunities for the pharmaceutical industry: key biotransformation technologies of the future. **Drug Discovery World**. Spring Ed., p. 80-86, 2004.
- LEONOWICZ, A., GRZYWNOWICZ, K, Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**. 3: 55 – 58, 1981.
- MANOSROI, A.; ABE, M.; MANOSROI, J. Biotransformation of stereoidal drugs using microorganisms screened from various sites in Chiang Mai, Thailand. **Bioresource Technology**.69:67-73, 1999.
- RAMA, R.; MOUGIN, C.; BOYER, Francois-Didier.; KOLLMANN, A.; MALOSSE, C.; SIGOILLOT, Jean-Claude. Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. **Biotechnology Letters**, v.20, p. 1101-1104, 1998.
- ROSAZZA, J. P. N.; SHUVENDU, D. **Journal of Natural Products**.v.69, p. 499-508, 2006.