



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás

Faculdade de Farmácia



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

PAULA LETÍCIA DE MELO SOUZA

**N-GLICOSILAÇÃO DE 5-(1-(3-FLUOROFENIL)-1H-PIRAZOL-4-IL)-1H-
TETRAZOL CATALISADA POR CÉLULAS FÚNGICAS LIVRES E
IMOBILIZADAS DE *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244**

Goiânia

2015

PAULA LETÍCIA DE MELO SOUZA

N-GLICOSILAÇÃO DE 5-(1-(3-FLUOROFENIL)-1H-PIRAZOL-4-IL)-1H-TETRAZOL CATALISADA POR CÉLULAS FÚNGICAS LIVRES E IMOBILIZADAS DE *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244

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

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof.^a Dra. Valéria de Oliveira

Goiânia

2015

"Procurai com zelo os melhores dons e eu vos mostrarei um caminho ainda mais excelente".

1 CORINTIOS 12 :31

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais.

À Professora Valéria de Oliveira, pela confiança, pela oportunidade e pelo incentivo.

Aos professores da Faculdade de Farmácia - UFG e do Instituto de Química - UFG, pelas orientações e ensinamentos.

Aos amigos do Labiocon e do LQFM, pela parceria.

Especialmente a Kelly e Thaís, pela compreensão, pela amizade e pelas palavras de apoio. Obrigada por sonharem comigo.

RESUMO

As biotransformações são ferramentas poderosas para otimização de compostos ativos, modificação e diversificação estrutural, além da manipulação de compostos não-funcionalizados inviável por métodos químicos tradicionais. A versatilidade dos sistemas microbiano, nesse contexto, e as inúmeras vantagens atribuídas aos fungos filamentosos alavancaram o uso das biotransformações com microorganismos. As glicosilações são um dos mais importantes e comuns processos de modificação e o uso de biocatalisadores tem configurado uma estratégia favorável a esse tipo de reação. Espécies de *Cunninghamella*, por seu arsenal enzimático, são extensamente aplicadas, principalmente por viabilizarem a produção de novos derivados de fármacos e a imobilização celular é evidenciada como uma estratégia para expressar essa atividade enzimática. Frente à relevância dos aminoaçúcares e seu enorme potencial terapêutico, o objetivo deste estudo foi produzir derivados do 5-(1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-tetrazol (LQFM 021), que contém anéis tetrazólico e pirazólico, a partir da biotransformação por células fúngicas livres e imobilizadas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Para tanto, foram desenvolvidas metodologias para análise da cinética de biotransformação do LQFM 021, bem como empregadas técnicas de caracterização (Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas com Ressonância Ciclotrônica de Íons (FTICR-MS) do produto obtido. Foram realizadas incubações de 96 horas com células livres de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, em meio de cultura PDSM e com células imobilizadas em três experimentos distintos: biofilme incubado em tampão PBS, biofilme incubado em meio de cultura PDSM e reutilização dos biofilmes, em que foi obtido um derivado do LQFM 021. A proposta estrutural para o derivado obtido, purificado em quantidades suficientes, é de um 1-(5-(1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)-2*H*-tetrazol-2-il)pentano-1,2,3,4,5-pentanol.

Palavras-chave: Biotransformação, *Cunninghamella echinulata*, tetrazóis, *N*-glicosilação

ABSTRACT

Biotransformations are powerful tools for optimization of active compounds, diversification and structural modifications, in addition to handling non-functionalized compounds unfeasible by chemical conventional methods. The versatility of microbial systems, in this context, and the numerous entitlements of filamentous fungi have leveraged the use of biotransformations with microorganisms. Glycosylations are one of the most important and common modification processes and the use of biocatalysts have set a favorable strategy to this type of reaction. *Cunninghamella* species, for its enzymatic arsenal, are widely applied, especially for enabling the production of novel drug and cell immobilization has been evidenced as a tool to express its enzymatic activity. Considering the relevance of amino sugars and their enormous potential in various therapies, the aim of this study was to produce 5-(1-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1*H*-tetrazole (LQFM 021) derivatives, which contains tetrazole and pyrazole rings, by biotransformation with free and immobilized fungi cells of *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Therefore, CLAE methodologies were developed for the analysis of biotransformation kinetics and characterization techniques employed (Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry with Ion cyclotron Resonance (FTICR-MS)) of the product. 96-hour incubations were proceeded with free cell *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, in the PDSM culture medium and immobilized cells in three separate experiments: biofilm incubated in PBS buffer, biofilm incubated in PDSM medium culture and reuse of biofilms, where one derivative was obtained. The structural characterization for the purified derivative obtained in sufficient quantities is a 1-(5-(1-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-2*H*-tetrazol-2-yl)pentane-1,2,3,4,5-pentanol.

Keywords: Biotransformation, *Cunninghamella echinulata*, tetrazoles, *N*-glycosylation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hidroxilação da progesterona catalisada por <i>Rhizopus nigricans</i>	16
Figura 2 - Mecanismo geral de formação da ligação glicosídica	18
Figura 3 - Exemplar de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, da coleção de cepas do Laboratório de Bioconversão – Labiocon	22
Figura 4 - Derivados glicosilados obtidos a partir de flavonoides (quercetina e 3-hidroxi-flavona) por espécies de <i>Cunninghamella</i>	23
Figura 5 - Biotransformação de nandrolona por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e <i>Cunninghamella blakesleeana</i> ATCC 8688A (121 rpm e 26 ± 2 °C).....	24
Figura 6 - Biotransformação de (L)-citronelal em (L)-citronelol por <i>Rhodotorula minuta</i> imobilizada	26
Figura 7 - Heterociclo de cinco membros contendo quatro átomos de nitrogênio.....	28
Figura 8 - Heterociclos de cinco membros com dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbonos adjacentes	28
Figura 9 - Esquema da hibridação molecular entre milrinona e cilostazol	29
Figura 10 - Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional da incubação com células livres	37
Figura 11 - Espectrograma na região do UV do substrato LQFM 021, em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.....	41
Figura 12- Espectro de massas FTICR-MS do LQFM 021.....	42
Figura 13 - Perfil cromatográfico do substrato LQFM 021 0,04 mg/mL (em metanol), em 220 nm	43
Figura 14 - Perfil cromatográfico do substrato LQFM 021 0,04 mg/mL (em metanol), em 270 nm	44
Figura 15 - Aspectos morfológicos dos micélios livres de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	45
Figura 16 - Biofilmes de fungos filamentosos desenvolvidos no Labiocon que apresentaram crescimento exacerbado de hifas aéreas e crescimento desuniforme	46
Figura 17 - Aspecto morfológico das cepas de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 imobilizadas em molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo	47
Figura 18 - Halo de crescimento formado durante incubação com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 livre	48

Figura 19 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada das Frações Acetato de Etila, Cetônica e Metanólica das incubações com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, cultivada livremente, eluída MeOH:AcOEt 70:30 e revelada com luz UV (254 nm);	49
Figura 20 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, cultivada livremente, após período de 96 horas de incubação	51
Figura 21 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, cultivada livremente, após período de 96 horas de incubação	52
Figura 22 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com biofilmes de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, incubados com tampão PBS, após período de 96 horas de incubação.....	53
Figura 23 – Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com biofilmes de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, incubados com meio de cultura PDSM, após período de 72 horas de incubação (A); Perfil cromatográfico do substrato LQFM 021 0,04 mg/mL (em metanol) (B).....	55
Figura 24 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com biofilmes reutilizados de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, após período de 96 horas de incubação.....	57
Figura 25 – Análise por Cromatografia em Camada Delgada da purificação do extrato bruto de incubação (Fração Cetônica) com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, eluída DCM:MeOH 90:10 e revelada com luz UV (254 nm)	59
Figura 26 - Espectro de massas do Labiocon 436	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistemas cromatográficos isocráticos testados para as análises do substrato LQFM 021 e das alíquotas de incubação para monitoramento da cinética de biotransformação	33
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cinética de biotransformação do LQFM 021 por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, cultivada livremente.....	52
Gráfico 2- Cinética de biotransformação do LQFM 021 por biofilme de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, incubado com tampão PBS	54
Gráfico 3 - Cinética de biotransformação do LQFM 021 por biofilme de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, incubado com meio de cultura PDSM	56
Gráfico 4 - Cinética de biotransformação do LQFM 021 por biofilme reutilizado de <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, incubado com meio de cultura PDSM.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de RMN ^1H (500 MHz) do LQFM 021, em DMSO-d_6	42
Tabela 2 - Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H ((500 MHz) $\text{DMSO-d}_6/\text{TMS}$ (δ ppm)) do LQFM 021 e Labiocon 436	60
Tabela 3 - Sinais evidenciados baseados em ^1H - ^{13}C HSQC/HMBC ($\text{DMSO-d}_6/\text{TMS}$ (δ ppm)) do LQFM 021 e Labiocon 436	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NRC	4-nerolidilcatecol
AS	<i>American strain</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B.O.D.	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYP	Citocromo P450
DCM	Diclorometano
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FTICR-MS	<i>Fourier Transformation Ion Cyclotron Ressonance Mass</i>
HEW	<i>Hen Egg White</i> (clara de ovo)
Labiocon	Laboratório de Bioconversão
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
NaTFA	<i>Sodium trifluoro-acetate</i>
NCIM	<i>National Collection of Industrial Microorganisms</i>
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDE	Fosfodiesterase
PDMS	<i>Potato dextrose soy médium</i>
PEI	Polietilenoimina
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
TMS	Tetrametilsilano
TOF	<i>Time-of-flight</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	BIOTRANSFORMAÇÃO	15
1.2	REAÇÕES DE GLICOSILAÇÃO	17
1.2.1	Glicosilações Microbianas	20
1.3	REAÇÕES COM ESPÉCIES DE <i>Cunninghamella</i>	21
1.4	IMOBILIZAÇÃO CELULAR	25
1.5	TETRAZÓIS E PIRAZÓIS	27
1.5.1	LQFM 021	29
2	OBJETIVOS	30
2.1	GERAL	30
2.2	ESPECÍFICOS	30
3	METODOLOGIA	31
3.1	SUBSTRATO	31
3.1.1	Espectroscopia na região do UV	31
3.1.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
3.1.3	Espectrometria de Massas com Ressonância Ciclotrônica de Íons (FTICR-MS)	31
3.1.4	Desenvolvimento de metodologia analítica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	32
3.2	MANUTENÇÃO E REPIQUE DA CEPA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO	33
3.3	PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL	33
3.3.1	Cultivo de células livres em meio de cultura líquido	33
3.3.2	Cultivo de células imobilizadas em meio de cultura líquido	34
3.4	INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO	34
3.4.1	Células livres	34
3.4.2	Células imobilizadas	34
3.4.2.1	Experimento 1: Incubação com Tampão PBS	34
3.4.2.2	Experimento 2: Incubação com meio de cultura PDSM	35
3.4.2.3	Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM	35
3.5	EXTRAÇÃO	36
3.5.1	Incubação com células livres	36
3.5.2	Incubação com células imobilizadas	37
3.5.2.1	Experimento 1: Incubação com tampão PBS	37
3.5.2.2	Experimento 2: Incubação com meio de cultura líquido PDSM	37
3.5.2.3	Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM	38
3.6	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE BIOTRANSFORMAÇÃO	38
3.7	PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS	38
3.7.1	Incubação com células livres	38
3.7.2	Incubação com células imobilizadas	39
3.7.2.1	Experimento 1: Incubação com tampão PBS	39
3.7.2.2	Experimento 2: Incubação com meio de cultura líquido PDSM	39
3.7.2.3	Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM	39
3.8	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	SUBSTRATO	41
4.1.1	Espectrometria na região do UV	41
4.1.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	41
4.1.3	Espectrometria de Massas com Ressonância Ciclotrônica de Íons (FTICR-MS)	42

4.1.4	Desenvolvimento de metodologia analítica de Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE)	43
4.2	MANUTENÇÃO E REPIQUE DA CEPA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO	44
4.3	PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL	44
4.3.1	Cultivo de células livres em meio de cultura líquido	44
4.3.2	Cultivo de células imobilizadas em meio de cultura líquido	45
4.4	INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO	48
4.5	EXTRAÇÃO	49
4.5.1	Células livres	49
4.5.2	Células imobilizadas	50
4.5.2.1	Experimento 1: Incubação com tampão PBS	50
4.5.2.2	Experimento 2: Incubação em meio de cultura líquido PDSM	50
4.5.2.3	Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM	50
4.6	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE BIOTRANSFORMAÇÃO	50
4.6.1	Células livres	50
4.6.2	Células imobilizadas	53
4.6.2.1	Experimento 1: Incubação com tampão PBS	53
4.6.2.2	Experimento 2: Incubação com meio de cultura PDSM	55
4.6.2.3	Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM	56
4.7	PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS	58
4.7.1	Incubação com células livres	58
4.7.2	Incubação com células imobilizadas	59
4.8	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS	59
4.8.1	Incubação com células livres	59
5	CONCLUSÕES	64
	PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO

As biotransformações são ferramentas poderosas para otimização de compostos ativos, modificação e diversificação estrutural – além daquela observada em transformações metabólicas de mamíferos –, e manipulação de compostos não-funcionalizados inviável por métodos tradicionais. A geração de derivados é uma importante etapa no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, não só pelo esclarecimento das suas propriedades farmacológicas, mas pela inspiração de novas rotas sintéticas, expansão de matrizes de síntese orgânica e por percorrer entraves e desafios relacionados a segurança e toxicidade (LIU e YU, 2010; CUSACK, KOOLMAN *et al.*, 2013; MEI, WANG *et al.*, 2014).

As biotransformações microbianas tem sido empregadas em novos conceitos em engenharia genética de microorganismos e como alternativa a substratos de difícil solubilidade, por exemplo. Também há esforços para a imobilização de enzimas e células inteiras em matrizes, o desenvolvimento de processos contínuos para melhor recuperação do produto obtido e a manipulação de meios de cultura com o desígnio de melhorar a produção (BHATTI e KHERA, 2012).

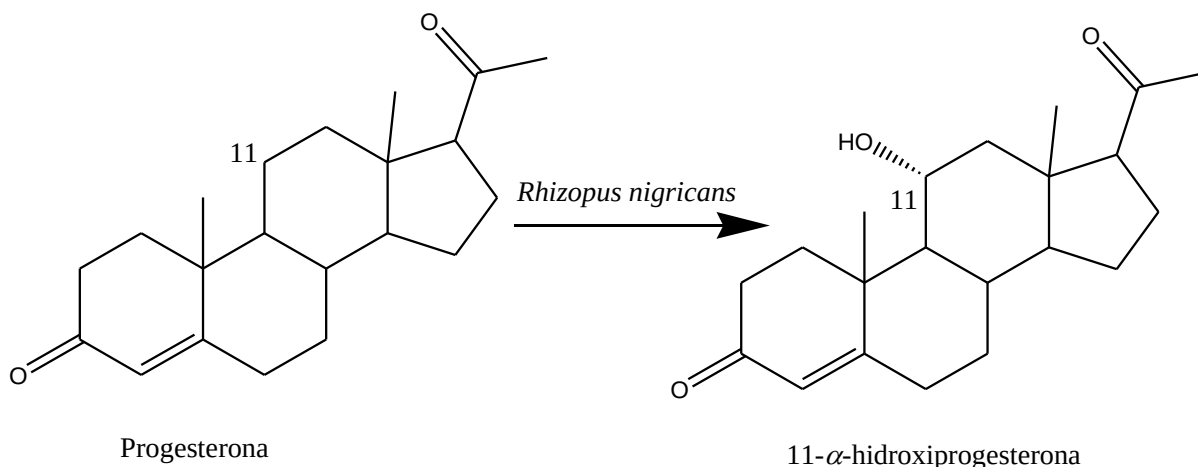
Nesse contexto, os microorganismos são fontes enzimáticas valiosas e vem demonstrando resultados prósperos na produção de novos compostos e candidatos a fármacos (BERTRAND, BOHNI *et al.*, 2014). Culturas microbianas fornecem atividades de enzima mais expressivas, estabilidade a longo prazo, facilidade no aumento de escala na preparação de derivados purificados, menores custos, sem necessidade de sistemas de regeneração, bem como apresentam manutenção simples e barata, triagem fácil e reprodutível e condições reacionais de incubação brandas (CUSACK, KOOLMAN *et al.*, 2013; PERVAIZ, AHMAD *et al.*, 2013).

Os fungos filamentosos são célebres em produzir uma ampla gama de enzimas em grande quantidade, sem exigências de meios de cultura onerosos, e realizar modificações estruturais com eficiência de exteriorização dos produtos. Dessa maneira, são largamente explorados na produção de derivados e compostos bioativos (WANG, RIDGWAY *et al.*, 2005; KRULL, WUCHERPFENNIG *et al.*, 2013).

A busca por compostos funcionalizados e técnicas que permitam e viabilizem a diversificação estrutural foram alavancadas na década de 50, quando Peterson e Murray

(1952) obtiveram o derivado ativo 11- α -hidroxilado a partir da biotransformação da progesterona com espécies de *Rhizopus* (Figura 1) (BHATTI e KHERA, 2012; CUSACK, KOOLMAN *et al.*, 2013).

Figura 1 - Hidroxilação da progesterona catalisada por *Rhizopus nigricans*



Fonte: Adaptado de Peterson e Murray (1952)

Desde então, a versatilidade dos sistemas microbianos na produção de derivados funcionalizados tem impulsionado a busca por tecnologias viáveis para a diversificação estrutural (BHATTI e KHERA, 2012; CUSACK, KOOLMAN *et al.*, 2013), sendo possível, ainda, a combinação de técnicas de biotransformação e química sintética para aqueles casos em que a biotransformação por si só não é capaz de permear, particularmente as estruturas heteronucleares (KRSTENANSKY e KHMELNITSKY, 1999).

Os terpenóides, por exemplo, tem sido amplamente submetidos a biotransformações, devido às suas características aromáticas e por suas insígnies atividades biológicas. Artemisinina, utilizada no tratamento da malária e de infecções cerebrais, foi bioconvertida em 10- β -hidroxi-artemisinina e 3- α -hidroxi-desoxiartemisinina por *Cunninghamella echinulata* AS 3.3400, *Aspergillus niger* AS 3.795 e *Penicillium chrysogenum* ATCC 9480. Nesse caso, desde sua descoberta, grandes esforços tem sido dedicados para a modificação estrutural e síntese de análogos, com o intento de desenvolver agentes antimaláricos mais potentes e com estabilidade *in vivo* melhorada (LIU e YU, 2010).

Paclitaxel, primeiramente isolado da casca de *Taxus brevifolia*, é um dos agentes mais efetivos contra o câncer e muito empregado no tratamento dos cânceres de ovário, mama e pulmão. A fim de obter novos derivados para reduzir efeitos colaterais e aumentar a

biodisponibilidade oral, mais de 500 microorganismos já foram triados frente sua habilidade de biotransformar o Taxol (LIU e YU, 2010).

A produção de fármacos esteroidais e precursores hormonais é um dos melhores exemplos da próspera aplicação de biotransformação em escala industrial, desempenhando um importante papel da geração de novos e mais potentes derivados. Os derivados glicosilados da bufalina foram obtidos a partir da biotransformação com *Mucor spinosus* AS 3.3540 e apresentaram atividades citotóxicas acentuadas, indicando que glicosilações e hidroxilações microbianas podem ser uma abordagem promissora para a obtenção de derivados mais polares com atividade melhorada (LIU e YU, 2010).

1.2 REAÇÕES DE GLICOSILAÇÃO

As glicosilações são um dos mais importantes e comuns processos de modificação molecular e compreendem as reações de formação de ligações glicosídicas por transferência de uma porção de açúcar de um substrato doador (geralmente os açúcares de nucleotídeos) aos compostos de partida ou substratos “aceitadores”, dando origem aos glicoconjugados (PALCIC, 2011b; THUAN e SOHNG, 2013; WANG, ZOU *et al.*, 2013).

Uma extensa variedade de processos bioorgânicos e bioquímicos está associada aos carboidratos e aos compostos contendo porções de carboidratos. Presentes livremente em todos os organismos vivos ou covalentemente ligados a outras estruturas e capazes de determinar ou alterar atividades biológicas, são responsáveis por formação de esqueletos biológicos, transporte de nutrientes (PELLISSIER, 2005; CIPOLLA, ARAUJO *et al.*, 2010; PALCIC, 2011b), manutenção da integridade celular, reconhecimento molecular e sinalização de informações biológicas, por exemplo, (SINGH, PHILLIPS *et al.*, 2012) e estão envolvidos na embriogênese, desenvolvimento neural, atividades hormonais e proliferação celular (PELLISSIER, 2005).

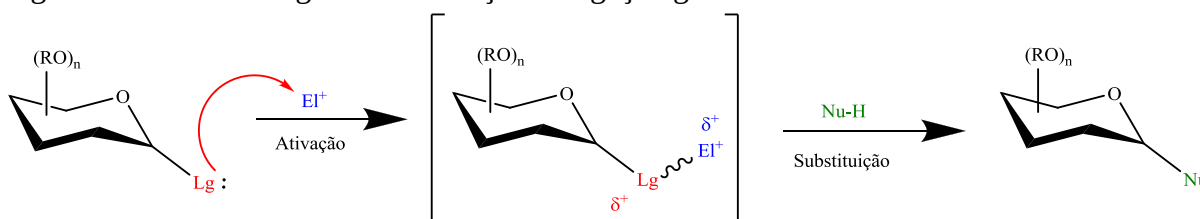
Dessa maneira, as glicosilações compõem uma estratégia viável na produção de compostos bioativos com atividade melhorada (WANG, ZOU *et al.*, 2013), podendo modificar substancialmente as propriedades farmacológica, farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos (GANTT, PELTIER-PAIN *et al.*, 2011; PALCIC, 2011a; THUAN e SOHNG, 2013; WANG, ZOU *et al.*, 2013).

A síntese orgânica clássica de oligossacarídeos e conjugados é exequível, no entanto requer múltiplas proteções e desproteções e etapas de purificação (PALCIC, 2011b). Roh e colaboradores (2012), por exemplo, realizaram as reações de sais de potássio de 5-fenil-1H-

tetrazol e 1*H*-tetrazol com brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -dglucopiranosil, em microondas, e metil 2,3,6-tri-*O*-benzil-4-*O*-triflilo- α -d-glucopiranósido com acetona em ebulição, e obtiveram uma mistura de isômeros de *N*-glicosídeos derivados de tetrazol.

A maioria dos métodos empregados está associada à formação da ligação glicosídica, já que essa é a principal maneira de construção dos blocos de monossacarídeos em oligossacarídeos (GALONIC e GIN, 2007). Na presença de um ativador eletrofílico, há a saída do grupo abandonador ligado ao carbono anomérico do carboidrato, que se torna extremamente deficiente de elétrons, permitindo, assim, a substituição nucleofílica por um grupamento alcoxila de um álcool (R-OH) ou um açúcar parcialmente protegido e/ou outras agliconas, formando o glicoconjugado (Figura 2) (PELLISSIER, 2005; GALONIC e GIN, 2007; WEIJERS, FRANSSEN *et al.*, 2008).

Figura 2 - Mecanismo geral de formação da ligação glicosídica



Fonte: Adaptado de Galonic e colaboradores (2007)

Na natureza, as reações de conjugação com açúcares – glicosilações, ribosilações e xilosilações, por exemplo – são uma estratégia contra a instabilidade e os efeitos tóxicos das agliconas livres, o que pode inspirar e direcionar, certamente, as bioproduções microbianas (TOMAZ e MARINA, 2010 ; ZHANG, FAURÉ *et al.*, 2013). Nesses casos, as glicosidases e as glicosiltransferases são as enzimas responsáveis por catalisar a formação das ligações glicosídicas (WEIJERS, FRANSSEN *et al.*, 2008).

As glicosidases, também conhecidas por glicosil hidrolases, geralmente, catalisam a clivagem da ligação glicosídica, mas podem, também, catalisar a formação desse tipo de ligação por uma reação hidrolítica reversa. Sua disponibilidade, robustez e tolerância a diferentes solventes orgânicos fazem-na enzimas sinteticamente interessantes. Uma limitação, no entanto, seriam os baixos rendimentos na formação dos glicosídeos (PELLISSIER, 2005; WEIJERS, FRANSSEN *et al.*, 2008; FABER, 2011).

As glicosiltransferases são responsáveis pela biossíntese, *in vivo*, da maioria dos conjugados glicosídicos de superfície celular. São altamente específicas no que se refere ao substrato e à natureza da ligação glicosídica a ser formada. Uma das maiores vantagens da

utilização dessa classe de enzimas, frente às glicosidases, é a complexidade dos glicoconjugados formados (PELLISSIER, 2005; WEIJERS, FRANSSEN *et al.*, 2008; FABER, 2011).

Estão localizadas nas superfícies celulares, onde são encontrados, também, inúmeros oligossacarídeos e nucleotídeos. Nesses espaços, acontecem as transferências das unidades de açúcar e o substrato, agora mais polar é, então, externalizado (LANGENHAN e THORSON, 2005; PALCIC, 2011b).

Tais reações são, em sua grande maioria, régio e estereoespecíficas, e a transferência do carboidrato pode ocorrer com a manutenção ou inversão da configuração do carbono anomérico. A classificação enzimática é fundamentada no glicosil-doador requerido pela enzima, na posição e na estereoquímica de transferência (PALCIC, 2011b).

Glicoconjugados são conhecidos pelo seu grande valor medicinal. Heterociclos acoplados a unidades de carboidratos através de ligações C-C apresentam elevado potencial quimioterapêutico, além de representarem um amplo espectro de atividades biológicas, tais quais as antitumorais e antivirais. Já as unidades de açúcares acoplados a heterociclos contendo átomos de nitrogênio, a exemplo dos tetrazóis, através de *N*-glicosilações, podem exercer um papel fundamental na Química Medicinal (KALE, PRASAD *et al.*, 2012).

A relevância de grupamentos amino ligados a carboidratos, em especial, e seu enorme potencial frente a diversas terapias, aliadas à escassez de fontes naturais e acessíveis de aminoaçúcares, tornam os métodos de reações diretas e em condições brandas essenciais (KOLDOBSKII, 2006; NICOTRA, FERLA *et al.*, 2008; KALE, PRASAD *et al.*, 2012).

Essa classe de compostos pode, ainda, servir de substratos para *N*-glicuronidação de xenobióticos, uma importante via de detoxificação biológica. Após a administração oral de um derivado de tetrazol, por exemplo, *N*-glicuronídeos foram identificados na urina de animais. *N*-glicosídeos de tetrazóis também tem sido usados no desenvolvimento de fármacos contra infecção viral (KALE, PRASAD *et al.*, 2012).

A diversidade do espaço químico acessível aos carboidratos é bastante expressiva e as potencialidades da terapia neles baseada são vastas, o que contribui indubitavelmente para um considerável conjunto de funções biológicas, hajam vistas a versatilidade, a abundância e a atrativa diversidade de papéis em sistemas biológicos dessa classe de compostos. Entretanto, há ainda limitações sintéticas no que se refere a eficácia e conveniência das técnicas de glicosilação (GRIFFITH, LANGENHAN *et al.*, 2005; PELLISSIER, 2005; CIPOLLA, ARAUJO *et al.*, 2010; GE, ZHANG *et al.*, 2012).

Soluções baseadas em métodos químico-enzimáticos, mediadas pelas glicosiltransferases, começaram a ser empregadas. No entanto, o uso desse tipo de enzima está, inevitavelmente, associado ao uso de açúcares de nucleotídeos, que, por sua vez, são altamente onerosos, e grandes quantidades desses compostos ainda não estão comercialmente disponíveis (PELLISSIER, 2005; WEIJERS, FRANSSEN *et al.*, 2008; CIPOLLA, ARAUJO *et al.*, 2010).

1.2.1 Glicosilações Microbianas

O uso de biocatalisadores tem configurado, então, uma estratégia favorável às glicosilações. Microorganismos, células vegetais e culturas de tecidos de mamíferos são capazes de glicosilar substratos exógenos com seu próprio arsenal enzimático e tem sido extensivamente empregados como ferramentas para a biossíntese de compostos ativos (CHEN, ZHANG *et al.*, 2010; WANG, ZOU *et al.*, 2013).

As glicosilações microbianas já foram bastante relatadas na literatura e se mostraram mais vantajosas do que as bioconversões utilizando células vegetais e de mamíferos, frente a sua alta seletividade, simplicidade, condições reacionais brandas e em menor número de etapas. Nesses casos, ainda, a mediação por glicosiltransferases e glicosidases se mostrou uma interpretação plausível (WILLIAMS e DAVIES, 2001; PELLISSIER, 2005; CHEN, ZHANG *et al.*, 2010).

Essas enzimas estão presentes universalmente em todos os domínios de organismos (de Archae a Eucariontes). Nos microrganismos, elas englobam as conversões de biomassa; nos animais, estão envolvidas nas quebras de glicolipídeos e de glicosídeos exógenos; e, nos vegetais, participam da lignificação, da liberação de aroma e da ativação de fitormônios, por exemplo (KETUDAT CAIRNS e ESEN, 2010).

Chen e colaboradores (2010) reportaram a conversão da ruscogenina em seu produto glicosilado por *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086. Quimicamente, a obtenção do glicosídeo derivado dessa saponina requer 12 etapas reacionais, com baixo rendimento global da reação. Assim sendo, a glicosilação, em uma única etapa, catalisada por tal fungo filamentoso mostrou-se efetiva e prática.

Derivados glicosilados também foram obtidos, mais rentavelmente, a partir da glicosilação microbiana regioseletiva do xantohumol pelos fungos filamentosos *Absidia coerulea* AM93, *Rhizopus nigricans* UPF701, *Mortierella mutabilis* AM404 e *Beauveria bassiana* AM446. Os piranosídeos apresentaram atividades antioxidante e antiproliferativa

melhoradas quando comparados com o composto de partida (TRONINA, BARTMANSKA *et al.*, 2013).

Kim e colaboradores (2006) estudaram o metabolismo também do xantohumol a partir do modelo microbiano com *Penicillium chrysogenum* e *Cunninghamella elegans* var. *elegans*. Foram fornecidos três novos metabólitos glicosilados.

No estudo de bioconversão do 4-nerolidilcatecol (4-NRC) por espécie de *Cunninghamella*, Cordeiro e colaboradores (2013) obtiveram o 4-NRC glicosídeo, cujo composto de partida, provavelmente, sofreu ação de glicosidases fúngicas para a reação direta. Tal enzima também foi apontada como mediadora da glicosilação microbiana do entacapone por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 (LUSTOSA, MENEGATTI *et al.*, 2012).

Gliocladium deliquescens NRRL1086, notadamente conhecido por sua capacidade de glicosilação de produtos naturais, foi empregado na biotransformação de tetrahidroprotoberberinas, em que foram obtidos, também, dois glicosídeos (GE, ZHANG *et al.*, 2013).

1.3 REAÇÕES COM ESPÉCIES DE *Cunninghamella*

Cunninghamella é um gênero de fungo filamentoso, estabelecido por Matruchot em 1903, da família Cunninghamellaceae, e um dos mais comuns da Ordem Mucorales, encontrado em solos, plantas e outros substratos orgânicos, especialmente em áreas mediterrâneas e subtropicais. Suas colônias apresentam crescimento rápido, micélio algodonoso e variação de cor entre branco, cinza e marrom (Figura 3) (SHIOSAKI, OKADA *et al.*, 2001; VASCONCELOS, RIOS *et al.*, 2003; MARINHO, 2004; ASHA e VIDYAVATHI, 2009).

Espécies de *Cunninghamella* tem sido empregadas satisfatoriamente como modelos em estudos *in vitro* do metabolismo de mamíferos, pela sua habilidade em catalisar regio e estereoseletivamente reações envolvendo xenobióticos, a exemplo das reações de Fase I e II, e pela sua extensa miscelânea enzimática, similar àquela verificada em mamíferos, bem como viabilizar a produção de novos derivados de fármacos (MA, HUANG *et al.*, 2007; ASHA e VIDYAVATHI, 2009; SUN, MAN *et al.*, 2009; ZI, VALIENTE *et al.*, 2011).

Figura 3 - Exemplar de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, da coleção de cepas do Laboratório de Bioconversão – Labiocon



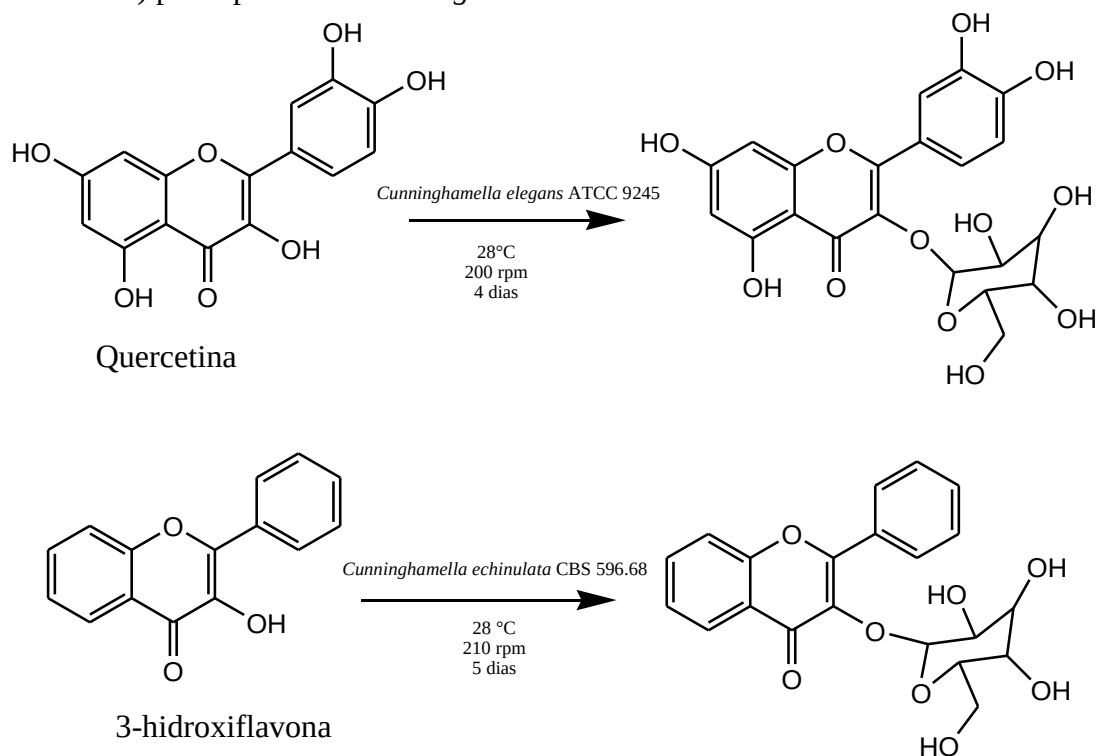
Fonte: Arquivo pessoal

Além disso, tem sido extensivamente submetidas a reações de biotransformação e sendo descritas como uma importante ferramenta para a obtenção de compostos com atividade farmacológica melhorada e uma alternativa a obtenção e isolamento desses compostos a partir de administração em animais e às condições, muitas vezes, hostis e/ou inviáveis da síntese química (AZERAD, 1999; AMADIO, GORDON *et al.*, 2010; LUSTOSA, MENEGATTI *et al.*, 2012; PALUDO, SILVA-JUNIOR *et al.*, 2013).

Às espécies de *Cunninghamella* tem sido atribuídas reações de glicosilação, hidroxilação e desidroxilação, O-metilação e N-oxidação, por exemplo (ZENG, GAGE *et al.*, 2012).

Zi e colaboradores (2011) e Miyakoshi e colaboradores (2010) reportaram o uso de espécies de *Cunninghamella* na biotransformação de flavonoides, como a quercetina e o 3-hidroxiavona, distintamente conhecidos por suas atividades biológicas, e obtiveram derivados glicosilados, esquematizados na Figura 4. Também foi atribuída à *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 a capacidade de transformar a rutina, um outro tipo de flavonoide, em derivados sulfatados, glucuronidados e metilados (ARAUJO, DE *et al.*, 2013).

Figura 4 - Derivados glicosilados obtidos a partir de flavonoides (quercetina e 3-hidroxi-flavona) por espécies de *Cunninghamella*



Fonte: Adaptado de Zi e colaboradores (2011) e Miyakoshi e colaboradores (2010)

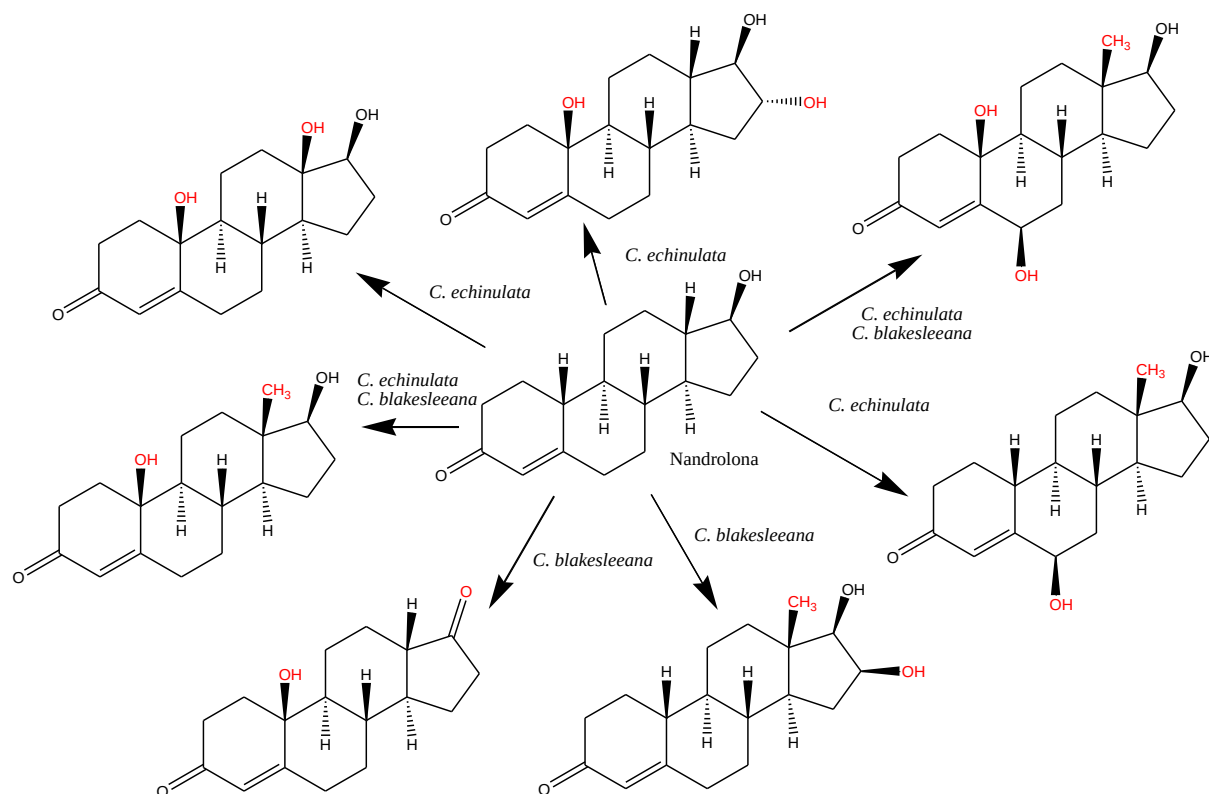
Cunninghamella echinulata e *Cunninghamella blakesleeana* foram empregadas na biotransformação do fármaco nandrolona, um anabolizante esteroidal, utilizado também no tratamento de ansiedade e perda de memória. Nesse trabalho, foram obtidos três derivados inéditos e outros quatro já descritos na literatura (Figura 5) (BAYDOUN, KARAM *et al.*, 2014).

Outro esteroide, a androsterona, também foi biotransformado por *Cunninghamella elegans*. Nesse estudo, foram caracterizados cinco derivados mais polares, sendo o primeiro relato do 9 α -hidroxilado (CHOUDHARY, KHAN *et al.*, 2007).

Moody e colaboradores (2002) estudaram a capacidade de biotransformação da *Cunninghamella elegans* frente a uma mistura racêmica de mirtazapina e seus enantiômeros puros. O fungo filamentoso foi capaz de biotransformar 91% do racemato em sete derivados e análises espectrais de dicroísmo circular da mistura indicaram que a porção não metabolizada pelo microorganismo era levemente enriquecida com o enantiômero *R*. O enantiômero puro *S*, quando submetido às mesmas condições reacionais, forneceu os mesmos metabólitos, enquanto que o enantiômero puro *R*, apenas quatro deles. Nesse estudo, ainda, a espécie de *Cunninghamella* utilizada foi apropriadamente um modelo microbiano do metabolismo

animal, visto que quatro desses metabólitos (8-hidroxiado, *N*-oxidado, demetilado e 13-hidroxiado) foram reportados em estudos em animais e humanos.

Figura 5 - Biotransformação de nandrolona por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688A (121 rpm e 26 ± 2 °C)



Fonte: Adaptado de Baydoun e colaboradores (2014)

Compostos com estruturas análogas à mirtazapina – amitriptilina, azatadina, amoxapina, ciproheptadina, doxepina e ciclobenzaprina – também foram submetidas a ensaios com *Cunninghamella elegans* e geraram metabólitos correspondentes aos 12-hidroximirtazapina, 13-hidroximirtazapina e *N*-desmetilmirtazapina. Tais metabólitos podem ser atribuídos à atividade enzimática da família CYP51 do citocromo P450, na *Cunninghamella elegans*, e às isoformas CYP2D6 e CYP1A2 e à família CYP3A, em humanos (MOODY, FREEMAN *et al.*, 2002).

Uma maneira de produzir enzimas fúngicas, principalmente quanto às glicosilações, é a imobilização celular. Logo, para maiores rendimentos, a técnica mostra-se bastante interessante (KAUSHIK e MALIK, 2009)

1.4 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A imobilização celular é o aprisionamento físico ou a localização de células intactas de microorganismos viáveis em uma região e/ou superfície definida, onde são preservadas suas propriedades catalíticas (KOURKOUTASA, BEKATOROUA *et al.*, 2004; COVIZZI, GIESE *et al.*, 2007). Geralmente, a imobilização mimetiza o crescimento natural das células microbianas em superfícies ou no interior de estruturas naturais e é habilidade da maioria dos microorganismos, já sendo relatada imobilização de células bacterianas, fúngicas e de leveduras (FREEMAN e LILLY, 1998; KOURKOUTASA, BEKATOROUA *et al.*, 2004).

Quando presas a matrizes, não há mudanças estruturais significativas nas células microbianas individuais. No entanto, os esporos tornam-se organizados em uma estrutura comum e passam a exibir novas características morfológicas e fenotípicas, bem como se tornam mais resistentes a estresses químicos, biológicos e/ou físicos (HARDING, MARQUES *et al.*, 2009).

A fixação pode se dar, naturalmente, por adsorção/adesão ou forças eletrostáticas das células microbianas em suportes sintéticos ou naturais, caracterizando a imobilização natural; ou artificialmente, em que a técnica requer ligações covalentes ou agentes ligantes (como glutaraldeído ou carbodiimida) e inclui encapsulação em matrizes/suportes, tais como o alginato de cálcio (COVIZZI, GIESE *et al.*, 2007; GENISHEVA, TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Tais comunidades microbianas associadas a superfícies, também conhecidas como biofilmes (AMADIO, CASEY *et al.*, 2013), biomassa fúngica, massas multicelulares e “tapetes” de micélio (HARDING, MARQUES *et al.*, 2009), são extensamente aplicadas como biocatalisadores em processos de biotransformação, principalmente pelo fato de “driblarem” entraves relacionados aos processos com células livres, tais quais o crescimento exagerado de biomassa, o que dificulta a homogeneização e aeração, a sua não reciclagem e a instabilidade a longo prazo (GROSS, HAUER *et al.*, 2007; GU, ZHOU *et al.*, 2013).

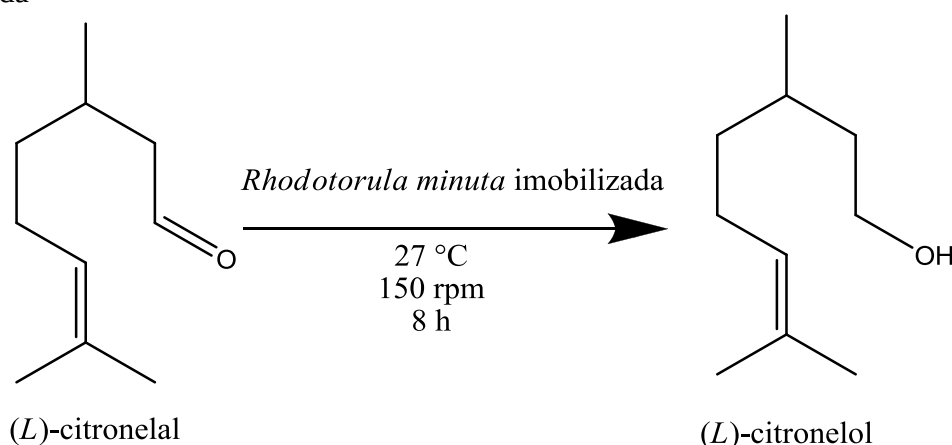
Resistência a compostos tóxicos, controle do crescimento microbiano, emprego em processos contínuos e descontínuos, robustez física, maior rendimento, flexibilidade no desenho do suporte/matriz imobilizadora, fácil extração e reuso das células, maior estabilidade dos microorganismos de crescimento lento e atividades enzimáticas mais expressivas em um período maior são vantagens associadas à biotransformação a base de biofilme (FREEMAN e LILLY, 1998; SEDARATI, KESHAVARZ *et al.*, 2003; GROSS, HAUER *et al.*, 2007). Apesar de muitas dessas características fazerem deles um problema em demais áreas, são muito proveitosos em biossíntese, biorremediação, indústria alimentícia e

tratamento de águas residuais e efluentes gasosos, por exemplo (GROSS, HAUER *et al.*, 2007; AMADIO, CASEY *et al.*, 2013).

Em contrapartida, vale salientar que a aplicação de imobilização celular nos processos biotecnológicos ainda continua limitada. Verificam-se, em alguns casos, condições não homogêneas de crescimento microbiano, o que dificulta a absorção de nutrientes; limitações na transferência de massa; rompimento da matriz imobilizadora; dificuldade de externalização dos produtos para o meio; e problemas de fornecimento de oxigênio, direcionando a técnica para processos anaeróbios (XAVIER, PICIOREANU *et al.*, 2003; WANG, RIDGWAY *et al.*, 2005). West e colaboradores (2001), na produção de pululana, imobilizaram *Aureobasidium pullulans* em cubos de ágar e alginato de cálcio e constataram o óbice na transferência de massa causada pela imobilização e o desprendimento de células do suporte imobilizador.

Células de *Rhodotorula minuta* NCIM 3359, todavia, foram imobilizadas, com êxito, em gel de agarose, clara de ovo (“Hen egg white (HEW)”), lã de vidro usando polietilenoimina (PEI), acrilamida e alginato e empregadas na biotransformação de (*L*)-citronelal em (*L*)-citronelol, esquematicamente representada pela Figura 6. Nesse estudo, reportou-se, ainda, o reuso das células imobilizadas e a imobilização foi considerada como alternativa à toxicidade do substrato (VELANKAR e HEBLE, 2003).

Figura 6 - Biotransformação de (*L*)-citronelal em (*L*)-citronelol por *Rhodotorula minuta* imobilizada



Fonte: Adaptado de Velankar e colaboradores (2003)

Trametes versicolor, um dos mais estudados basidiomicetos de podridão branca, por sua vez, foi imobilizado em malha de “nylon” montada sobre um deflector de metal no interior do biorreator. Anteriormente, já havia sido relatada a imobilização desse tipo de célula para a produção de enzimas ligninolíticas, porém, até a publicação do trabalho, não

havia sido empregada na transformação de clorofenóis. A imobilização, nesse caso, permitiria a substituição, prontamente, da biomassa “velha” por novos micélios já aprisionados, sem graves intervenções no processo (SEDARATI, KESHAVARZ *et al.*, 2003).

Biofilmes de *Aspergillus niger* ATCC 10864 foram desenvolvidos em tecido poliéster com pontos circulares como suporte e demonstraram um acréscimo de 50% na expressão da atividade da celulase, quando comparado com culturas células livres (VILLENNA e GUTIÉRREZ-CORREA, 2006). Seis outras espécies de *Aspergillus* foram imobilizadas em alginato de cálcio e co-imobilizadas com outras espécies de fungos e leveduras para a biotransformação de polidatina em resveratrol. Verificou-se, então, maiores rendimentos no processo e maiores atividades enzimáticas na co-imobilização (JIN, LUO *et al.*, 2013).

Na biotransformação de astragalosídeos em astragalosídeo IV, o fungo endofítico *Penicillium canescens* foi imobilizado em alginato de cálcio. As pérolas puderam ser, comodamente, reutilizadas por no mínimo treze execuções do processo, viabilizando a produção em grande escala (YAOA, LIUA *et al.*, 2014).

Na produção de ácido fumárico a partir da glicose, *Rhizopus arrhizus* foi imobilizado em fibra retangular com mesh de 3-4 mm atravessada longitudinalmente por um arame, formando um dispositivo circular. Constatou-se a formação satisfatória de biofilme por toda extensão da rede e oxigênio e nutrientes puderam transitar facilmente através da malha. Nessas circunstâncias, houve grandes melhorias de produtividade e redução nos custos e a produção em larga escala mostrou-se viável diante da imobilização (GU, ZHOU *et al.*, 2013).

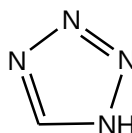
Amadio e colaboradores (2013) reportaram pioneiramente o cultivo e o emprego de biofilme de *Cunninghamella elegans*, imobilizada em molas de aço inoxidável mantidas em contato com o vidro dos frascos de cultivo, como biocatalisador na produção de metabólitos hidroxilados do fármaco flurbiprofeno.

1.5 TETRAZÓIS E PIRAZÓIS

Tetrazóis são uma classe de heterociclos muito empregada em Química Medicinal e comumente utilizados como substituintes isostéricos de vários grupos funcionais de produtos em desenvolvimento farmacêutico (NGUYEN-TRUNG, TRITSCH *et al.*, 2013). Compostos contendo anel tetrazólico foram, primeiramente, sintetizados em 1885, por J. A. Bladin, e apresentam um heterociclo de cinco membros contendo quatro átomos de nitrogênio (Figura 7) (OSTROVSKII, KOLDOBSKII *et al.*, 2008). A eles foram atribuídas propriedades

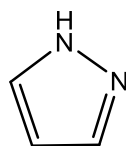
antibacteriana, antiviral, herbicida, antiinflamatória, antitumoral, analgésica e antiproliferativa (ELAVARASAN, BHAKIARAJ *et al.*, 2014).

Figura 7 - Heterociclo de cinco membros contendo quatro átomos de nitrogênio



Pirazóis são compostos químicos sintéticos constituídos por heterociclos de cinco membros com dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbonos adjacentes (Figura 8). Muitos desses compostos apresentam propriedades farmacológicas interessantes, tais como antiinflamatória, analgésica, antipirética e antiarrítmica (RAMOS MARTINS, PAZINI *et al.*, 2013).

Figura 8 - Heterociclos de cinco membros com dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbonos adjacentes



O uso de “estruturas privilegiadas” revelou-se como uma possibilidade de acelerar o desenvolvimento de fármacos. Ademais, a triagem de compostos conforme os ensaios biológicos, a modificação e o aperfeiçoamento de moléculas ativas existentes e a otimização seletiva dos efeitos colaterais são muito atrativos nesse processo (COSTANTINO e BARLOCCO, 2006).

Compostos heterocíclicos contendo átomos de nitrogênio são especialmente considerados “privilegiados” na síntese e no desenvolvimento de novos fármacos e compõem estruturalmente muitos dos produtos naturais bioativos, tais quais vitaminas, hormônios, antibióticos, e daqueles essenciais para a saúde humana e animal (ELAVARASAN, BHAKIARAJ *et al.*, 2014).

Um número considerável de *N*-heterociclos, como os tetrazóis e os pirazóis, são substratos de *N*-glicuronidação, por exemplo, formando os *N*-glicuronídeos. Esse tipo de

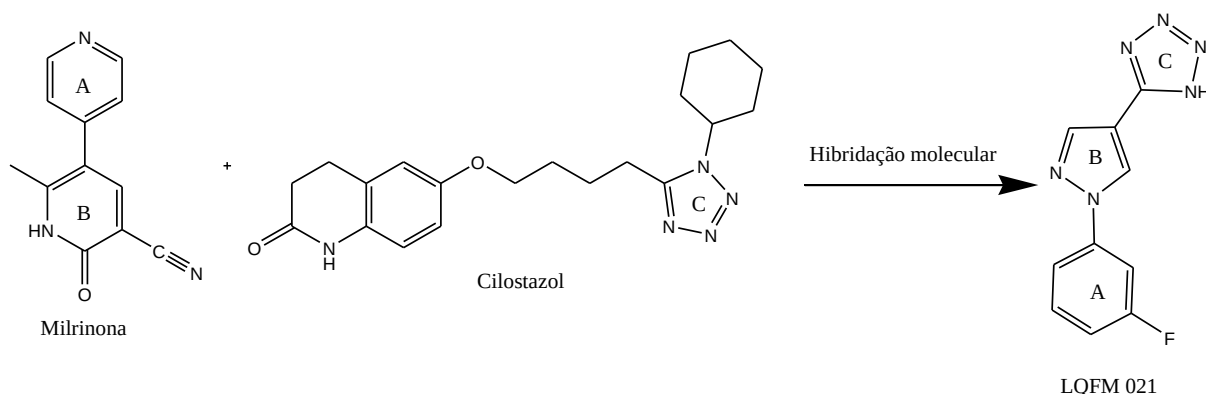
reação representa uma das maiores via de eliminação da maioria dos fármacos, e os produtos obtidos, geralmente, seguros, e menos tóxicos (KAIVOSAARI, 2010).

1.5.1 LQFM 021

O 5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)-1H-tetrazol (LQFM 021) foi originalmente desenvolvido a partir de hibridização molecular de milrinona e cilostazol (Figura 9), conhecidamente inibidores da fosfodiesterase-3 (PDE-3) (RAMOS MARTINS, PAZINI *et al.*, 2013). Quando inibidas, algumas PDEs são responsáveis pela indução do relaxamento vascular em diferentes leitos vasculares, incluindo aortas de ratos. Ramos Martins e colaboradores (2013) verificaram o efeito vasodilatador do LQFM 021 e análises de toxicidade revelaram boa tolerância quando oralmente administrado.

Derivados azólicos já foram reportados na literatura como agentes leishmanicidas (MARRA, BERNARDINO *et al.*, 2012). Faria e colaboradores (2013) planejaram e sintetizaram híbridos de pirazol-tetrazol, que se mostraram mais potentes em inibir as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Em adição, o perfil geral dos compostos testados demonstraram que as atividades biológicas foram altamente influenciadas pelo anel tetrazólico.

Figura 9 - Esquema da hibridação molecular entre milrinona e cilostazol



2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Produzir derivados do 5-(1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-tetrazol (LQFM 021) a partir da biotransformação por células fúngicas livres e imobilizadas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

2.2 ESPECÍFICOS

- Aplicar metodologia de imobilização celular fúngica;
- Desenvolver e aplicar metodologias de monitoramento das cinéticas reacionais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Implementar processos de purificação dos derivados por cromatografia em coluna e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Semi-Preparativa;
- Caracterizar estruturalmente os derivados obtidos.

3 METODOLOGIA

3.1 SUBSTRATO

O substrato 5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)-1H-tetrazol (LQFM 021) foi planejado e sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal – LQFM da Faculdade de Farmácia – FF da Universidade Federal de Goiás – UFG, sob supervisão do professor Dr. Ricardo Menegatti.

Técnicas de Espectrometria na região do UV, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H e ^1H - ^{13}C HSQC/HMBC) e Espectrometria de Massas (EM) foram empregadas para caracterização do LQFM 021, bem como técnicas cromatográficas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram utilizadas para sua identificação.

3.1.1 Espectroscopia na região do UV

A determinação do comprimento de onda de máxima absorção foi realizada em Espectrofotômetro Cintra® 10e UV-visible Spectrometer de 200 a 400 nm.

3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Química – IQ da Universidade Federal de Goiás - UFG. O espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o ^1H e 75,46 MHz para o ^{13}C), equipado com sonda HR-MAS de 4 mm. As análises foram feitas em dimetilsulfóxido deuterado (CIL – Cambridge Isotope Laboratories) utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.1.3 Espectrometria de Massas com Ressonância Ciclotrônica de Íons (FTICR-MS)

Um Espectrômetro de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier Solarix 9,4 T (*Bruker, Bremen, Alemanha*) foi empregado nas análises de altíssima resolução. Previamente à aquisição dos espectros de ESI(+)-FT-ICR MS, realizou-se uma otimização experimental de parâmetros de aquisição, tais como concentração, TOF, (*ion accumulation time, skimmer, collision voltage*). Preparou-se solução de 1 mg/mL da amostra

em metanol, de onde 10 μL foram transferidos para um vial contendo 990 μL de metanol com 0,1 % de hidróxido de amônia. A vazão do *electrospray* foi de 4 mL/min. A faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR foi de m/z 200-2000. Os demais parâmetros da fonte de ESI(+) são: i) voltagem no capilar (cone): -3200 V; ii) *end plate offset* = -500 V; iii) temperatura e fluxo do gás de secagem: 250 °C e 4 L min^{-1} ; vi) pressão do gás nebulizador: 1 bar; v) *skimmer* = 75 V e vi) *collision voltage* = -10 V. Na transmissão de íons, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (*ion accumulation time*) e o TOF foram de 0,3 s e 0,8 ms, respectivamente. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 200 *scans* com um domínio de tempo de 4 M (*mega-point*). Antes da aquisição, o equipamento foi externamente calibrado a partir de uma solução de NaTFA.

3.1.4 Desenvolvimento de metodologia analítica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico do LQFM 021 foi obtido a partir de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para tanto, amostras de concentrações conhecidas foram injetadas em cromatógrafo a líquido Gilson[®], equipado com duas bombas modelo 321 da Gilson[®], injetor manual Rheodyne[®] com capacidade de 20 μL , detector UV modelo 152 Gilson[®] e coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 5 μm), e vazão de 1 mL/minuto.

As análises de Espectrometria na região do UV definiram os parâmetros de comprimento de onda para as análises de CLAE.

As fases móveis foram preparadas com água purificada por sistema Milli-Q (Millipore[®], São Paulo, Brasil), acetonitrila (J. T. Baker[®]) e acetato de amônio (Merck[®]), e filtradas em membranas Millipore[®] de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro e degaseificadas, por 15 minutos, em banho de ultrassom Thornton T7.

Os sistemas cromatográficos isocráticos desenvolvidos para as análises do substrato estão descritos no Quadro 1. Para o desenvolvimento da metodologia analítica, foram considerados, também, os perfis cromatográficos das alíquotas de incubação (com células livres e imobilizadas) retiradas para monitoramento da cinética de biotransformação (descritos detalhadamente mais adiante).

Quadro 1 - Sistemas cromatográficos isocráticos testados para as análises do substrato LQFM 021 e das alíquotas de incubação para monitoramento da cinética de biotransformação

Sistema	Bomba A (%)	Bomba B (%)	Vazão (mL/min)
1	Acetonitrila (90 %)	Acetato de amônio 0,02 M (10 %)	1,0
2	Acetonitrila (90 %)	Acetato de amônio 0,02 M (10 %)	0,8
3	Acetonitrila (85 %)	Acetato de amônio 0,02 M (15 %)	1,0
4	Acetonitrila (85 %)	Acetato de amônio 0,02 M (15 %)	0,8
5	Acetonitrila (100 %)	-	1,0
6	Acetonitrila (90 %)	Água (10 %)	1,0
7	Acetonitrila (85 %)	Água (15 %)	1,0
8	Acetonitrila (70 %)	Água (30 %)	1,0

Fonte: Autor

3.2 MANUTENÇÃO E REPIQUE DA CEPA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO

A cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, oriunda da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, Maryland, USA, foi conservada em ágar batata inclinado e armazenada em refrigerador a 4 °C. Para o repique, os esporos do microorganismo foram ressuspensos com glicerol estéril 25 % (v/v), transferidos, em triplicata, para tubos de ensaio rosqueados contendo ágar batata inclinado, previamente autoclavados, e incubados em Câmara Germinativa B.O.D (Tecnal® Modelo TE 401) por 7 dias, a 27 °C. Ao final da incubação, observaram-se o crescimento e os aspectos morfológicos de cada colônia.

3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL

3.3.1 Cultivo de células livres em meio de cultura líquido

Erlenmeyers de boca larga com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido de cultura *Potato dextrose soy medium* – PDSM (5 g de peptona bacteriológica (BD®), 20 g de dextrose (Synth), 5 g de lecitina de soja (Vetec®), 5 g de fosfato monopotássico (Synth), 5 g de cloreto de sódio (Vetec®) e 3 g de extrato de levedura (BD®) para 1000 mL de água destilada) (COSTA, PIMENTA *et al.*, 2008)), foram semeados com uma gota de esporos ressuspensos do ágar batata inclinado e mantidos em incubadora rotativa (Tecnal® Model TE 420), a 27 °C, 200 rpm, por 65 horas. Durante esse período,

foram observadas as características morfológicas das cepas, bem como temperatura e agitação.

3.3.2 Cultivo de células imobilizadas em meio de cultura líquido

Depois de cultivadas, as cepas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foram semeadas em meio líquido de cultura PDSM em Ernlennmeyers de boca larga com capacidade de 250 mL com molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo e acomodadas firmemente no fundo dos frascos. Estes foram, então, incubados em incubadora rotativa (Tecnal[®] Model TE 420), a 28 °C, 150 rpm, por 10 dias. Durante esse período, foram observados a formação do biofilme pela extensão da mola de aço inoxidável, seu aspecto morfológico, agitação e temperatura de incubação.

3.4 INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO

3.4.1 Células livres

Após o crescimento da cepa em meio de cultura líquido, o substrato LQFM 021 foi pesado e solubilizado em solução de demetilformamida:etanol (Neon[®] e Tedia[®]) 1:1. Um mL da solução resultante de concentração igual 25 mg/mL foi adicionado a cada meio reacional e 10 enlennmeyers foram reincubados, nas mesmas condições, por mais 96 horas. Para posterior estudo de cinética de formação dos possíveis derivados, alíquotas de incubação (1 mL) foram retiradas, assepticamente, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, bem como alíquotas de branco (PDSM + cepa livre e PDSM + substrato).

A viabilidade celular foi verificada antes e depois da adição do subtrato.

3.4.2 Células imobilizadas

3.4.2.1 Experimento 1: Incubação com Tampão PBS

Após a imobilização celular de *C. echinulata* ATCC 9244, cultivada em meio de cultura PDSM, nas molas de aço inoxidável, o halo de crescimento e o meio de cultura foram descartados e o biofilme lavado com tampão fosfato-salino – PBS (1,38 g de fosfato

mossódico (Vetec®), 6,96 g de fosfato de potássio dibásico (Vetec®) e 7,2 g de cloreto de sódio (Vetec®) para 1000 mL de água destilada) –, previamente autoclavado.

O substrato LQFM 021 foi, então, pesado e solubilizado em dimetilformamida:etanol (Neon® e Tedia®) na proporção de 1:1. Um mL da solução resultante de concentração igual 25 mg/mL foi adicionado ao meio reacional, composto, agora, por 50 mL de tampão PBS. Dois Enlenmeyers foram reincubados, nas mesmas condições, por mais 96 horas. Para posterior estudo de cinética de formação dos possíveis derivados, alíquotas de incubação (1 mL) foram retiradas, assepticamente, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, bem como alíquotas de branco (tampão PBS + cepa imobilizada e tampão PBS + substrato).

A viabilidade celular foi verificada antes e depois da adição do substrato.

3.4.2.2 Experimento 2: Incubação com meio de cultura PDSM

Uma solução de LQFM 021 (dimetilformamida:etanol (Neon® e Tedia®) 1:1) de concentração igual a 25 mg/mL foi adicionada ao meio reacional PDSM com os biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 (após retirada dos halos de crescimento), formados a partir do cultivo, também, em meio de cultura PDSM e imobilizados em mola de aço inoxidável.

Três Enlenmeyers foram reincubados, nas mesmas condições, por mais 72 horas. Para posterior estudo de cinética de formação dos possíveis derivados, alíquotas de incubação (1 mL) foram retiradas, assepticamente, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, bem como alíquotas de branco (PDSM + cepa imobilizada e PDSM + substrato).

A viabilidade celular foi verificada antes e depois da adição do substrato.

3.4.2.3 Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM

A fim de se verificar a viabilidade das células imobilizadas após a extração (descrita mais adiante), os biofilmes obtidos no Experimento 2 (subitem 3.5.2.2) foram reutilizados para subsequente biotransformação do LQFM 021.

Para tanto, após extração, 100 mL de meio de cultura PDSM foram adicionados aos Erlenmeyers com biofilmes. Após um período de 65 horas (para restabelecimento do microorganismo), uma solução de LQFM 021 (dimetilformamida:etanol (Neon® e Tedia®) 1:1) de concentração igual a 25 mg/mL foi adicionada ao meio reacional PDSM e os Erlenmeyers foram reincubados, nas mesmas condições, por mais 96 horas. Para posterior estudo de cinética de formação dos possíveis derivados, alíquotas de incubação (1 mL) foram

retiradas, assepticamente, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, bem como alíquotas de branco (PDSM + cepa imobilizada reutilizada e PDSM + substrato).

A viabilidade celular, durante o período de incubação, foi verificada antes e depois da adição do substrato.

3.5 EXTRAÇÃO

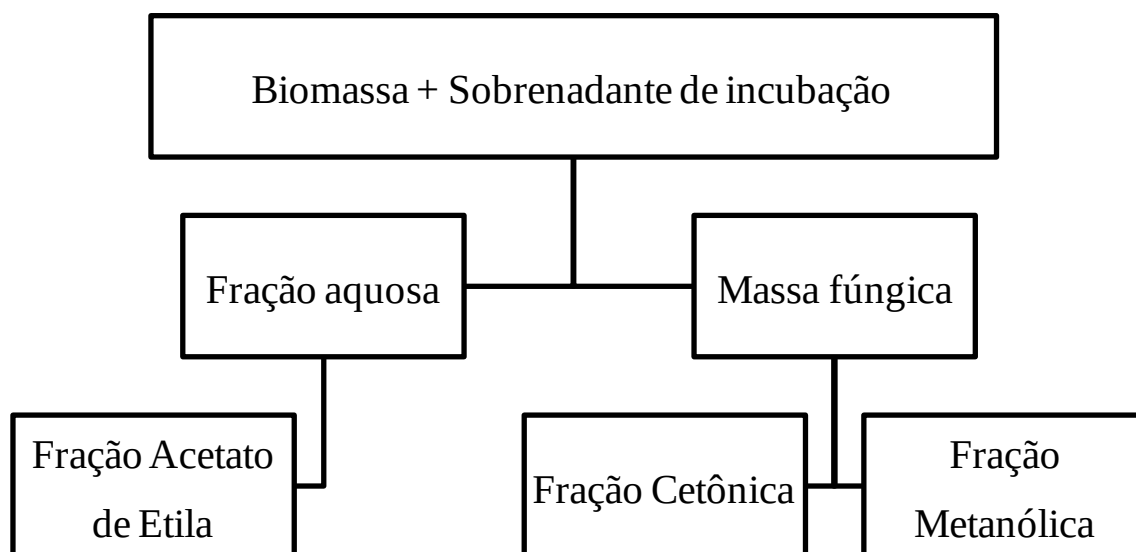
3.5.1 Incubação com células livres

Após o período de 96 horas, o sobrenadante de incubação com células livres e a biomassa dos Erlenmeyers foram reunidos e filtrados em gaze, sob vácuo. A fração aquosa, após saturação com cloreto de sódio (Vetec®), foi filtrada em Celite-545 (Tedia®) em Funil de Buchner e extraída, em funil de separação, com acetato de etila (J. T. Baker®) (3 x 100 mL). O extrato, denominado Fração Acetato de Etila, foi, então, seco com sulfato de sódio (Dinâmica®), filtrado à vácuo em funil de vidro sinterizado e concentrado em evaporador rotativo (Tecnal® Modelo TE-211).

A massa fúngica, por sua vez, foi extraída com acetona (Neon®) (200 mL), sob agitação, por 2 horas, e filtrada em papel de filtro. A Fração Cetônica foi, então, seca com sulfato de sódio (Dinâmica®), filtrada à vácuo em funil de vidro acoplado à bomba de vácuo (Tecnal® Modelo TE-058) e concentrada em evaporador rotativo (Tecnal® Modelo TE-211). Procedeu-se, nas mesmas condições, à extração da massa fúngica com metanol, obtendo-se a Fração Metanólica.

Os procedimentos descritos acima estão esquematizados na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional da incubação com células livres



Fonte: Autor

3.5.2 Incubação com células imobilizadas

3.5.2.1 Experimento 1: Incubação com tampão PBS

Para a biotransformação com *C. echinulata* ATCC 9244 imobilizada e incubada em tampão PBS, procedeu-se à extração apenas do tampão PBS com acetato de etila (J. T. Baker®) (3 x 100 mL), obtendo-se o extrato, denominado Fração Acetato de Etila – Biofilme Tampão PBS, que, posteriormente foi seca com sulfato de sódio (Dinâmica®), filtrada à vácuo em funil de vidro sinterizado e concentrada em evaporador rotativo (Tecnal® Modelo TE-211).

3.5.2.2 Experimento 2: Incubação com meio de cultura líquido PDSM

Na biotransformação do LQFM 021 com células imobilizadas de *C. echinulata* ATCC 9244, incubadas com meio de cultura líquido PDSM, os biofilmes foram extraídos com acetona (Neon®) (200 mL), sob agitação, por 2 horas. A Fração Cetônica – Biofilme PDSM foi, então, seca com sulfato de sódio (Dinâmica®), filtrada à vácuo em funil de vidro sinterizado acoplado à bomba de vácuo (Tecnal® Modelo TE-058) e concentrada em

evaporador rotativo (Tecnal[®] Modelo TE-211). Procedeu-se, nas mesmas condições, à extração do biofilme com metanol, obtendo-se a Fração Metanólica – Biofilme PDSM.

Após a extração dos biofilmes, a reutilização dos biofilmes foi sucedida, conforme descrito no subitem 3.4.2.3.

3.5.2.3 Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM

Os biofilmes reutilizados foram igualmente extraídos, conforme descrito no subitem anterior, obtendo-se as Frações Cetônica – Biofilme Reutilizado PDSM e Metanólica – Biofilme Reutilizado PDSM.

3.6 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Alíquotas (1 mL) do meio reacional, com células livres e imobilizadas, obtidas conforme descrito no subitem 3.4, foram submetidas à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a fim de se determinar a cinética de biotransformação do LQFM 021. Para tanto, foram centrifugadas em microcentrífuga HT Modelo MCD-2000, a 100.000 rpm, por 5 minutos, e 20 µL do sobrenadante injetados em cromatógrafo líquido Gilson[®], equipado com duas bombas modelo 321 da Gilson[®], injetor manual Rheodyne[®] com capacidade de 20 µL, detector UV modelo 152 Gilson[®] e coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm), e fluxo de 1 mL/minuto.

As fases móveis foram preparadas com água purificada por sistema Milli-Q (Millipore[®], São Paulo, Brasil) e acetonitrila (J. T. Baker[®]) e acetato de amônio (Merck[®]), filtradas em membranas Millipore[®] de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro e desgaseificadas, por 15 minutos, em banho de ultrassom Thornton T7.

Os sistemas cromatográficos isocráticos desenvolvidos para as análises do substrato e do meio reacional estão descritos no subitem 3.1.4.

3.7 PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS

3.7.1 Incubação com células livres

A purificação dos derivados do LQFM 021, oriundos da biotransformação com células livres, deu-se por cromatografia em coluna, com coluna de vidro de 30 cm de comprimento e

1,5 cm de diâmetro, preenchida com 10 g do adsorvente sílica gel 60 Å Vetec 0,063 – 0,200 mm (70 – 230 mesh) e eluente acetato de etila, e monitorada por CCD, eluídas com fases móvel AcOEt:EtOH 70:30 e DCM:MeOH 90:10 e reveladas com luz UV (254 nm). No preparo das pastilhas, utilizaram-se quantidades das Frações Acetato de Etila, Cetônica e Metanólica e sílica.

Foram coletadas, em tubos de ensaio, alíquotas de aproximadamente 2 mL, à medida que a coluna era eluída com gradientes de fase móvel AcOEt 100 %, AcOEt:MeOH 95:5, AcOEt:MeOH 90:10, AcOEt:MeOH 85:15, AcOEt:MeOH 50:50 e MeOH 100%.

Os produtos purificados foram concentrados em evaporador rotativo Tecnal[®] Modelo TE-211, mantidos em dessecador e, posteriormente, pesados.

3.7.2 Incubação com células imobilizadas

3.7.2.1 Experimento 1: Incubação com tampão PBS

A Fração Acetato de Etila – Biofilme Tampão PBS foi lavada com hexano (J. T. Baker[®]), concentrada em evaporador rotativo Tecnal[®] Modelo TE-211, mantida em dessecador e, posteriormente, pesada.

3.7.2.2 Experimento 2: Incubação com meio de cultura líquido PDSM

A purificação das Frações Cetônica – Biofilme PDSM e a Fração Metanólica – Biofilme PDSM deu-se por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Semi-Preparativa Varian ProStar/Varian 440-LC Fraction Collector, *software* Galaxie Chromatography Data System (versão 1.9.302.952) equipado com coluna Microsorb 100-5 C18 (250 x 10 mm x 5 µm) com fase móvel acetonitrila grau cromatográfico e detector UV em 220 nm e 270 nm.

3.7.2.3 Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM

As frações obtidas (Fração Cetônica – Biofilme Reutilizado PDSM e Fração Metanólica – Biofilme Reutilizado PDSM) foram reunidas às Frações Cetônica – Biofilme PDSM e Metanólica – Biofilme PDSM, e submetidas à purificação em CLAE Semi-Preparativa Varian ProStar/Varian 440-LC Fraction Collector, conforme descrito acima.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

Os derivados obtidos purificados em quantidades suficientes foram caracterizados por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Espectrometria de Massas (EM). Tais técnicas estão descritas no subitem 3.1.

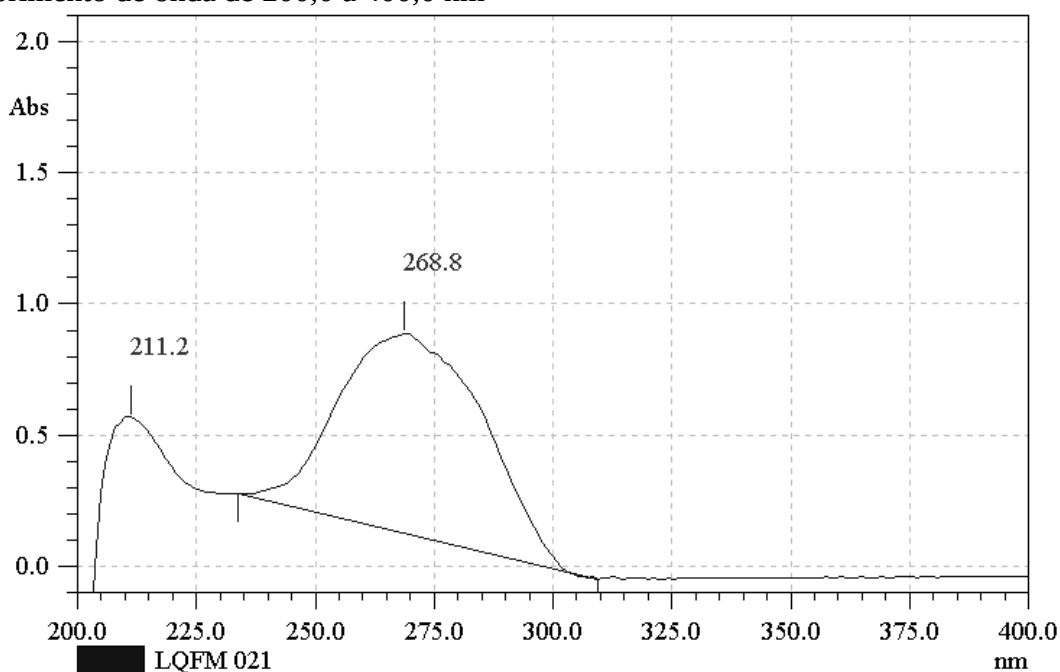
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SUBSTRATO

4.1.1 Espectrometria na região do UV

A varredura de comprimento de onda na região do UV do composto LQFM 021, determinado em Espectrofotômetro Cintra 10^e UV-visible Spectrometer, demonstrou absorção em 211,2 nm e 268,8 nm (Figura 11). Tais resultados serviram de parâmetro para as análises de CLAE tanto do substrato LQFM 021, quanto das alíquotas de incubação (com células livres e imobilizadas) retiradas para monitoramento da cinética de biotransformação.

Figura 11 - Espectrograma na região do UV do substrato LQFM 021, em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm



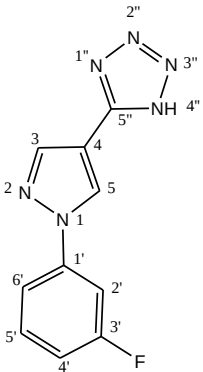
Fonte: Autor. Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV-visible Spectrometer

4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN ¹H foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o ¹H). Os espectros foram registrados em DMSO, com TMS como padrão interno. A Tabela 1 demonstra as atribuições dos deslocamentos químicos obtidos do

espectro de RMN ^1H do LQFM 021 (Anexo A), que por sua vez, foram comparados aos já descritos por Pazini (2012).

Tabela 1 – Dados de RMN ^1H (500 MHz) do LQFM 021, em DMSO- d_6

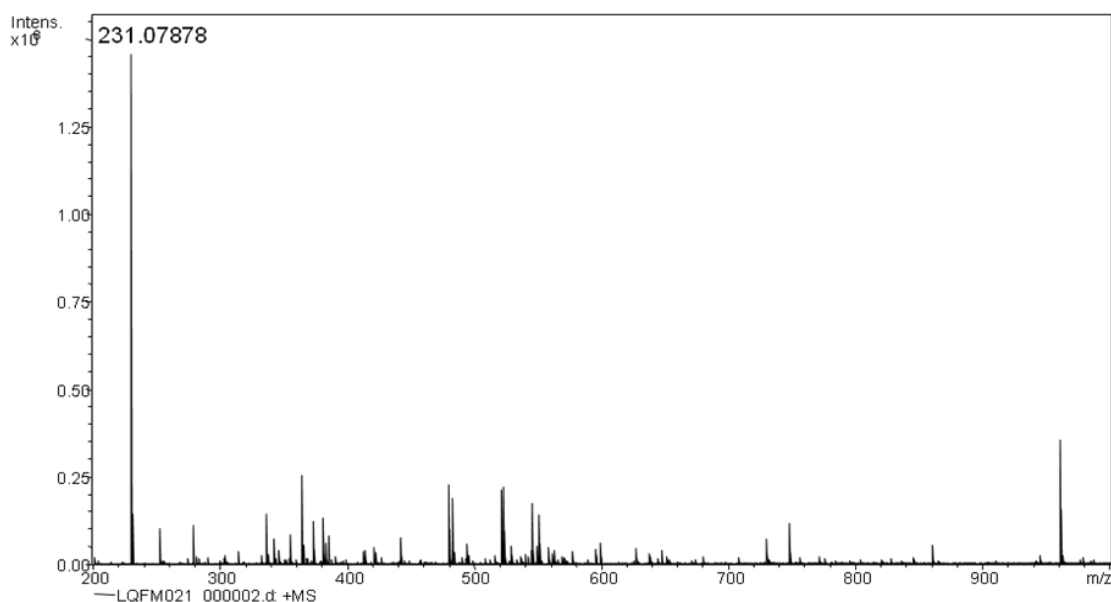
LQFM 021	Posição	δ ^1H (mult, J Hz) *	δ ^1H (mult, J Hz)
	5	9,19 (1 H, d , $J = 0,6$ Hz)	9,22 (1 H, d , $J = 0,6$ Hz)
	3	8,33 (1 H, d , $J = 0,6$ Hz)	8,31 (1 H, d , $J = 0,6$ Hz)
	2'	7,82 (1 H, ddd , $J = 7,4$; 2,3 e 1,1 Hz)	7,90 – 7,80 (2 H, m)
	6'	7,81 (1 H, $dddd$, $J = 10,3$; 2,2; 2,1 e 1,1 Hz)	
	5'	7,60 (1 H, ddd , $J = 10,3$; 8,5 e 2,1 Hz)	7,65 – 7,52 (5 H, m)
	4'	7,23 (1 H, tt , $J = 8,5$ e 2,3 Hz)	7,23 (1 H, tt , $J = 8,24$ e 2,44)

* Pazini (2012)

4.1.3 Espectrometria de Massas com Ressonância Ciclotrônica de Íons (FTICR-MS)

A Figura 12 mostra o espectro de massas (FTICR-MS) do LQFM 021, no qual se observa o pico $m/z = 231,07878$, relativo ao $[\text{MH}]^+$, com erro de 0,11 Da e fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{FN}_6$.

Figura 12- Espectro de massas FTICR-MS do LQFM 021

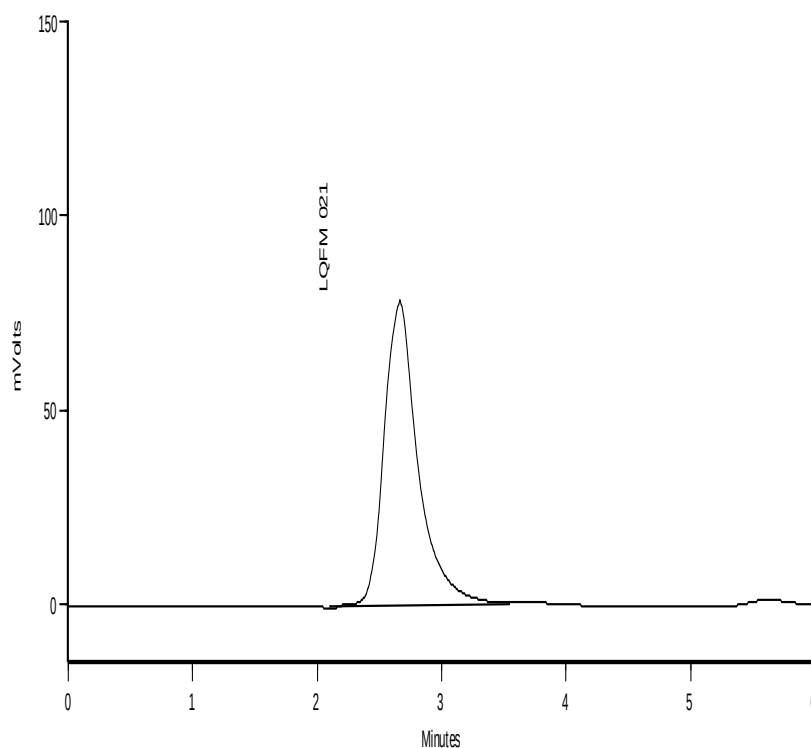


4.1.4 Desenvolvimento de metodologia analítica de Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE)

Com base nos comprimentos de onda de absorção do LQFM 021, 220 nm e 270 nm foram estabelecidos para as análises por CLAE. Os sistemas cromatográficos isocráticos 6 (Acetonitrila (Bomba A):Água (90:10)) e 8 ((Acetonitrila (Bomba A):Água (70:30)) apresentaram satisfatória separação dos picos para as alíquotas do meio reacional com células livres e imobilizadas, respectivamente, e foram os selecionados para a identificação do substrato e determinação da cinética de biotransformação.

A análise por CLAE do substrato LQFM 021, em 220 nm, utilizando o sistema isocrático 6, gerou o cromatograma contido na Figura 13. É possível observar o pico referente ao composto em 2,66 minutos.

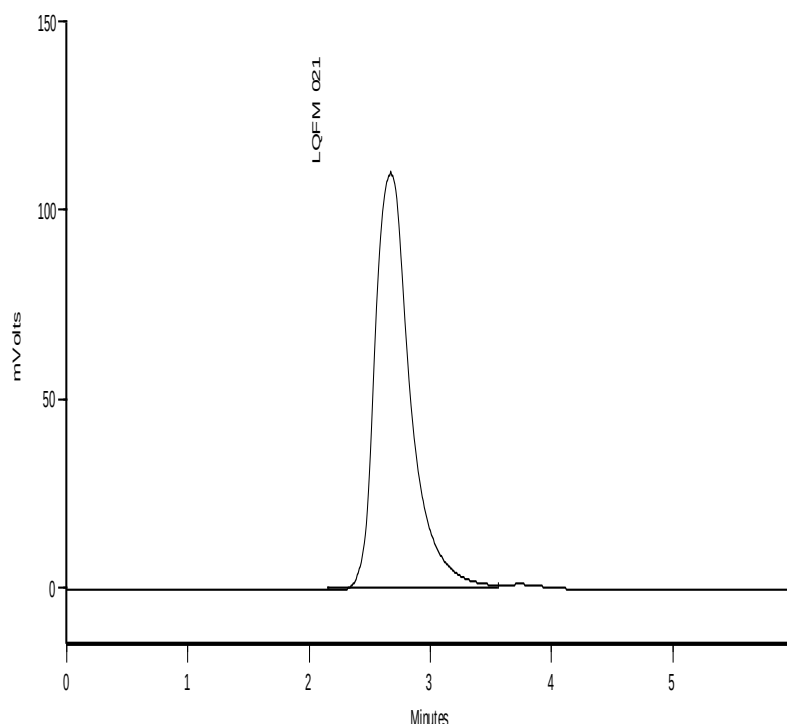
Figura 13 - Perfil cromatográfico do substrato LQFM 021 0,04 mg/mL (em metanol), em 220 nm



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm), Sistema cromatográfico isocrático 6; 220 nm

Já a análise, em 270 nm, utilizando o mesmo sistema isocrático, gerou o cromatograma contido na Figura 14. É possível observar o pico referente ao composto no mesmo tempo de retenção da análise conduzida em 220 nm (2,66 minutos).

Figura 14 - Perfil cromatográfico do substrato LQFM 021 0,04 mg/mL (em metanol), em 270 nm



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm), Sistema cromatográfico isocrático 6; 270 nm

4.2 MANUTENÇÃO E REPIQUE DA CEPA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO

As cepas de *C. echinulata* ATCC 9244, utilizadas neste estudo, apresentaram crescimento satisfatório em ágar batata inclinado, visualmente examinado, no período de 7 dias. Os exemplares apresentaram aspecto algodinoso e variação de cor entre cinza e marrom, característicos do microorganismo. Um exemplar, então, foi selecionado para a biotransformação do LQFM 021 e seus esporos foram ressuspensos para incubação em meio de cultura líquido.

4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL

4.3.1 Cultivo de células livres em meio de cultura líquido

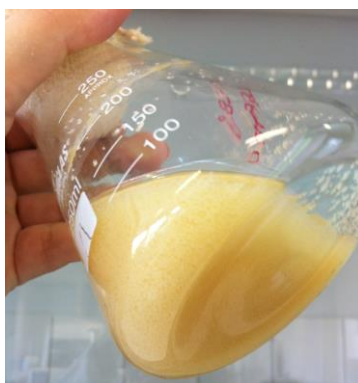
As características morfológicas dos fungos filamentosos variam desde micélios dispersos no meio de cultura (massa amorfa) a diferentes *pellets* de biomassa agregada e, portanto, a máxima produtividade depende muito da morfologia da cepa. A alta complexidade

dos tipos morfológicos e a interação direta entre morfologia e condições reacionais – concentração do substrato, viabilidade celular, pH, temperatura, aeração e agitação, por exemplo – exigem, então, que tais parâmetros sejam bem determinados (KRULL, WUCHERPFENNIG *et al.*, 2013).

O meio de cultura PDSM mostrou-se adequado ao processo de bioconversão com a cepa utilizada, além de apresentar baixo custo, facilidade de preparo, conservação e extração dos produtos formados e capacidade de promover crescimento uniforme, conforme verificado também por Gomes (2007) e Lustosa e colaboradores (2012).

Observaram-se, durante o processo de incubação, temperatura, agitação, aspecto e crescimento da cepa. Após 65 horas de cultivo livre no meio de cultura líquido, a 27 °C e 200 rpm, os micélios de *C. echinulata* ATCC 9244 apresentaram-se na forma de pequenos *pellets* (Figura 15).

Figura 15 - Aspectos morfológicos dos micélios livres de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244



Fonte: Arquivo pessoal

4.3.2 Cultivo de células imobilizadas em meio de cultura líquido

A aplicação de células microbianas viáveis imobilizadas em biotransformação e obtenção de derivados vantajosos vem se destacando desde a década de 70. O interesse inicial em células imobilizadas foi direcionado para sua aplicação como alternativa ao isolamento e purificação de enzimas. Há muitos relatos de técnicas de imobilização, contudo o potencial dos biofilmes ainda requer maiores detalhes (WANG, RIDGWAY *et al.*, 2005; AMADIO, CASEY *et al.*, 2013).

O meio de cultura PDSM mostrou-se viável para o crescimento e formação dos biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244. A escolha do meio de cultura para cultivo de células

imobilizadas deve garantir crescimento homogêneo e uniforme ao longo da matriz imobilizadora e, preferencialmente, estar aliado a maiores taxas de biotransformação. Em escala semi-preparativa, meios de cultura compostos por glicose podem estimular o crescimento celular e promover o “engrossamento” do biofilme. Em contrapartida, a escassez de fontes de carbono e nitrogênio ou a carência de outros nutrientes podem levar à deformação do biofilme, a exemplo de “encolhimento” e alterações leves na sua morfologia (PAKULA e FREEMAN, 1996).

Outro aspecto que deve ser considerado na escolha do meio de cultura é a formação de hifas aéreas durante os períodos de cultivo, incubação e imobilização em meio líquido, que dificulta a aeração do meio reacional e, quando retiradas, podem danificar o biofilme (AMADIO, CASEY *et al.*, 2013). Estudos complementares desenvolvidos no Laboratório de Bioconversão (Labiocon) mostraram que o meio de cultura Sabouraud, utilizado para cultivo e imobilização de diferentes espécies de fungos filamentosos, propiciou a formação exacerbada de hifas aéreas, crescimento desuniforme e, em alguns casos, o não crescimento celular (Figura 16).

Figura 16 - Biofilmes de fungos filamentosos desenvolvidos no Labiocon que apresentaram crescimento exacerbado de hifas aéreas e crescimento desuniforme



Fonte: Arquivo pessoal

As molas de aço inoxidável foram matrizes adequadas à imobilização. Visualmente, a matriz foi capaz de alojar grande quantidade de células viáveis, sem limitar a transferência de massa entre o microorganismo e o meio de cultura, garantindo, assim a eficiência do suporte no processo de imobilização celular (COVIZZI, GIESE *et al.*, 2007). Possuir grande área superficial com espaço intersticial, ser reutilizável e apresentar estabilidades mecânica, química, térmica e biológica também são cruciais na escolha da matriz imobilizadora, bem

como proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial (DEVI e SRIDHAR, 2000; FENICE, FEDERICI *et al.*, 2000; DIAZ, FERRANDEZ *et al.*, 2001).

O contato das matrizes com o vidro dos frascos de cultivo, ademais, foi determinante para a satisfatória formação do biofilme. Os estudos complementares realizados no Labiocon, conforme citado acima, demonstraram que o não contato das molas com os Erlenmeyers resultaram em não formação de biofilme. Foi possível verificar, também, que as molas devem ser acomodadas “sem folgas” nos fundos dos frascos utilizados, uma vez que molas maiores promoveram aglomeração de massas amorfas nos “excessos” de mola. Neste caso, desuniformidade e não adesão dos biofilme à matriz também foram observados por Amadio e colaboradores (2013).

Os micélios de *C. echinulata* ATCC 9244 imobilizadas, neste estudo, apresentaram aspecto algodonosos, levemente amarelados (Figura 17).

Figura 17 - Aspecto morfológico das cepas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 imobilizadas em molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo



Fonte: Arquivo pessoal

Outro parâmetro importante para a imobilização celular é a agitação, já que sua intensidade afeta tanto a morfologia fúngica quanto a transferência de massa. Em incubações conduzidas sem agitação, o crescimento celular deu-se apenas sob a forma de hifas aéreas, sem formação de biofilme (AMADIO, CASEY *et al.*, 2013). Na maioria das biotransformações, incluindo as com células imobilizadas, uma alta taxa de agitação é requerida, a fim de viabilizar a homogeneização do meio e a transferência de massa. Portanto, a agitação é pautada em velocidades que evitem danos aos micélios e, ainda, rompimento do biofilme (WANG, RIDGWAY *et al.*, 2005).

Nos estudos complementares realizados no Labiocon, incubações conduzidas a 200 rpm, por exemplo, comprometeram a formação homogênea do biofilme, sendo observados micélios dispersos e danificados no meio de cultura.

Alguns estudos concluíram que temperaturas mais baixas de incubação (15 °C a 30 °C) favorecem a viabilidade e a atividade de células imobilizadas (KOURKOUTASA, BEKATOROUA *et al.*, 2004; GENISHEVA, TEIXEIRA *et al.*, 2014). O parâmetro de temperatura estabelecido para este trabalho (28 °C) foi baseado nos estudos de Amadio e colaboradores (2013).

4.4 INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO

As viabilidades celulares, durante os períodos de incubação em meio de cultura líquido com células livres e imobilizadas, foram verificadas pela formação do halo de crescimento antes e depois da adição do substrato LQFM 021 (Figura 18), não havendo comprometimentos para o microorganismo em todos os Erlenmeyers inoculados com *C. echinulata* ATCC 9244.

Figura 18 - Halo de crescimento formado durante incubação com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 livre



Fonte: Arquivo pessoal

A reposição do meio de cultura aos biofilmes extraídos e o “período de adaptação” (65 horas) do microorganismo possibilitaram a reutilização dos biofilmes e mantiveram as células viáveis à biotransformação (PAKULA e FREEMAN, 1996). A adição de meios de cultura “novos” criam “pulsos de reativação” dos microorganismos e podem ser responsáveis por sucessos nesses processos de biotransformação (FREEMAN e LILLY, 1998).

4.5 EXTRAÇÃO

4.5.1 Células livres

Após a extração do sobrenadante de incubação e dos micélios de *C. echinulata* ATCC 9244, cultivados livremente, obtiveram-se as Frações Acetato de Etila, Cetônica e Metanólica, com massas de 130 mg, 700 mg e 590 mg, respectivamente. As análises por CCD mostraram a formação de apenas um derivado mais polar que o LQFM 021 (Figura 19). Tais frações foram submetidas à purificação por cromatografia em coluna, conforme descrito no subitem 3.7.

Figura 19 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada das Frações Acetato de Etila, Cetônica e Metanólica das incubações com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cultivada livremente, eluída MeOH:AcOEt 70:30 e revelada com luz UV (254 nm);



Legenda: Spot 1: LQFM 021; Spot 2: Fração Metanólica; Spot 3: Fração Acetato de Etila; Spot 4: Fração Cetônica

Fonte: Arquivo pessoal

4.5.2 Células imobilizadas

4.5.2.1 Experimento 1: Incubação com tampão PBS

A Fração Acetato de Etila – Biofilme Tampão PBS, após concentração em evaporador rotativo (Tecnal[®] Modelo TE-211), foi pesada, sem, no entanto fornecer quantidade suficiente para posterior caracterização por RMN ¹H.

4.5.2.2 Experimento 2: Incubação em meio de cultura líquido PDSM

As Frações Cetônica – Biofilme PDSM e Fração Metanólica PDSM apresentaram massas de 150 mg e 120 mg, respectivamente. A purificação deu-se por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Semi-Preparativa.

4.5.2.3 Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM

Frações Cetônica – Biofilme Reutilizado PDSM e Metanólica – Biofilme Reutilizado PDSM, com massas iguais a 120 mg e 100 mg, foram reunidas às Frações Cetônica – Biofilme PDSM e Fração Metanólica PDSM e purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Semi-Preparativa.

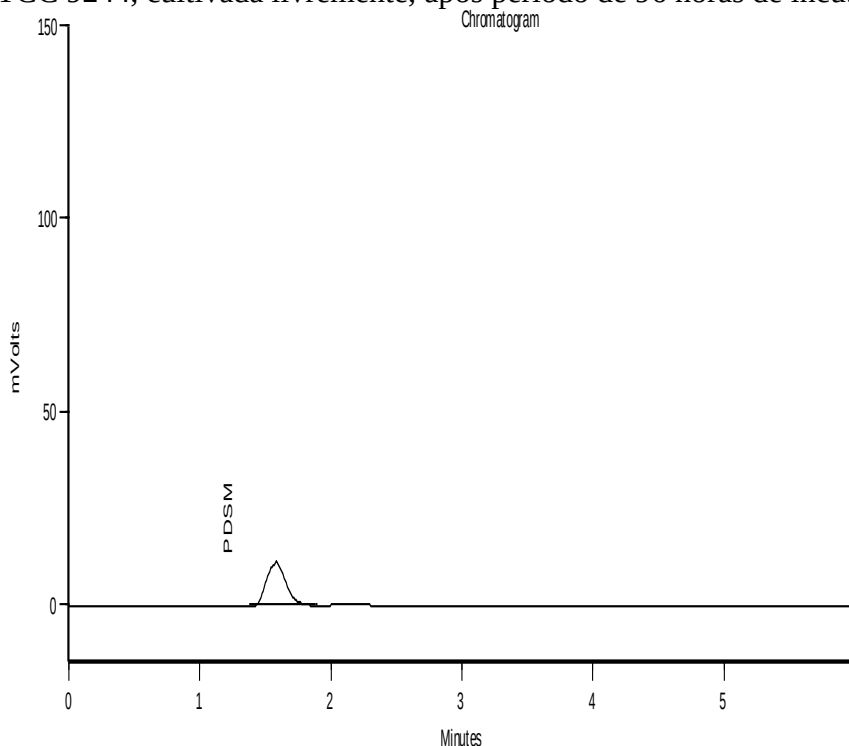
4.6 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE BIOTRANSFORMAÇÃO

4.6.1 Células livres

As alíquotas de 24, 48, 72 e 96 h foram submetidas à análise por CLAE e o sistema cromatográfico isocrático 6 foi selecionado para as análises do meio reacional com células livres. Métodos analíticos de CLAE com fases móveis compostas por mistura de água e acetonitrila também foram empregadas satisfatoriamente por (WANG, CAI *et al.*, 2013) no monitoramento de síntese de tetrazóis.

As análises foram conduzidas nos dois comprimentos de onda estabelecidos (220 nm e 270 nm). Os cromatogramas obtidos das análises das alíquotas, em comprimento de onda de 270 nm, mostraram apenas um pico referente ao meio de cultura PDSM, em 1,38 minutos (Figura 20).

Figura 20 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cultivada livremente, após período de 96 horas de incubação

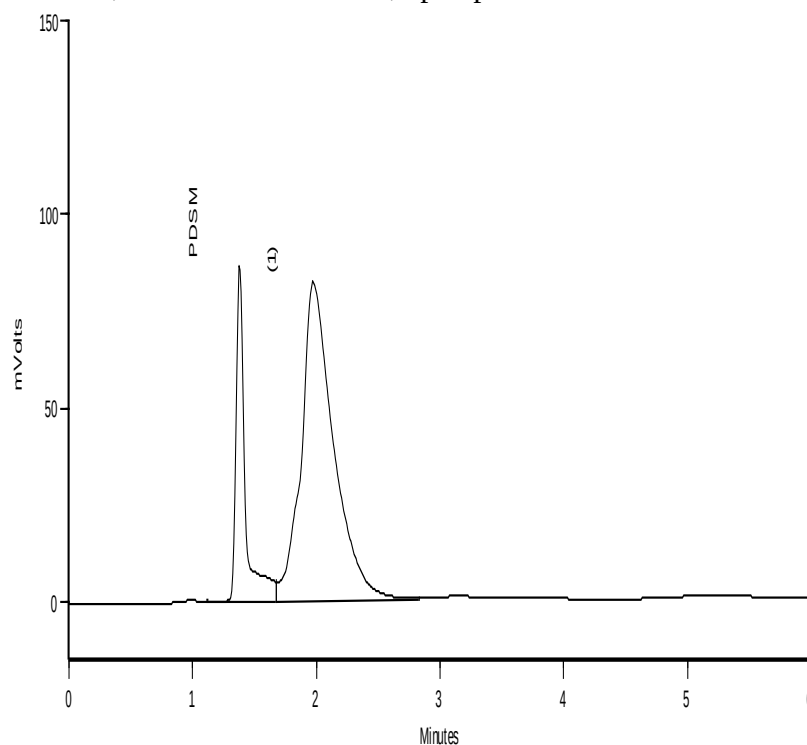


Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 μ), Sistema cromatográfico isocrático 6, 270 nm

Já em 220 nm, verificou-se a presença de um derivado do LQFM 021 ((**1**)) ao fim da incubação (Figura 21), no tempo de retenção igual a 1,98 minutos. O meio de cultura PDSM não influenciou a identificação do derivado. A análise da alíquota de incubação de 96 horas mostra a presença de um derivado mais polar que o LQFM 021.

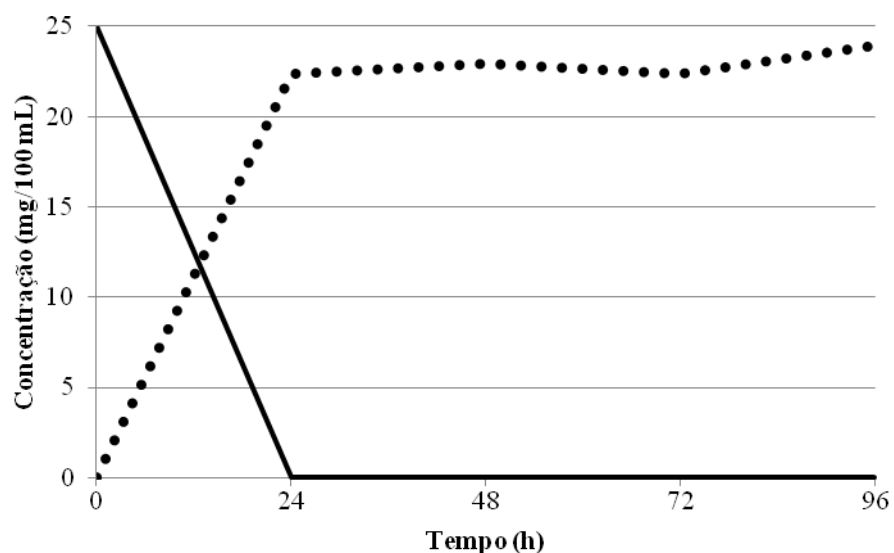
As análises por CLAE permitiram a determinação da cinética de biotransformação do LQFM 021 durante o período de incubação com células livres. A partir do Gráfico 1, é possível verificar que, já nas primeiras 24 horas, há a formação do derivado do LQFM 021, sendo a concentração máxima atingida em 96 h. É possível notar, ainda, um leve decaimento nas alíquotas de 72 horas e um leve aumento a partir desse tempo, que pode ser atribuído à dinâmica do produto formado pelos compartimentos intra e extracelulares do microorganismo (ARAÚJO, DE *et al.*, 2013).

Figura 21 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cultivada livremente, após período de 96 horas de incubação



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 μ), Sistema cromatográfico isocrático 6, 220 nm

Gráfico 1 - Cinética de biotransformação do LQFM 021 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cultivada livremente



Fonte: Autor

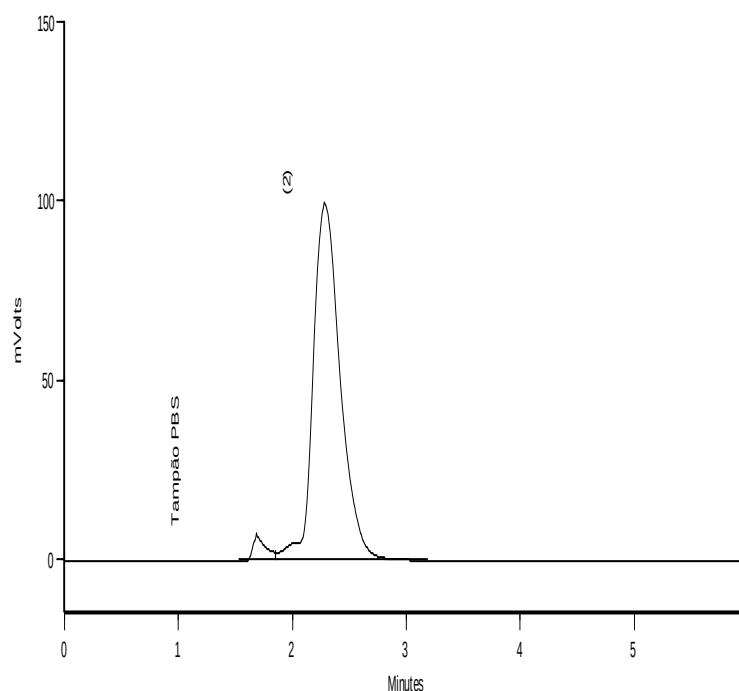
O decaimento completo do LQFM 021 deu-se nas primeiras 24 horas, não sendo verificado nas alíquotas de 24, 48, 72 e 96 h. É possível, nesse caso, que tenha havido adsorção do substrato à massa fúngica (não sendo mais, portanto, detectado no sobrenadante de incubação) e/ou sua internalização pelas células. Tal mecanismo também foi observado por Pakula e colaboradores (1996), Araujo e colaboradores (2013) e Silveira (2012).

4.6.2 Células imobilizadas

4.6.2.1 Experimento 1: Incubação com tampão PBS

Para as análises das alíquotas de 24, 48, 72 e 96 h, oriundas da incubação com células imobilizadas e incubadas com tampão PBS, selecionaram-se o sistema cromatográfico isocrático 8 e 220 nm como comprimento de onda na região do UV. Na Figura 22 está contido o perfil cromatográfico da alíquota de 96 horas, em que é possível verificar, também, a identificação de um derivado mais polar que o LQFM 021 (tempo de retenção igual a 2,29 minutos).

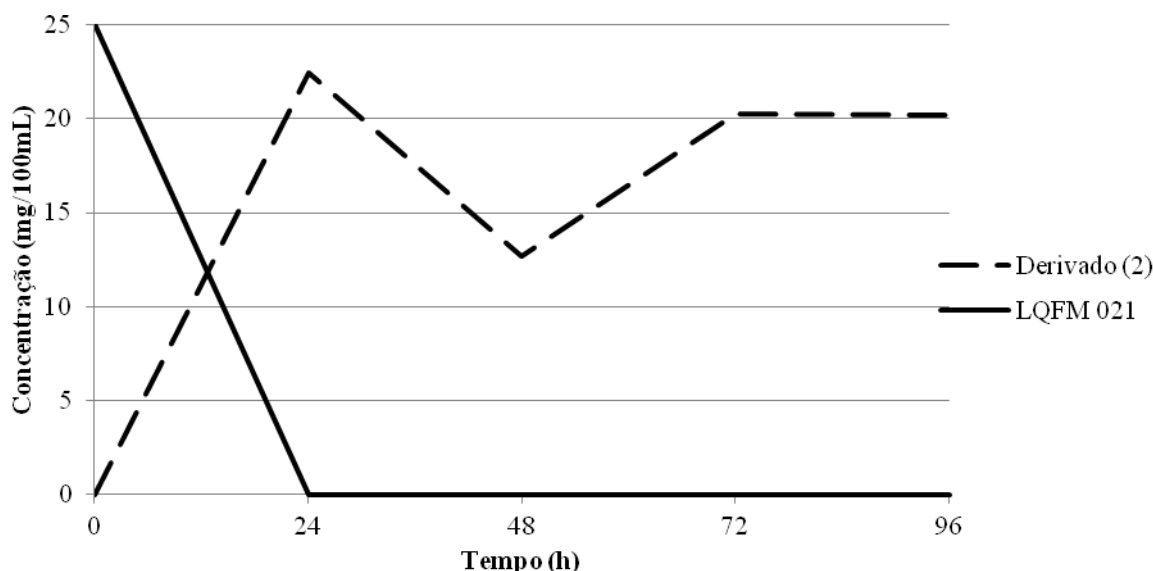
Figura 22 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com biofilmes de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, incubados com tampão PBS, após período de 96 horas de incubação



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µ), Sistema cromatográfico isocrático 8; 220 nm

A partir das análises de CLAE, foi possível determinar a cinética de biotransformação do LQFM 021, incubado com tampão PBS com células imobilizadas de *C. echinulata* ATCC 9244, e obter o Gráfico 2.

Gráfico 2- Cinética de biotransformação do LQFM 021 por biofilme de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, incubado com tampão PBS



Fonte: Autor

Apesar da obtenção de um derivado do LQFM 021, dentre todos os experimentos realizados neste estudo, essas condições foram as que propiciaram menores taxas de biotransformação, quando observada a cinética de formação do derivado.

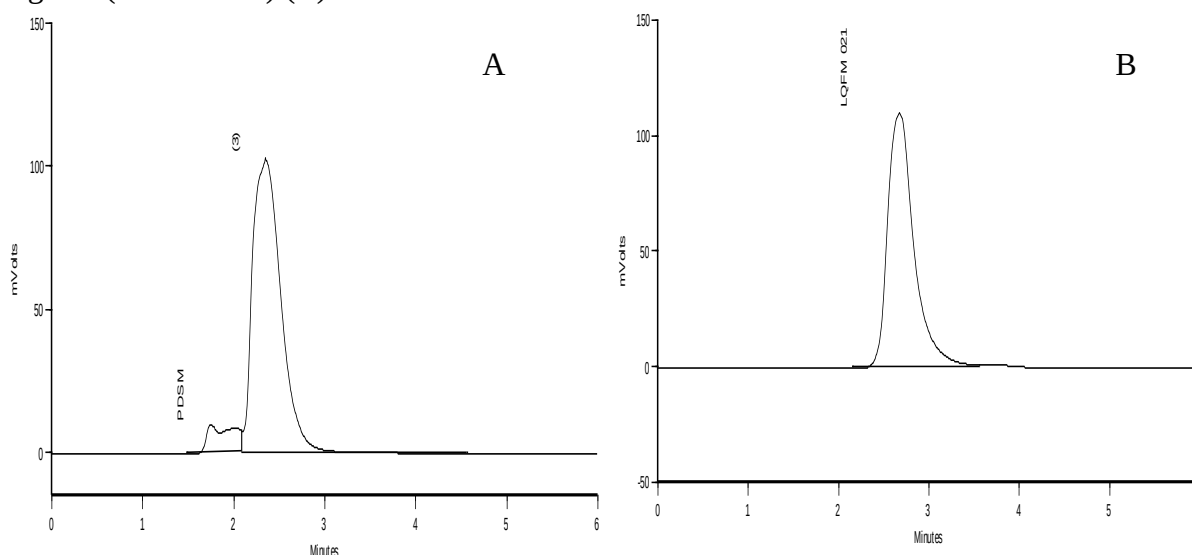
Uma inconveniência da imobilização celular seria a formação de “microambientes” privados de nutriente e oxigênio no interior dos suportes, o que afetaria a viabilidade celular e, por conseguinte, a biotransformação (JUNTER E JOUENNE, 2004). Nesse caso, o biofilme foi completamente privado de nutrientes essenciais, o que pode, de fato, ter prejudicado o processo.

O decaimento completo do substrato também se deu nas primeiras 24 horas, como observado nas incubações com células livres, não sendo verificado nas alíquotas de 24, 48, 72 e 96 h. Junter e colaboradores (2004) destacam como um dos obstáculos da imobilização celular a limitação na transferência de massa dentro das matrizes imobilizadoras, que, neste estudo, pode estar associada à solubilidade do LQFM 021.

4.6.2.2 Experimento 2: Incubação com meio de cultura PDSM

As alíquotas de 24, 48 e 72 h retiradas durante a incubação com células imobilizadas e incubadas com meio de cultura PDSM, foram, também, analisadas por CLAE, em que se selecionaram o sistema cromatográfico isocrático 8 e 220 nm como comprimento de onda na região do UV. Na Figura 23 está contido o perfil cromatográfico da alíquota de 72 horas, em que é possível verificar, também, a identificação de um derivado ((3)) mais polar (tempo de retenção igual a 2,35 minutos) que o LQFM 021 (tempo de retenção igual a 2,65 minutos).

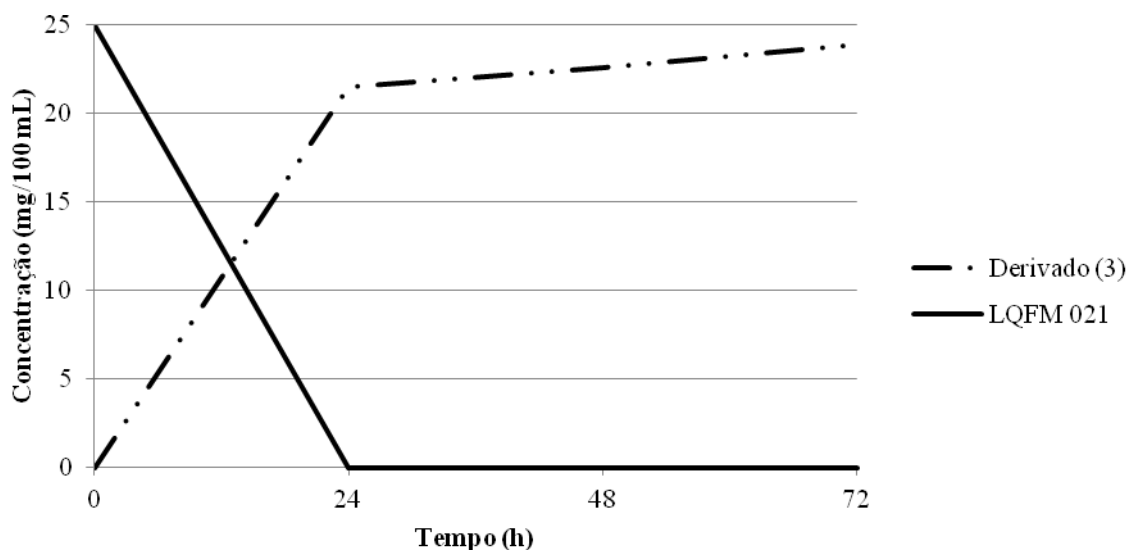
Figura 23 – Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com biofilmes de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, incubados com meio de cultura PDSM, após período de 72 horas de incubação (A); Perfil cromatográfico do substrato LQFM 021 0,04 mg/mL (em metanol) (B)



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 μ), Sistema cromatográfico isocrático 8; 220 nm

A cinética de biotransformação do LQFM 021 pôde ser avaliada a partir do Gráfico 3, obtido com base nas análises de CLAE das alíquotas de incubação. Nas primeiras 24 horas, o rendimento da biotransformação foi levemente maior, quando comparado ao verificado com células livres. A formação do derivado deu-se de forma crescente até o período de 96 h, em que se verificou a sua maior concentração. Infere-se, ainda, que a externalização do produto formado foi satisfatória, o que pode ser relacionado, também, à facilidade de extração.

Gráfico 3 - Cinética de biotransformação do LQFM 021 por biofilme de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, incubado com meio de cultura PDSM



As principais vantagens obtidas com a utilização de células inteiras imobilizadas, ao invés de enzimas, são as de evitar várias etapas de extração e a purificação enzimática, além dos efeitos sobre a atividade, estabilidade e custo (JUNTER e JOUENNE, 2004). A imobilização, neste estudo, mostrou-se viável na produção de derivados do LQFM 021.

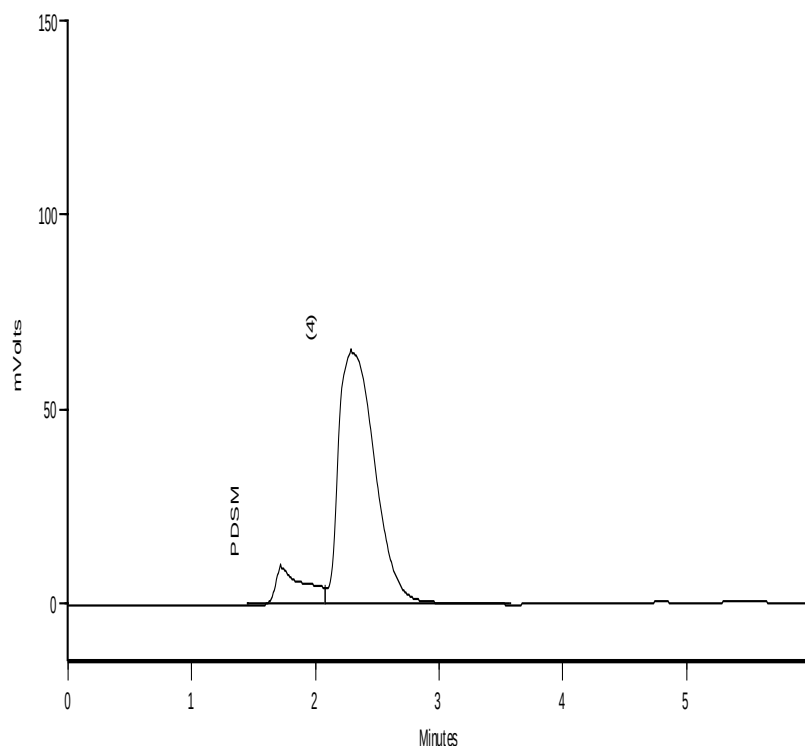
Células fúngicas imobilizadas tem apresentado maior capacidade de biotransformar fármacos do que células livres, sugerindo aumento da atividade enzimática em biofilmes. Tais resultados, ainda, reportam sua utilização como ferramentas eficazes para a produção de derivados em escala industrial (AMADIO, CASEY *et al.*, 2013).

Em adição, as células crescidas como biofilmes mantiveram sua integridade estrutural, estando protegidos das tensões mecânicas provocadas pela agitação contínua e, apresentando, portanto, mais robustez e manuseio facilitado (AMADIO, CASEY *et al.*, 2013).

4.6.2.3 Experimento 3: Reutilização dos biofilmes incubados com meio de cultura PDSM

As análises, por CLAE, em que foram selecionados o sistema cromatográfico isocrático 8 e 220 nm como comprimento de onda na região do UV, das alíquotas de incubação com biofilmes reutilizados, também indicaram a obtenção de um derivado do LQFM 021. O perfil cromatográfico obtido da alíquota de 96 h está apresentado na Figura 24, com tempos de retenção iguais a 1,73 minutos e 2,30 minutos para o picos referentes ao meio de cultura PDSM e ao derivado (4), respectivamente.

Figura 24 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 021 com biofilmes reutilizados de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, após período de 96 horas de incubação



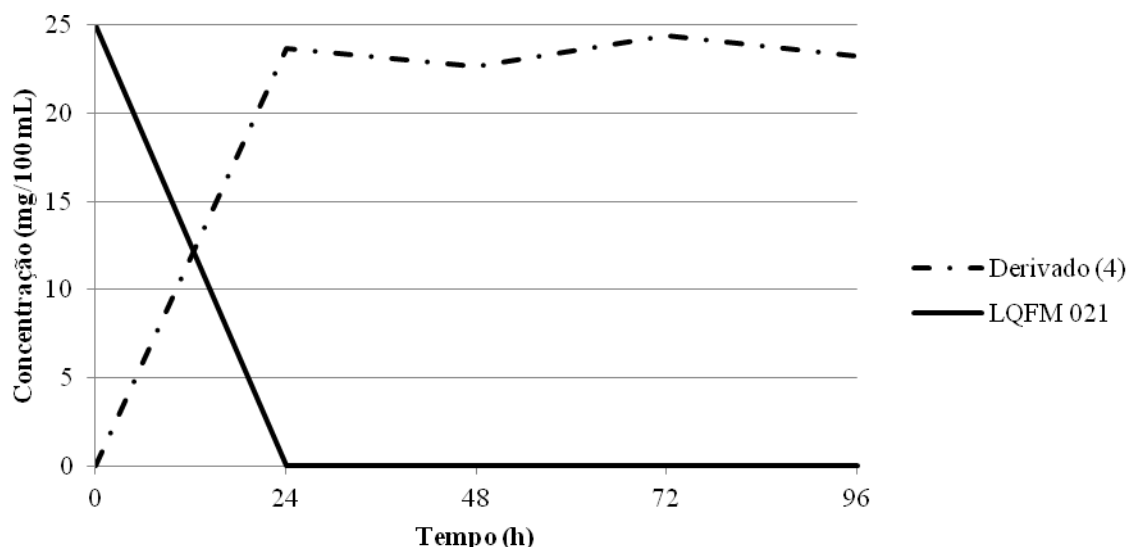
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 μ), Sistema cromatográfico isocrático 8; 220 nm

Células imobilizadas viáveis podem se multiplicar no interior da matriz imobilizadora e são capazes, portanto, de serem regeneradas e reutilizadas, mesmo em condições hostis de incubação ou na presença de substratos tóxicos (JUNTER e JOUENNE, 2004). Os biofilmes reutilizados foram capazes de biotransformar o LQFM 021 em um derivado mais polar.

Geralmente, o reuso eficiente de biofilmes está associado à regeneração das células viáveis (FREEMAN e LILLY, 1998), que, neste estudo, foi realizado pela reposição do meio de cultura aos biofilmes extraídos.

No Gráfico 4, obtido a partir das análises, por CLAE, das alíquotas de 24, 48, 72 e 96 h da incubação, em PDSM, utilizando biofilmes reutilizados de *C. echinulata* ATCC 9244, é possível verificar a formação do derivado (4) já nas primeiras 24 horas, sendo a concentração máxima atingida em 72 h.

Gráfico 4 - Cinética de biotransformação do LQFM 021 por biofilme reutilizado de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, incubado com meio de cultura PDSM



É possível verificar, ainda, maiores concentrações do derivado obtido nessas condições nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h, quando comparado com as incubações com células livres e imobilizadas (incubadas com tampão PBS e meio de cultura PDSM). Os “pulsos de reativação” dos microorganismos, quando da adição de meio de cultura “novo”, conforme citado anteriormente, podem, ainda, ter induzido a atividade enzimática da cepa, promovendo maiores taxas de biotransformação do LQFM 021 com biofilmes reutilizados de *C. echinulata* ATCC 9244. Nesse caso, a biotransformação procedida com células imobilizadas mostraram-se mais viáveis, devido à maior facilidade no processo de extração dos produtos formados.

O decaimento completo do substrato também se deu nas primeiras 24 h de incubação, fato que se verificou em todos os experimentos decorridos neste estudo e que pode ser justificado, também, pela adsorção física do substrato às hifas internas do biofilme (PAKULA e FREEMAN, 1996).

4.7 PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS

4.7.1 Incubação com células livres

A Fração Cetônica foi submetida à cromatografia em coluna cromatográfica, com coluna de vidro de 30 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro, preenchida com sílica gel 60 Å (Vetec®) e eluída com gradientes de fase móvel AcOEt 100 %, AcOEt:MeOH 95:5, AcOEt:MeOH 90:10, AcOEt:MeOH 85:15, AcOEt:MeOH 50:50 e MeOH 100%.

A partir de 200 mg de extrato bruto, foram obtidos 5 mg do derivado do LQFM 021, denominado Labiocon 436 (Figura 25), que foi caracterizado por Espectrometria na região do UV, RMN ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massas Alta Resolução. Os outros extratos brutos foram, igualmente, purificados, sem, no entanto, fornecerem produtos com quantidade suficiente para caracterização.

Figura 25 – Análise por Cromatografia em Camada Delgada da purificação do extrato bruto de incubação (Fração Cetônica) com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, eluída DCM:MeOH 90:10 e revelada com luz UV (254 nm)



Legenda: Spot 1: LQFM 021; Spot 2: Labiocon 436

Fonte: Arquivo pessoal

4.7.2 Incubação com células imobilizadas

Não foram obtidas quantidades suficientes dos derivados para caracterização por RMN ^1H , apesar da satisfatória purificação em Cromatógrafo Líquido Semi-preparativo Varian ProStar/Varian 440-LC Fraction Collector. Proceder-se-ão a sucessivas injeções das frações, a fim de se obter maiores quantidades.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO

4.8.1 Incubação com células livres

As análises de RMN ^1H foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o ^1H). Os espectros foram registrados em DMSO, com TMS como padrão interno (Anexos B-E). A Tabela 2 demonstra as atribuições dos deslocamentos

químicos obtidos do espectro de RMN ^1H do LQFM 021 e de seu derivado (Labiocin 436), obtido a partir da incubação com células livres.

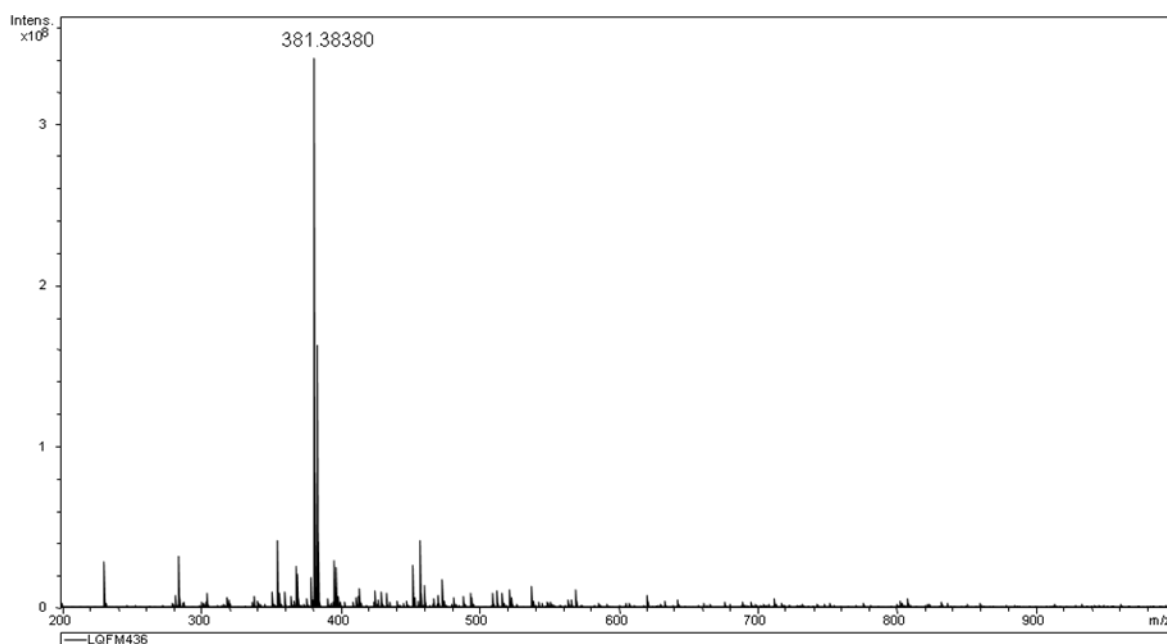
Tabela 2 - Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H ((500 MHz) $\text{DMSO-d}_6/\text{TMS}$ (δ ppm)) do LQFM 021 e Labiocin 436

Posição	LQFM 021		Labiocin 436	
5	9,22 (1 H, d, , $J = 0,6$ Hz)		9,19 (1 H, d, 0,6 Hz)	
3	8,31 (1 H, d, $J = 0,6$ Hz)		8,29 1 H, d, $J = 0,6$ Hz)	
2'	7,90 – 7,80 (m)		7,90 – 7,80 (m)	
6'				
5'	7,65 – 7,52 (m)		7,64 - 7,53 (m)	
4'	7,23 (1 H, tt, $J = 8,24$ e 2,44)		7,23 (1 H, tt, $J = 8,24$ e 2,44)	
1'''	-		4,22 (d, $J = 7,63$ Hz)	
2''' – 5'''	-		3,69 – 2,85 (m)	

Os sinais dos prótons anoméricos são facilmente identificados entre 4,5 e 5,4 ppm e cada sinal aparece como um dubleto (d) (DA SILVA JUNIOR, DE SOUZA *et al.*, 2008). Sinais típicos de hidrogênios de carboidratos podem ser identificados entre δ_{H} 3,2 e 4,0. Baseado nisso, a caracterização do Labiocin 436 foi direcionada para um glicosídeo do LQFM 021. A substituição, ainda, foi proposta no anel tetrazólico, já que os sinais referentes aos prótons dos anéis pirazol e fluorofenil foram evidenciados, também, nos espectros do Labiocin 436.

Análises por Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ressonância Ciclotrônica de Íons foram realizadas a fim de se obter a fórmula molecular do derivado e confirmar a sua estrutura. Foi verificado o aumento de massa comparado ao LQFM 021, com o cátion $(MH+150)^+$ e valor referente a m/z 381,38380, com erro de 0,14 Da (Figura 26).

Figura 26 - Espectro de massas do Labiocon 436



Fonte: Autor

Tais resultados, então, sugeriram possível pentosilação. Xilose, ribose e arabinose são as pentoses mais comumente verificadas nesse tipo de reação. A adição do açúcar de 5 membros xilose raramente ocorre na natureza e foram reportadas apenas em bactérias e plantas (WEN, FOLEY *et al.*, 2013).

O espectro de fragmentação MS/MS (Anexo F) apresentou um fragmento de massa m/z 349,14267, com erro de 2,23 ppm, indicando a perda de duas hidroxilas da porção do açúcar e outro fragmento de massa m/z 231,07890, indicando a perda completa da porção de açúcar, comprovando, assim, a *N*-glicosilação proposta.

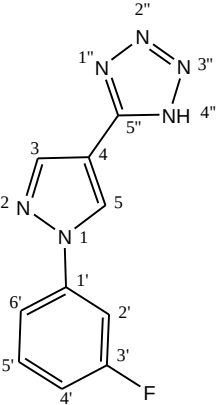
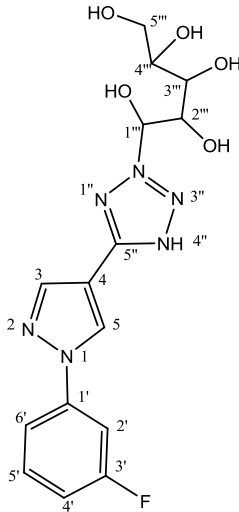
Ribosilação e xilosilação foram as alternativas, *a priori*, mais razoáveis frente às biotransformações, uma vez que há relatos literários dessas reações catalisada por culturas microbianas. Yuan e colaboradores (2006) obtiveram o ribosídeo da xantona derivada de *Halenia elliptica*, e, na produção de sterinas, às agliconas livres foram adicionadas riboses (YUN, CHO *et al.*, 2002).

Kondo e colaboradores (KONDO, YAMAGAMI *et al.*, 1993) obtiveram o xilosídeo do 4-metilguaiacol (MeG) a partir da incubação com *Coriolus versicolor*. Biotransformação com *Escherichia coli* também forneceu um xilosil-derivado da quercetina (PANDEY, MALLA *et al.*, 2013). Nesse caso, as análises espectrais de RMN ^{13}C foram suficientes para identificação do produto obtido, uma vez que foi possível verificar a similaridade com relatos anteriores.

Majoritariamente, a confirmação da porção de açúcar adicionada dá-se mediante os resultados de hidrólise ácida e/ou de RMN ^{13}C . Yuan e colaboradores (2006) identificaram a ribose no derivado obtido a partir dessas técnicas.

As análises de RMN ^1H - ^{13}C HSQC/HMBC foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T . Os espectros foram registrados em DMSO, com TMS como padrão interno (Anexos G-J). A Tabela 3 demonstra as atribuições dos deslocamentos químicos obtidos do espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC/HMBC do substrato LQFM 021 e de seu derivado (Labiocin 436), obtido a partir da incubação com células livres.

Tabela 3 - Sinais evidenciados baseados em ^1H - ^{13}C HSQC/HMBC ($\text{DMSO-d}_6/\text{TMS}$ (δ ppm)) do LQFM 021 e Labiocon 436

Posição	LQFM 021		Labiocon 436	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
				
5	9,22 (1 H, d, , $J = 0,6$ Hz)	128,0	9,19 (1 H, d, 0,6 Hz)	128,2
3	8,31 (1 H, d, $J = 0,6$ Hz)	141,5	8,29 1 H, d, $J = 0,6$ Hz)	140,3
2'	7,90 – 7,80 (m)	106,1	7,90 – 7,80 (m)	106,5
6'				
5'	7,65 – 7,52 (m)	131,1	7,64 - 7,53 (m)	131,9
4'	7,23 (1 H, tt, $J = 8,24$ e $2,44$)	115,1	7,23 (1 H, tt, $J = 8,24$ e $2,44$)	114,3
3'	-	162,8	-	162,1
1'	-	140,2	-	139,9
4		109,6	-	110,3
5''	-	162,3	-	163,0
1'''	-	-	4,22 (d, $J = 7,63$ Hz)	100,8
2''' – 5'''	-	-	3,69 – 2,85 (m)	*

O dado de deslocamento químico δ (^{13}C -1''') 100,8, referente ao carbono anomérico sugere, então, que ribulose ($\delta(^{13}\text{C}_{\text{anomérico}})$ 104,0) e xilulose ($\delta(^{13}\text{C}_{\text{anomérico}})$ 104,4), podem ser as unidades de açúcar do Labiocon 436. Infere-se, além disso, a partir da constante de acoplamento [δ 4,22 (1H, d, $J = 7,63$ Hz)], que a sua configuração é β (BUBB, 2003; YUAN, ZHANG *et al.*, 2006).

5 CONCLUSÕES

Foi obtido um derivado do LQFM 021, denominado Labiocon 436, a partir da biotransformação por células fúngicas de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cultivadas livremente.

A metodologia de imobilização celular foi satisfatória, sendo observada a formação de biofilme de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

As metodologias CLAE desenvolvidas para o monitoramento da biotransformação do LQFM 021 foram satisfatórias para a separação, identificação e quantificação para análise da cinética da reação.

O processo de purificação por cromatografia em coluna proporcionou o isolamento e purificação do Labiocon 436 com rendimento global de 2 %. A purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Semi-Preparativa também se mostrou eficiente.

As metodologias empregadas para caracterização do substrato LQFM 021 foram eficientes e a proposta para o Labiocon 436 é de um pentosil-derivado.

PERSPECTIVAS

- Proceder a biotransformação de diferentes tetrazóis;
- Alterar as condições reacionais a fim de otimizar o processo de biotransformação e aumentar o rendimento de formação dos derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADIO, J.; CASEY, E.; MURPHY, C. D. Filamentous fungal biofilm for production of human drug metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 5955-63, 2013.
- AMADIO, J.; GORDON, K.; MURPHY, C. D. Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6299-303, 2010.
- ARAÚJO, K. C. et al. Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 93-6, 2013.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16–29, 2009.
- AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 169-218, 1999.
- BAYDOUN, E. et al. Microbial transformation of nandrolone with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana* and evaluation of leishmaniacidal activity of transformed products. **Steroids**, v. 88C, p. 95-100, 2014.
- BERTRAND, S. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnol Adv**, 2014.
- BHATTI, H. N.; KHERA, R. A. Biological transformations of steroidal compounds: a review. **Steroids**, v. 77, n. 12, p. 1267-90, 2012.
- BUBB, W. A. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 2003.
- CARRILLO-CONDE, B. R. et al. High-throughput synthesis of carbohydrates and functionalization of polyanhydride nanoparticles. **J Vis Exp**, n. 65, 2012.
- CHEN, N.-D. et al. Microbial conversion of ruscogenin by *Gliocladium deliquescens* NRRL1086: glycosylation at C-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 491–497, 2010.
- CHOUDHARY, M. I. et al. Biotransformation of adrenosterone by filamentous fungus, *Cunninghamella elegans*. **Steroids**, v. 72, n. 14, p. 923-9, 2007.
- CIPOLLA, L. et al. Discovery and design of carbohydrate-based therapeutics. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 721-37, 2010.
- COSTA, E. M. D. M. B. et al. Selection of filamentous fungi of the *Beauveria* genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 405-408, 2008.

COSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 65-85, 2006.

COVIZZI, L. G. et al. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

CUSACK, K. P. et al. Emerging technologies for metabolite generation and structural diversification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 20, p. 5471-83, 2013.

DA SILVA JUNIOR, E. N. et al. Complete and unambiguous assignments of ¹H and ¹³C chemical shifts of new arylamino derivatives of ortho-naphthofuranquinones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 1158-62, 2008.

DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 225-231, 2000.

DIAZ, E. et al. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 523-+, 2001.

ELAVARASAN, T.; BHAKIARAJ, D. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Synthesis, Spectral Analysis, In Vitro Microbiological Evaluation, and Molecular Docking Studies of Some Novel 1-(1-Aryl-1H-tetrazol-5-yl)-2-(piperidin-1-yl)ethanone Derivatives. **ISRN Organic Chemistry**, v. 2014, p. 120173, 2014.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. New York: Springer, 2011.

FARIA, J. V. et al. Synthesis and activity of novel tetrazole compounds and their pyrazole-4-carbonitrile precursors against *Leishmania* spp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 23, p. 6310-6312, 2013.

FENICE, M. et al. Repeated-batch production of pigments by immobilised *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 271-276, 2000.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

GALONIC, D. P.; GIN, D. Y. Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1000-7, 2007.

GANTT, R. W.; PELTIER-PAIN, P.; THORSON, J. S. Enzymatic methods for glyco(diversification/randomization) of drugs and small molecules. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 11, p. 1811-1853, 2011.

GE, H. X. et al. Chemical and microbial semi-synthesis of tetrahydroprotoberberines as inhibitors on tissue factor procoagulant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 62-9, 2013.

GE, H. X. et al. Regio- and enantio-selective glycosylation of tetrahydroprotoberberines by *Gliocladium deliquescens* NRRL1086 resulting in unique alkaloidal glycosides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2357-64, 2012.

GENISHEVA, Z.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, J. M. Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. **Trends in Food Science & Technology**, 2014.

GOMES, T. C. F. **Bioconversão do derivado N-fenilpiperazínico LASSBio 579, um potencial candidato a protótipo de fármaco**. 2007. 119 (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007

GRIFFITH, B. R.; LANGENHAN, J. M.; THORSON, J. S. ‘Sweetening’ natural products via glycorandomization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 622–630, 2005.

GROSS, R. et al. Microbial biofilms: new catalysts for maximizing productivity of long-term biotransformations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 6, p. 1123-34, 2007.

GU, C. et al. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 303-7, 2013.

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475–480, 2009.

JIN, S. et al. Biotransformation of polydatin to resveratrol in *Polygonum cuspidatum* roots by highly immobilized edible *Aspergillus niger* and Yeast. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 766–770, 2013.

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome em leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 8, p. 633-58, 2004.

KAIVOSAARI, S. **N-Glucuronidation of Drugs and Other Xenobiotics**. 2010. 86 (Master). Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki, 2010

KALE, R. R. et al. Benzotriazole-Mediated Facile Synthesis of Novel Glycosyl Tetrazole. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 31, p. 130-142, 2012.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potencial. **Environment International**, v. 35, p. 127-141, 2009.

KETUDAT CAIRNS, J. R.; ESEN, A. beta-Glucosidases. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 20, p. 3389-405, 2010.

KIM, H. J.; LEE, I. S. Microbial metabolism of the prenylated chalcone xanthohumol. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 10, p. 1522-4, 2006.

KOLDOBSKII, G. I. Strategies and Prospects in Functionalization of Tetrazoles. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 469-486, 2006.

KONDO, R.; YAMAGAMI, H.; SAKAI, K. Xylosylation of Phenolic Hydroxyl-Groups of the Monomeric Lignin Model Compounds 4-Methylguaiacol and Vanillyl Alcohol by *Coriolus-Versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 438-441, 1993.

KOURKOUTASA, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.

KRSTENANSKY, J. L.; KHMELNITSKY, Y. Biocatalytic combinatorial synthesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n. 10, p. 2157-62, 1999.

KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112-23, 2013.

LANGENHAN, J. M.; THORSON, J. S. Recent Carbohydrate-Based Chemoselective Ligation Applications. **Current Organic Synthesis**, v. 2, p. 59-81, 2005.

LIU, J. H.; YU, B. Y. Biotransformation of Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Lead Compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1400-1406, 2010.

LUSTOSA, K. R. M. D. et al. Microbial β -glycosylation of entacapone by *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 611-613, 2012.

MA, B. et al. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, p. 1067-1074, 2007.

MARINHO, P. H. C. **Aspectos Bioquímicos e Ultraestruturais de *Cunninghamella elegans* cultivada em meio contendo naftaleno**. 2004. 74 (Mestrado). Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004

MARRA, R. K. et al. 4-(1H-Pyrazol-1-yl) benzenesulfonamide derivatives: identifying new active antileishmanial structures for use against a neglected disease. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12961-73, 2012.

MEI, J. et al. Synthesis of two new hydroxylated derivatives of spironolactone by microbial transformation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 14, p. 3023-5, 2014.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S.; KUZUYAMA, T. Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 320-1, 2010.

MOODY, J. D. et al. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 11, p. 1274-9, 2002.

NGUYEN-TRUNG, A. T. et al. Synthesis of tetrazole analogues of phosphonohydroxamic acids: an attempt to improve the inhibitory activity against the DXR. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 6, p. 1643-7, 2013.

NICOTRA, F.; FERLA, B. L.; AIROLDI, C. **Amino Group Chemistry: From Synthesis to the Life Sciences**. Germany: 2008.

OSTROVSKII, V. A.; KOLDOBSKII, G. I.; TRIFONOV, R. E. In: LTD., E. (Ed.). **Comprehensive Heterocyclic Chemistry III**. St. Petersburg, Russia, 2008. cap. Tetrazoles,

PAKULA, R.; FREEMAN, A. A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil-degrading filamentous fungi. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 20-5, 1996.

PALCIC, M. M. Glycosyltransferases as biocatalysts. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, n. 2, p. 226-33, 2011a.

PALCIC, M. M. Glycosyltransferases as biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 226-33, 2011b.

PALUDO, C. R. et al. Microbial transformation of b-lapachone to its glycosides by *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 657-661, 2013.

PANDEY, R. P. et al. Production of 3-O-xylosyl quercetin in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1889-901, 2013.

PAZINI, F. **Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Protótipos de Fármacos Cardiotônicos**. 2012. 442 (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012

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

PERVAIZ, S. et al. Microbial Biotransformation: a Tool for Drug Designing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 437-450, 2013.

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

RAMOS MARTINS, D. et al. Synthesis, docking studies, pharmacological activity and toxicity of a novel pyrazole derivative (LQFM 021)--possible effects on phosphodiesterase. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 5, p. 524-31, 2013.

ROH, J.; VAVROVA, K.; HRABALEK, A. Synthesis and Functionalization of 5-Substituted Tetrazoles. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 31, p. 6101-6118, 2012.

SEDARATI, M. R. et al. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 104-114, 2003.

SHIOSAKI, R. K. et al. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, n. 3, p. 123-7, 2001.

SILVEIRA, J. P. **Aplicação do fungo filamentosso *Beauveria bassiana* spp. na produção de derivado potencialmente vasodilatador e antiproliferativo de naringenina.** 2012. 72 (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012

SINGH, S.; PHILLIPS, G. N., JR.; THORSON, J. S. The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 10, p. 1201-37, 2012.

SUN, X.-H. et al. Fungal biotransformation of mosapride by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 82-89, 2009.

THUAN, N. H.; SOHNG, J. K. Recent biotechnological progress in enzymatic synthesis of glycosides. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 12, p. 1329-56, 2013.

TOMAZ, R.; MARINA, D. Cytokinins and their Function in Developing Seeds. **Acta Chimica Slovenica**, v. 57, p. 617-629, 2010

TRONINA, T. et al. Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 23, n. 7, p. 1957-60, 2013.

VACHHANI, D. D. et al. Synthesis of (spiro)cyclopentapyridinones via C(sp³)-H functionalization: a post-Ugi gold-catalyzed regioselective tandem cyclization. **Chem Commun (Camb)**, v. 49, n. 64, p. 7171-3, 2013.

VASCONCELOS, W. E. D. et al. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, n. 2, 2003.

VELANKAR, H. R.; HEBLE, M. R. Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 90-103, 2003.

VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 262-268, 2006.

WANG, K. et al. Highly regioselective glycosylation of xylosyl-containing taxanes by *Enterobacter cloacae*. **Fitoterapia**, v. 84, p. 158-162, 2013.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-29, 2005.

WANG, W.-X.; CAI, H.-L.; XIONG, R.-G. Hydrothermal synthesis method of 5-(40-methylbiphenyl-2-yl)-1H-tetrazole. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, p. 783-785, 2013.

WEIJERS, C. A. G. M.; FRANSSEN, M. C. R.; VISSER, G. M. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 436-456, 2008.

WEN, D. et al. Discovery and investigation of O-xylosylation in engineered proteins containing a (GGGS)_n linker. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 9, p. 4805-12, 2013.

WEST, T. P.; STROHFUS, B. Polysaccharide production by immobilized *Aureobasidium pullulans* cells in batch bioreactors. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 285-8, 2001.

WILLIAMS, S. J.; DAVIES, G. J. Protein--carbohydrate interactions: learning lessons from nature. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 356-62, 2001.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.

YAO, M.-L. et al. A novel biotransformation of astragalosides to astragaloside IV with the deacetylation of fungal endophyte *Penicillium canescens*. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 807–812, 2014.

YUAN, W. et al. Microbial O-demethylation, hydroxylation, sulfation, and ribosylation of a xanthone derivative from *Halenia elliptica*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 811-4, 2006.

YUN, B. S. et al. Sterins A and B, new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum*. **Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 2, p. 208-10, 2002.

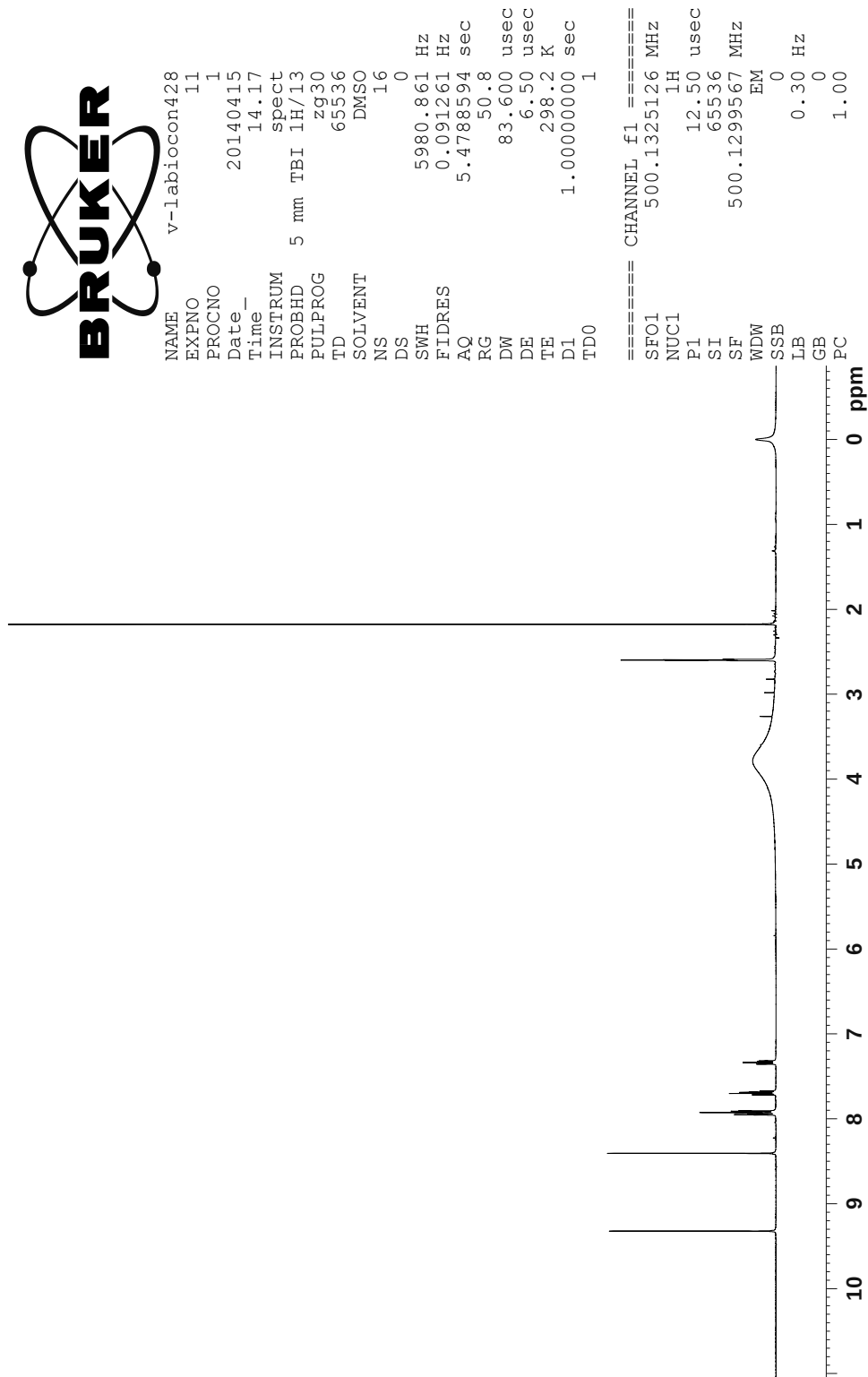
ZENG, J.; GAGE, D.; ZHAN, J. Production of a new pyridine N-oxide by bioconversion with *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 5, p. 497-9, 2012.

ZHANG, H. et al. Xylosylation as an effective means for reducing yeast growth inhibition by 2-phenylethanol. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, p. 792–795, 2013.

ZI, J. et al. Metabolism of quercetin by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 360-2, 2011.

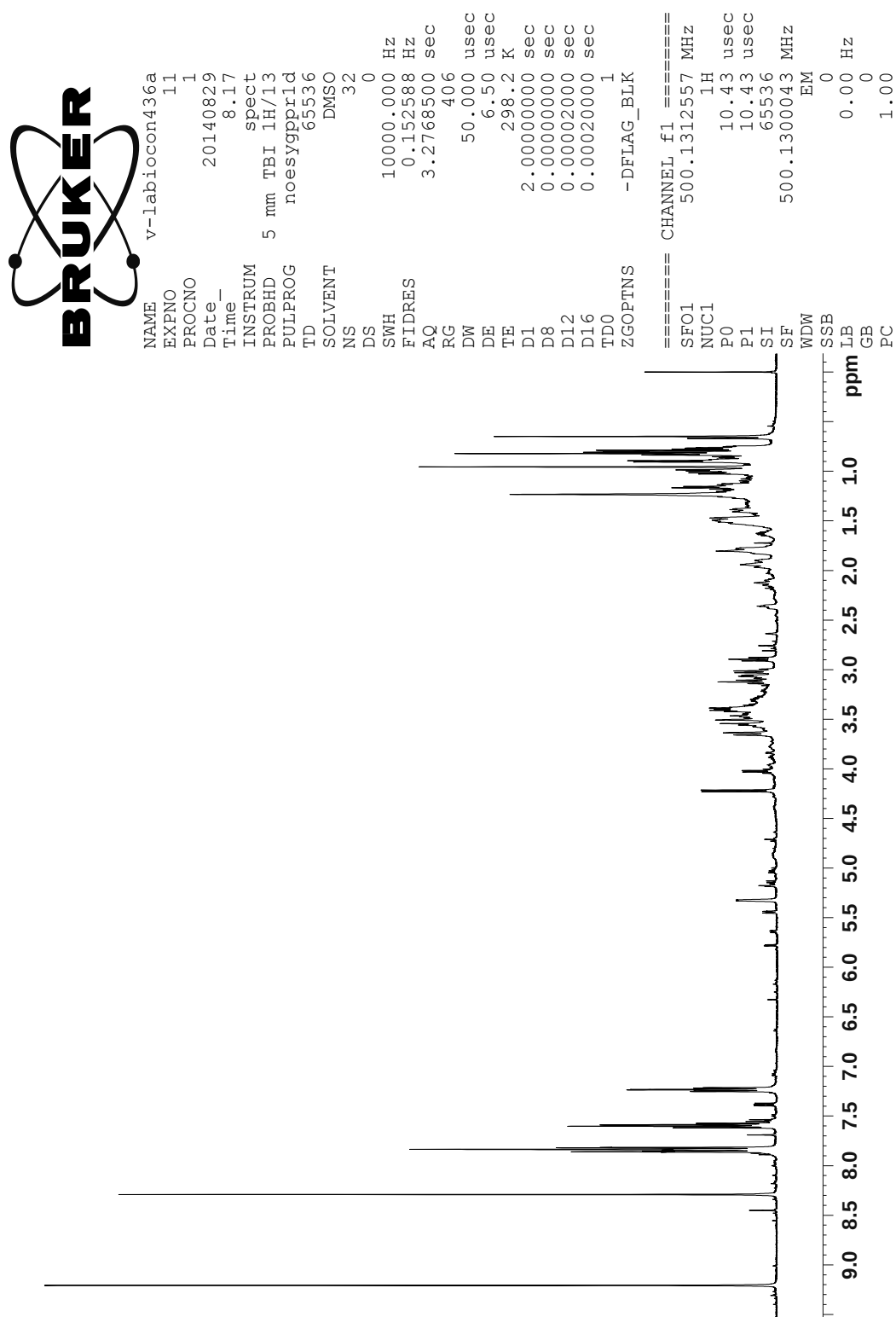
ANEXOS

Anexo A - Espectro de ^1H RMN do substrato LQFM 021 obtido em DMSO deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)

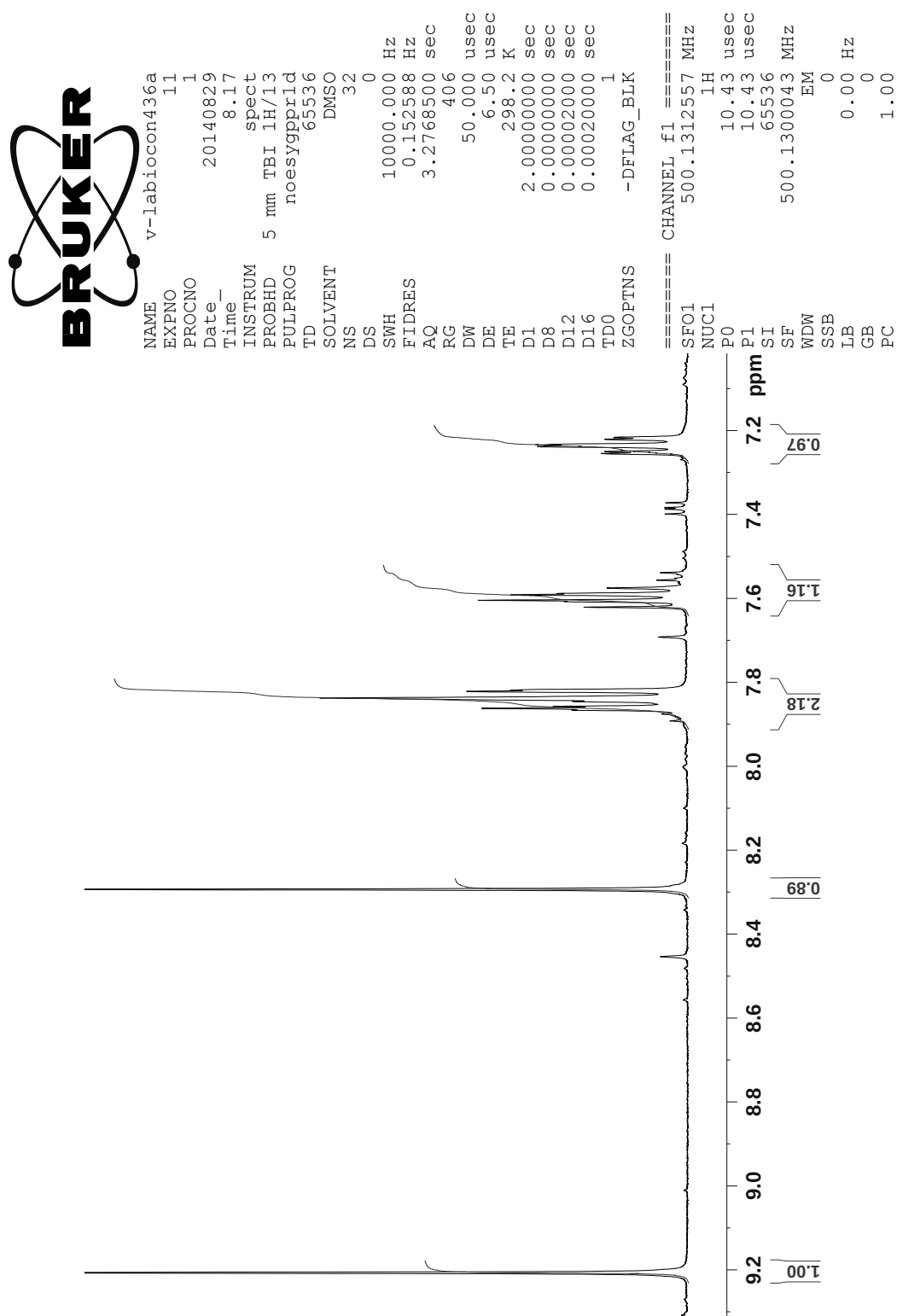


Anexo B - Espectro de ^1H RMN do Labiocon 436 obtido em DMSO deuterado com TMS.

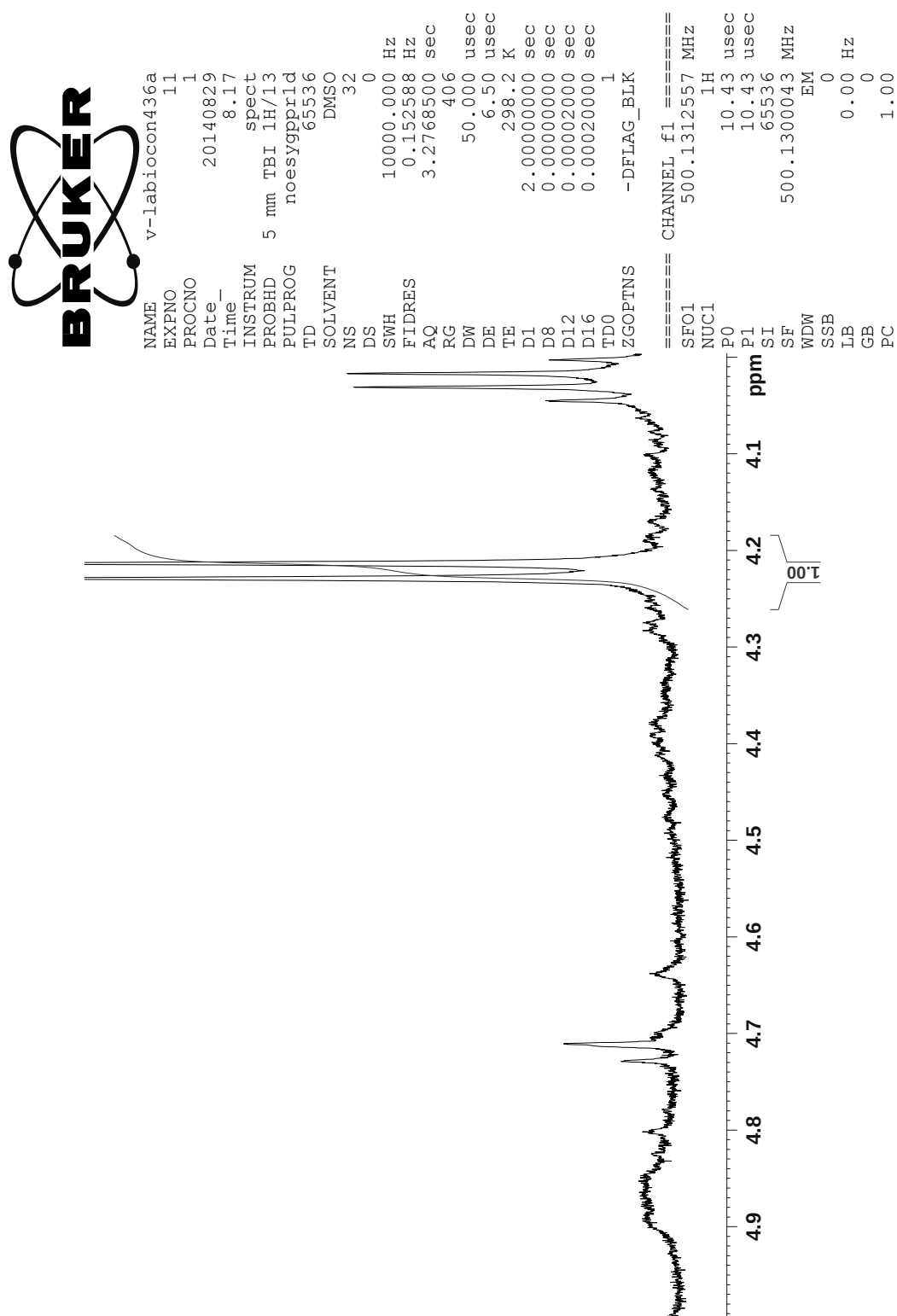
Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



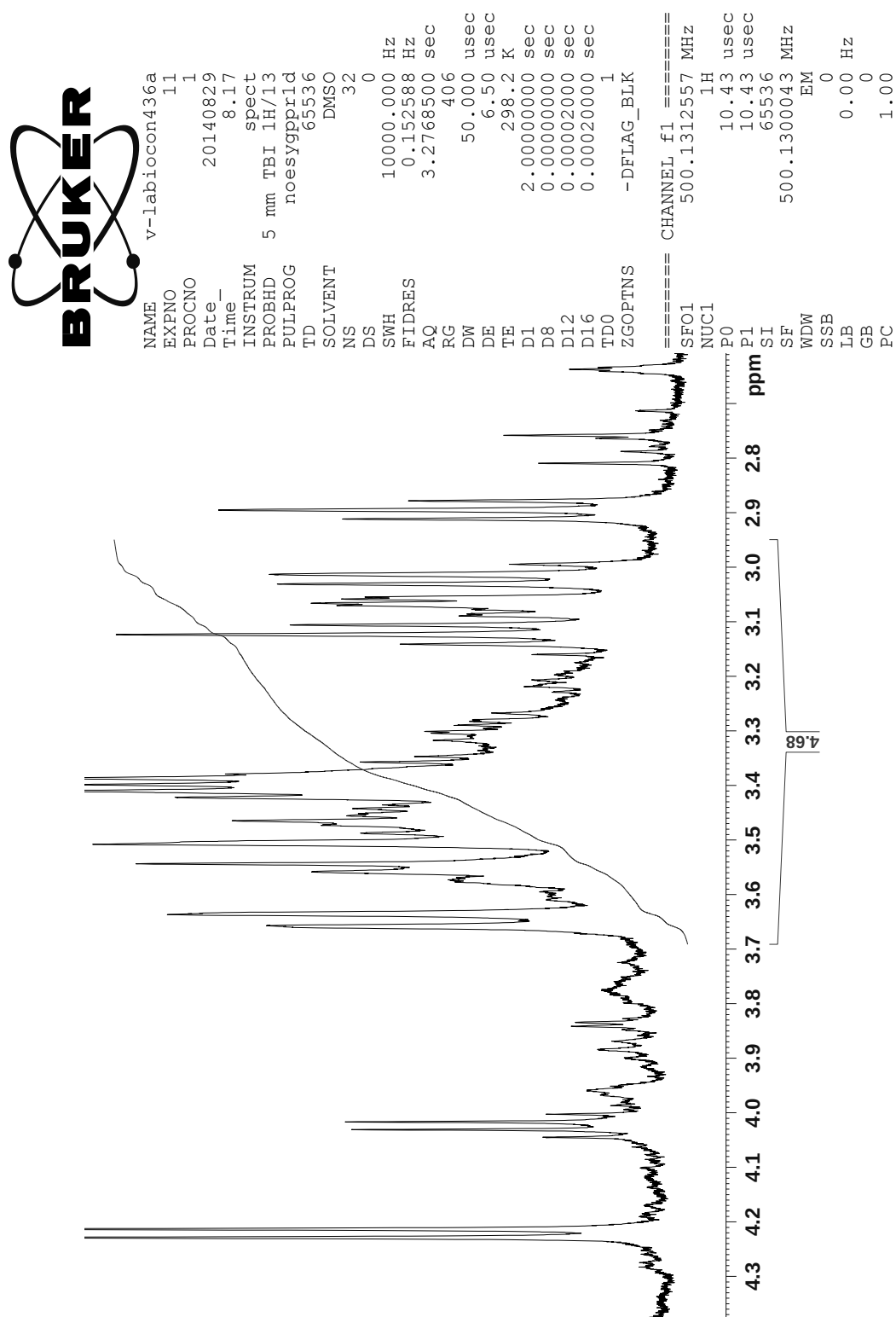
Anexo C - Espectro ampliado (9,3 a 7,1 ppm) de ^1H RMN do Labiocon 436 obtido em DMSO deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



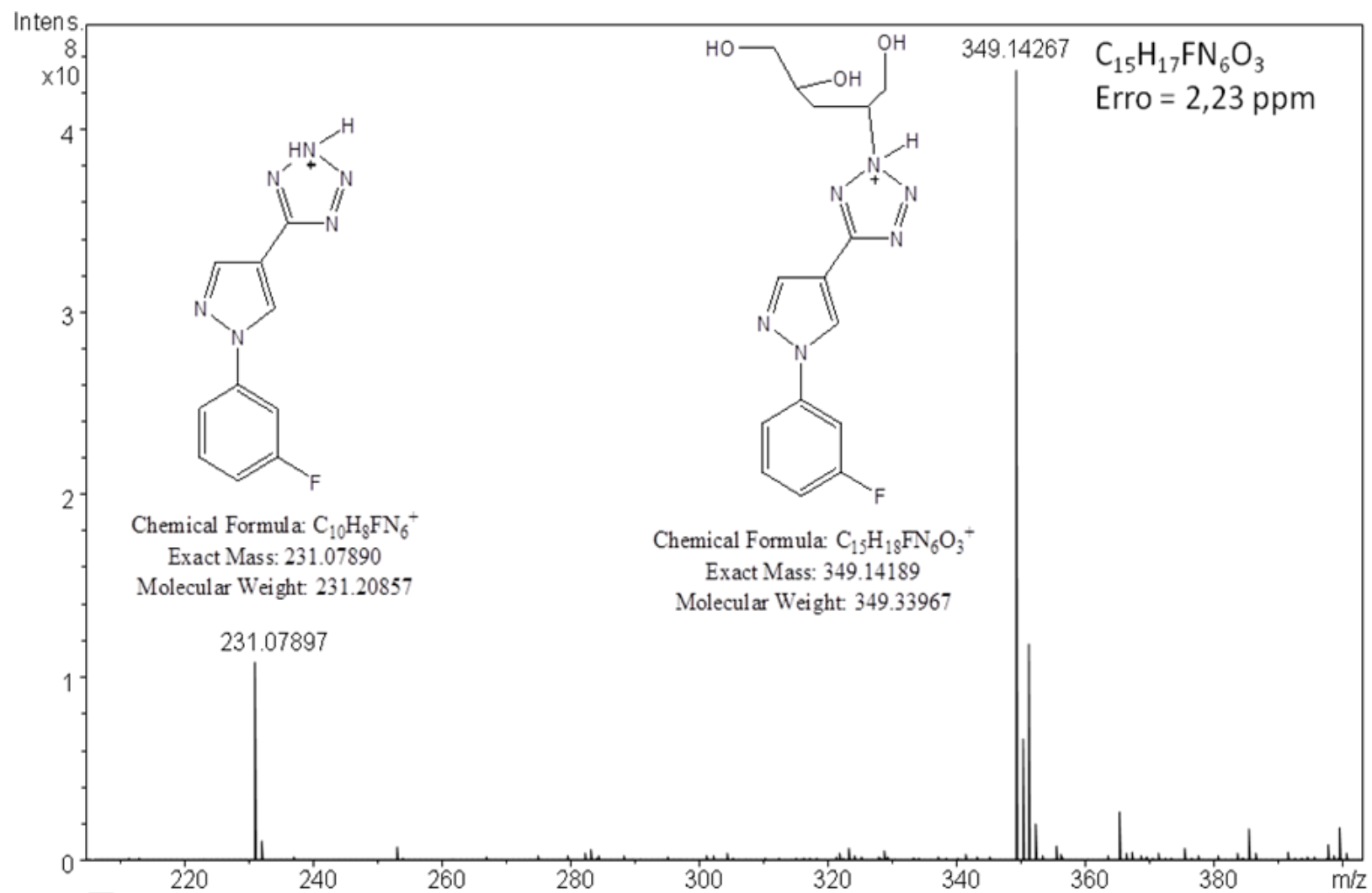
Anexo D - Espectro ampliado (5,0 a 4,0 ppm) de ^1H RMN do Labiocon 436 obtido em DMSO deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



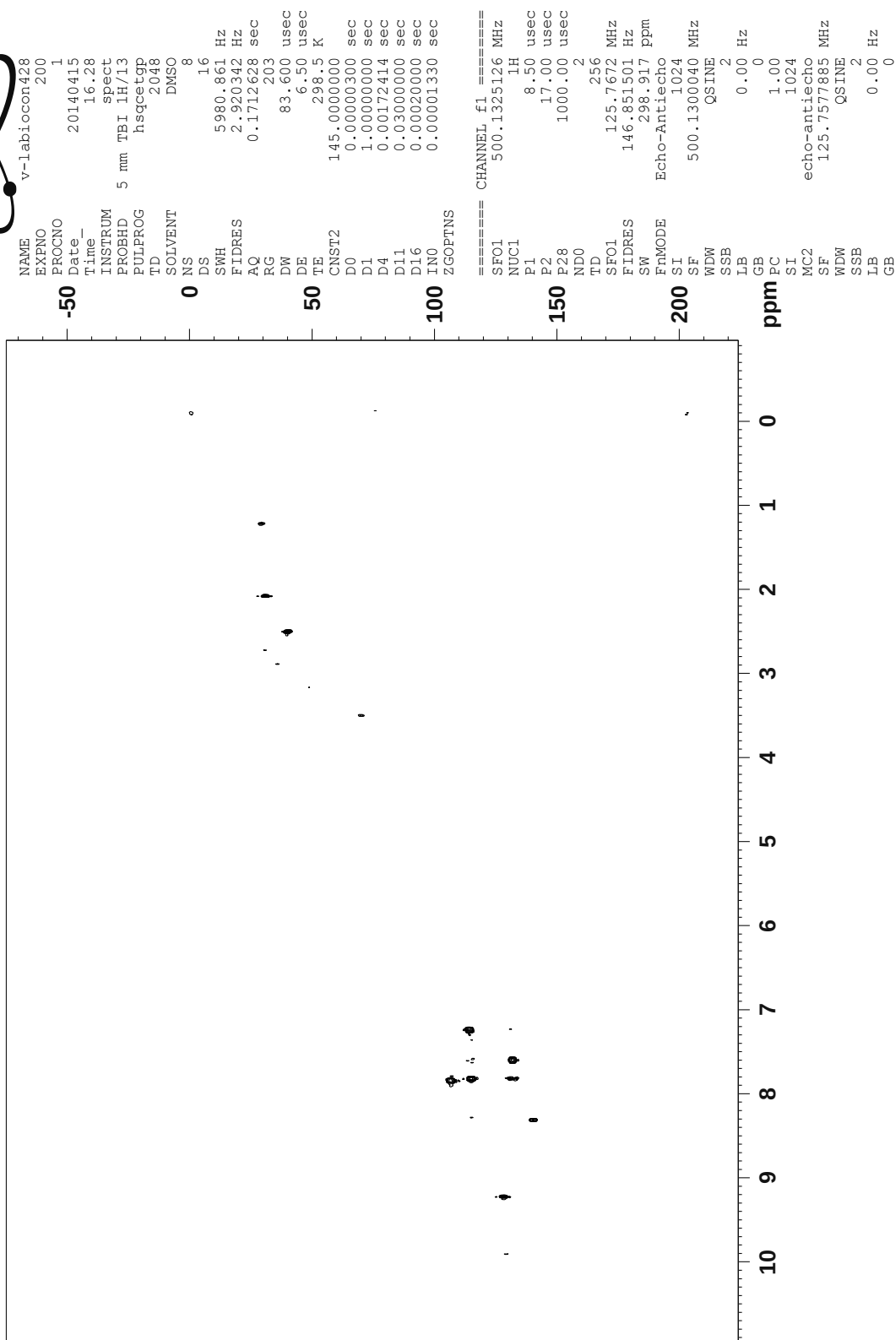
Anexo E - Espectro ampliado (4,4 a 2,6 ppm) de ^1H RMN do Labiocon 436 obtido em DMSO deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



Anexo F - Espectro MS/MS do íon majoritário m/z 349,14267 referente à análise do derivado Labiocon 436



Anexo G - Espectro HSQC do substrato LQFM 021 obtido em DMSO deuterado com TMS



Anexo H – Espectro HSQC do substrato LQFM 021 obtido em DMSO deuterado com TMS

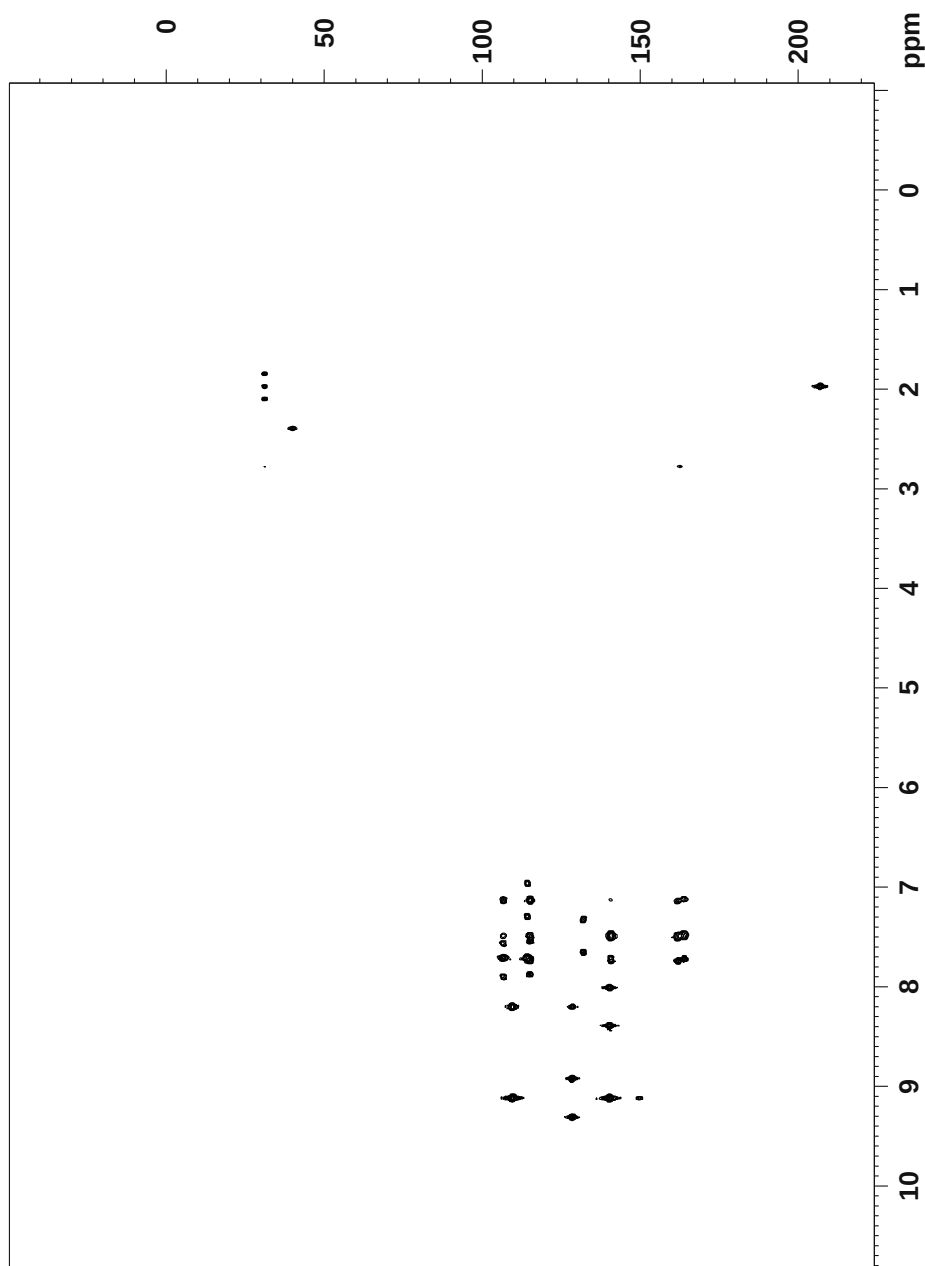


```

NAME v-labiocon428
EXPNO 300
PROCNO 1
Date_ 20140415
Time_ 14.21
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG hmbcgp1pndqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 24
DS 16
SWH 5980.861 Hz
FIDRES 2.920342 Hz
AQ 0.1712628 sec
RG 203
DE 83.600 usec
TE 298.2 K
CNST2 145.0000000
CNST13 10.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 1.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D6 0.05000000 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00001330 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 500.1325126 MHz
NUC1 1H
P1 8.50 usec
P2 17.00 usec
ND0 2
TD 256
SFO1 125.7703 MHz
FIDRES 146.851501 Hz
SW 298.910 ppm
F1MODE QF
SI 2048
SF 500.1300620 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
SI 1024
PC 1.00
MC2 QF
SF 125.7577885 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

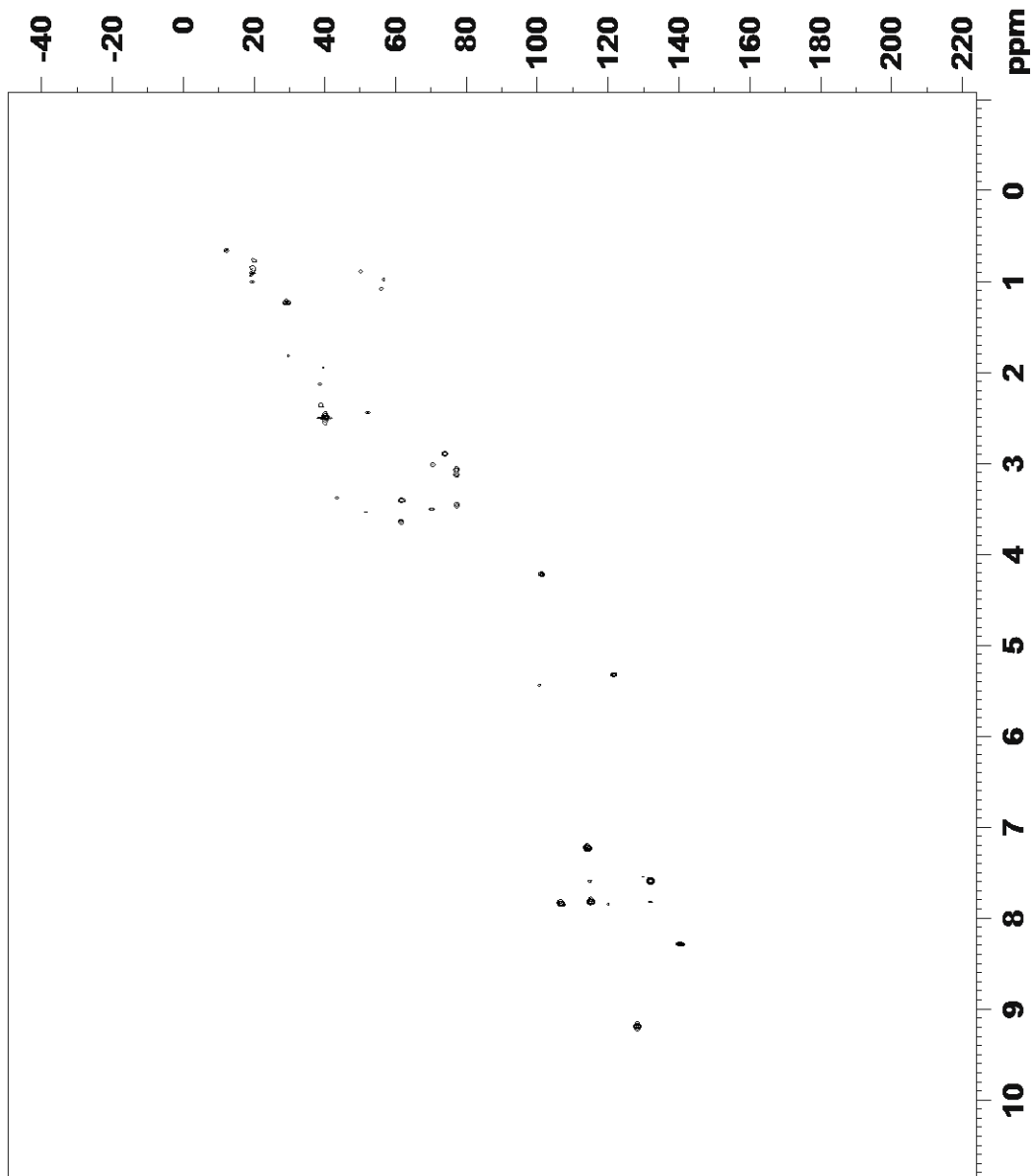
```





NAME v-labiocon436a
EXPNO 200
PROCNO 1
Date_ 20140829
Time_ 3.29
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG hsqcetpsi_MOD
TD 4096
SOLVENT DMSO
NS 48
DS 16
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 1.956255 Hz
AQ 0.2556404 sec
RG 912
DW 62.400 usec
DE 6.50 usec
TE 298.4 K
CNST2 145.000000
D0 0.0000300 sec
D1 1.00000000 sec
D4 0.00172414 sec
D11 0.03000000 sec
D16 0.00020000 sec
D24 0.00086207 sec
IN0 0.00001330 sec
ZGPTNS

===== CHANNEL f1 =====
SF01 500.1325007 MHz
NUC1 1H
P1 10.38 usec
P2 20.76 usec
P28 1000.00 usec
ND0 2
TD 256
SF01 125.7704 MHz
FIDRES 146.851501 Hz
SW 298.910 ppm
FMODE Echo-Antiecho
SI 1024
SF 500.1300038 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 0.02
SI 1024
MC2 echo-antiecho
SF 125.7577915 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0



Anexo J - Espectro HMBC do Labiocon 436 obtido em DMSO deuterado com TMS



NAME v-labiocon436a
 EXPNO 300
 PROCNO 1
 Date_ 20140828
 Time_ 18.52
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm TBI 1H/13
 PULPROG hmbegplprdqf
 TD 4096
 SOLVENT DMSO
 NS 92
 DS 16
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 1.956255 Hz
 AQ 0.2556404 sec
 RG 203
 DW 62.400 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 CNST2 145.0000000
 CNST13 10.0000000
 D0 0.00000300 sec
 D1 1.00000000 sec
 D2 0.00344828 sec
 D6 0.05000000 sec
 D16 0.00020000 sec
 IN0 0.00001330 sec

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 500.1325007 MHz
 NUC1 1H
 P1 10.38 usec
 P2 20.76 usec
 ND0 2
 TD 256
 SFO1 125.7703 MHz
 FIDRES 146.851501 Hz
 SW 298.910 ppm
 FMODE QF
 SI 2048
 SF 500.1300027 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 125.7577885 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0

