



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

KELLY CAROLINA FRAUZINO ARAÚJO CORDEIRO

Biotransformação fúngica da hesperetina e sua aplicação na
produção de metabólitos ativos

Goiânia
2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

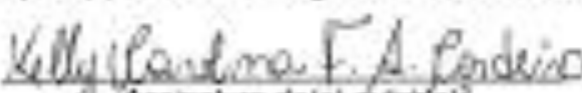
Nome completo do autor: Kelly Carolina Frauzino Araújo Cordeiro

Título do trabalho: Biotransformação fúngica da hesperetina e sua aplicação na produção de metabólitos ativos

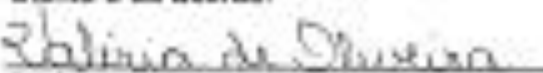
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 11/09/19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de depósito. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

KELLY CAROLINA FRAUZINO ARAÚJO CORDEIRO

Biotransformação fúngica da hesperetina e sua aplicação na produção
de metabólitos ativos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
da Universidade Federal de Goiás para
obtenção do Grau de Doutor em Inovação
Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Oliveira

Goiânia
2018

Ficha de Identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Frauzino Araujo Cordeiro, Kelly Carolina
Biotransformação fúngica da hesperetina e sua aplicação na produção de metabólitos ativos [manuscrito] / Kelly Carolina Frauzino Araujo Cordeiro. - 2019.
cxvii, 135 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Valéria de Oliveira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biotransformação. 2. hesperetina. 3. microbioreator. 4. Cunninghamella. I. de Oliveira, Valéria, orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
UFG/UFAM/UNIFAP/UFGA



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO 07

Aluno (a): Kelly Carolina Frauzino Araújo Cordeiro

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira

Título da Tese: "Biotransformação fúngica da hesperetina e sua aplicação na produção de metabólitos ativos".

Data: 11/01/2019

Horário: 08:30 horas

Local: Mini auditório da Faculdade de Farmácia/UFG

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da Tese deve ser acompanhada de justificativa.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Prof ^a . Dr ^a . Valéria de Oliveira (UFG) <i>Presidente</i>	<i>Aprovado</i>	<i>Valéria de Oliveira</i>
Prof ^a . Dr ^a . Lorena Maione Silva (UEG)	<i>Aprovado</i>	<i>Lorena Maione Silva</i>
Prof ^a . Dr ^a . Maria do Rosário Rodrigues Silva (UFG)	<i>Aprovado</i>	<i>Maria do Rosário</i>
Prof ^a . Dr ^a . Carla Rosane Mendanha da Cunha (UEG)	<i>Aprovado</i>	<i>Carla Rosane M. Cunha</i>
Prof ^a . Dr ^a . Ana Paula Terezan (UFG)	<i>Aprovado</i>	<i>Ana Paula Terezan</i>
Prof ^a . Dr ^a . Maisa Borges Costa (UEG)		
Prof ^a . Dr ^a . Mariângela Fontes Santiago (UFG)		
Parecer Final	Aprovado/Reprovado <i>Aprovado</i>	



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. José Realino de Paula

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

Goiânia-GO

2018

“E nesse caminho encontramos dificuldades, e desafios, e noites mal dormidas, e incertezas e inúmeras angústias. E lembrei-me também do quanto me mantive firme na crença de que valia a pena continuar a lutar por algo, valia a pena seguir aguardando uma planta que eu tinha certeza absoluta de que floresceria.”

Ligia Moreiras Sena

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Diogo Dias Cordeiro, pelo apoio, amor, paciência, incentivo e companheirismo nestes anos conturbados em que passamos juntos. Nos momentos difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fez acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa.

À minha Lia, a quem dedico integralmente meus esforços, a fim de que ela tenha orgulho da mãe, mulher e profissional que me tornei. Quero ser sempre um exemplo e abrigo para você minha filha.

Aos meus pais pelas palavras de apoio e por me ensinarem o valor da dedicação e da disciplina.

À minha orientadora, Dr^a Valéria de Oliveira, por contribuir com meu crescimento científico e pessoal, despertando em mim o interesse pela ciência.

Ao professor Dr. Boniek Gontijo Vaz e Dr^a Thays Colletes de Carvalho pelas análises de espectrometria de massas e pela disponibilidade.

Aos amigos do Labiocon que sempre foram prestativos e fizeram esta caminhada mais leve.

Em especial à Evilanna Lima, Tatiana Caroline e Kamila Bohne pela amizade, compreensão, auxílio e palavras de apoio.

Aos colegas e amigos do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues, que foram essenciais para que eu concluísse o trabalho e lograsse êxito nesta reta final.

Em especial às minhas amigas Flavia Pine e Sophia Wieczorek que compartilharam dos momentos de dúvida e cansaço, sempre me mostrando que havia uma saída no meio do turbilhão de sentimentos de um final de pós graduação.

À CAPES pela bolsa concedida durante anos de estudo.

À todos que de alguma forma tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 FLAVONOIDES	17
1.2 HESPERETINA	18
1.3 MICRORGANISMOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONOIDES	24
1.3.1 Reações de glicuronidação e sulfatação catalisadas por fungos filamentosos	27
1.3.2 Reações de glicosilação catalisadas por fungos filamentosos	33
1.4 O GÊNERO <i>Beauveria</i> sp	38
1.5 O GÊNERO <i>Mortierella</i> sp.	39
1.6 O GÊNERO <i>Cunninghamella</i> sp	40
1.7 BIOPROCESSOS E METODOLOGIAS APLICADAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO	42
2 OBJETIVO GERAL	51
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 SUBSTRATO	53
3.2 PREVISÃO DOS METABÓLITOS DA HESPERETINA	53
3.3 MICRORGANISMOS: MANUTENÇÃO E REPIQUE	53
3.4 MEIO DE CULTURA	54
3.5 TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS	54
3.6 BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA	55
3.6.1 Filtração e extração	55
3.6.2 Purificação dos metabólitos	57
3.7 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA HESPERETINA EM MEIO DE CULTURA	57
3.8 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MICROESCALA	57

3.8.1 Ensaio com diferentes concentrações de hesperetina	58
3.8.2 Ensaio com diferentes fontes de carbono	59
3.8.3 Avaliação do crescimento do microrganismo em diferentes microbiorreatores	60
3.8.4 Microextração	61
3.9 ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO DO MICRORGANISMO	62
3.10 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS POR ESI-IT-MS	63
3.11 CINÉTICA REACIONAL POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE-EMAR).	63
3.12 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS POR RMN	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1 CARACTERIZAÇÃO E PREVISÃO DE METABÓLITOS DA HESPERETINA	66
4.1.1 Caracterização por ESI-IT-MS e RMN	66
4.1.2 Previsão dos metabólitos in silico	68
4.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	69
4.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DA HESPERETINA EM ESCALA SEMI PREPARATIVA	72
4.3.1 Filtração e extração	73
4.3.2 Caracterização	74
4.4 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA HESPERETINA EM MEIO DE CULTURA	83
4.5 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MICROESCALA	83
4.5.1 Incubação em microbiorreator com diferentes concentrações de hesperetina	84
4.5.2 Incubação em microbiorreator com diferentes meios de cultura	92

4.5.3 Avaliação do crescimento da <i>C. echinulata</i> ATCC 9245 em diferentes microbiorreatores	96
4.6 ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	99
5 CONCLUSÃO	104
6 REFERÊNCIAS	107

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura molecular geral dos flavonoides	17
Figura 2- Estrutura química da hesperetina (1) e hesperidina (2).	19
Figura 3- Estrutura química dos principais metabólitos humanos da hesperetina: hesperetina-7-O-sulfato, hesperetina-3'-O-sulfato, hesperetina-7-O-glicuronideo e hesperetina-3'-O-glicuronideo.	23
Figura 4- Hidroxilação e redução da bavaquinina por microrganismos.....	26
Figura 5- Reação de sulfatação mediada por SULTs.....	28
Figura 6- Reação de glicuronidação mediada por UGTs.	29
Figura 7- Biotransformação da silibina em metabólitos de fase I e fase II por <i>B. bassiana</i> , <i>C. blakesleana</i> e espécie de <i>Cunninghamella</i>	30
Figura 8- Quercetina e seus metabólitos de fase I e II produzidos por <i>Beauveria</i>	31
Figura 9 – Biotransformação da crisina e apigenina por <i>C. elegans</i>	32
Figura 10- Formação estereoespecífica de ligações glicosídicas nas configurações α e β	34
Figura 11- Características estruturais das glicosiltransferases. Estrutura proteica geral de glicosiltransferases dependentes de açúcar UDP mostrando os dois domínios responsáveis pela interação com o doador de açúcar e a molécula aceptora, em azul e vermelho, respectivamente.	35
Figura 12- Biotransformação da quercetina por <i>G. deliquescens</i> NRRL 1086	36
Figura 13- Biotransformação da kurarinona por <i>C. echinulata</i> AS 3.3400 produzindo kurarinona-7-O- β -D-glucosídeo.....	37
Figura 14- Produção de derivados glicosilados de flavonoides prenilados por <i>Cunninghamella</i> sp.....	37
Figura 15 - Metabolismo da daidzeína por <i>Mortierella isabellina</i> ATCC 38063.	40
Figura 16- Biotransformação do entacapone por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	41
Figura 17- Glicosilação do 4-NRC por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	42
Figura 18- Crescimento de biofilme de <i>C. elegans</i> em molas de aço inoxidável após 6 dias.....	45
Figura 19- Classificação de biorreatores e sistemas de cultura de células por volume	46

Figura 20- Desenvolvimento do bioprocessos tradicional comparado ao sistema com microbiorreator.	47
Figura 21- Biotransformação da azidotimidina por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	48
Figura 22- Biotransformação do LQFM 021 por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 imobilizada em biorreator.	49
Figura 23- Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional para cada cepa.....	56
Figura 24- Microbiorreator e incubadora de placas utilizados para a biotransformação em microescala.	58
Figura 25- Representação esquemática de ensaio com diferentes concentrações de hesperetina em microbiorreatores.....	58
Figura 26- Representação esquemática de ensaio com diferentes fontes de carbono em microbiorreator.	59
Figura 27- Microbiorreatores utilizados para crescimento do microrganismo <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	61
Figura 28- Porção de esponja de aço inoxidável utilizada para imobilização.....	62
Figura 29- Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo da hesperetina	66
Figura 30- Espectro de ESI-IT-MS/MS no modo negativo da hesperetina.....	66
Figura 31- Previsão dos metabólitos da hesperetina pelo programa Metaprint 2D. ..	68
Figura 32- Formação dos derivados da hesperetina em 24 horas de incubação com diferentes microrganismos.	72
Figura 33- Massa do produto reacional obtido nas extrações da biotransformação da hesperetina por microrganismos.	73
Figura 34- CCD de extração dos sobrenadantes de incubação dos microrganismos.	73
Figura 35- Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo do produto reacional da cepa <i>M. isabelina</i> NRRL 1757.	74
Figura 36- Espectro de ESI-IT-MS/MS no modo negativo do produto reacional da cepa <i>M. isabelina</i> NRRL 1757.....	75
Figura 37- Esquema da biotransformação da hesperetina por <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757 produzindo derivados sulfatados.	75

Figura 38- Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo do produto reacional da extração da <i>B. bassiana</i> ATCC 7159.	76
Figura 39- Espectro de ESI-IT-MS/MS no modo negativo do produto reacional da extração da <i>B. bassiana</i> ATCC 7159.	76
Figura 40- Biotransformação da hesperetina por <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 produzindo o derivado glicuronidado.	77
Figura 41- Análise de ESI-IT-MS do produto reacional da incubação com a <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244.	79
Figura 42- Análise de ESI-IT-MS/MS do produto reacional da incubação com a <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244.	79
Figura 43- Esquema da biotransformação da hesperetina por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 produzindo derivados glicosilados.	81
Figura 44- CCD das alíquotas de incubação da hesperetina em meio de cultura estéril, nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.	83
Figura 45- Formação de derivados após 48 horas de incubação em microbiorreator com diferentes concentrações de substrato.	84
Figura 46- Estrutura química do eriodictiol.	85
Figura 47- Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 287,06.	86
Figura 48- Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 381,03.	87
Figura 49- Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 463,12.	88
Figura 50 Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 477,10.	88
Figura 51- Cinética reacional da biotransformação fúngica com diferentes concentrações de hesperetina e formação dos derivados.	90
Figura 52- Estrutura química dos açúcares utilizados na composição dos meios de cultura	92
Figura 53- Formação dos metabólitos na incubação com cepas de <i>Cunninghamella</i> em diferentes meios de cultura.	93

Figura 54- ESI-IT-MS de incubação da <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169 em meio de frutose, em destaque o íon m/z 463 referente ao derivado hesperetina glicosilado e íon m/z 499 referente ao derivado glicosilado com aduto de cloro.	95
Figura 55- Morfologia do microrganismo <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245 após 48 horas de crescimento em diferentes microplacas.	96
Figura 56- Curva de crescimento da <i>C. echinulata</i> ATCC 9245 em meio de glicose incubada em microbiorreator.	98
Figura 57- Microrganismos imobilizados em esponja de aço após 48 horas de crescimento.	99
Figura 58- Microrganismos imobilizados em esponja de aço após 96 horas de incubação com a hesperetina.	100
Figura 59- CCD da extração das aliquotas de 96 horas dos microrganismos.	100
Figura 60- ESI-IT-MS do produto reacional extraído da incubação com microrganismos imobilizados em esponja de aço inoxidável.	101
Figura 61- Análise de ESI-IT-MS/MS do íon m/z 397 no modo negativo do produto reacional extraído da incubação com microrganismos imobilizados em esponja de aço inoxidável.	102

Lista de Tabelas

Tabela 1- Condições operacionais do equipamento LCQ-Fleet utilizada nas análises de ESI-IT-MS.....	63
Tabela 2- Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C da hesperetina.	67
Tabela 3- Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C da hesperetina e seu derivado glicosilado	80

Lista de Quadros

Quadro 1- Classificação, estrutura e exemplos de fontes de obtenção dos flavonoides.	18
Quadro 2- Diferentes fontes de carbono utilizadas na biotransformação em microbiorreator.	59
Quadro 3 - Morfologia dos microrganismos em meio de glicose para triagem em erlenmeyers.....	70
Quadro 4 - Análise de CCD da biotransformação da Hesperetina após 96 horas de incubação com diferentes microrganismos em meio de glicose, 27 °C e 200 r.p.m..	71

Lista de abreviaturas e siglas

^{13}C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
AcOEt	Acetato de etila
ADME(T)	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ATCC	American Type Culture Collection
B.O.D.	<i>Biochemical oxygen demand</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CICC	<i>China Center of Industrial Culture Collection</i>
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CYP	Citocromo P450
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ESI-IT-MS	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador <i>ion trap</i>
ESI-IT-MS/MS	Espectrometria de massas em tandem com ionização por <i>electrospray</i> e analisador <i>ion trap</i>
Hes-7-O-G	hesperetina-7-O-glicosídeo
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMG-CoA	DL-3-hidroxi-3-metil-glutalil coenzima A
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
MLG	Meio líquido de glicose
NOR	Razão de Ocorrência Normalizada
NRLL	<i>Agricultural Research Service Culture Collection</i>
ONOO ⁻	Peroxinitrito
Rpm	Rotações por minuto
STZ	Streptozotocina
SULTs	Sulfotransferases
UDP	Uridina difosfato
UGTs	UDP glicosiltransferases

Resumo

A hesperetina é um flavonoide da classe das flavanonas. Seus metabólitos humanos, hesperetina-3'-sulfato, hesperetina-3'-glicuronideo, hesperetina-7-sulfato e hesperetina-7-glicuronideo, e o derivado glicosilado apresentam potenciais propriedades farmacológicas. A utilização de microrganismos, como fungos filamentosos, é uma alternativa na produção destes derivados e uma ferramenta útil no processo de escalonamento das reações. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi aplicar e avaliar diferentes bioprocessos para produção de metabólitos ativos da hesperetina por biotransformação fúngica. Aplicação de microbiorreatores, uso de diferentes fontes de carbono, concentração do substrato e imobilização fúngica foram alguns dos bioprocessos avaliados além do monitoramento da reação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. Dentre os 15 fungos testados 12 cepas foram capazes de biotransformar a hesperetina. A previsão do metabolismo *in silico* utilizando o programa Metaprint 2D, indicou a possibilidade de reações de glicosilação, glicuronidação, sulfatação, com maior propabilidade nas posições 7 e 3'. A *Mortierella isabellina* NRRL 1757 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram capazes de produzir os metabólitos da hesperetina sulfatado e glicuronidado, respectivamente. A cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 produziu o metabólito glicosilado da hesperetina. Houve diferença na morfologia da *C. echinulata* ATCC 9245 no crescimento em diferentes microbiorreatores. A microplaca de orifício quadrado provocou um crescimento amorfo enquanto que as microplacas de fundo redondo favoreceram o crescimento de *pellets*. A placa redonda com capacidade de 2,2 mL demonstrou uma maior produção de massa fúngica e o tempo de 48 horas foi considerado ideal para adição do substrato. As quatro cepas de *Cunninghamella* testadas para biotransformação em microescala foram capazes de produzir o derivado glicosilado. Análises da cinética da biotransformação por CLAE-EMAR demonstraram que *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 produziu quatro derivados em microplacas, sendo eles: eriodictiol, hesperetina sulfatada, hesperetina glicosilada e hesperetina glicuronidada. Tais análises também demonstraram que altas concentrações de hesperetina inibem a formação destes derivados. Esponjas de aço inoxidável foram eficientes para a imobilização de cepas de *Cunninghamella echinulata* e

Cunninghamella elegans, estando o biofilme já formado em 48 horas. Análises de ESI-IT-MS e ESI-IT-MS/MS indicaram a produção de um derivado da hesperetina glicosilado e outro hidroxilado e sulfatado. Assim, os estudos demonstraram que diferentes bioprocessos podem ser aplicados para otimizar o escalonamento da reação e produzir derivados da hesperetina utilizando fungos filamentosos.

Palavras chave: Biotransformação, hesperetina, microbiorreator, *Cunninghamella*.

Abstract

Hesperetin belongs to the flavanone class of flavonoids, its human metabolites (i.e. hesperetin-3'-sulfate, hesperetin-7-sulfate, hesperetin-3'-glucuronide and hesperetin-7-glucuronide), and its glycosylated derivative has potential pharmacological properties. The use of microorganisms, such as filamentous fungi, is an alternative in derivatives production and a useful tool in scale up process. Therefore, the goal of the work was to apply and evaluate different bioprocesses for the production of active metabolites of hesperetin by fungal biotransformation. Application of microbioreactors, use of different carbon sources, substrate concentration, fungal immobilization and monitored reactions by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry were some of evaluated bioprocesses. From 15 tested fungi, 12 strains were able to biotransform hesperetin. In silico metabolite prediction modeling with MetaPrint 2D software, indicated positions 7 e 3' as energetically favored for glycosylation, glucuronidation and sulfation reactions. *Mortierella isabellina* NRRL 1757 and *Beauveria bassiana* ATCC 7159 produced only sulfate and glucuronide hesperitins, respectively. *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 strain produced the glycosylated metabolite. A morphological difference was observed in *C. echinulata* ATCC 9245 growth using different microbioreactors. Square microwell plates resulted in an amorphous growth whereas round bottom microwell plates favored pellets growth. The latest, with volume well of 2.2 ml led to a higher content of fungi and 48 hours was found to be the ideal time to substrate addition. All four strands of *Cunninghamella* tested for biotransformation in a microscale were able to produce the glycosylated metabolite. Analyzes of the biotransformation kinetics by HPLC-HRMS showed that *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 produced four microplate derivatives: eriodictiol, sulfated hesperetin, glycosylated hesperetin and glucuronidated hesperetin. Such analyzes have also shown that high concentrations of hesperetin inhibit these derivatives formation. Stainless steel sponge proved to be efficient for *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella elegans* strains immobilization. The immobilization process achieved biofilm in 48 hours. ESI-IT-MS and ESI-IT-MS/MS analysis indicated production of a glycosylated and a hydroxylated-sulfonated derivative. Thus, studies

demonstrated that different bioprocesses can be applied to optimize scale up reactions and produce hesperetin derivatives using filamentous fungi.

Keywords: Biotransformation, hesperitin, microbioreactor, *Cunninghamella*.

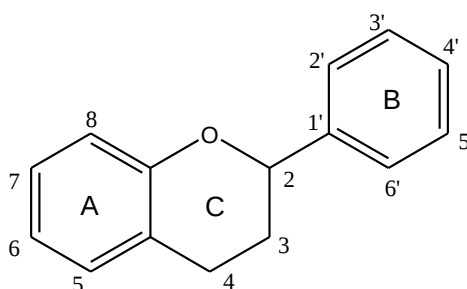
1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 FLAVONOIDES

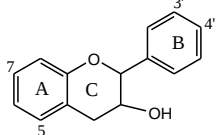
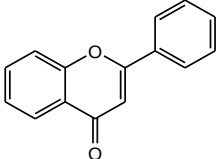
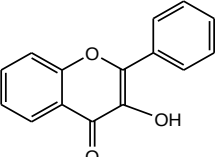
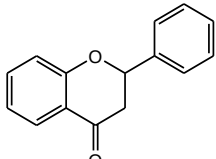
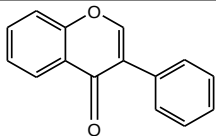
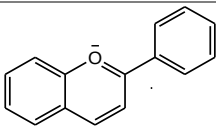
Flavonoides são uma classe de compostos naturais conhecidos como polifenóis, consistem em metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em frutas, vegetais, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho (NIJVELDT et al., 2001). Atividades farmacológicas destes compostos, tais como: antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, cardioprotetora, antidiabética, anti-câncer, antioxidante, dentre outras, já foram extensivamente descritas (WANG; LI; BI, 2018). Mais de 9000 flavonoides já foram reportados na literatura, sendo eles divididos em várias subclasses com base na estrutura molecular (WANG; CHEN; YU, 2011). Sua estrutura molecular geral consiste em dois anéis benzênicos (A e B), onde o anel A está condensado com o anel C, este último possuindo um átomo de oxigênio (Figura 1).

Figura 1- Estrutura molecular geral dos flavonoides



Apesar de amplamente distribuídos na natureza e de suas variadas aplicações terapêuticas, a biodisponibilidade dos flavonoides é baixa, o que pode impactar nos seus efeitos nutricionais (WANG; LI; BI, 2018). A tabela 1 mostra as diferentes classes de flavonoides, os principais compostos que pertencem a elas e suas respectivas fontes de obtenção.

Quadro 1- Classificação, estrutura e exemplos de fontes de obtenção dos flavonoides.

Classe	Estrutura geral	Flavonoide	Exemplos de fontes
Flavanol		(+)- catequina (-)-epicatequina Epigallocatequina galato	Chá (<i>Camelia sinensis</i>) Chá Chá
Flavona		Crisina Apigenina Rutina Luteolina Glicosídeos Luteolina	Casca de frutas Salsa, aipo Vinho tinto, trigo, cítricos Pimenta vermelha
Flavonol		Kampferol Quercetina Miricetina Tamarixetina	Alho poró, brócolis, toranja, Cebola, brócolis, tomate, Vinho tinto, uva
Flavanona		Naringina Naningenina Taxifolina Eriodictiol Hesperetina Hesperidina	Cítricos, toranja Frutas cítricas Frutas cítricas Limão Laranja Laranja
Isoflavona		Genistina Genisteina Daidzina Daidzeina	Soja Soja Soja Soja
Antocianidina		Apigenidina Cianidina	Frutas Coloridas Cereja, framboesa, morango

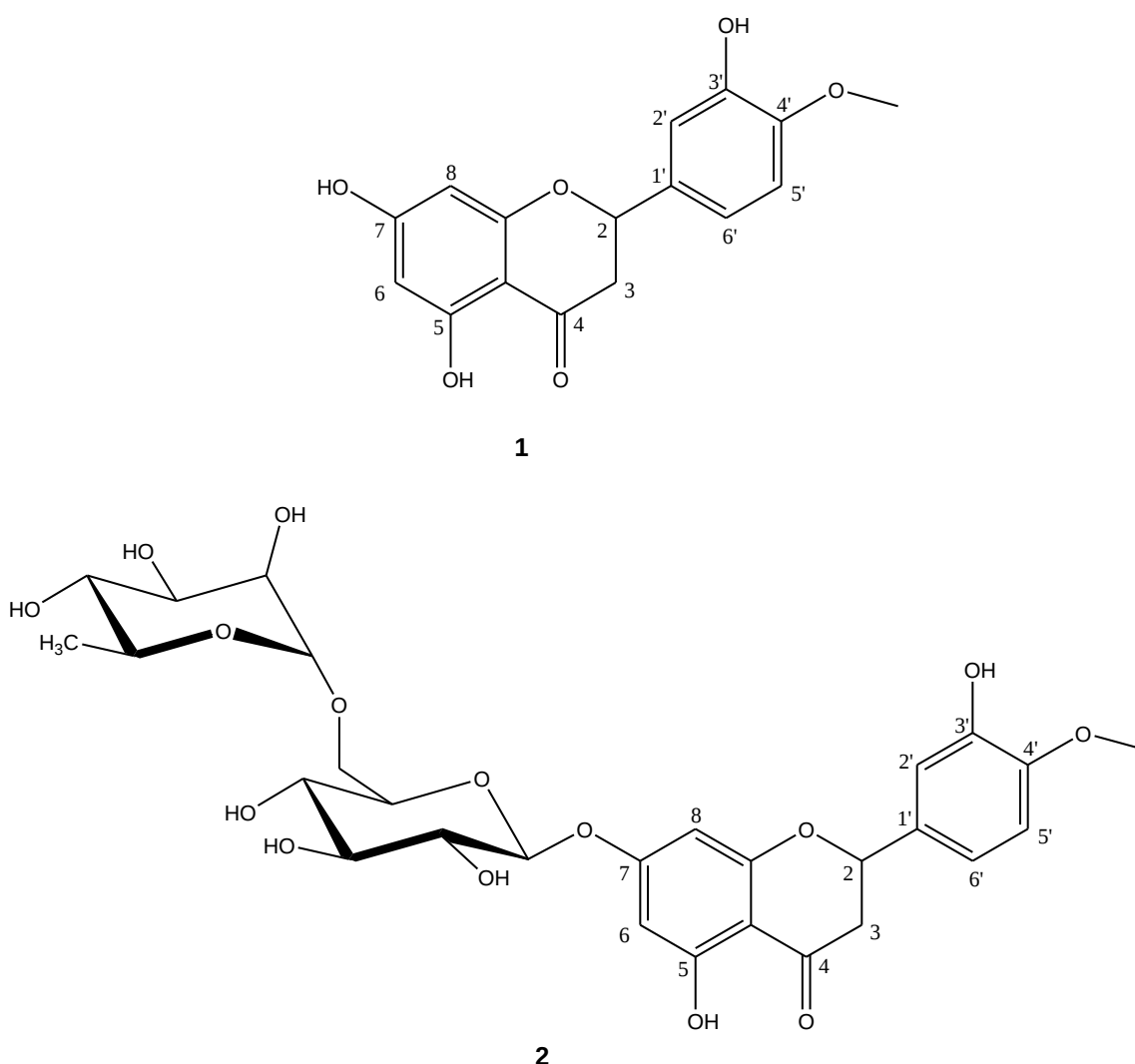
Fonte: Adaptado de Hein (2002).

1.2 HESPERETINA

A Hesperetina (3',5,7-Trihidroxi-4'-metoxiflavanona) é um flavonoide da classe das flavanonas disponível em frutas cítricas como a laranja e a *grapefruit* (ERLUND

et al., 2001). A ingestão diária de hesperetina é considerável diante do alto consumo destas fontes na dieta da população em geral. Na Finlândia, por exemplo, a hesperetina representa 50% do total de flavonoides consumidos diariamente (KNEKT et al., 2002). Entretanto, a hesperetina está presente em maior quantidade nos alimentos como um rutinosídeo, denominado hesperidina (hesperetina 7-rhamnoglucosídeo), onde a aglicona está ligada à uma glicose e uma rhamnose na posição 7 (KANAZE et al., 2006) (Figura 2).

Figura 2- Estrutura química da hesperetina (1) e hesperidina (2).



Nos mamíferos, os rutinosídeos, compostos ligados à uma glicose e uma rhamnose, são hidrolizados na parte distal do intestino e no cólon por bactérias, já os glicosídeos são hidrolizados no intestino delgado pelas enzimas beta-glicosidases. A aglicona liberada desta hidrólise, no caso a hesperetina, é então

metabolizada e encontrada no plasma como metabólitos glicuronidados, sulfatados e sulfaglicuronidados (HACKETT et al., 1979; UWE; L., 1995; JANG; KIM, 1996; CHOUDHURY et al., 1999; FELGINES et al., 2000; NIELSEN et al., 2006).

A porção de açúcar dos flavonoides, como a hesperidina, pode ser determinante na sua absorção em humanos, a exemplo da rhamnose que possui limitada absorção quando comparada às formas aglicona e glicosídica (HOLLMAN et al., 1999).

Kanaze e colaboradores (2006) relatam que a absorção da aglicona hesperetina foi muito mais rápida do que estudos anteriores que administravam oralmente a hesperidina pura ou em forma de sucos cítricos.

Por outro lado, Gonzalez-Barrio e colaboradores (2004), propuseram que removendo a porção rhamnose da hesperidina para assim gerar este flavonoide glicosilado elevaria sua biodisponibilidade. Para confirmar esta proposta, Nielsen e colaboradores (2006), conduziram um experimento com administração oral de hesperidina e hesperetina-7-glicosídeo, e obtiveram resultados comprovando que a biodisponibilidade do glicosídeo hesperetina foi até três vezes maior que a da hesperidina.

Atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, antidiabética, vasorelaxante, neuroprotetora e hipolipidêmica já foram descritas na literatura para a aglicona hesperetina (GARG et al., 2001).

Estudos de atividade antioxidante demonstraram que a hesperetina é potencial sequestradora de peroxinitrito (ONOO^-), sendo assim auxilia na prevenção de doenças relacionadas com a presença de ONOO^- , tais como Alzheimer, artrite reumatoide, câncer, aterosclerose e outras doenças inflamatórias (KIM et al., 2004).

Em modelos de câncer de cólon induzido por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos, a administração oral de hesperetina diminuiu significativamente os tumores intestinais, devido principalmente ao aumento da proteção antioxidante. A hesperetina foi capaz de retomar os perfis de peroxidação lipídica do fígado e cólon aos níveis normais. Enquanto o tratamento com DMH diminuiu as atividades da catalase e da superóxido desmutase, esta flavanona reverteu essa tendência e potencializou o sistema antioxidante do cólon e fígado, sem causar toxicidade aos órgãos. (ARANGANATHAN; NALINI, 2009)

Comparando os efeitos da hesperetina e hesperidina em células HL-60 foi relatado que o tratamento com hesperetina resultou em *DNA laddering*, alterações morfológicas, aparecimento de corpos apoptóticos, elevação da atividade da caspase-3 e diminuição de proteínas anti-apoptóticas e Mcl-1, mas nenhuma alteração nos níveis de proteína da família Bcl-2, enquanto a hesperidina não teve efeito sobre os fatores mencionados. Assim, o autor propõe que a presença do rutinosídeo no carbono 7 pode atenuar as propriedades de indução apoptóticas destes flavonoides (CHEN; SHEN; LIN, 2003).

Sarmoko e colaboradores (2014) avaliaram a aplicação do tratamento conjunto de hesperetina e doxorubicina para células de câncer de mama (MCF-7). O resultado demonstrou que a hesperetina apresentou efeito citotóxico em células resistentes à doxorubicina (MCF-7/DOX) com IC₅₀ de 95 µM e aumentou a indução apoptótica quando combinada com a doxorubicina. Ademais, o tratamento combinado mostrou efeito sinérgico em células resistentes através da supressão da expressão da glicoproteína-P.

A atividade antidiabética da hesperetina foi investigada por Revathy e colaboradores (2018) em experimentos com modelos de ratos tratados com estreptozotocina (STZ) para simular *Diabetes mellitus*. Neste modelo os ratos demonstraram aumentos dos níveis plasmáticos de glicose e redução da insulina plasmática. A suplementação com hesperetina (40 mg/Kg) por 45 dias demonstrou uma diminuição significativa da glicose plasmática e uma melhora nos níveis de insulina e glicogênio nos ratos induzidos com STZ. As atividades das enzimas de metabolismo hepático, o perfil lipídico, antioxidantes enzimáticos e biomarcadores séricos de toxicidade hepática e renal que estavam alterados foram restaurados para níveis aproximados dos normais. Os resultados obtidos foram comparados com a administração de glibenclamida (1 mg/kg), um fármaco usado no tratamento hipoglicemiante. O autor concluiu que o tratamento com hesperetina exibiu um potencial significativo, atenuando o estresse oxidativo mediado pela hiperglicemia no pâncreas e protegendo-o da toxicidade induzida pela STZ.

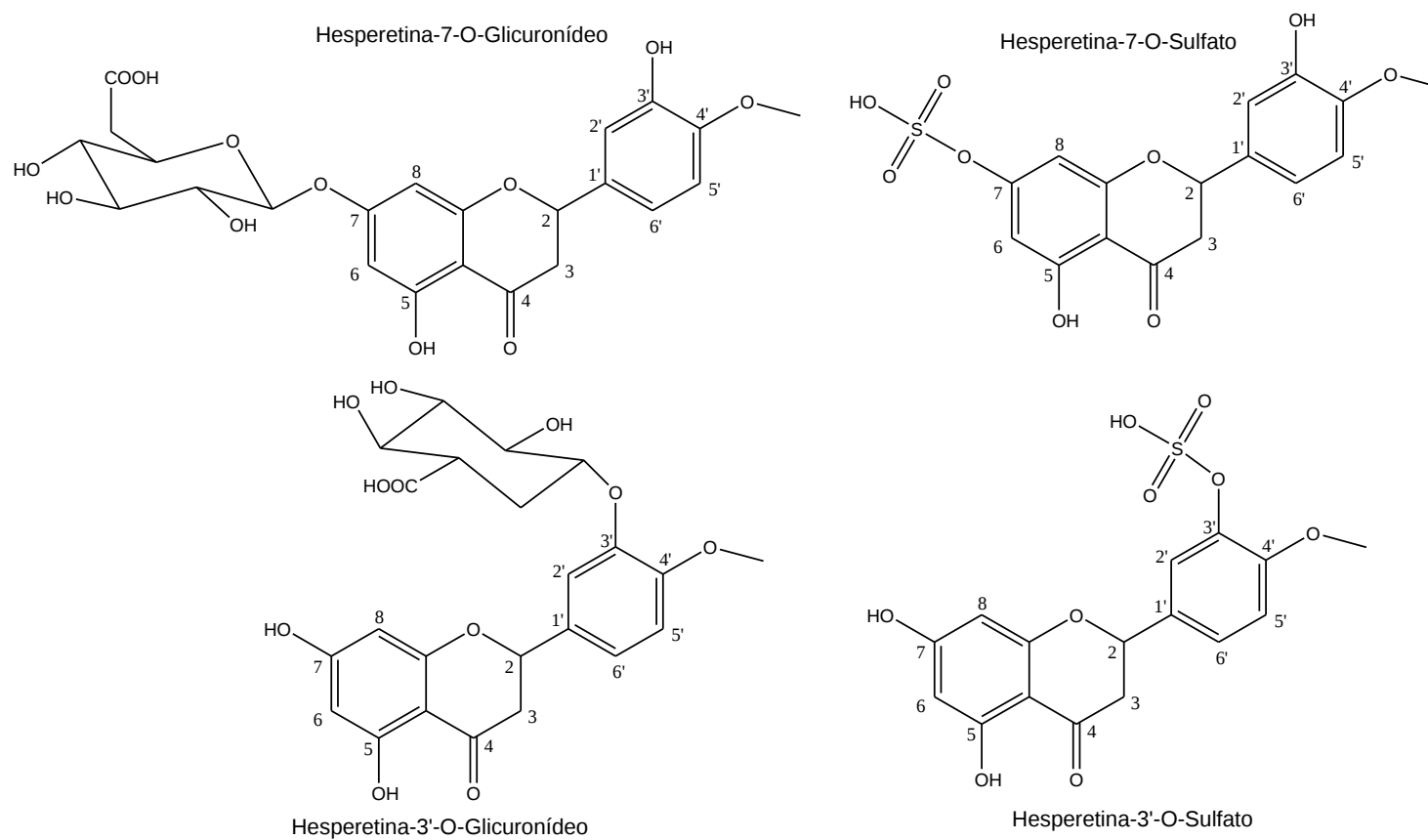
A hesperetina também parece ter efeitos na enzima α -glicosidase, segundo o trabalho de Gong e colaboradores (2017). A inibição da enzima α -glicosidase é interessante no tratamento de diabetes do tipo 2. Devido à atividade antioxidante da hesperetina, apresentou inibição reversível desta enzima (IC₅₀ = 0,38 ± 0,05mM)

acompanhada de mudanças estruturais terciárias. De acordo com os estudos computacionais de simulação de *docking* e dinâmica molecular, dois anéis da hesperetina interagem com diversos resíduos próximos ao sítio ativo da α -glicosidase. Assim, os resultados obtidos demonstraram que a hesperetina é um inibidor efetivo da α -glicosidase e pode ser uma candidata para o tratamento da diabetes tipo 2.

A atividade antidiabética *in vitro* também foi avaliada para um derivado glicosilado da hesperetina. A enzima naringinase isolada do *Aspergillus sojae* foi aplicada na bioconversão da hesperidina em hesperetina-7-O-glicosídeo (Hes-7-G), através da remoção da porção rhamnose. A Hes-7-G foi testada quanto à atividade inibidora da maltase, DL-3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, e inibição do crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*. Os resultados demonstraram que a Hes-7-G foi 1,7 e 2,4 vezes melhor do que a hesperidina e hesperetina, respectivamente, na inibição da maltase intestinal. Além disso, o produto glicosilado foi duas vezes mais potente na inibição da HMG-CoA redutase quando comparado às análises realizadas com a hesperidina. Quanto à inibição do crescimento da bactéria *Helicobacter pylori* a Hes-7-G demonstrou maior atividade que a hesperetina e similar à hesperidina. (LEE et al., 2012)

Estudos conduzidos em humanos e animais constataram que os metabólitos majoritários da hesperidina e hesperetina seriam principalmente conjugados com glicuronídeos e sulfatos (Figura 3) (BARBARA et al., 1996; FELGINES et al., 2000; ERLUND et al., 2001). Matsumoto e colaboradores (2004) demonstraram em estudos *in vivo* que os metabólitos glicuronidados da hesperetina são principalmente a hesperetina-7-O- β -glicuronideo e hesperetina-3'-O- β -glicuronideo, sendo que a concentração da hesperetina-7-O- β -glicuronideo no plasma de ratos seria levemente maior que o metabólito conjugado na posição 3'.

Figura 3- Estrutura química dos principais metabólitos humanos da hesperetina: hesperetina-7-O-sulfato, hesperetina-3'-O-sulfato, hesperetina-7-O-glicuronídeo e hesperetina-3'-O-glicuronídeo.



A atividade hipotensiva, vasodilatadora e anti-inflamatória da hesperetina-7-O- β -glicuronideo foi descrita por Yamamoto e colaboradores (2013). Utilizando modelos de ratos espontaneamente hipertensivos foi constatado a diminuição da pressão arterial ($-9,9 \pm 1,7$ mmHg, $p < 0,01$ vs. controle), além de aumento da vasodilatação em aortas isoladas (resposta vasodilatadora endotélio-dependente à acetilcolina) e supressão da inflamação em células endoteliais.

Ademais, os metabólitos hesperetina-3-sulfato e hesperetina-3-glicuronideo apresentaram atividade vasoprotetora através da redução da adesão de monócitos às células endoteliais estimuladas pelo TNF- α , afetando a expressão de genes relacionados à adesão e recrutamento de monócitos na parede vascular (CHANET et al., 2013).

A atividade cardioprotetora dos principais metabólitos da hesperetina (hesperetina-3'-sulfato, hesperetina-3'-glicuronideo, hesperetina-7-sulfato e hesperetina-7-glicuronideo) foi investigada em células endoteliais de aortas humanas (HAECs). A hesperetina e seus metabólitos diminuíram a migração celular na presença da citocina pró-inflamatória TNF- α , acompanhada ou talvez mediada por uma diminuição significativa nos níveis do trombogênico Inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) (proteína que inibe a conversão de plasminogênio em plasmina) (GIMENEZ-BASTIDA et al., 2016).

1.3 MICRORGANISMOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONOIDES

A biotransformação é uma reação química catalisada por células de microrganismos (fungos, leveduras ou bactérias) ou enzimas isoladas destes. O objetivo primordial destas reações é promover a detoxificação de um composto, por exemplo um fármaco ou produto natural, para formar produtos mais polares, facilitando sua excreção. Contudo, também pode ocorrer a formação de derivados ativos, com atividade farmacológica melhorada, ou até mesmo a formação de derivados tóxicos (VENISETTY; CIDDI, 2003; PERVAIZ et al., 2013).

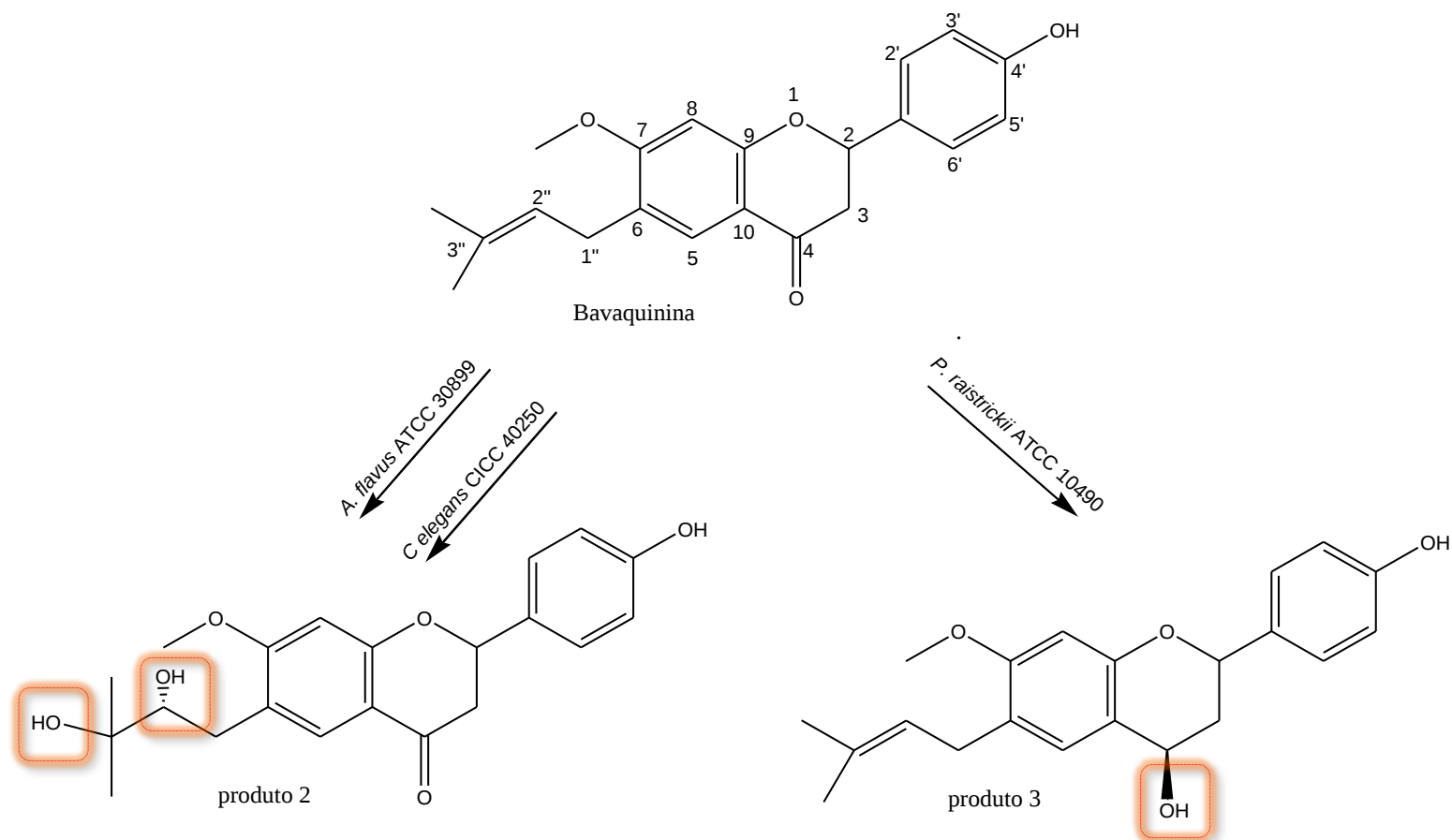
Diversas abordagens da biotecnologia, como biotransformação microbiana, engenharia enzimática, engenharia metabólica e biotransformação

utilizando células de plantas, são interessantes na biossíntese de derivados de flavonoides, pois possibilitam a produção de compostos que não existem na natureza (CAO et al., 2015). Assim, a biotransformação com fungos filamentosos é uma ferramenta para o *design* de novos compostos podendo levar à substituições em posições de difícil acesso na síntese química convencional. Tais derivados também auxiliam no aperfeiçoamento da relação estrutura atividade, gerando novas idéias em relação à biodiversidade estrutural (PERVAIZ et al., 2013).

Os sistemas enzimáticos responsáveis pela biotransformação nos fungos filamentosos catalisam uma série de reações como hidroxilação, desidroxilação, redução, O-metilação, O-demetilação, glicosilação, acetilação e conjugação (LIU; YU, 2010; CAO et al., 2015). A utilização de microrganismos inteiros para a catálise dessas reações se torna uma estratégia vantajosa frente à síntese química convencional devido às suas características estereo e regioseletivas, condições brandas de reação, procedimentos operacionais simples e de baixo custo além de menor impacto ambiental (ROZZELL, 1999).

A exemplo da aplicação desta metodologia está a biotransformação da flavanona bavaquinina por fungos filamentosos, o que resultou na produção de dois compostos inéditos através de reações de redução e hidroxilação. Três fungos filamentosos, *Aspergillus flavus* ATCC 30899, *Cunninghamella elegans* CICC 40250 e *Penicillium raistrickii* ATCC 10490 foram utilizados na biotransformação, sendo os dois primeiros responsáveis pela hidroxilação nas posições C-2" e C-3" da bavaquinina, e o *P. raistrickii* ATCC 10490 capaz de promover a redução do oxigênio na posição C-4, do anel C (Figura 4). A atividade dos compostos foi avaliada por ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. Comparando os resultados do ensaio dos derivados com a bavaquinina, foi verificado que o derivado reduzido na posição C-4 demonstrou maior inibição da atividade da linhagem de células de câncer de mama (MCF-7) (LUO et al., 2014).

Figura 4- Hidroxilação e redução da bavaquinina por microrganismos



Fonte: Adaptado de LUO et al., 2014.

1.3.1 Reações de glicuronidação e sulfatação catalisadas por fungos filamentosos

Os fungos filamentosos, como *Beauveria* sp. e *Cunninghamella* sp, podem ser aplicados como modelos para o estudo do metabolismo de compostos. Isto devido à sua capacidade de mimetizar as reações de biotransformação de fármacos e xenobióticos que ocorrem em mamíferos (GROGAN; HOLLAND, 2000; ASHA; VIDYAVATHI, 2009b).

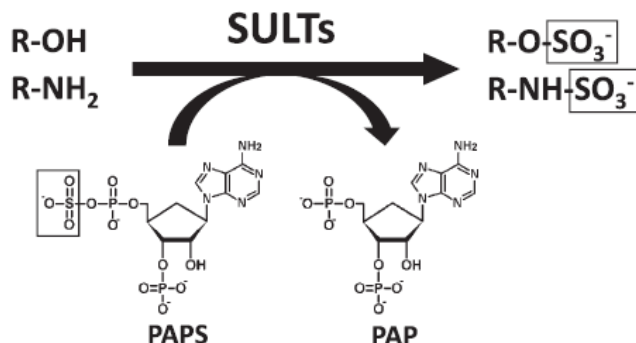
Deve-se destacar a importância destes estudos no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Ensaios pré-clínicos fornecem dados importantes de farmacodinâmica e ADME(T) (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) de uma molécula (HUGHES et al., 2011; SMITH, 2011). O estudo do metabolismo frequentemente é realizado com métodos *in vitro* utilizando microsomas hepáticos e hepatócitos ou ensaios *in vivo* em animais. Assim, a biotransformação microbiana com fungos filamentosos pode ser uma alternativa e/ou complemento à esses métodos com a vantagem de baixo custo e simplicidade da técnica (VENISETTY; CIDDI, 2003).

As reações de biotransformação em humanos são geralmente divididas em dois grupos: reações de fase I e reações de fase II. As reações de fase I envolvem principalmente reações de oxidação, redução e hidrólise, no qual atuam as enzimas do citocromo P450, flavina monoxigenases, carboxil esterase. As reações de fase II englobam reações de conjugação, principalmente glicuronidação, sulfatação, metilação e conjugação com glutathione (SUDHAKARAN; ARCHANA; AGUILAR, 2017).

As enzimas do citocromo P450 dos microrganismos, por exemplo, são capazes de desempenhar diversas funções, desde a síntese de componentes da parede celular até o metabolismo de xenobióticos e biodegradação de substâncias químicas. Estudos recentes apontam que as enzimas naturais ou modificadas geneticamente podem ser aplicadas para reações específicas em compostos naturais e sintéticos, ressaltando seu emprego no processo de desenvolvimento de novos fármacos (BHATTACHARYA; YADAV, 2018).

Em relação às reações de fase II, as enzimas responsáveis pela sulfatação e glicuronidação em humanos são as sulfotransferases (SULTs) e UDP glicosiltransferases (UGTs), respectivamente. A superfamília de SULTs compreendem ao menos 13 tipos de enzimas em humanos. A maioria das enzimas conhecidas foram caracterizadas e estudos propuseram que as principais isoformas responsáveis pelo metabolismo em humanos são as SULT1A1, SULT1A3/4,2 SULT1B1, SULT1E1 e SULT2A1 (RICHERS et al., 2009). Essas enzimas catalisam a transferência do grupamento sulfonato do sulfato ativo, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), para o substrato que contenha o grupamento hidroxila ou amina (Figura 5) (LIPMANN, 1958). A conjugação com sulfato pode resultar na inativação do composto ou aumentar sua solubilidade, facilitando a eliminação do organismo. Contudo, tal modificação pode também produzir compostos sulfatados com atividade farmacológica melhorada e melhor biodisponibilidade (IBRAHIM, 2000).

Figura 5- Reação de sulfatação mediada por SULTs.



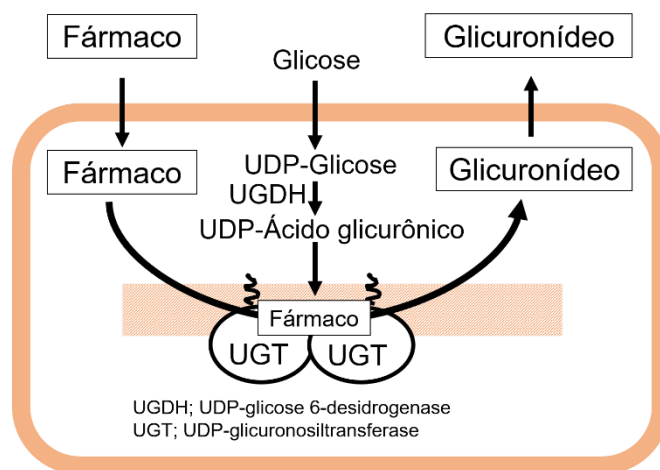
Legenda: SULTs: sulfotransferases; PAPS : 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, PAP: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato.

Fonte: (SUIKO et al., 2017).

Já a superfamília de genes UDP glicosiltransferases (UGT) codificam enzimas que ligam grupamentos glicosídicos (glicose, ácido glicurônico, xilose, galactose e outros) à substratos lipofílicos de forma covalente (Figura 6) (MACKENZIE et al., 2005). A nomenclatura UGT é comumente utilizada em trabalhos para se referir à UDP-glicuronosiltransferase, onde o UDP-ácido glicurônico seria o açúcar doador. A razão pela qual os mamíferos selecionam

o ácido glicurônico como o açúcar de escolha para a reação de conjugação ainda é desconhecida (BOCK, 2016). Mamíferos expressam quatro famílias de UGT: UGT1, UGT2, UGT3 e UGT8. As famílias UGT1 e UGT2 são mais eficientes em utilizar o UDP-ácido glicurônico como doador glicosídico, contudo, outros açúcares, incluindo a UDP glicose e xilose, podem ser utilizadas por essas enzimas (MACKENZIE et al., 2005).

Figura 6- Reação de glicuronidação mediada por UGTs.



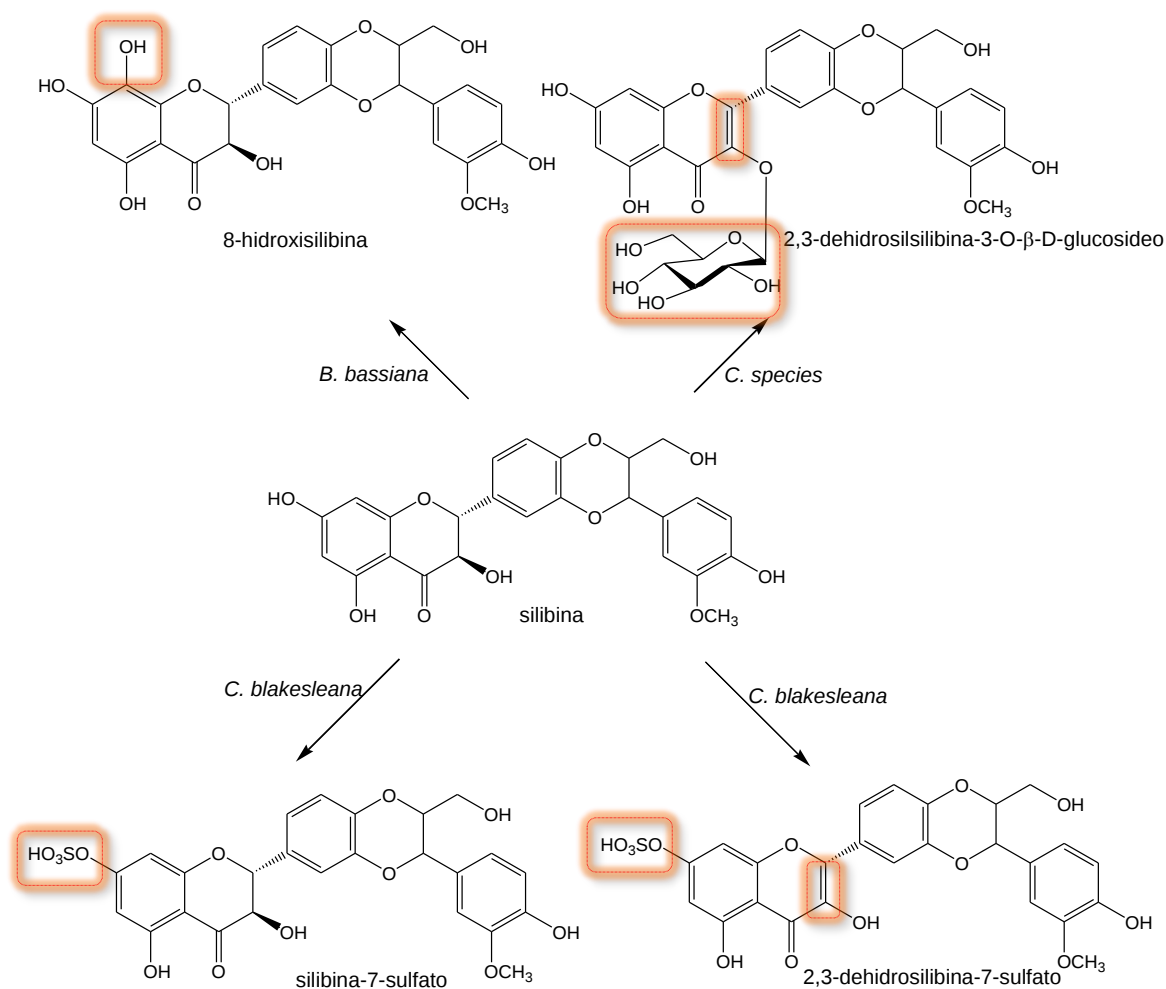
Fonte: Adaptado de IKUSHIRO et al., 2016

As enzimas envolvidas nas reações de glicuronidação e sulfatação em microrganismos, principalmente em fungos filamentosos, ainda não estão bem esclarecidas. Estudos apontam a produção de metabólitos glicuronidados e sulfatados semelhante aos mamíferos em incubações com *Cunninghamella elegans* (AMADIO; MURPHY, 2010). A participação de SULTs e UGTs em reações de conjugação utilizando a *Cunninghamella elegans* como catalisador já foi reportada (ZHANG et al., 1996). Porém, estudos aprofundados para identificação das enzimas e suas isoformas responsáveis pela conjugação ainda não foram relatados.

A biotransformação microbiana da silibina, uma flavolignana, resultou na formação de metabólitos de fase I e fase II. A cepa *Beauveria bassiana* foi capaz de catalisar a produção da 8-hidroxisilibina, e as espécies de *Cunninghamella* sp produziram os metabólitos 2,3-dehidrosililbina-3-O-β-D-glucosídeo, silibina-7-sulfato e 2,3-dehidrosililbina-7-sulfato (Figura 7). Em

ensaios de DPPH dois dos metabólitos gerados apresentaram maior atividade antioxidante em comparação ao substrato (ABOURASHED; MIKELL; KHAN, 2012).

Figura 7- Biotransformação da silibina em metabólitos de fase I e fase II por *B. bassiana*, *C. blakesleana* e espécie de *Cunninghamella*.

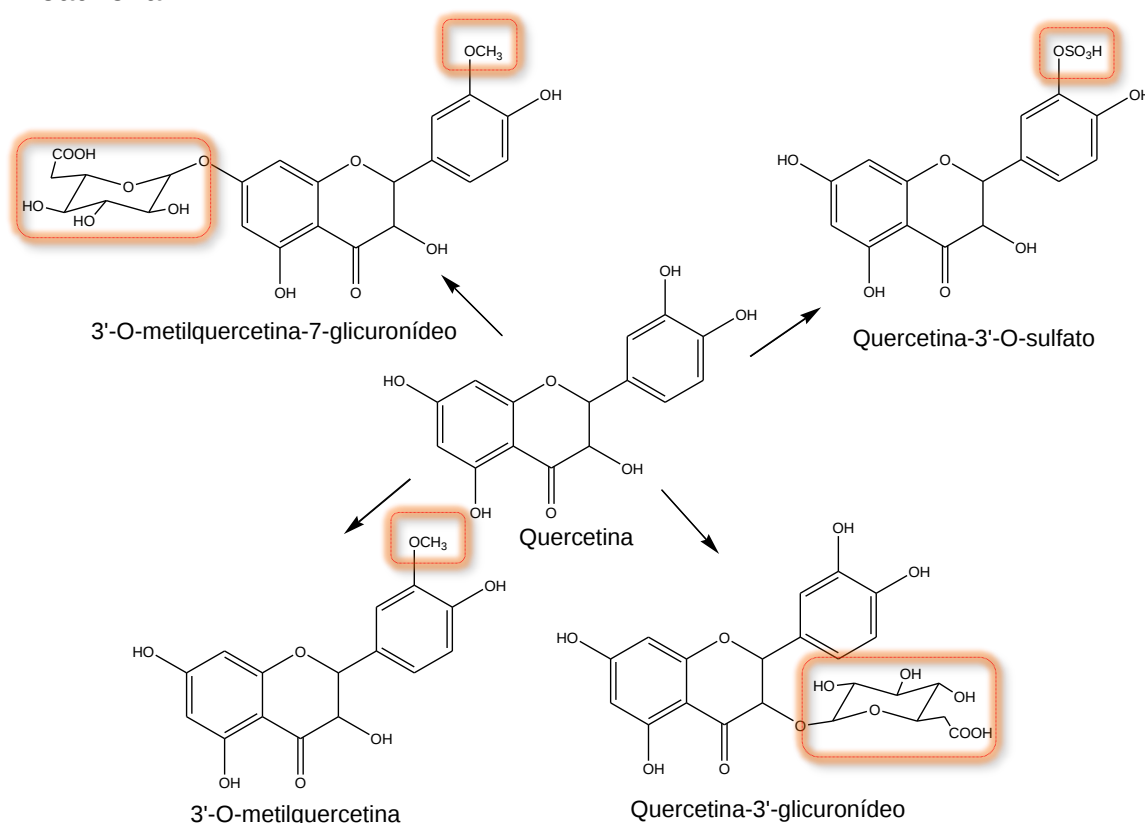


Fonte: Adaptado de ABOURASHED; MIKELL; KHAN, 2012.

Costa e colaboradores (2008) realizaram a biotransformação da quercetina com *Beauveria bassiana* ATCC 7159, produzindo metabólitos humanos. Dez cepas de *Beauveria*, isoladas do cerrado brasileiro, e a cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram avaliadas quanto à capacidade de biotransformação do flavonoide. Todas as cepas testadas biotransformaram a quercetina, formando metabólitos encontrados em mamíferos. Foram

produzidos metabólitos metilados, sulfatados e glicuronidados, indicando que tais microrganismos são capazes de expressar enzimas metabólicas de fase II na presença da quercetina (Figura 8).

Figura 8- Quercetina e seus metabólitos de fase I e II produzidos por *Beauveria*.



Fonte: Adaptado de Costa e colaboradores, 2008.

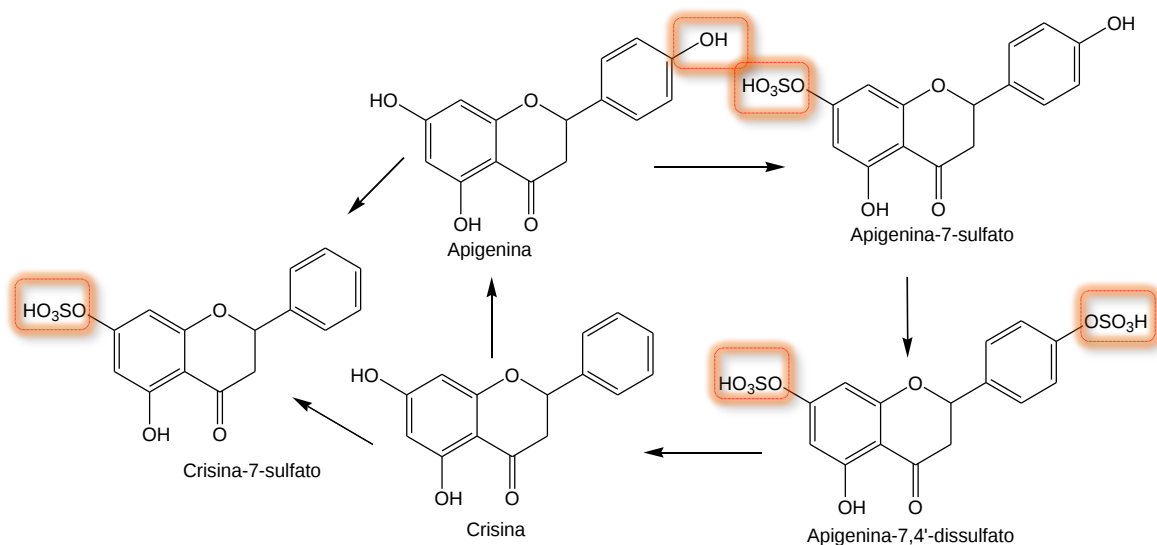
A glicuronidação através da síntese química tradicional fornece desafios adicionais quando comparada com a mais comumente realizada glicosilação de produtos naturais. Isso é evidenciado no caso dos polifenóis, para os quais até a glicosilação pode ser problemática (V. STACHULSKI; V. JENKINS, 1998). Tanto os doadores de glicosil do tipo de ácido glicurônico como os aceitadores fenólicos apresentam problemas para reações de acoplamento. A construção da ligação glicurônica regioespecífica de fenol requer, antes da conjugação com os doadores, que os compostos fenólicos sejam convertidos em precursores apropriadamente protegidos. Para alcançar a glicuronidação dos

flavonoides, é necessária a proteção parcial ou completa dos grupos hidroxila (DOCAMPO et al., 2017).

A produção de sulfatos de flavonoides para potencial aplicação terapêutica ou como padrões para o estudo do metabolismo requer a preparação de compostos régio e estéreo específicos. Quimicamente estas reações são complexas, requerem várias etapas e podem envolver reagentes tóxicos como o ácido sulfúrico e piridina (AL-HORANI; DESAI, 2010; BEDINI et al., 2017). Alternativamente, enzimas microbianas podem ser utilizadas na produção destes compostos por possuírem a capacidade catalítica estereo e régio seletiva.

A biotransformação da crisina por *Cunninghamella elegans* NRLL 1392 produziu apigenina, apigenina-7-sulfato, apigenina-7,4'-dissulfato e um novo metabólito identificado como crisina-7-sulfato. Por outro lado, a aplicação do mesmo microrganismo na biotransformação da apigenina produziu apigenina-7-sulfato e apigenina-7,4'-dissulfato (Figura 9). Este resultado, em conjunto com outros da literatura (IBRAHIM, 2000; IBRAHIM et al., 2003), indicam a preferência da *C. elegans* na sulfatação do grupo hidroxil na posição 7 dos flavonoides. Contudo, incubações por maior tempo podem gerar a sulfatação nas posições 7 e 4' (IBRAHIM, 2005).

Figura 9 – Biotransformação da crisina e apigenina por *C. elegans*.



Fonte: Adaptado de IBRAHIM, 2005.

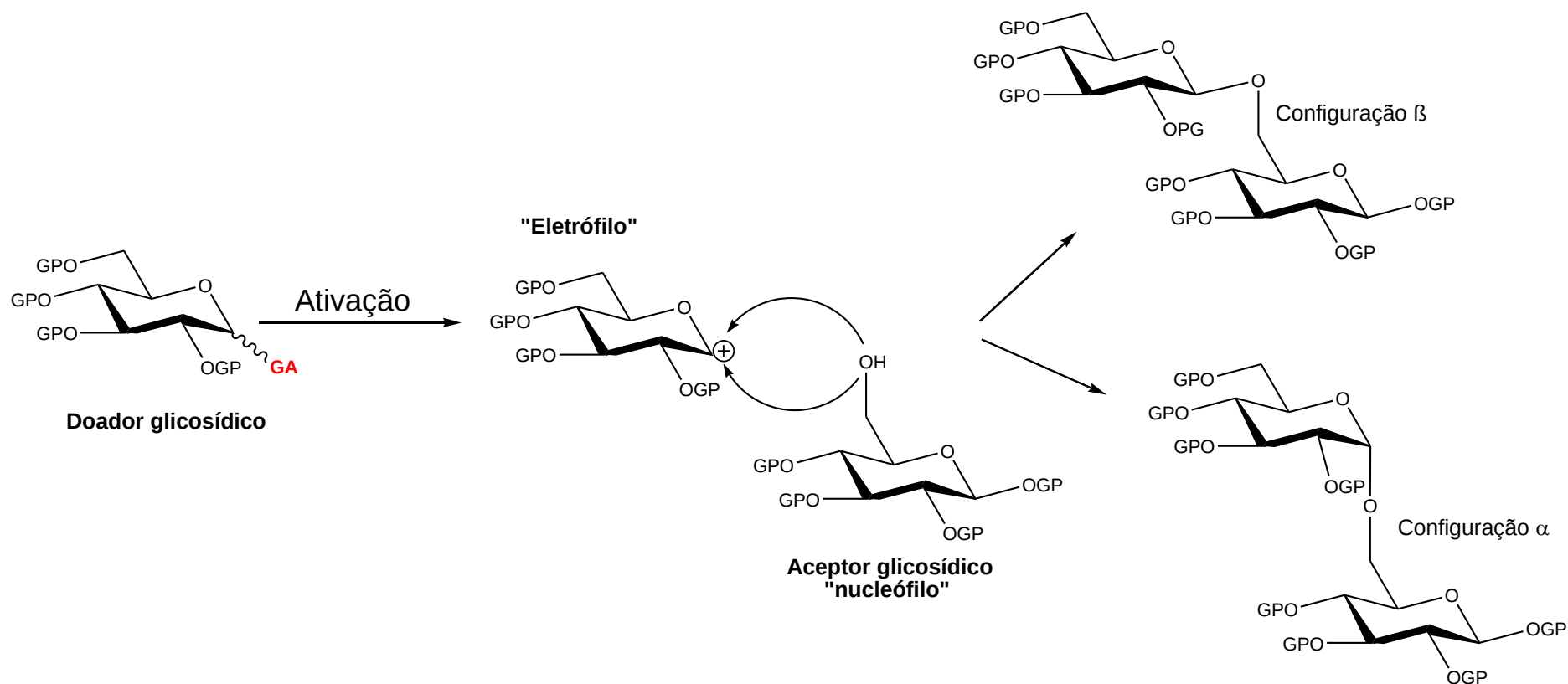
1.3.2 Reações de glicosilação catalisadas por fungos filamentosos

A glicosilação é considerada um importante método na modificação estrutural de compostos com atividade biológica, permitindo a conversão de compostos lipofílicos em hidrofílicos e melhorando assim as suas propriedades farmacocinéticas. Muitas vezes, ao adicionar um açúcar, as propriedades farmacodinâmicas também são alteradas, além de promover a formação de novos ou mais eficazes sistemas de liberação de fármacos (pró-fármacos) (KREN; THIEM, 1997).

O principal desafio na síntese química de glicosídeos é a necessidade de se modificar um grupamento hidroxila específico na presença de muitos outros. Dessa forma, tal síntese é caracterizada pela manipulação de vários grupos de proteção, porções químicas que mascaram o grupamento hidroxila e o impedem de reagir com outros compostos. A adição e remoção seletiva de grupamentos protetores permite a exposição química do grupamento hidroxila em que se deseja a modificação. Posteriormente, o produto deve ser seletivamente desprotegido para as próximas etapas da reação (Figura 10) (SEEBERGER et al., 2009).

A maior parte das reações de glicosilação na natureza são catalisadas por glicosiltransferases (Gts) (EC 2.4.x.y), que medeiam a formação de ligações glicosídicas régio e estéreo específicas entre açúcares e várias biomoléculas. Atualmente, a classificação aceita universalmente (o sistema da família GT) é baseada principalmente na homologia de sequência coletada no Banco de Dados de Enzimas Ativas de Carboidratos (*Carbohydrate Active enZyme Database* – CAZy). Assim as GTs podem ser categorizadas em 101 famílias numeradas de acordo com a homologia sequencial e estereoquímica da ligação glicosídica formada (LOMBARD et al., 2014). Das 101 famílias, a família GT1, muitas vezes referida como UDP-glicosiltransferases (UGTs), é caracterizada pela utilização de doadores de açúcares comumente ativados sob a forma de açúcares de nucleosídeo difosfato (Figura 11) (XIE et al., 2017).

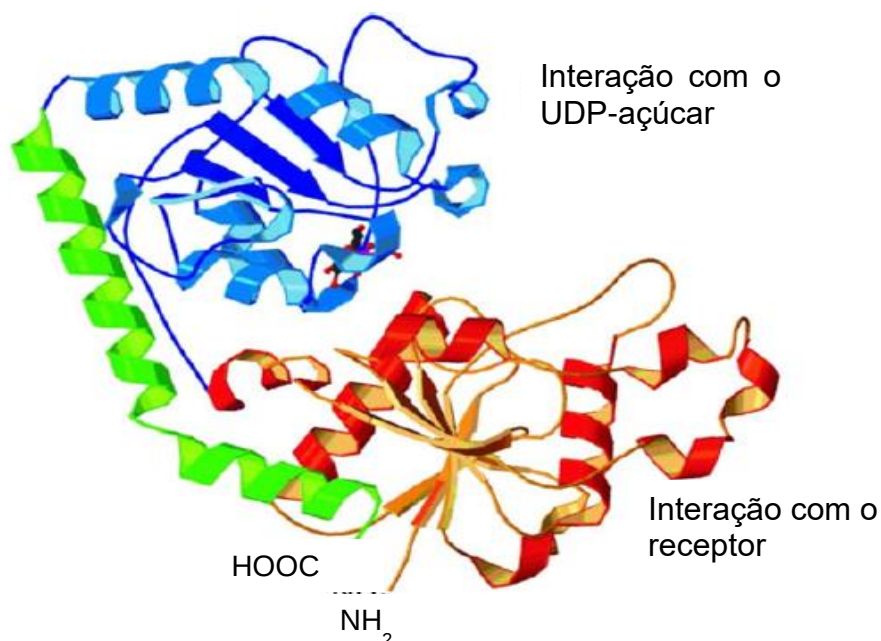
Figura 10- Formação estereoespecífica de ligações glicosídicas nas configurações α e β .



Legenda: (GA) Grupo abandonador, (GP) Grupo protetor.

Fonte: Adaptado de Seeberger, Finney et al. (2009)

Figura 11- Características estruturais das glicosiltransferases. Estrutura proteica geral de glicosiltransferases dependentes de açúcar UDP mostrando os dois domínios responsáveis pela interação com o doador de açúcar e a molécula aceptora, em azul e vermelho, respectivamente.



Fonte: Adaptado de WILFRIED; THILO; MATTHIAS, 2015.

A glicosilação pode ser uma estratégia para a melhoria da solubilidade de compostos bioativos como os flavonoides que tem limitada aplicação devido à baixa solubilidade em água, o que diminui seu tempo no intestino e resulta em baixa absorção, comprometendo sua eficácia (HYUNG KO; GYU KIM; JOONG-HOON, 2006; KUMAR; PANDEY, 2013; TRONINA et al., 2013).

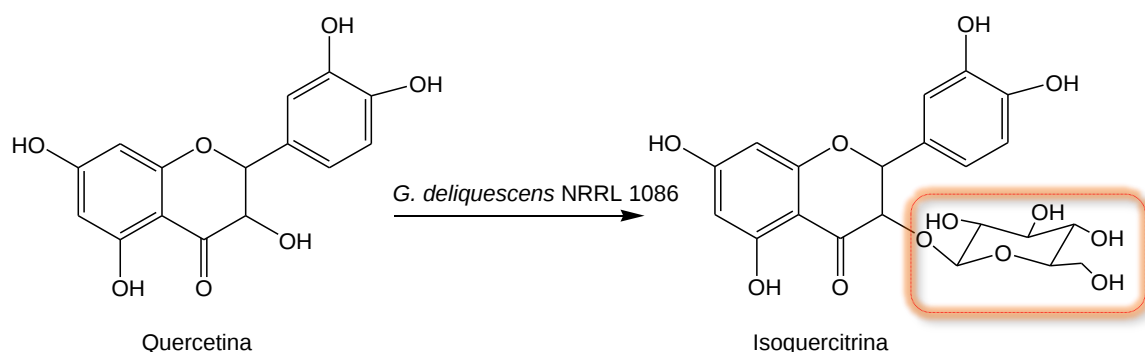
Enzimas vegetais, microrganismos inteiros e enzimas isoladas podem catalisar a glicosilação de produtos naturais, sendo capazes de alcançar diferentes posições, tipos e quantidades de glicosilação, direcionando a biotransformação (HUANG et al., 2016).

Alguns microrganismos como *Bacillus cereus*, *Streptomyces rimosus*, *Cunninghamella elegans* e *Cunninghamella echinulata* são conhecidos pela sua capacidade de glicosilar compostos fenólicos (RAO; WEISNER, 1981; MIYAKOSHI; AZAMI; KUZUYAMA, 2010; ZI et al., 2011; MA et al., 2013).

Slana e colaboradores (2011) relatam que em determinadas condições em que flavonoides são considerados tóxicos aos fungos, por exemplo quando presente em altas concentrações, fungos filamentosos podem produzir enzimas de glicosilação (glicosiltransferases), transformando os compostos fenólicos em metabólitos menos tóxicos.

A biotransformação do flavonoide quercetina por *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086 produziu o composto isoquercetrina, um derivado glicosilado na posição 3, com rendimento de 21,6% (Figura 12). Outros flavonoides, como a morina, galangina, miricetina e kaempferol, foram submetidos à incubação com o mesmo microrganismo e os resultados demonstraram a alta região-seletividade na glicosilação na posição 3 (XU et al., 2017).

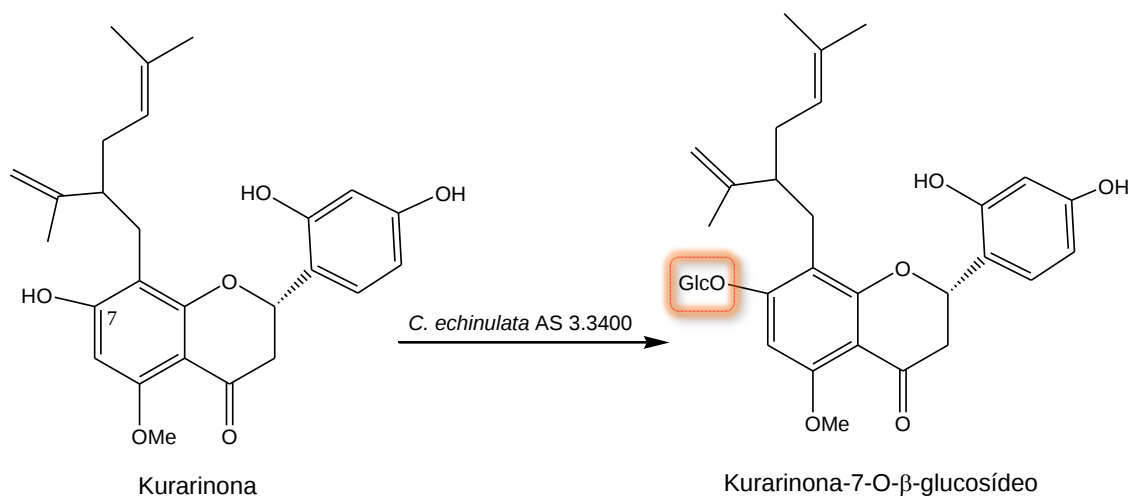
Figura 12- Biotransformação da quercetina por *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086



Fonte: Adaptado de Xu et al., 2017.

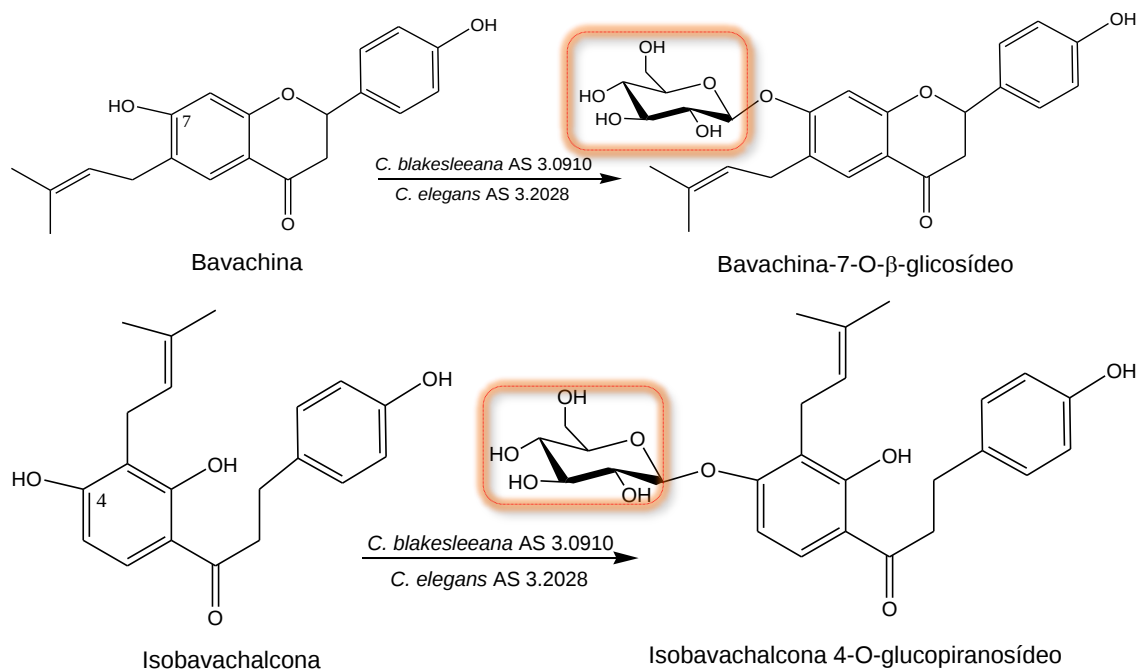
O fungo *Cunninghamella echinulata* AS 3.3400 catalisou a reação de glicosilação do flavonoide kurarinona, produzindo seu derivado glicosilado na posição 7 (Figura 13). Ensaios de citotoxicidade com células Hela demonstraram potencial atividade citotóxica do derivado glicosilado com IC₅₀ de 8,7 µmol/L (SHI et al., 2012).

Figura 13- Biotransformação da kurarinona por *C. echinulata* AS 3.3400 produzindo kurarinona-7-O-β-D-glucosídeo



Fonte: adaptado de Shi et al., 2012.

Figura 14- Produção de derivados glicosilados de flavonoides prenilados por *Cunninghamella* sp.



Fonte: Adaptado de Ma et al., 2015.

Já a aplicação de cepas de *Cunninghamella* na biotransformação de flavonoides prenilados como a bavachina e a isobavachalcona produziu seus derivados glicosilados na posição 7 e 4, respectivamente, com rendimentos de aproximadamente 25% (Figura 14). A biotransformação foi conduzida por cinco dias, utilizando 15 mg de substrato para cada Erlenmeyer que continha 150 mL de meio de cultura com o microrganismo. As condições de incubação foram de 25 °C e 160 rpm (MA et al., 2015).

Em muitos casos, os microrganismos são capazes de biotransformar os flavonoides no seu 7-O-glicosídeo correspondente. Contudo, 3-O-glicosídeos também são formados de substratos com grupamentos hidroxila na posição 3, estes compostos assemelham-se aos flavonoides glicosídeos encontrados na natureza (XIAO; MUZASHVILI; GEORGIEV, 2014).

1.4 O GÊNERO *Beauveria* sp

As espécies *B. bassiana* e *B. brongniartii* são as principais representantes do gênero *Beauveria* spp. São fungos filamentosos, da família Clavicipitaceae, encontrados em todas as regiões do mundo (CANFORA et al., 2016). Estes fungos são utilizados no controle de pragas causadores de doenças devido à sua atividade inseticida, resultado da produção de enzimas proteolíticas que causam imunossupressão, além da produção das toxinas beauvericina e oospereina (LORD, 2009).

A cepa *Beauveria bassiana* é conhecida pela capacidade de realizar reações mediadas pelo citocromo P450 e enzimas de fase I e II, sendo aplicada como modelo para o estudo do metabolismo hepático de xenobióticos em mamíferos (COSTA et al., 2008; ABOURASHED; MIKELL; KHAN, 2012). Assim, este microorganismo tem sido utilizado na biotransformação de vários produtos naturais e sintéticos (PARSHIKOV et al., 2002; ZHAN; LESLIE GUNATILAKA, 2006; BARTMAŃSKA; TRONINA; HUSZCZA, 2012; XIAO; MUZASHVILI; GEORGIEV, 2014).

A presença de citocromo P450 em *B. bassiana* foi confirmada por estudos genômicos, onde diferentes famílias dessas enzimas foram identificadas como a CYP52X1, que exibe atividade de hidroxilase de ácidos graxos, estudada por Zhang et al (2012).

Dessa forma, a capacidade catalítica desses fungos tem sido amplamente descrita na literatura, entre elas, já foram descritas reações de glicosilação, metilação, acetilação, oxidação, sulfatação e redução de compostos ativos de origem natural e/ ou sintética (BUCHANAN; REESE, 2001; RAO et al., 2006; ZHAN; GUNATILAKA, 2006; COSTA et al., 2008; BARTMAŃSKA; TRONINA; HUSZCZA, 2012).

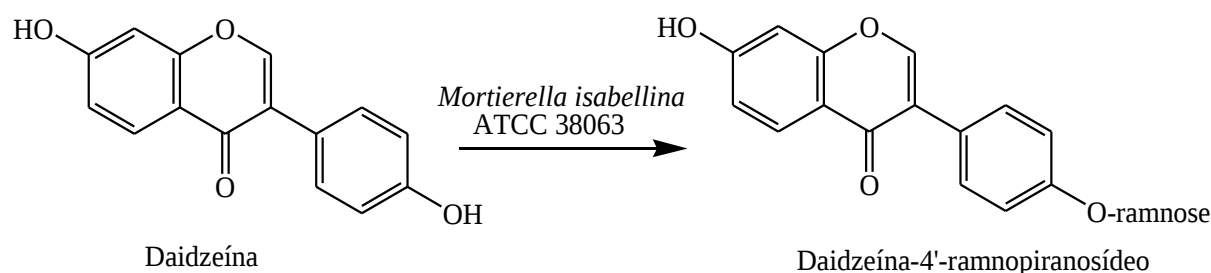
1.5 O GÊNERO *Mortierella* sp.

A espécie *Mortierella isabellina* é um fungo presente no solo, em restos ou raízes de plantas (TURNER, 1963). Inicialmente foi classificada como pertencente à família Mortierellaceae, subgênero *Micromucor* (também conhecido como grupo *Isabellina*). Devido às diferenças com o resto do gênero como a forma dos micélios e formação da colônia, o grupo foi transferido para a família Umbelopsidaceae, na ordem Mucorales, e classificado como gênero *Umbelopsis* (MEYER; GAMS, 2003; PETKOVITS et al., 2011).

A aplicação de *Mortierella isabellina* em reações de biotransformação já é bastante descrita, sendo relatados diferentes tipos de reações. A sulfoxidação de sulfetos fenilmetil e benzilmetil, alquila substituídos, foi realizada por esse microrganismo e seu mecanismo foi proposto em 1982 (HOLLAND; CARTER, 1982). Reações de hidroxilação em compostos aromáticos também foram relatadas, o etilbenzeno e uma série de derivados *para*-substituídos foram convertidos para seu correspondente 1-feniletanol (HOLLAND et al., 1987).

A isoflavona majoritária da soja, a daidzeína, possui atividades antioxidante, antitrombótica, antialérgica, anti-inflamatória e é um potencial agente anticâncer. A cepa *Mortierella isabellina* ATCC 38063 foi capaz de biotransformar a daidzeína em um metabólito incomum: a daidzeína-4'-ramnopiranosídeo (Figura 15). Sendo este, o único metabólito formado no processo de biotransformação (MAATOOQ; ROSAZZA, 2005).

Figura 15 - Metabolismo da daidzeína por *Mortierella isabellina* ATCC 38063.



Fonte: Adaptado de ROSAZZA E MAATOOQ (2005).

1.6 O GÊNERO *Cunninghamella* sp

A *Cunninghamella* é um fungo filamentoso presente no solo e em material vegetal, é encontrada particularmente na região do Mediterrâneo e em zonas subtropicais e é considerada uma espécie importante para a micologia médica e processos biotecnológicos. O gênero contém 14 espécies sendo *C. bertholletiae*, *C. elegans* e *C. echinulata* as mais comuns (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Tal gênero é conhecido pela habilidade de metabolizar uma ampla variedade de compostos de forma régio e estéreo-seletiva, de forma similar ao sistema enzimático de mamíferos (GRIFFITHS; BEST; JEZEQUEL, 1991; AZERAD, 1999). Dessa forma este fungo é descrito como um modelo microbiano para o metabolismo animal, considerando seu sistema enzimático análogo ao citocromo P450 presente nos mamíferos, e que estão envolvidos na biotransformação de fármacos, xenobióticos e produtos naturais (MURPHY, 2015).

Nos últimos anos, a aplicação de três espécies de *Cunninghamella* (*C. elegans*, *C. blakesleeana* e *C. echinulata*) na obtenção de metabólitos hidroxilados, desalquilados e oxidados de diferentes compostos confirmou a sua similaridade com a biotransformação humana. Os benefícios do uso deste microrganismo nos estágios iniciais de estudos para o descobrimento de novos fármacos se baseiam em sua vantagem econômica, facilidade e segurança de

manipulação e aceitação ética quando comparado aos modelos *in vivo* e *in vitro* disponíveis para estudo do metabolismo (PISKA et al., 2016).

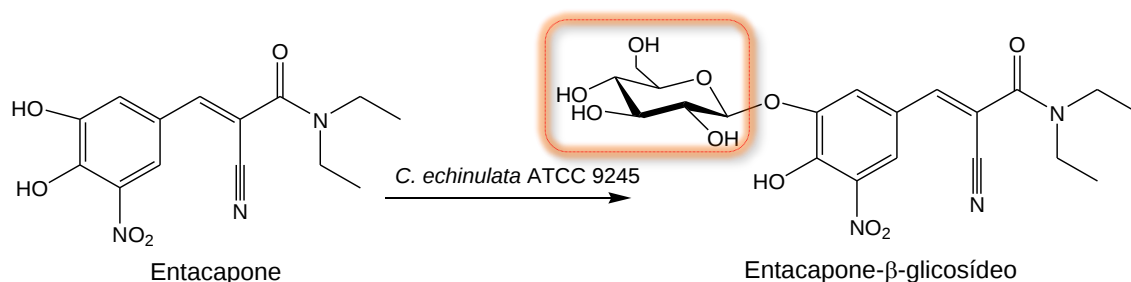
Zhang e colaboradores (1996) estudaram as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos catalisadas por *Cunninghamella elegans*. Os resultados demonstraram atividade enzimática de PAPs-Sulfotransferases, UDP-Glucuronosiltransferase e UDP-Glucosiltransferase na biotransformação do naftol. No geral, tais enzimas fúngicas apresentaram níveis de atividade comparáveis àqueles encontrados em ensaios de metabolismo de xenobióticos utilizando fígado de rato.

Estudos relatam a produção de compostos hidroxilados, glicuronidados, sulfatados, glicosilados, desmetilados, acetilados, dealquilados, entre outros, em biotransformações catalisadas por diversas espécies de *Cunninghamella* (ASHA; VIDYAVATHI, 2009a; PISKA et al., 2016).

No Laboratório de Bioconversão (LaBiocon) da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Goiás, as diversas cepas de *Cunninghamella* têm sido aplicadas na biotransformação de compostos, obtendo-se majoritariamente produtos glicosilados.

Como exemplo temos a biotransformação do entacapone, um inibidor da catecol-O-metiltransferase (COMT) utilizado no tratamento de Parkinson, por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 produziu um derivado β glicosilado na posição 3'. Em conformidade com princípios da química verde, considerando baixo impacto ambiental, reutilização de solventes e baixo custo dos mesmos, foi possível obter um rendimento de 18% do entacapone- β -glicosilado (Figura 16) (LUSTOSA et al., 2012).

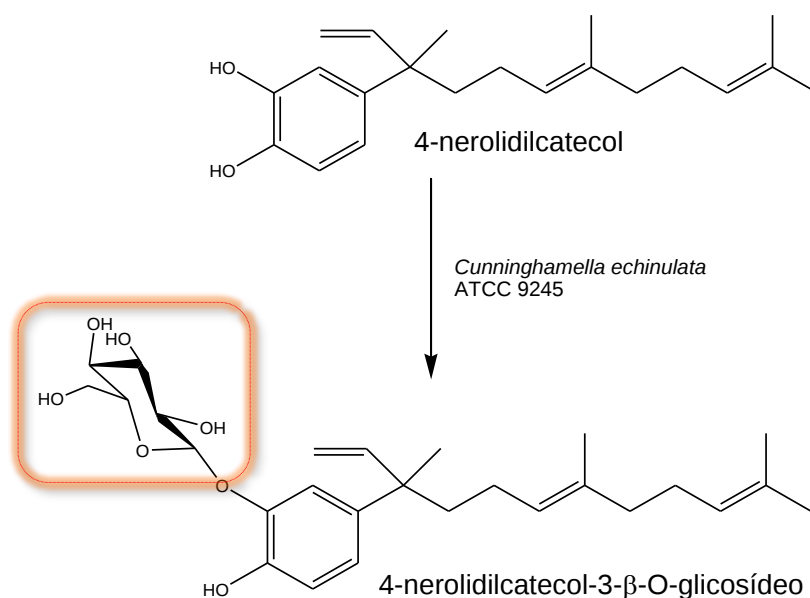
Figura 16- Biotransformação do entacapone por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245



Fonte: Adaptado de Lustosa et al., 2012.

O fungo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 também foi utilizado na biotransformação do 4-nerolidilcatecol (4-NRC), o metabólito secundário majoritário das plantas *Pothomorphe peltata* e *Pothomorphe umbellata*, que possui atividade antioxidante, antimalárica, anti-inflamatória e anti-HIV. A incubação por 96 horas em 27°C e 200 rpm produziu um derivado glicosilado, o 4-Nerolidilcatecol-3'-β-O-glicosídeo (Figura 17). O metabólito glicosilado foi submetido a ensaios de voltametria cíclica que demonstraram sua potencial atividade antioxidante, superior ao 4-NRC (CORDEIRO et al., 2013).

Figura 17- Glicosilação do 4-NRC por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245



Fonte: Adaptado de Cordeiro et al., 2013.

1.7 BIOPROCESSOS E METODOLOGIAS APLICADAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO

A biotransformação consiste no uso de um biocatalisador para mediar uma reação química, tal método objetiva a síntese de um composto ou a quebra de um produto indesejado. Os bioprocessos aplicam os princípios da tecnologia e engenharia para projetar, desenvolver, analisar e aplicar metodologias, como a biotransformação (DOBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004).

As reações de biotransformação podem ser catalisadas por enzimas isoladas ou células inteiras. Geralmente, fontes de carbono acessíveis, como glicose, glicerol ou ácidos orgânicos, são aplicadas na produção de biocatalisadores e pode servir como fonte de energia para a manutenção de células e regeneração de cofatores durante a biotransformação. Durante o processo um substrato de escolha é transformado em um produto de valor agregado por catálise única ou múltipla. A biotransformação utilizando enzimas isoladas é dirigida pela bioquímica de proteínas e seus cofatores e coenzimas. Em analogia, a biotransformação com células inteiras é controlada pela transferência de massa, metabolismo celular, síntese de proteínas, compartimentalização e crescimento e inativação celular (SCHREWE et al., 2013).

Em alguns casos, como na hidroxilação seletiva de átomos de carbono não ativados, as biotransformações podem ser a única solução conhecida para produzir um determinado composto. Nas reações em uma única etapa, as enzimas isoladas podem ter benefícios quando comparadas às células inteiras, uma vez que não devem ocorrer reações secundárias e os substratos não necessitam de transporte através de membrana. Entretanto, o isolamento e purificação de enzimas podem ser onerosos e demorados, além de necessária a adição de cofatores e, em geral, é mais difícil realizar reações que requeiram mais de uma enzima. Contrariamente o uso de células microbianas inteiras e microrganismos inteiros apresentam vantagens na biotransformação em múltiplas etapas (DE CARVALHO, 2011).

Outra vantagem na utilização de células inteiras é que as células fornecem um ambiente natural para as enzimas, impedindo mudanças conformacionais na estrutura da proteína que levariam à perda de atividade em meio não convencional, e são capazes de regenerar eficientemente cofatores (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2007).

Um método efetivo para o aumento do desempenho e economia de processos biotecnológicos é a imobilização de células inteiras. A imobilização celular foi definida como o confinamento físico ou localizado de células intactas em uma determinada região espacial com preservação da atividade catalítica da mesma (GALLO et al., 2016).

Os sistemas celulares imobilizados podem ser aplicados à biotransformação devido às vantagens que as células imobilizadas apresentam no desempenho do reator quando comparado aos sistemas de células livres, sendo elas a fácil separação da biomassa do meio de cultura e fácil recuperação do produto, além das melhorias metabólicas específicas ou produtos produzidos após a imobilização (ZHU, 2007). Além disso o sistema de imobilização oferece a possibilidade de uso contínuo do reator e pode, assim, reduzir significativamente o custo do catalisador (por kg de produto) em relação aos sistemas convencionais (WÖLTINGER et al., 2005).

Basicamente, existem dois tipos de imobilização celular: aprisionamento e fixação. No primeiro, os microrganismos são aprisionados nos interstícios de materiais fibrosos ou porosos ou são fisicamente restringidos em uma matriz sólida ou porosa, tal como um gel estabilizado ou uma membrana. No último, os microrganismos aderem a superfícies ou outros organismos por auto-adesão ou ligação química (COUTO et al., 2004).

Um dos métodos de imobilização por fixação é a formação de biofilme. Neste processo o crescimento multicamada de células do microrganismo em uma superfície de suporte sólida forma o biofilme, sendo este suporte biologicamente inerte. O biofilme é formado em qualquer lugar onde os nutrientes estão presentes e nos vários grupos de microrganismos, a exemplo do local do tratamento biológico de águas residuais (GAUR et al., 2017). Dessa forma os biofilmes constituem um caso especial de catálise de células inteiras na medida em que consistem tipicamente em uma mistura de células em crescimento e em repouso e são aplicáveis para fermentações e biotransformações (ROSCHE et al., 2009).

As propriedades da superfície de imobilização desempenham um papel essencial na fixação inicial das células. O uso de revestimentos apropriados ou uma superfície áspera podem promover interações célula-superfície e fornecer proteção contra forças de cisalhamento e, portanto, estimular o estabelecimento de células e o crescimento de biofilmes (ROSCHE et al., 2009).

Amadio e colaboradores (2013) investigaram a biotransformação do flurbiprofeno utilizando *Cunninghamella elegans* como biofilme crescido em

suportes de molas de aço inoxidável em Erlenmeyers (Figura 18). Após 24 horas o microrganismo imobilizado foi capaz de produzir o metabólito hidroxilado com taxa de biotransformação de 86%, levemente maior que a reação catalisada pelo microrganismo de forma livre (76%). O biofilme foi reutilizado e os resultados mostraram que a biotransformação ainda foi efetiva após três ciclos de 72 horas.

Figura 18- Crescimento de biofilme de *C. elegans* em molas de aço inoxidável após 6 dias.

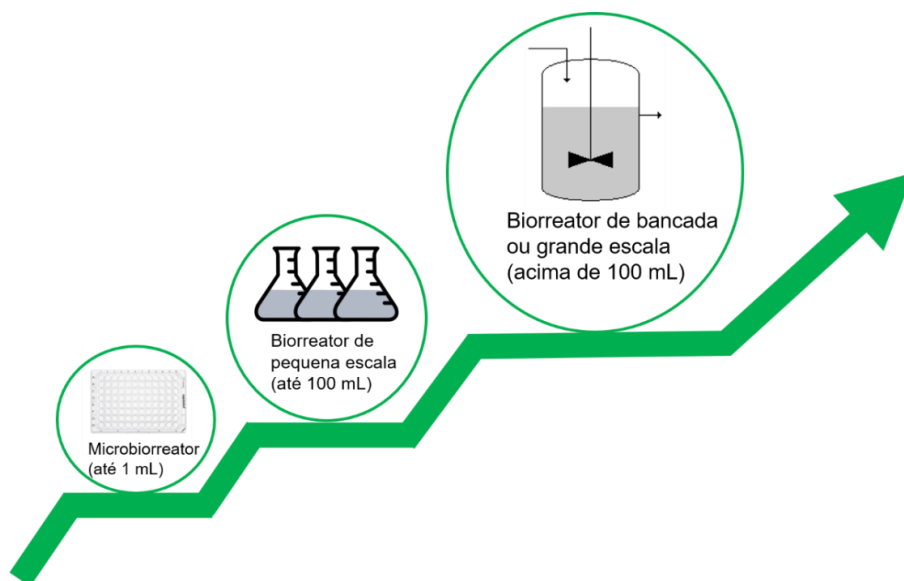


Fonte: Adaptado de AMADIO; CASEY E MURPHY (2013)

A tecnologia/engenharia de bioprocessos engloba o desenvolvimento e aplicação de microrganismos para a produção de metabólitos em um biorreator especializado, dependendo de fatores como cinética de crescimento e natureza dos produtos, adequando os níveis físico-químicos e nutricionais (GAUR et al., 2017). Considerando o volume, os bioprocessos fornecem condições para o desenvolvimento do catalisador em ensaios que podem variar de micro a escalas industriais (Figura 19) (KIRK; SZITA, 2013).

No cenário atual, o desenvolvimento de uma tecnologia para biorreator pode alterar economicamente os parâmetros do processo com maior produtividade e qualidade dos produtos formados. Assim, o *design* e arquitetura dos biorreatores são importantes e podem trazer revoluções na engenharia de bioprocessos (GAUR et al., 2017).

Figura 19- Classificação de biorreatores e sistemas de cultura de células por volume



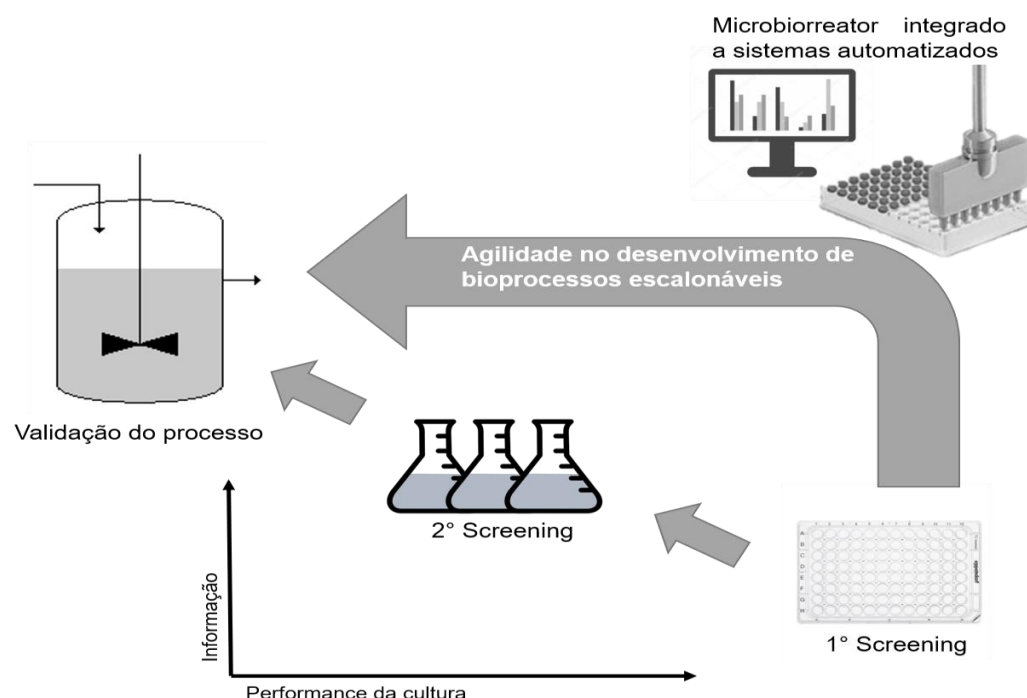
Fonte: Adaptado de KIRK e SZITA, 2013.

Usualmente, a etapa de triagem dos microrganismos para uso na biotransformação é realizada em frascos Erlenmeyers utilizando uma agitadora (*shaker*) de laboratório, produzindo compostos em escala de miligramas, suficiente para caracterização estrutural. Tal processo permite a seleção de cepas, otimização do tempo de incubação, avaliação do tipo de meio de cultura e pH. A vantagem dessa abordagem é a previsibilidade das reações em todos os aspectos, incluindo o rendimento de metabólitos. Esta técnica não requer equipamentos muito complexos, embora o início do cultivo e o término de tais processos possa ser demorado (PISKA et al., 2016).

Alguns esforços têm sido feitos para diminuir a escala de triagem permitindo a biotransformação de vários compostos simultaneamente e para aumentar a escala de biotransformação produzindo metabólitos em escalas preparativas. Escalonar um bioprocesso do laboratório para a escala industrial é desafiador e necessita de diversas inovações. No entanto, as indústrias estão se movendo em direção ao desenvolvimento de processos baseados em biocatálise/biotransformação devido suas vantagens inerentes (DOBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004).

Nos últimos anos, sistemas de microbiorreatores evoluíram para ferramentas versáteis de engenharia de bioprocessos. Eles fornecem uma solução única para combinar maior rendimento experimental com monitoramento e controle de bioprocessos, indispensável para desenvolver processos de bioprodução economicamente e ecologicamente competitivos. Assim, os microbiorreatores consistem em reatores de tanque agitado em escala reduzida ou em dispositivos agitados de cultivo com placas de microtitulação. É importante ressaltar que tais sistemas podem ser aplicados com processos de monitoramento com medições ópticas, gerando dados importantes do processo como concentração de biomassa, oxigênio dissolvido, pH e fluorescência. A gama de aplicação dos microbiorreatores pode ser aumentada pela integração com sistemas robotizados de manipulação de líquidos, permitindo a automatização e, assim, a padronização de vários procedimentos de operação manual (Figura 20) (HEMMERICH et al., 2017).

Figura 20- Desenvolvimento do bioprocessos tradicional comparado ao sistema com microbiorreator.



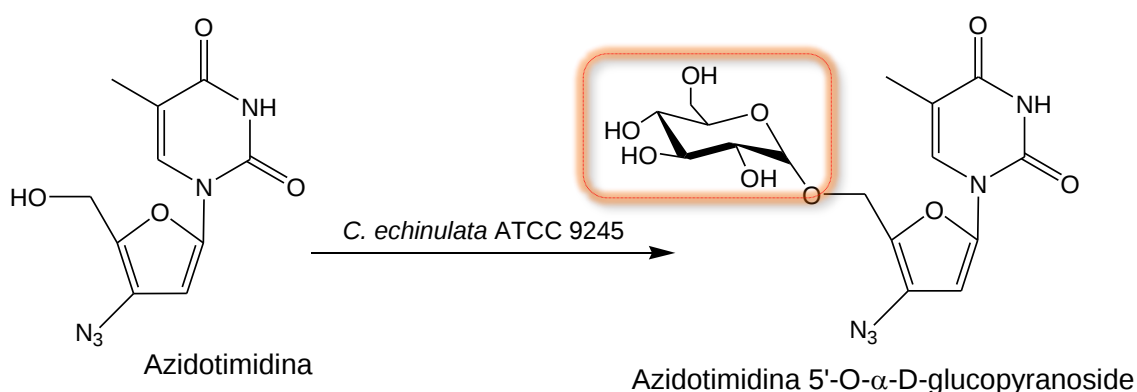
Legenda: Embora as microplacas e os frascos de agitação proporcionem uma cultura de alta performance, as informações obtidas sobre as cepas e propriedades do processo são limitadas. Biorreatores de bancada permitem um preciso controle do ambiente e podem ser equipados com diferentes sensores, mas o desempenho da cultura é limitado. Os sistemas com microbiorreatores automatizados podem oferecer um atalho para permitir ambos, sendo um desenvolvimento rápido e confiável de bioprocessos. Adaptado de: HEMMERICH et al., 2017.

Métodos automatizados, como o *High-throughput screening* (HTS) e técnicas microbiológicas destinadas a melhorar o desempenho do biocatalisador estão aumentando o interesse de processos de biotransformação com células inteiras pela indústria (R. CARVALHO, 2017).

A maioria dos estudos aplica o processo com microbiorreatores para incubações de células de mamíferos, leveduras ou bactérias (KHETANI; BHATIA, 2007; HE et al., 2016; NAGHDI et al., 2018). Contudo, Quinn e colaboradores (2015) relataram a aplicação da *Cunninghamella elegans* para biotransformação do flubiprofeno, realizando o *screening* em microplacas de 12 e 96 orifícios. Os resultados demonstraram que foi possível cultivar *C. elegans* em microplacas e usar as culturas diretamente para a biotransformação de fármacos, o que é muito mais conveniente do que o método do frasco de agitação comumente empregado.

Arruda e colaboradores (2016) utilizaram o biorreator em tanque agitado para produzir um derivado glicosilado da azidotimidina, a reação foi catalisada por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 em única etapa com células inteiras. O rendimento alcançado foi de 45%, demonstrando a eficácia na produção de metabólitos em escala preparativa (Figura 21).

Figura 21- Biotransformação da azidotimidina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245



Fonte: Adaptado de ARRUDA e colaboradores, 2016.

A biotransformação de um inibidor da fosfodiesterase 3 (5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)-2H-tetrazol—LQFM 021) foi realizada pela cepa

Figura 22- Biotransformação do LQFM 021 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 imobilizada em biorreator.



49

2. Objetivos

2 OBJETIVO GERAL

Biotransformação fúngica da hesperetina através da aplicação de diferentes bioprocessos para a produção de metabólitos ativos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Realizar a triagem dos fungos filamentosos capazes de biotransformar a hesperetina;
- 2- Aplicar metodologia computacional para prever os derivados da biotransformação fúngica da hesperetina;
- 3- Identificar os microrganismos capazes de produzir os metabólitos humanos;
- 4- Identificar os microrganismos aptos a realizar a glicosilação da hesperetina;
- 5- Investigar o crescimento do microrganismo em diferentes modelos de microplacas para otimização do processo;
- 6- Aplicar a metodologia de microescala para triagem dos microrganismos capazes de produzir o glicosídeo da hesperetina;
- 7- Estudar os parâmetros envolvidos na reação em microescala (meio de cultura e concentração do substrato) que podem influenciar na biotransformação da hesperetina;
- 8- Investigar a aplicação da imobilização dos microrganismos na produção de derivados glicosilados;
- 9- Avaliar a metodologia de monitoramento da cinética de reação, através da Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EMAR).

3. Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUBSTRATO

A hesperetina (3',5,7-Trihidroxi-4'-metoxiflavanona) foi adquirida da Sigma Aldrich com grau de pureza $\geq 95\%$ e caracterizada pelas técnicas de ESI-IT-MS e RMN uni e bidimensional.

3.2 PREVISÃO DOS METABÓLITOS DA HESPERETINA

Foi realizada a previsão dos metabólitos da hesperetina em programa online Metaprint 2D (<http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/>).

3.3 MICRORGANISMOS: MANUTENÇÃO E REPIQUE

Os quinze microrganismos selecionados para os experimentos foram provenientes de duas coleções internacionais e uma nacional.

American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA – ATCC:

- *Absidia blaklesleana* ATCC 10148b
- *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009
- *Beauveria bassiana* ATCC 7159
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245
- *Cunninghamella elegans* ATCC 26169
- *Cunninghamella elegans* ATCC 36112
- *Fusarium roseum* ATCC 14717
- *Mucor plumbeus* ATCC 4740
- *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145

Northern Utilisations Research and Development Division, Peoria-Illions, USA – NRRL:

- *Mortierella isabellina* NRRL 1757

As cepas *Rhodotorula mucilaginosa*, IP 94, IP 147 e IP 153 foram obtidas da coleção do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-UFG isoladas do solo do cerrado brasileiro.

Os microrganismos foram mantidos em ágar batata inclinado entre 2 e 4 °C, sendo repicados periodicamente com glicerol estéril 25% (v/v). A cada experimento as cepas foram novamente repicadas e mantidas em câmara germinativa do tipo *Biochemical oxygen demand* (B.O.D.) (Modelo TE 401 Tecnal®) a 27 °C, por 7 dias para crescimento. Após esse período, as cepas foram avaliadas macroscopicamente para avaliar seu crescimento.

3.4 MEIO DE CULTURA

O meio líquido de glicose (MLG) descrito por Gurram et al. (2009) foi o meio de cultura selecionado para realização dos experimentos. Cada 1000 mL de meio de cultura contém: 20 g de glicose anidra (Vetec®), 5 g de extrato de levedura (BD®), 5 g de peptona de soja (Himedia®), 5 g NaCl (Dinâmica®) e 5 g de K₂HPO₄ (Vetec®) e q.s. água destilada.

Transferiu-se 100 mL do meio para erlenmeyers de vidro de boca larga de 250 mL. Os frascos foram autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

3.5 TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS

A triagem foi realizada para verificar quais entre os 15 microrganismos utilizados seriam capazes de biotransformar a hesperetina.

Uma gota de suspensão de esporos (em glicerol estéril 25%) foi transferida dos microrganismos cultivados em ágar batata para erlenmeyers contendo o meio de cultura líquido (MLG), preparado conforme seção 3.3, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. Os erlenmeyers foram identificados quanto ao microrganismo que continha e foram incubados em incubador rotativo (TE 420 Tecnal®) a 200 r.p.m., 27 °C durante 65 horas.

Finalizadas as 65 horas de incubação o substrato foi adicionado. A hesperetina foi pesada e solubilizada em acetona para obtenção de solução de

concentração 25 mg/mL. Aos erlenmeyers foram adicionados 1 mL da solução resultando na concentração final de 0,25mg/mL de substrato.

Os erlenmeyers foram novamente incubados a 200 r.p.m., 27 °C e alíquotas de 1 mL dos meios de incubação foram retiradas nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h e transferidas para eppendorfs. Para análises por CCD as alíquotas foram saturadas com cloreto de sódio, extraídas com acetato de etila (Vetec[®]) e aplicadas em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄. A fase móvel utilizada foi acetato de etila:hexano (80:20) e visualização por luz UV 254 nm.

A fim de avaliar a influência de componentes do meio de cultura, dos microrganismos ou de uma possível degradação do substrato ao longo do tempo de incubação, dois diferentes experimentos controle foram realizados. Um branco do microrganismo, contendo o meio de cultura e microrganismo, e outro do substrato, contendo meio de cultura e substrato.

3.6 BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA

Finalizada a análise de CCD dos sobrenadantes de incubação, as cepas *Mortierella isabellina* NRRL 1757, *Cunninghameella echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram selecionadas para incubações em escala semipreparativa com a hesperetina devido ao seu desempenho na biotransformação. O procedimento descrito para a triagem foi repetido em escala semipreparativa, utilizando 10 Erlenmeyers de 250 mL de boca larga com 100 mL de MLG e concentração de 0,25 mg/mL de substrato para cada cepa.

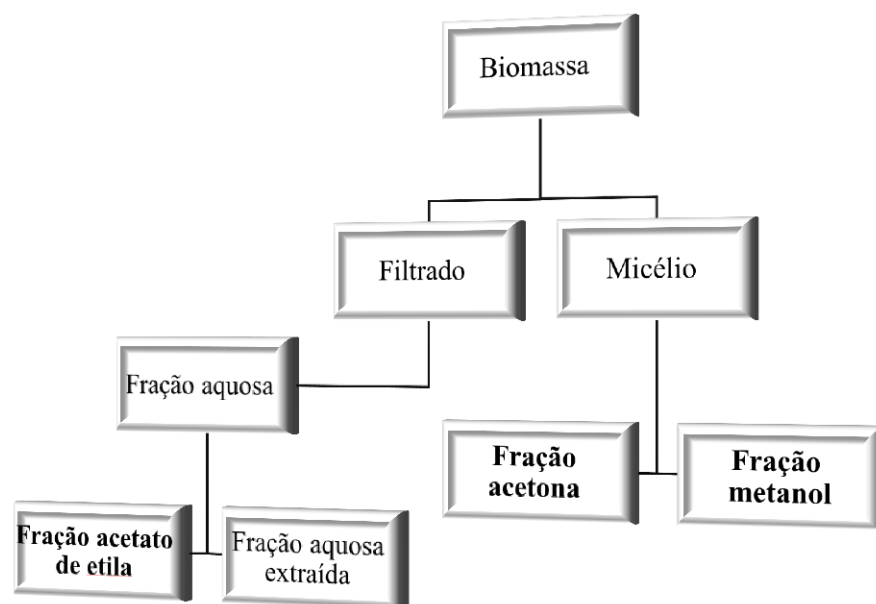
3.6.1 Filtração e extração

Após o período de 96 horas de incubação o conteúdo dos 10 erlenmeyers foi reunido e a biomassa foi filtrada em funil de Büchner com gaze sob vácuo. A solução filtrada foi saturada com cloreto de sódio (Vetec[®]) e posteriormente filtrada em funil de Buchner contendo Celite-545 (Tedia[®]) sob vácuo. O filtrado foi então denominado “Fração aquosa” e transferido para um funil de separação, onde foi extraído com três porções de 100 mL de acetato

de etila. Após a extração foram obtidas duas frações: fração aquosa extraída e fração acetato de etila. A fração aquosa extraída foi descartada. Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fração acetato de etila e procedeu-se a filtração em funil de vidro sinterizado. O filtrado foi evaporado em evaporador rotativo Tecnal® modelo TE-211, acoplado à bomba de vácuo Tecnal® TE-058 resultando em um extrato bruto seco para posterior purificação (Figura 23).

A biomassa separada na filtração foi extraída com acetona (200 mL) em agitador magnético por 1 hora e filtrado em papel de filtro. Posteriormente a biomassa foi extraída com metanol (200 mL) em agitador magnético por 1 hora e filtrada novamente. Assim foram obtidas a fração metanol e a fração acetona. As frações foram evaporadas em evaporador rotativo originando dois extratos brutos secos para posterior purificação (Figura 23).

Figura 23- Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional para cada cepa.



Fonte: Autor

3.6.2 Purificação dos metabólitos

A purificação dos extratos foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna, uma coluna de vidro de 220 x 15 mm foi preenchida com fase estacionária sílica gel 60, Vetec®, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh) e fase móvel acetato de etila. O monitoramento foi realizado por CCD, com acetato de etila:hexano (80:20) como eluente e luz UV (254 nm) como revelador.

Primeiramente foi purificado o extrato seco da fração acetato de etila, sendo este solubilizado em metanol, adicionado sílica gel 60, Vetec®, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh), seco para a formação da pastilha e transferido para a coluna de vidro previamente compactada com fase estacionária. Gradientes de solventes foram eluídos na coluna, primeiramente com hexano 100%, hexano:AcOEt (50:50) e no fim com AcOEt 100%. Os produtos purificados tiveram seus solventes evaporados e foram mantidos em dessecador para posterior pesagem. O procedimento foi repetido para o extrato seco da fração metanol e acetona.

3.7 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA HESPERETINA EM MEIO DE CULTURA

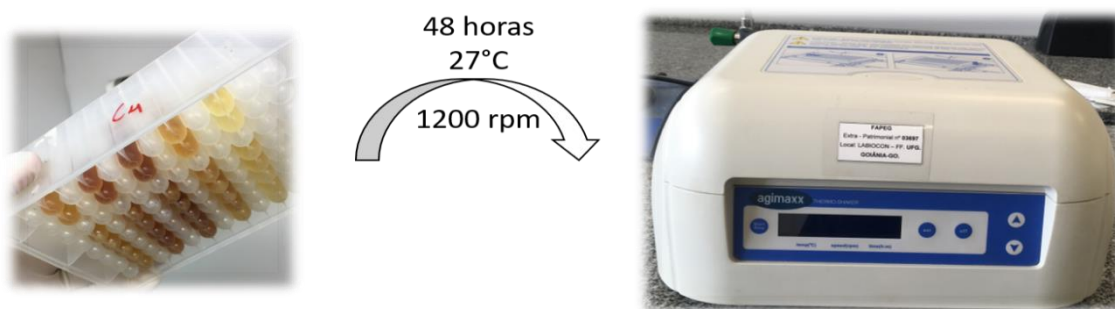
Foi avaliada a estabilidade da hesperetina no meio de cultura utilizado para a incubação durante o período de 96 horas. Para tal, alíquotas do meio reacional com 0,25 mg/mL de hesperetina e meio de cultura (MLG) foram retiradas a cada 24 horas, com amostras nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Tais alíquotas foram saturadas com cloreto de sódio e extraídas com Acetato de Etila, através da técnica de extração líquido-líquido e posteriormente analisadas por CCD.

3.8 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MICROESCALA

Os ensaios em microescala foram realizados em placas de titulação com 96 orifícios redondos com capacidade para 2,2 mL (Axygen Scientific®) também denominados microbiorreatores. Cada orifício da placa foi preenchido com 1 mL de meio de cultura e 0,5 µL de solução de glicerol 25% e aproximadamente 17×10^4 esporos fúngicos foram adicionado em seguida. A

placa foi coberta com filme PVC e levada a uma incubadora de placas (Agimaxx®), sendo mantida na temperatura de 27°C e 1200 rpm por 48 horas, quando foi adicionado a hesperetina e mantidas por mais 48 horas (Figura 24).

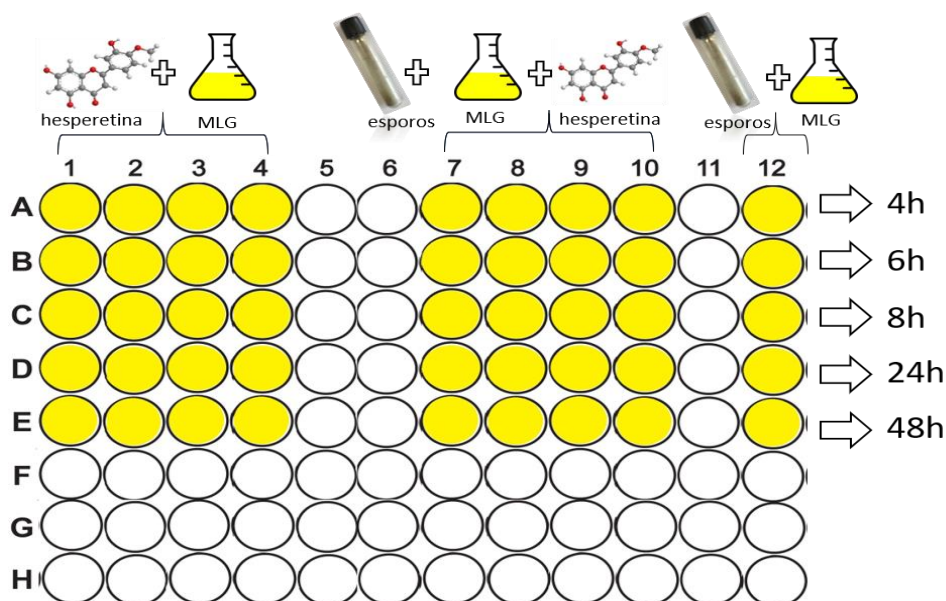
Figura 24- Microbiorreator e incubadora de placas utilizados para a biotransformação em microescala.



3.8.1 Ensaio com diferentes concentrações de hesperetina

Diferentes concentrações da hesperetina foram adicionadas nos orifícios do microbiorreator, a fim de se avaliar a formação de derivados frente a essa variável. A concentração final nos orifícios foram de 1 mg.mL⁻¹, 0,5 mg.mL⁻¹, 0,25 mg.mL⁻¹ e 0,125 mg.mL⁻¹. Os fungos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 e *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 foram selecionados para este ensaio, sendo alíquotas retiradas pelo método de esgotamento de poços nos tempos de 4, 6, 8, 24 e 48 horas de incubação (Figura 25).

Figura 25- Representação esquemática do ensaio com diferentes concentrações de hesperetina em microbiorreatores.



Legenda: MLG – meio líquido de glicose.

3.8.2 Ensaio com diferentes fontes de carbono

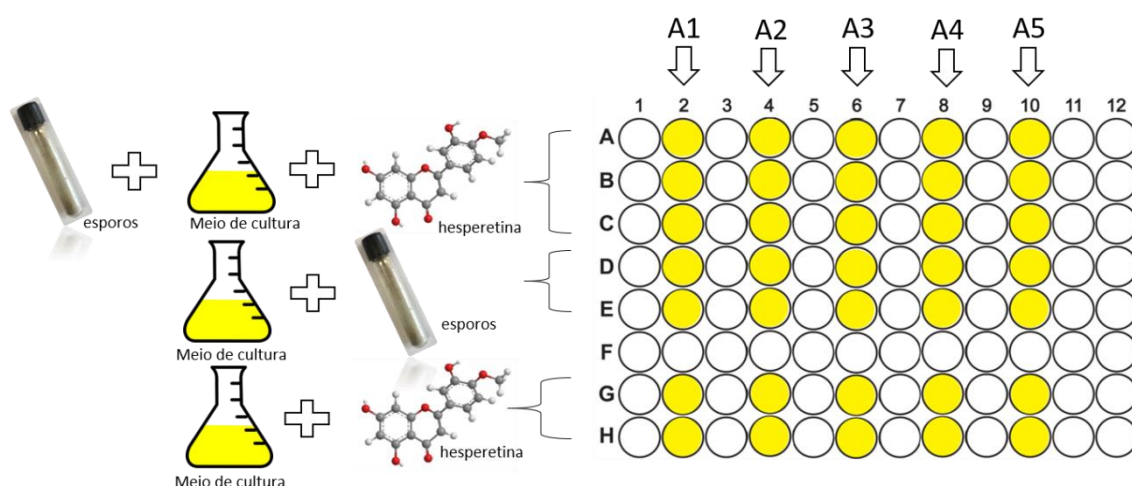
Foi realizada a incubação em microbiorreator com diferentes fontes de carbono a fim de se avaliar a formação de derivados da hesperetina frente a meios de cultura distintos. O meio de cultura descrito em 3.4 foi modificado através da substituição da glicose por cinco variedades de açúcares conforme o quadro 2.

Quadro 2- Diferentes fontes de carbono utilizadas na biotransformação em microbiorreator.

Codificação	Fonte de carbono (20g/L)
A1	Glicose
A2	Frutose
A3	Xilose
A4	Maltose
A5	Sacarose

As quatro cepas de *Cunninghamella* sp disponíveis na coleção do Labiocon/UFG foram selecionadas para este experimento, são elas: *Cunnnninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunnnninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 e *Cunninghamella elegans* ATCC 26169. Após o período de 48 horas de incubação, alíquotas foram retiradas para o procedimento de microextração e análise em CCD e ESI-IT-MS. Uma placa de microbiorreator foi utilizada para cada microrganismo, além de dois diferentes experimentos de branco: um branco do microrganismo, com o meio de cultura e microrganismo, e outro do substrato, com meio de cultura e substrato (Figura 26).

Figura 26- Representação esquemática de ensaio com diferentes fontes de carbono em microbiorreator.



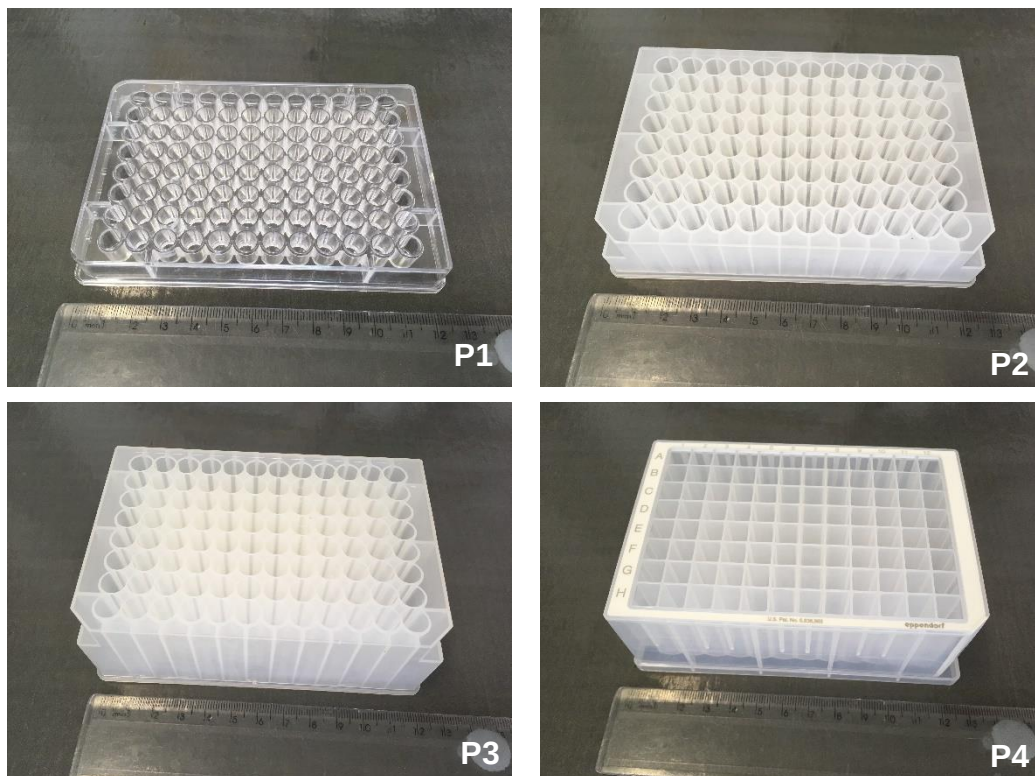
Legenda: Meios de cultura com diferentes fontes de carbono: A1- glicose, A2-frutose, A3-xilose, A4-maltose, A5-sacarose.

3.8.3 Avaliação do crescimento do microrganismo em diferentes microbiorreatores

Os ensaios de avaliação do crescimento da *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 em microescala foram realizados em três placas com 96 orifícios redondos com capacidade para 300 μ L, 1,5 mL e 2,2 mL (Axygen Scientific®) e uma placa de orifícios quadrados com capacidade para 2,2 mL (Eppendorf®) (Fig. 27). Foi avaliado o crescimento do microrganismo na ausência do substrato. Cada orifício da placa foi preenchido com 200 μ L, 500 μ L e 1,0 mL de meio de cultura para as placas com capacidade de 300 μ L, 1,5 mL e 2,2 mL, respectivamente. Em seguida, 0,5 μ L de solução de glicerol 25% contendo esporos fúngicos foram adicionados. As placas foram cobertas com filme PVC e levadas a uma incubadora de placas (Agimaxx®), sendo mantida a temperatura de 27°C e 1200 rpm por 120 horas e realizou-se análises diárias do peso seco micelial. A cada 24 horas os meios com micélios fúngicos foram retirados e transferidos para microtubos, centrifugados por 10 minutos, lavados com água destilada e centrifugados por 10 minutos novamente. Posteriormente, a biomassa fúngica foi transferida para papel de filtro Whatman N.º1, previamente seco à 105 °C por 24 horas. O crescimento do fungo foi quantificado em termos de peso seco micelial, no qual o micélio obtido foi levado à estufa à 105°C por 24 horas e em seguida pesado em balança analítica.

O experimento foi realizado em 3 repetições e as médias e o erro padrão foram calculadas utilizando o programa Excel.

Figura 27- Microbiorreatores utilizados para crescimento do microrganismo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245



Legenda: P1 – Placa de orifício redondo com capacidade para 300µL, P2 - Placa de orifício redondo com capacidade para 1,5 mL, P3 - Placa de orifício redondo com capacidade para 2,2 mL, P4 - Placa de orifício quadrado com capacidade para 2,2 mL.

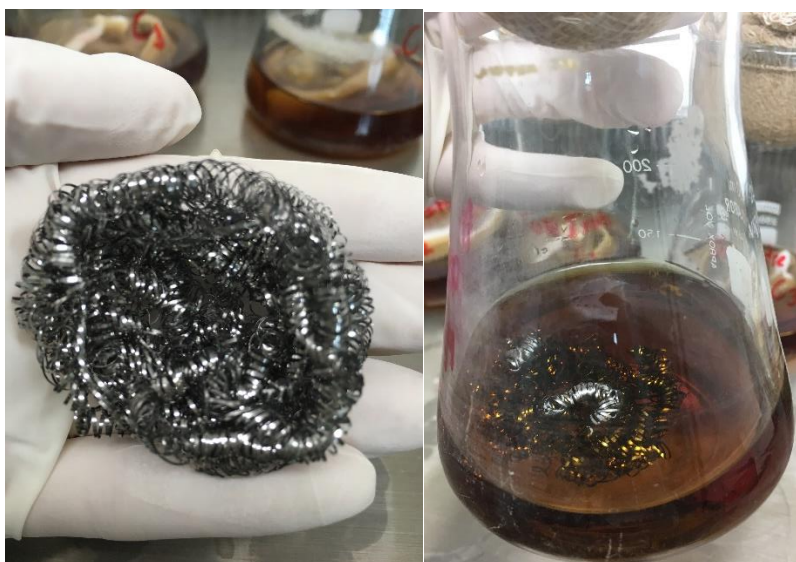
3.8.4 Microextração

As alíquotas retiradas do microbiorreator nos diferentes tempos de incubação foram submetidas à um procedimento de microextração para a realização das análises de cromatografia de camada delgada, análises de ESI-IT-MS e CLAE/EMAR. Para isso, 500 µL do meio reacional foram saturados com cloreto de sódio (Vetec®) e em seguida extraídos com 500 µL acetato de etila por meio da metodologia de extração líquido-líquido.

3.9 ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO DO MICRORGANISMO

Frascos erlenmeyers de boca larga com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de meio MLG, foram utilizados nos ensaios em pequena escala com imobilização. Para promover a imobilização dos microrganismos uma porção de aproximadamente 2g de esponja aço inoxidável (Zupp®) foi adicionada em cada erlenmeyer e autoclavados (Figura 28). Posteriormente o meio foi semeado com uma gota de solução de glicerol 25% contendo esporos fúngicos. Os frascos foram mantidos em uma incubadora rotativa (Tecnal® Model TE 420) a 28°C, 150 rpm por 24 horas até o crescimento do microrganismo. A solução de hesperetina na concentração de 25 mg/mL foi adicionado ao meio e o mesmo foi mantido nas condições anteriormente descritas por 96 horas. As diferentes cepas de *Cunninghamella* sp disponíveis no laboratório foram microrganismos selecionados para o ensaio de imobilização, sendo elas *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 e *Cunninghamella elegans* ATCC 26169.

Figura 28- Porção de esponja de aço inoxidável utilizada para imobilização.



Após o período de incubação (96 h) o meio líquido foi extraído conforme descrito em 3.6.1 e analisado por CCD e ESI-IT-MS

3.10 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS POR ESI-IT-MS

Para a caracterização dos derivados as análises foram conduzidas no laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LACEM/UFG, em espectrômetro de massas LCQ Fleet – *ion trap* (Thermo Scintific, Bremen, Alemanha) com fonte de ESI no modo de ionização negativo. Para tal as amostras foram solubilizadas em solução de metanol contendo 0,1% de hidróxido de amônio. As condições operacionais utilizadas estão descritas na tabela 1:

Tabela 1- Condições operacionais do equipamento LCQ-Fleet utilizada nas análises de ESI-IT-MS.

Parâmetros	Valores
Tensão do spray (kV)	4,5
Tube Lens (V)	-60,0
Tensão do capilar (V)	-30,0
Temperatura do capilar (°C)	275

3.11 CINÉTICA REACIONAL POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE-EMAR).

As análises de CLAE-EMAR foram realizadas no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – CRTI.

As amostras do meio reacional para construção da cinética reacional em microplacas foram adicionadas de 300 uL de metanol e filtradas com membrana PVDF (Polyvinylidene Fluoride, 0,45µm, 13mm).

Os equipamentos utilizados foram Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, com coluna ACE - C18 (4,6 x 100mm; 3µm), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando no modo negativo, utilizando voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 350°C, temperatura de gás auxiliar 300 °C, tube lens 55 e faixa de massas m/z 150-700. A análise por CLAE foi realizada com água deionizada acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (Fase móvel A, v/v) e metanol acidificado com 0,1% ácido fórmico (Fase móvel B – v/v). A programação gradiente realizada iniciou com 93:07 (A:B %), 70:30 (A:B %) em 10 minutos, 50:50 (A:B %) em 5 minutos, 30:70 (A:B %) em 3 minutos, 20:80 (A:B %) em 2 minutos, 100 (B %) em 3 minutos, permanecendo por 3 minutos, 93:07 (A:B %) em 2 minutos, permanecendo por 2 minutos. O tempo de corrida foi 33 minutos com fluxo de 0,3 mL/min, volume injeção 10 µL e temperatura da coluna 20 °C. Para o estudo de fragmentação foi utilizado o experimento PRM (Parallel Reaction Monitoring – Monitoramento de Reações Paralelas) com energias de colisão 30 eV (CE).

Os íons $[M - H]^+$ monitorados foram 287,05557 (Eriodictiol), 301,07122 (Hesperetina), 317,06613 (8-Hidroxilado, 3-hidroxilado), 381,02803 (Sulfatado - posições 7 e 3'), 463,12404 (Glicosilado - posições 7,5 e 3') e 477,10331 (Glicuronideo -posições 7 e 3).

3.12 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS POR RMN

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. O equipamento utilizado foi o espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para 1H e 75,46 MHz para o ^{13}C , equipado com sonda HR-MAS de 4mm. O solvente utilizado para as análises foi metanol deuterado (CIL- Cambridge Isotope Laboratories).

4. Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO E PREVISÃO DE METABÓLITOS DA HESPERETINA

4.1.1 Caracterização por ESI-IT-MS e RMN

A análise por espectrometria de massas demonstrou um sinal em 301 m/z referente à massa da hesperetina subtraída de um próton ($M-H$)⁻ (Figura 29), os íons obtidos em análise de ESI-IT-MS/MS, m/z 286, 283, 257 e 242 (Figura 30) foram compatíveis com o descrito na literatura (JUSTESEN, 2000; BRETT et al., 2008).

Figura 29- Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo da hesperetina

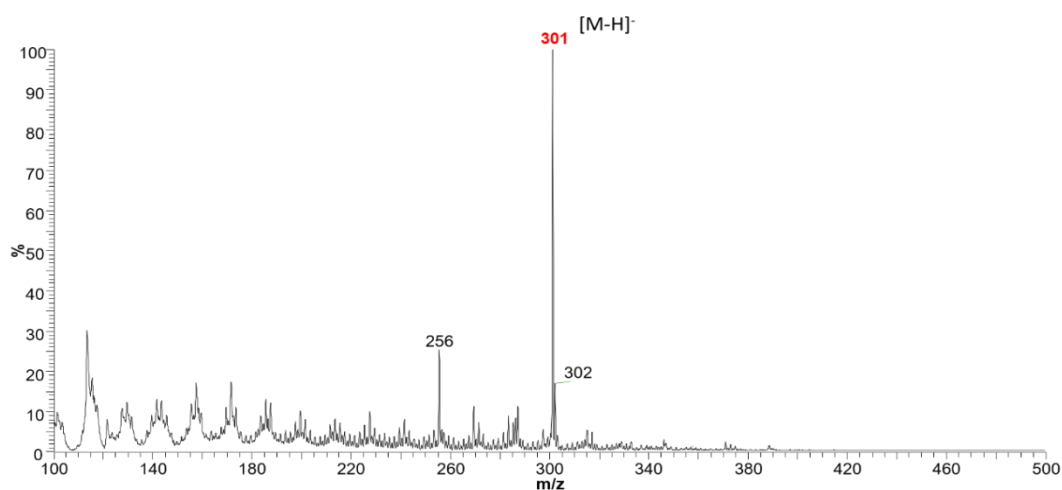
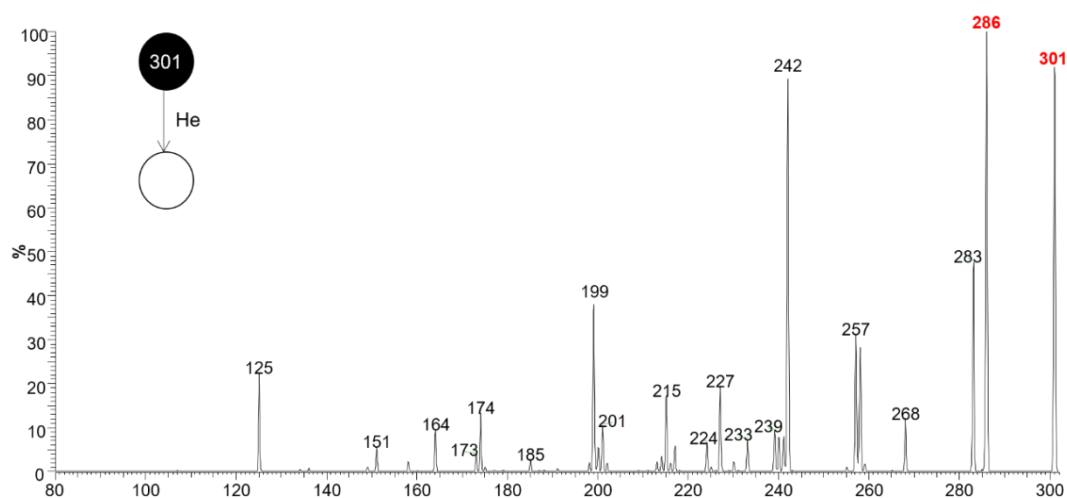


Figura 30- Espectro de ESI-IT-MS/MS no modo negativo da hesperetina



A flavanona hesperetina foi caracterizada por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C previamente aos experimentos de incubação com microrganismos a fim de se confirmar sua estrutura molecular. A Tabela 2 contém os resultados obtidos na análise de RMN comparados com dados da literatura, os deslocamentos e acoplamentos semelhantes confirmam a estrutura da hesperetina (MALTESE et al., 2009).

Tabela 2- Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C da hesperetina e dados da literatura.

Posição	Hesperetina		Hesperetina (literatura*)
	^1H δ (multiplicidade, J = Hz)	^{13}C δ	^1H δ (multiplicidade, J = Hz)
2	5.31 dd (12.8, 3.0)	79,0	5.46 dd (12.3, 3.0)
3ax	2,71 dd (3.0, 17.1)	43,0	2,74 dd (3.0, 17.2)
3eq	3,05 dd (12.8, 17.1)	43,0	3,23 dd (12.3, 17.2)
4	-	196,2	-
5	-	162,7	-
6	5.88 d (2.1)	94,7	5.91 d (1.9)
7	-	164,9	-
8	5.90 d (2.1)	96,2	5.92 d (1.9)
9	-	162,7	-
10	-	102,0	-
1'	-	131,2	-
2'	6,95 d (1,8)	113,8	6,95 d (1,6)
3'	-	147,3	-
4'	-	149,1	-
5'	6,93 d (8.2)	111,3	6,97 d (8.2)
6'	6,90 dd (2.14, 8.2)	118,6	6,90 dd (1.6, 8.2)
4'-OMe	3.86 s	55,4	3.81 s

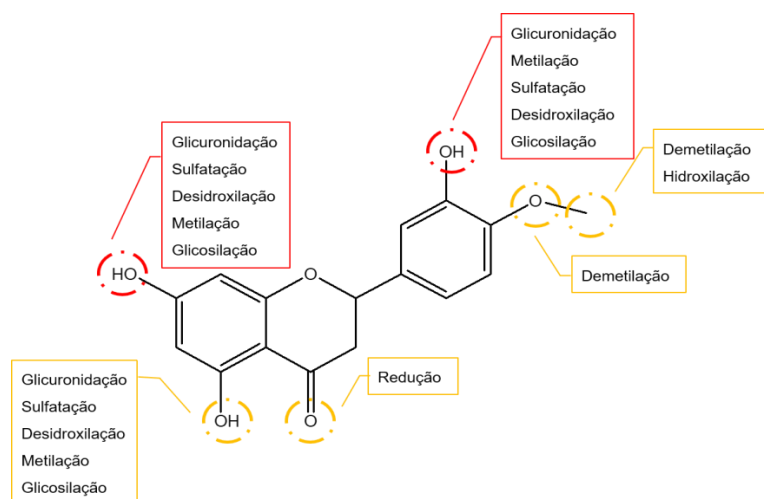
Legenda: d-dupleto, dd-duplo dupleto, s-simpleto, m-multipeto.

*MALTESE et al, 2009.

4.1.2 Previsão dos metabólitos *in silico*

Foi realizada uma previsão *in silico* de potenciais metabólitos de mamíferos da hesperetina utilizando o programa Metaprint 2D®, com tais resultados foi possível inferir os possíveis metabólitos e sítios de metabolismo da biotransformação com microrganismos, que mimetiza as reações de mamíferos. A previsão do metabolismo *in silico* utilizando o programa Metaprint 2D, indicou a possibilidade de reações de glicosilação, glicuronidação, sulfatação, oxidação e redução, como demonstra a figura 31.

Figura 31- Previsão dos metabólitos da hesperetina pelo programa Metaprint 2D.



O MetaPrint2D, é um programa de predição de metabólitos de mamíferos desenvolvido pela Unilever Cambridge, Centre for Molecular Science Informatics, da Universidade de Cambridge, Reino Unido. Os dados do programa são gerados através do processamento das transformações encontradas no banco de dados de metabólitos Symyx, que contém mais de 80.000 transformações metabólicas de xenobióticos embasadas por relatórios da literatura científica (CARLSSON et al., 2010).

O MetaPrint2D é uma ferramenta para prever os locais de metabolismo de uma molécula de acordo com as informações de um banco de dados, é descrito por impressões digitais circulares que possuem maior probabilidade de sofrer metabolismo de Fase I, baseada em sua semelhança com os sítios de metabolismo conhecidos e sítios que se entende por não serem metabolizados.

Estas impressões digitais circulares representam o ambiente químico de um átomo em uma forma que pode ser processada por um computador. A cor que destaca um átomo indica sua NOR (Razão de Ocorrência Normalizada). Esta NOR indica a probabilidade relativa de cada sítio em uma molécula ser um centro de metabolismo, embora não faça nenhuma previsão quanto à probabilidade absoluta da molécula sofrer transformação metabólica (CARLSSON et al., 2010; SINGH et al., 2014).

Na figura 31, a cor vermelha indica uma maior probabilidade de reação $0,66 \leq \text{NOR} \leq 1,00$, seguida da cor laranja que indica uma média probabilidade de reação $0,33 \leq \text{NOR} \leq 0,66$. Os resultados para NOR abaixo de 0,33 foram suprimidos.

4.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A morfologia complexa dos fungos filamentosos é evidenciada quando verificamos as diferentes formas estruturais que tal microrganismo pode assumir ao longo do seu ciclo de vida. Sua diferenciação morfológica pode ser afetada por fatores como temperatura de incubação, composição do meio de cultura, pH e agitação (PAPAGIANNI, 2004; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018). Assim, é fundamental a avaliação e acompanhamento do aspecto das cepas durante o processo de incubação, além de serem monitoradas a temperatura de incubação e agitação. As cepas utilizadas durante a triagem apresentaram formação de halo de crescimento antes e depois da adição da hesperetina, o que indica que seu crescimento não foi alterado pela adição do substrato.

Os metabólitos formados durante um processo de biotransformação com fungos filamentosos podem ser influenciados pelo meio de cultura utilizado. O meio utilizado neste experimento foi o meio de glicose, rico em fontes de carbono necessários para o crescimento dos fungos. Estudo de biotransformação do albendazol com *Cunninghamella blakesleeana* NCIM 687 em diferentes meios líquidos demonstrou que a capacidade de biotransformação quando utilizado o meio de glicose foi superior aos

experimentos com outros meios de cultura para a formação do seu derivado sulfoxidado e metilado (GURRAM et al., 2009)

Em meio líquido a estrutura micelar dos fungos filamentosos pode se desenvolver em forma de “pellets” (filamentos de micélios entrelaçados) ou como uma massa amorfa (filamentos de micélios dispersos). O quadro 3 demonstra a formação micelar em meio líquido de glicose dos fungos utilizados na triagem para a biotransformação da hesperetina.

Quadro 3 - Morfologia dos microrganismos em meio de glicose para triagem em erlenmeyers.

Microrganismo	"Pellets"	Massa amorfa	Halo
<i>Absidia blaklesleana</i> ATCC 10148b	++	-	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	-	+	+
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	-	+	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	+	-	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	++	-	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	++	-	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	+	-	+
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	-	+	+
<i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757	+	-	+
<i>Mucor plumbeus</i> ATCC 4740	++	-	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	+	-	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	+	+
<i>Beauveria</i> sp. IP 94	-	+	+
<i>Beauveria</i> sp. IP147	-	+	+
<i>Beauveria</i> sp. IP 153	-	+	+

Legenda:(-) ausência, (+) presença e/ou “pellets” pequenos, (++) “pellets” grandes.

Para selecionar as cepas capazes de biotransformar a hesperetina, alíquotas do meio de incubação foram retiradas a cada 24 horas a fim de verificar a formação de metabólitos com análises de CCD (Fase móvel: AcOEt: hexano, 80:20).

O quadro 4 apresenta os resultados da triagem com as cepas utilizadas. Os resultados de CCD desmontaram que os microrganismos *Aspergillus*

ochraceus ATCC 1009, *Fusarium roseum* ATCC 14717 e *Rhodotorula mucilaginosa* não foram capazes de biotransformar a hesperetina sob as condições reacionais e experimentais utilizadas.

Quadro 4 - Análise de CCD da biotransformação da hesperetina após 96 horas de incubação com diferentes microrganismos em meio de glicose, 27 °C e 200 r.p.m.

Microrganismo	Derivado 1 Rf: 0,09	Derivado 2 Rf: 0,17	Derivado 3 Rf: 0,25	Derivado 4 Rf: 0,69	Hesperetina Rf: 0,8
<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 10148b	+	+	-	-	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	-	-	-	-	+
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	+	+	+	+	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	+	+	-	+	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	+	+	-	+	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	-	+	-	+	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	-	-	-	+	+
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	-	-	-	-	+
<i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757	+	+	-	+	+
<i>Mucor plumbeus</i> ATCC 4740	+	+	-	-	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	+	+	-	-	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	+
<i>Beauveria</i> sp. IP 94	-	+	+	-	+
<i>Beauveria</i> sp. IP147	+	+	+	-	+
<i>Beauveria</i> sp. IP 153	+	+	+	-	+

Legenda: O símbolo (-) indica ausência e (+) presença dos metabólitos. Fase móvel: AcOEt:Hex (80:20), fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,25 cm de espessura e visualização por UV 254 nm.

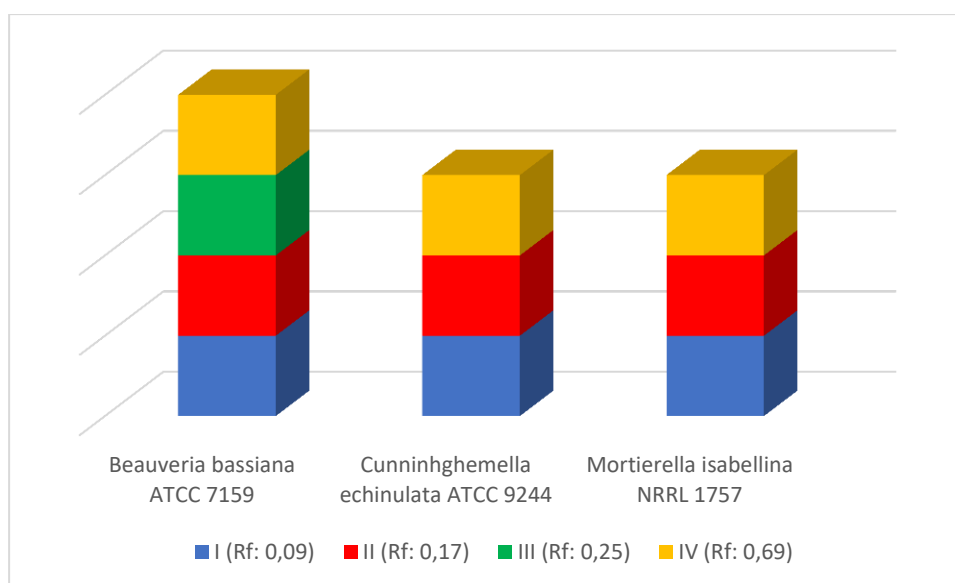
Os outros doze microorganismos biotransformaram a hesperetina em até quatro diferentes derivados, todos mais polares que o próprio substrato. Foi observado que a hesperetina não foi totalmente consumida ao final do tempo

de incubação (96 horas). As cepas *Mortierella isabellina* NRRL 1757, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foram capazes de produzir o maior número de derivados, sendo selecionadas para incubação em maior escala como representantes de seus gêneros.

4.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DA HESPERETINA EM ESCALA SEMI PREPARATIVA

As incubações em escala semi preparativa foram realizadas com as cepas *Mortierella isabellina* NRRL 1757, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e os resultados indicaram a formação de metabólitos já nas primeiras 24 horas de reação (Figura 32). Os fungos do gênero *Cunninghamella* e *Beauveria* são os mais comumente utilizados para biotransformação de fármacos e xenobióticos, devido ao seu amplo conjunto de enzimas capazes de realizar as mais variadas reações, como hidroxilação, glicosilação, sulfoxidação, *N*-oxidação, demetilação, glicuronidação e sulfatação (GROGAN; HOLLAND, 2000; ASHA; VIDYAVATHI, 2009b). A cepa *Mortierella* sp.; também já foi descrita na literatura como um microrganismo promissor para reações de biotransformação sendo capaz de realizar reações de oxidação e sulfatação (ABOURASHED; CLARK; HUFFORD, 1999; MAATOOQ; ROSAZZA, 2005; MIKELL; KHAN, 2012).

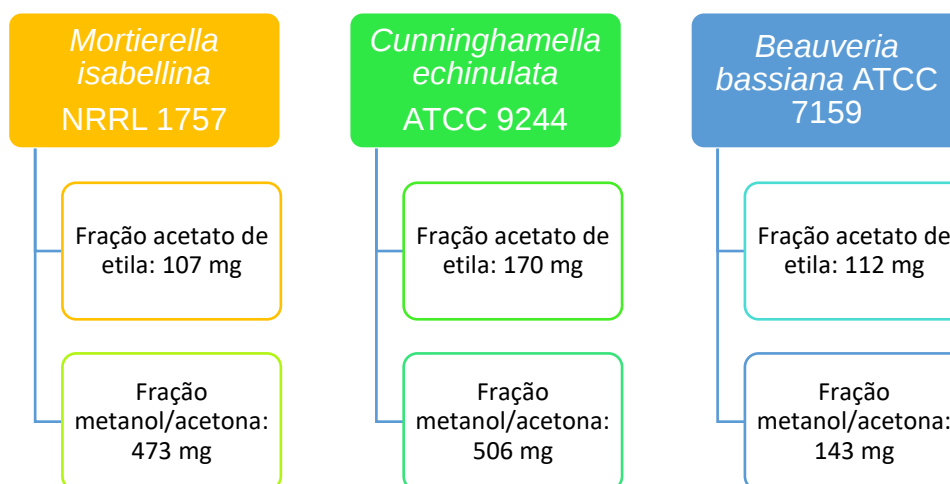
Figura 32- Formação dos derivados da hesperetina em 24 horas de incubação com diferentes microrganismos.



4.3.1 Filtração e extração

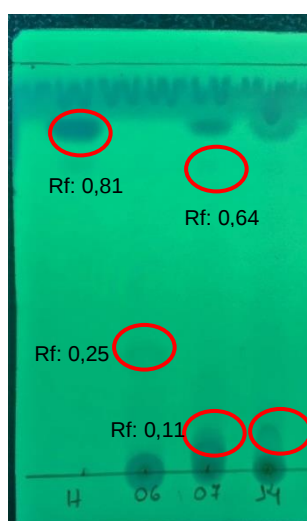
Após a filtração e extração dos sobrenadantes de incubação e micélios dos microrganismos *Mortierella isabellina* NRRL 1757, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram obtidos as frações acetato de etila e frações metanol/acetona. A figura 33 mostra as massas do produto reacional obtidas nos processos com cada cepa.

Figura 33- Massa do produto reacional obtido nas extrações da biotransformação da hesperetina por microrganismos.



As análises por CCD mostraram a formação de diferentes metabólitos mais polares que a hesperetina para as cepas utilizadas (Figura 34).

Figura 34- CCD de extração dos sobrenadantes de incubação dos microrganismos das frações acetato de etila.



Fase móvel: AcOEt:Hex (80:20), fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,25 cm de espessura e visualização por UV 254 nm.

Legenda: *Mortierella isabellina* NRRL 1757 (14), *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (07) e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (06)

4.3.2 Caracterização

Análises de espectrometria de massas foram realizadas nas alíquotas das frações acetato de etila para os ensaios com os microrganismos *Mortierella isabellina* NRRL 1757, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

4.3.2.1 Caracterização dos metabólitos de mamíferos

A figura 35 mostra o espectro de massas do produto reacional acetato de etila (fração acetato de etila) da cepa *Mortierella isabellina* NRRL 1757. O íon m/z 381 obtido na análise ESI no modo negativo é compatível com a massa do derivado sulfatado da hesperetina. O ensaio de ESI-IT-MS/MS evidenciou o padrão de fragmentação da massa do íon molecular. O pico de m/z 301 corresponde a perda do sulfato na fragmentação deste composto. (Figura 36).

Figura 35- Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo do produto reacional da cepa *M. isabellina* NRRL 1757.

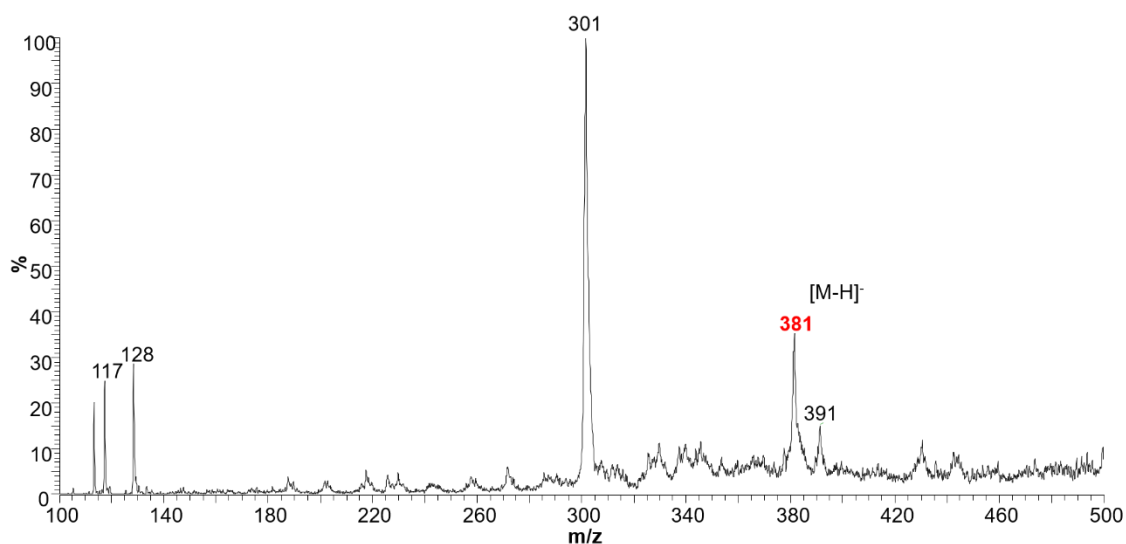
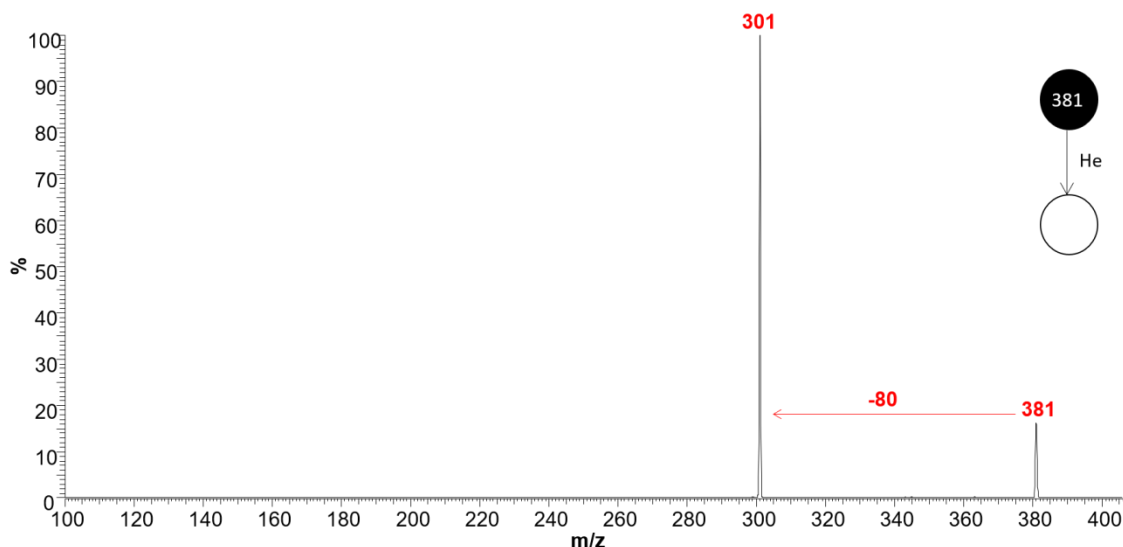
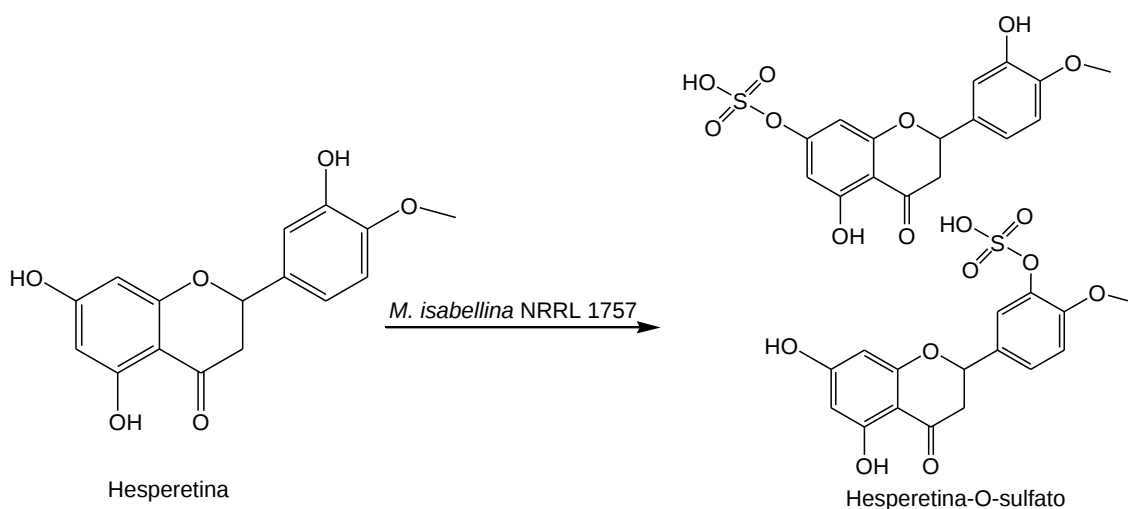


Figura 36- Espectro de ESI-IT-MS/MS no modo negativo do produto reacional da cepa *M. isabelina* NRRL 1757.



É possível confirmar, portanto, que a cepa *Mortierella isabelina* foi capaz de biotransformar a hesperetina em seu derivado sulfatado (Figura 37). Mikell & Khan (2012) já relataram a produção de derivados sulfatados da 7-hidroxiflavona com a participação de fungos do gênero *Mortierella*.

Figura 37- Esquema da biotransformação da hesperetina por *Mortierella isabelina* NRRL 1757 produzindo derivados sulfatados.



Nas análises ESI/MS no modo negativo do produto reacional da extração da *Beauveria bassiana* ATCC 7159 o íon m/z 477 equivale ao derivado glicuronidado da hesperetina (Figura 38). Ensaios de ESI-IT-MS/MS

revelaram o fragmento de m/z 301 corresponde a perda do glicuronídeo na fragmentação deste composto (Figura 39).

Figura 38- Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo do produto reacional da extração da *B. bassiana* ATCC 7159.

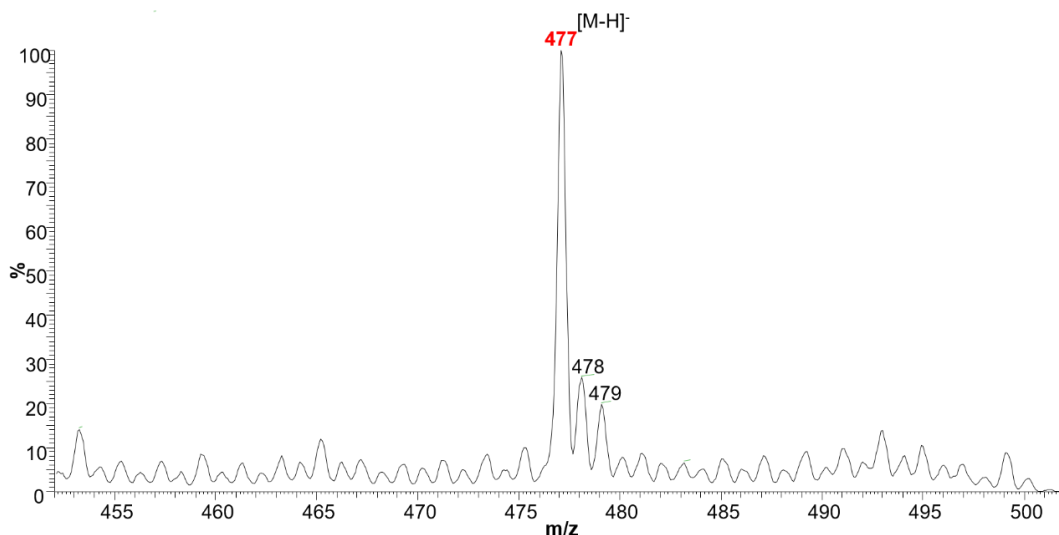
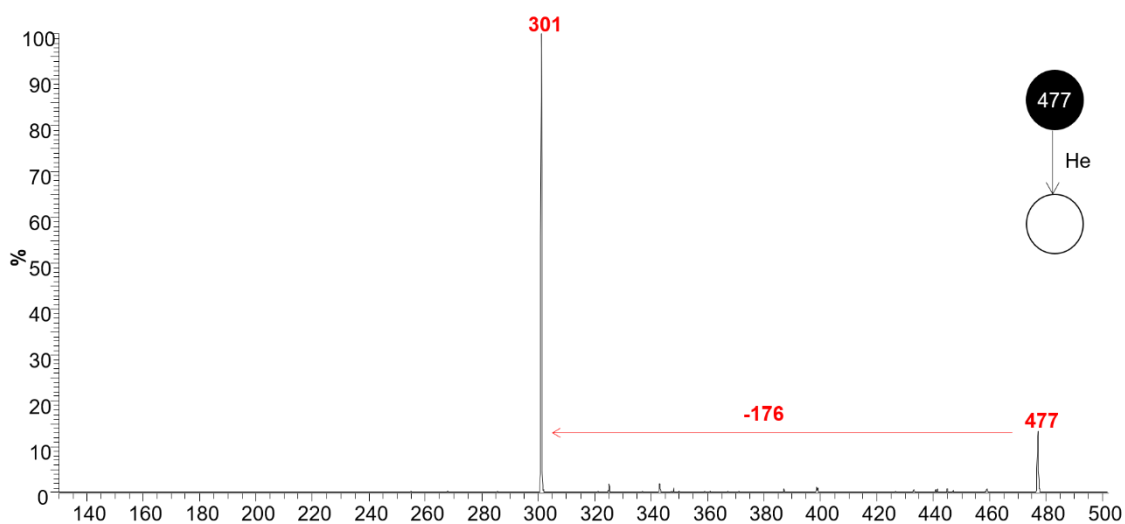
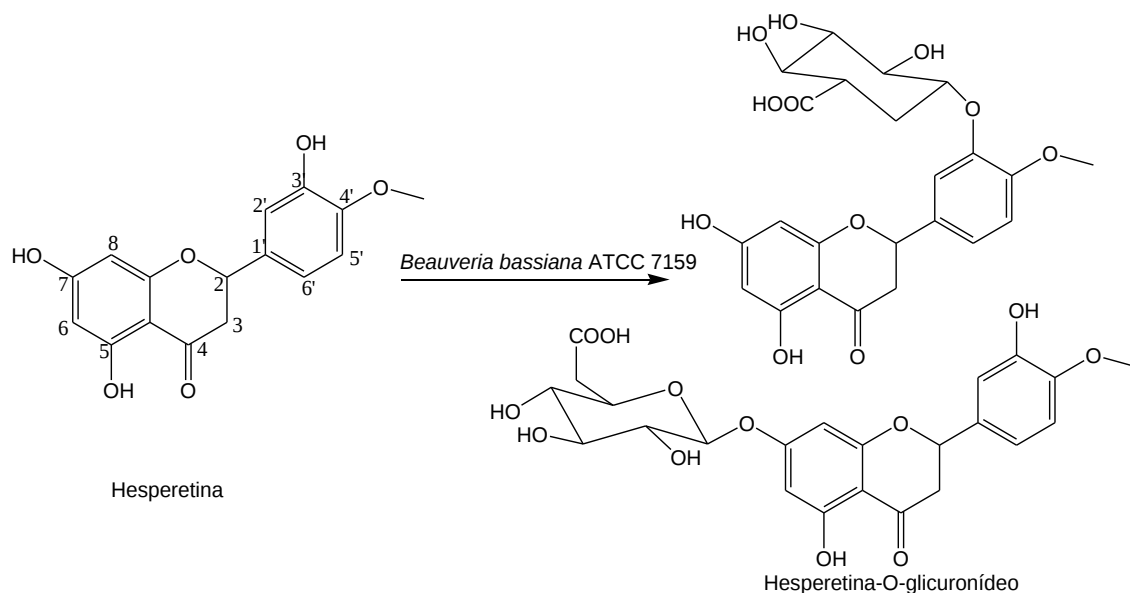


Figura 39- Espectro de ESI-IT-MS/MS no modo negativo do produto reacional da extração da *B. bassiana* ATCC 7159.



Assim, de acordo com os resultados obtidos nas análises de ESI-IT-MS, pode-se propor a glicuronidação da hesperetina pela cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159, como mostra a figura 40.

Figura 40- Biotransformação da hesperetina por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 produzindo o derivado glicuronidado.



A glicuronidação da 7-hidroxiflavona também foi descrita por Mikell & Khan (MIKELL; KHAN, 2012), os autores descrevem que a cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 obteve de taxa de conversão de 46% do produto inicial em seu glicuronídeo.

Metabólitos glicuronidados de polifenóis podem ser produzidos a partir de reações utilizando fungos filamentosos. A quercetina e a rutina, por exemplo, já foram bioconvertidos em seus glicuronídeos catalisados por cepas de *Streptomyces* (MARVALIN; AZERAD, 2011). Diferentes cepas de *Beauveria*, incluindo a *Beauveria bassiana* ATCC 7159, foram capazes de biotransformar o flavonol quercetina, em metabólitos sulfatados e glicuronidados em trabalhos anteriores desenvolvidos neste laboratório, comprovando a capacidade dessa cepa de produzir metabólitos similares àqueles identificados em mamíferos (COSTA et al., 2008).

Nas células intestinais de mamíferos ou durante o metabolismo de primeira passagem a hesperetina é metabolizada pelas enzimas UDP-glicuroniltransferase (UGTs) e sulfotransferase (SULTs) produzindo compostos glicuronidados e sulfatados, respectivamente. Tais metabólitos já foram

detectados em amostras de plasma humano e de ratos (MATSUMOTO et al., 2004; BRETT et al., 2008; MULLEN et al., 2008).

Estudos conduzidos com diferentes enzimas UGTs e SULTs demonstraram que as reações de conjugação da hesperetina em mamíferos ocorrem principalmente nas posições 7 e 3' e que existem diferenças específicas na cinética e regiosseletividade para os conjugados. Ademais o estudo conclui que os metabólitos hesperetina-3'-O-glicuronídeo e hesperetina-7-O-glicuronídeo são os majoritariamente encontrados *in vivo* (BRAND et al., 2010).

Em suma, os metabólitos glicuronidados e sulfatados da hesperetina são os principais produtos do metabolismo desta flavanona, logo, o resultado obtido nos experimentos de biotransformação da hesperetina com as cepas *Beauveria* e *Mortierella* podem indicar que tais fungos expressam enzimas de fase II do metabolismo na presença deste flavonoide.

Herath & Khan (2011) desenvolveram seu trabalho com o objetivo de caracterizar os metabólitos da hesperetina utilizando o modelo microbiano do metabolismo animal. Para tal, foram realizadas incubações com 40 microrganismos a fim de avaliar a capacidade de biotransformar a hesperetina em seus principais metabólitos. O microrganismo *Mucor ramannianus* (ATCC 2628) foi o selecionado para incubações em escala preparativa devido à sua alta eficiência de biotransformação quando comparado com os outros microrganismos da triagem. Tal cepa foi capaz de produzir metabólitos hidroxilados (8-hidroxihesperetina), demetilados (eriodictiol), sulfatados (hesperetina-7-sulfato) e conjugados com a quinovose (eriodictiol-4'-O- α -quinovopiranosídeo). Tais resultados corroboram com os obtidos neste trabalho e confirmam a capacidade dos microrganismos em mimetizar o metabolismo animal.

4.3.2.2 Caracterização do metabólito glicosilado

O produto reacional da incubação com a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 demonstra em análises de ESI-IT-MS a presença do íon molecular m/z 463, compatível com a massa do derivado glicosilado da hesperetina, e o

íon m/z 499, que seria o produto glicosilado com aduto de cloro $[M + Cl]^-$ (Figura 41). No ESI, a ionização é obtida através da protonação ou desprotonação, ou ainda pela adição de outros íons, como Na^+ , K^+ , NH_4^+ e Cl^- , formando adutos. O íon em m/z 301 após análises de ESI/MS/MS confirma a fragmentação do composto 3, correspondendo à perda da porção glicosídica deste (Figura 42).

Figura 41- Análise de ESI-IT-MS do produto reacional da incubação com a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

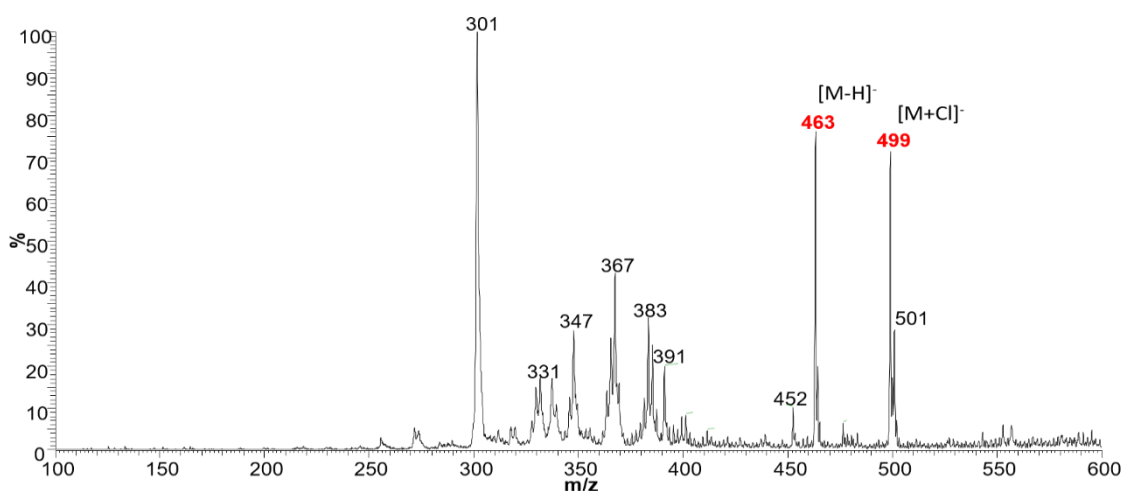
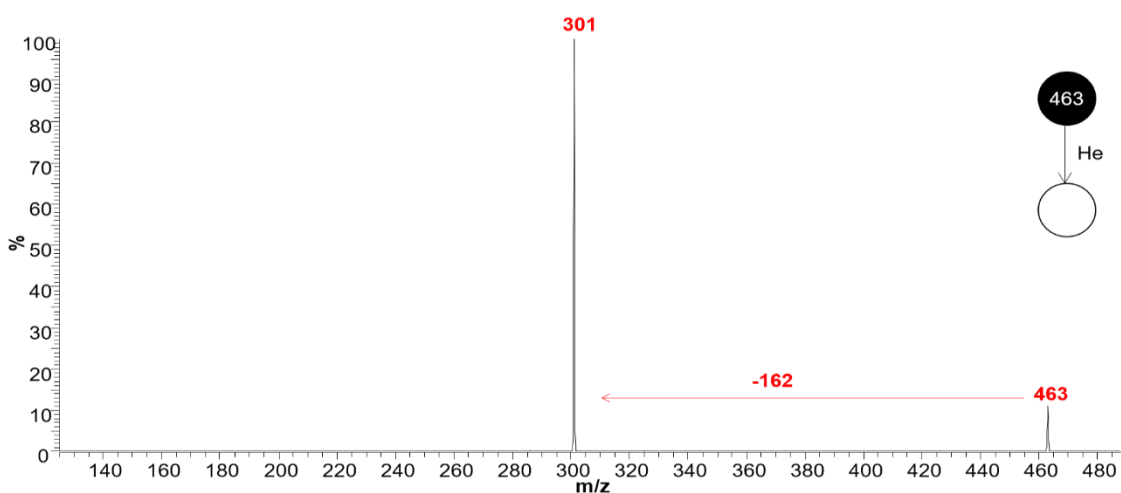


Figura 42- Análise de ESI-IT-MS/MS do produto reacional da incubação com a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.



O derivado foi purificado de acordo com o descrito no tópico 3.6.2 e os espectros de RMN de 1H adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III 500 (11,75 T) registrados com CD_3OD . As atribuições e deslocamentos químicos

dos átomos de carbono foram obtidos através de análises 2D HSQC e HMBC. Tais resultados estão na tabela 3, juntamente com os dados de ^1H .

Tabela 3- Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C da hesperetina e seu derivado glicosilado

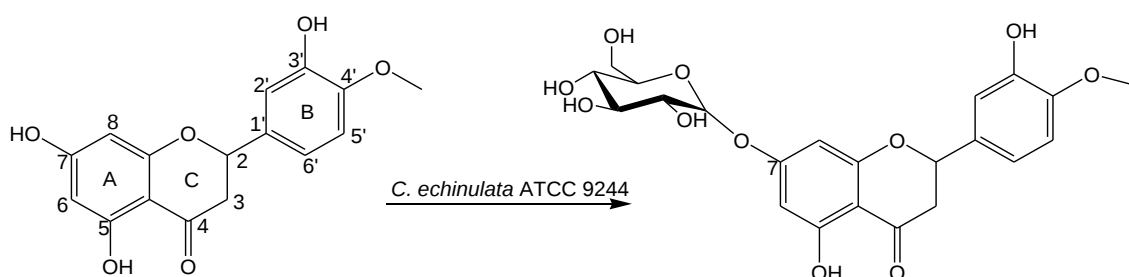
Posição	hesperetina		Hesperetina glicosídeo	
	^1H δ (multiplicidade, J = Hz)	^{13}C δ	^1H δ (multiplicidade, J = Hz)	^{13}C δ
2	5.31 dd (12.8, 3.0)	79,0	5.37 dd (6.7, 12.5)	79,5
3ax	2,71 dd (3.0, 17.1)	43,0	2.77 dd (3.3, 17,1)	43,0
3eq	3,05 dd (12.8, 17.1)	43,0	3.13 dd (12.8, 17.1)	43,0
4	-	196,2	-	197,0
5	-	162,7	-	162,8
6	5.88 d (2.1)	94,7	6,20 d (2.1)	96,0
7	-	164,9	-	164,8
8	5.90 d (2.1)	96,2	6,19 d (2.1)	97,2
9	-	162,7	-	162,9
10	-	102,0	-	103,3
1'	-	131,2	-	131,6
2'	6,95 d (1,8)	113,8	6,96 d (1,8)	113,8
3'	-	147,3	-	145,6
4'	-	149,1	-	147,4
5'	6,93 d (8.2)	111,3	6,94 d (8.2)	111,7
6'	6,90 dd (2.14, 8.2)	118,6	6,91 dd (2.14, 8.2)	118,4
4'-OMe	3.86 s	55,4	3.88 s	55,3
1"	-	-	4.99 d (7,32)	100,4
2"-6"	-	-	3.45-3.82, m	61.0-76.1

Legenda: d-dupeto, dd-duplo dupeto, s-simpleto, m-multipeto.

O derivado purificado apresentou uma unidade adicional de glicose caracterizada por sinais típicos de ^1H RMN em δ 4,99 (1H, d, $J = 7,3\text{Hz}$) e multipeto na região δ 3,45-3,82, respectivamente referindo-se à região anomérica (C-1) e aos hidrogênios carbinólicos. O espectro de ^{13}C RMN mostrou um desvio químico para o carbono anomérico em δ 100,4. A configuração β da glicose foi confirmada através da sua constante de

acoplamento ($J = 7,3$ Hz), como sendo o grupamento hidroxila da posição 7 da hesperetina de acordo com a correlação de HMBC entre o sinal do próton em δ 4,99 (H-1'') e o carbono em δ 164,8 (C-7). Os resultados obtidos foram comparados aos dados de Shimoda e colaboradores (2008) e confirmam a proposta apresentada. Assim, a estrutura foi determinada como sendo hesperetina 7-O- β -D-glucopiranosídeo (Figura 43).

Figura 43- Esquema da biotransformação da hesperetina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 produzindo o derivado glicosilado hesperetina 7-O- β -D-glucopiranosídeo.



O microrganismo *Cunninghamella echinulata* já foi descrito como capaz de realizar reações de glicosilação de uma vasta gama de compostos em estudos anteriores realizados neste laboratório. A glicosilação de compostos como o entacapone, produzindo seu derivado β -glicosilado, assim como a produção do derivado 4-nerolidilcatecol β -glicosilado a partir do 4 nerolidilcatecol e a O-glicosilação do composto azidotimidina em biorreator são alguns exemplos (LUSTOSA et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013; ARRUDA et al., 2016).

Já para os flavonoides, reações de glicosilação com cepas do gênero *Cunninghamella* foram relatadas na produção derivados glicosilados da quercetina, kaempferol, morina e kurarinona (CAO et al., 2015; SORDON; POPŁOŃSKI; HUSZCZA, 2016). Todavia, reações de glicosilação com tal microrganismo envolvendo a flavanona hesperetina ainda não haviam sido reportadas.

A glicosilação é uma reação bioquímica comum que se realiza principalmente com a atuação das glicosiltransferases. As glicosiltransferases

são enzimas que catalisam a formação de ligações glicosídicas através da transferência de um açúcar (geralmente um monossacarídeo) de um substrato doador para uma molécula nucleofílica aceptora de glicose, como proteínas lipídeos, esteroides, flavonoides e outras moléculas pequenas (SORDON; POPŁOŃSKI; HUSZCZA, 2016).

Na reação descrita neste trabalho, o flavonoide hesperetina se comportaria como a molécula nucleofílica aceptora de glicose, produzindo um composto glicosilado, preferencialmente nas posições 7 e 3'.

Os flavonoides podem apresentar uma melhor solubilidade em água, resultando no aumento da biodisponibilidade, quando glicosilados. Ademais, autores descreveram em seus trabalhos que as atividades anti-bacterianas e anti-inflamatórias destes compostos foram melhoradas com a adição da glicose (KWON et al., 2004; NENAAH, 2013).

Lee e colaboradores (LEE et al., 2012) realizaram a bioconversão enzimática da hesperidina em hesperetina-7-O-glicosídeo e relataram uma maior biodisponibilidade, resultando em melhor inibição das enzimas maltase e HMGC_o-redutase, assim sendo capaz de diminuir os níveis de glicose e colesterol, respectivamente. Acrescenta-se ainda que o composto glicosilado teve eficaz ação na inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* quando comparado com a atividade da hesperetina.

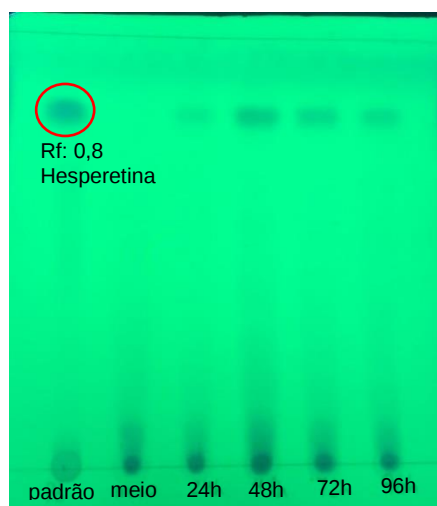
Diante do exposto, é possível presumir que a incubação da hesperetina com o microrganismo *Cunninghamella echinulata* pode ser capaz de produzir um produto glicosilado com potencial atividade antimicrobiana, antidiabética e hipocolesterolêmica.

Os resultados obtidos da incubação com as cepas *Mortierella*, *Beauveria* e *Cunninghamella* são compatíveis com a previsão *in silico* realizada no Metaprint 2D, descrita no item 4.1. O programa foi capaz de prever a produção de derivados sulfatados, glicuronidados e glicosilados, sendo assim efetivo no direcionamento dos experimentos realizados posteriormente.

4.4 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA HESPERETINA EM MEIO DE CULTURA

Para avaliar a estabilidade da hesperetina em meio de cultura foi realizada uma incubação nas mesmas condições de agitação e temperatura (200 rpm, 27 °C, pH 6.5) com 0,25 g/mL do substrato adicionado em meio de cultura estéril. Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 horas, perfazendo um total de 96 horas, posteriormente foram extraídas e analisadas por CCD. A figura 44 exibe a CCD das alíquotas extraídas assim como o padrão da hesperetina. Foi observado a ausência de degradação do substrato no tempo total do experimento (96h).

Figura 44- CCD das alíquotas de incubação da hesperetina em meio de cultura estéril, nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.



Fase móvel: AcOEt:Hexano (80:20), visualização em luz UV (254 nm).

4.5 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MICROESCALA

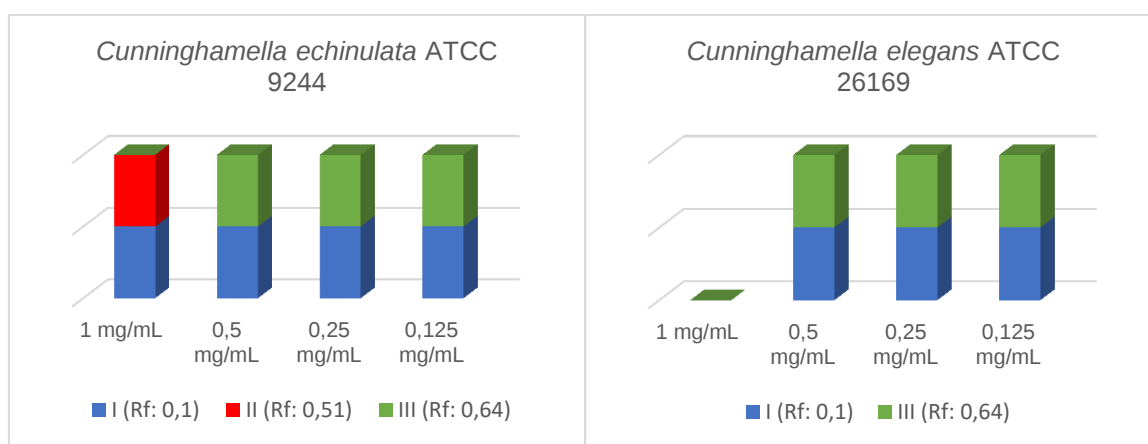
Cepas de *Cunninghamella* foram incubadas em microbiorreator para avaliar a formação de derivados da hesperetina em microescala.

4.5.1 Incubação em microbiorreator com diferentes concentrações de hesperetina

Diferentes concentrações de hesperetina foram utilizadas para a biotransformação utilizando as cepas *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 em microbiorreatores.

As análises de CCD das incubações com concentrações de hesperetina de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL indicaram alteração na variedade de derivados formados, como mostra o gráfico da figura 45. Também foi possível verificar uma maior variedade de derivados quando comparado às incubações realizadas em pequena escala (erlenmeyers).

Figura 45- Resultados de CCD demonstrando a formação de derivados após 48 horas de incubação em microbiorreator com diferentes concentrações de substrato.



Desta forma foi possível observar que diferentes concentrações de hesperetina foram capazes de modificar a formação dos derivados em microbiorreatores.

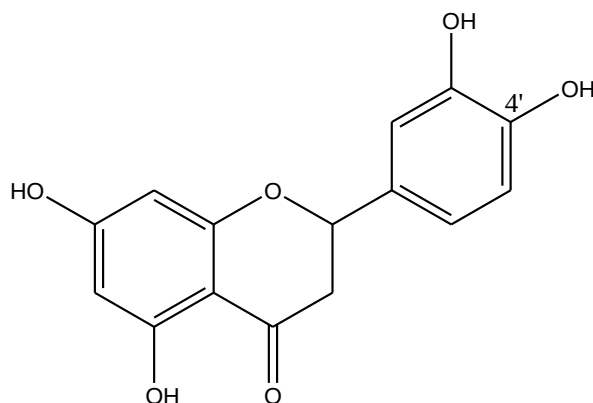
Para avaliar a influência da concentração do substrato na cinética de formação de metabólitos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EMAR). As análises foram realizadas nas incubações da *Cunninghamella echinulata* ATCC

9244 com as concentrações de 0,25 mg/mL (C2) e 1 mg/mL (C4) de hesperetina, nos tempos de 6h, 8h e 48 horas.

Foram detectados quatro derivados da hesperetina com a técnica de CLAE-EMAR nas duas concentrações de incubação analisadas, sendo eles o eriodictiol, a hesperetina sulfatada, hesperetina glicosilada e hesperetina glicuronidada.

O eriodictiol (Fig. 46) é uma flavanona pertencente à família dos flavonoides. Este composto pode ser obtido por fontes naturais, como os cítricos limão, laranja e tangerina ou como produto do metabolismo de outras flavanonas como a hesperetina e a naringenina (XIAO; HOGGER, 2013; HAYTOWITZ; WU; BHAGWAT, 2018). Sua atividade contra diabetes mellitus foi comprovada, além de possuir ação antinociceptiva, anti-inflamatória e anticâncer (ZHU et al., 2014; HE et al., 2018; KWON et al., 2018; LV et al., 2018). O estudo da biotransformação da hesperetina utilizando microssomas hepáticos humanos e de ratos gerou a demetilação deste flavonoide na posição 4, produzindo o eriodictiol. Além disso a aplicação de enzimas recombinantes da CYP demonstraram a participação da isoforma 1A2 no metabolismo da hesperetina para a formação do produto desmetilado (BREINHOLT et al., 2002)

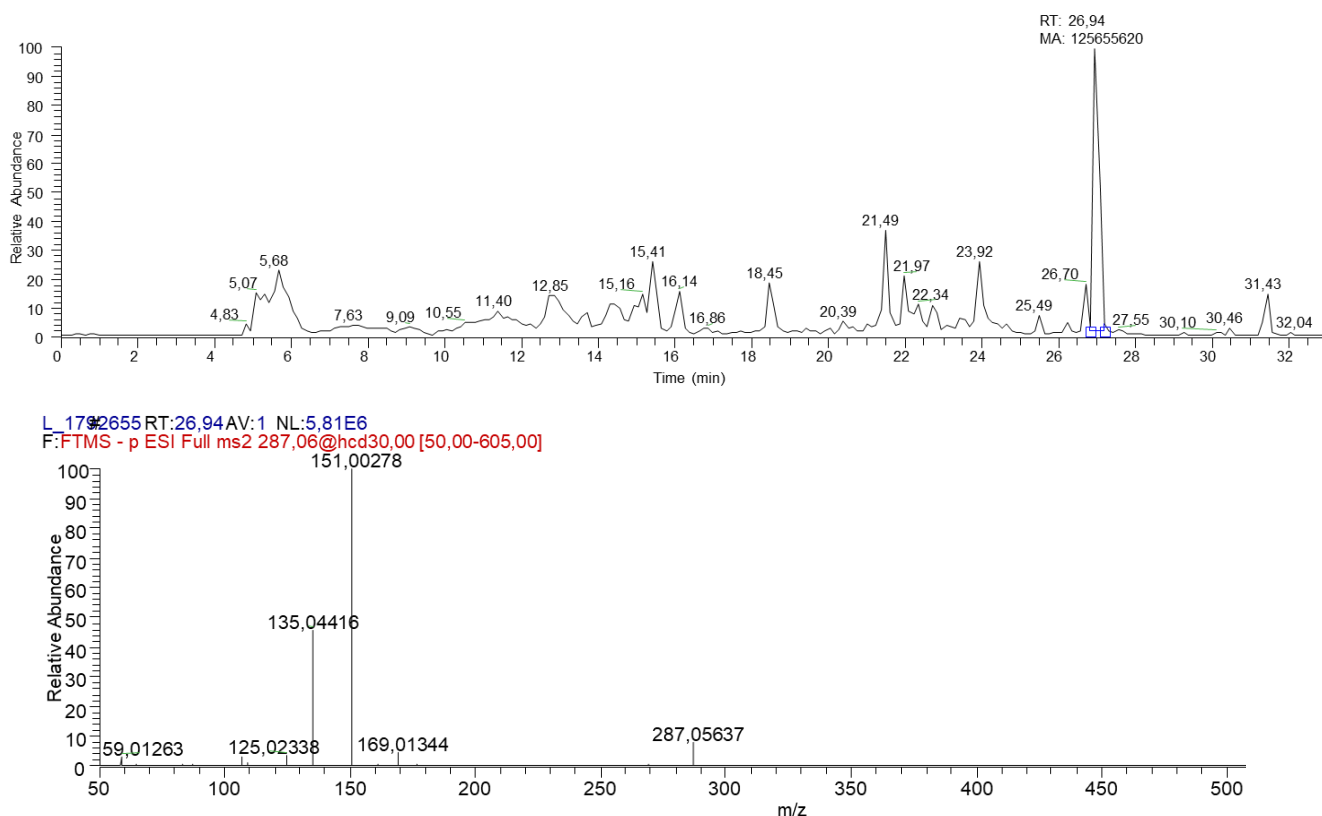
Figura 46- Estrutura química do eriodictiol.



Na figura 47 estão representados o cromatograma do sobrenadante de incubação da hesperetina em 48 horas, com o microorganismo

Cunninghamella echinulata ATCC 9244 em microplacas e o espectro de massas do pico referente ao tempo de retenção 26,94.

Figura 47- Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 287,05637.



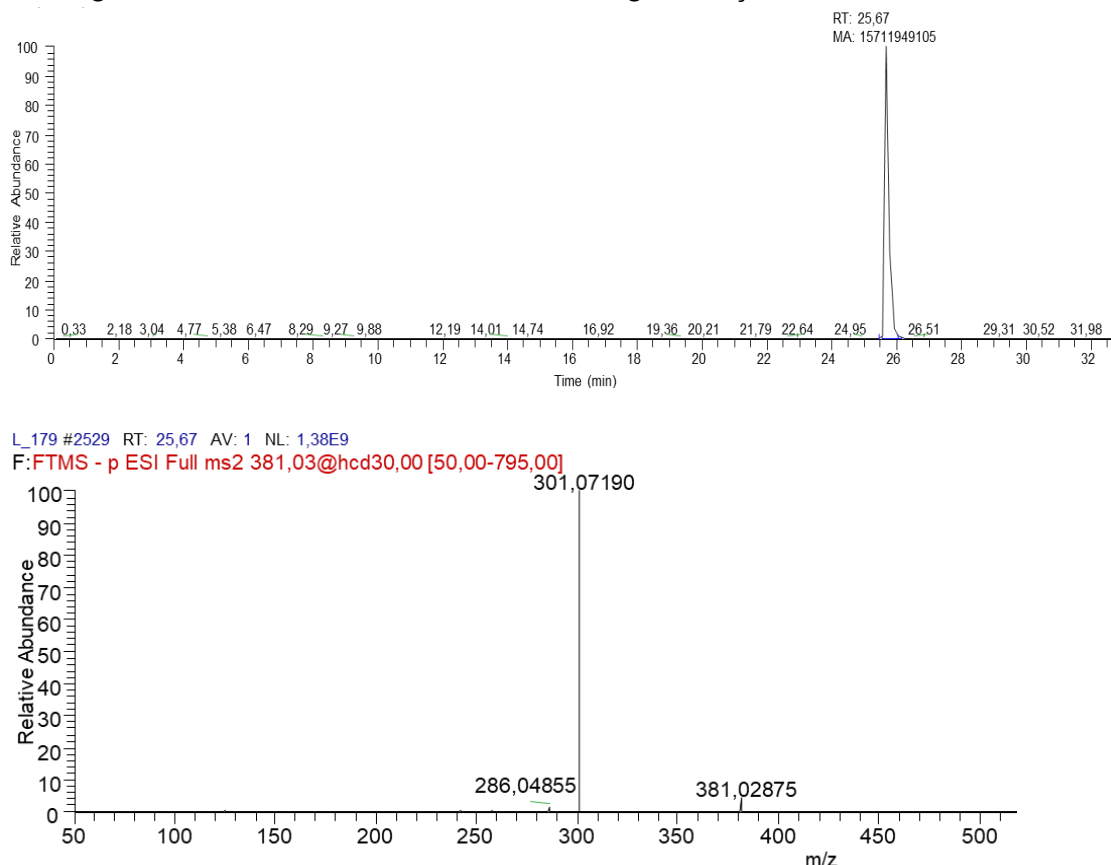
No espectro de massas no modo negativo do pico selecionado, foi possível observar o íon de m/z 287,05637 com erro de 3,006 ppm, indicando que o produto formado seria o eriodictiol. A fragmentação do íon 287 demonstrada no espectro de massas indica a produção dos íons de m/z 151, 135 e 125, compatíveis com o perfil de fragmentação do eriodictiol de acordo com a literatura (JUSTESEN, 2000).

Dessa forma é possível confirmar a detecção do eriodictiol em amostras de biotransformação da hesperetina pelo fungo filamentosos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 utilizando microbiorretores.

Outro derivado detectado no sobrenadante de incubação a partir de análise de CLAE-EMAR foi o metabólito da hesperetina sulfatado. Este metabólito já foi descrito previamente neste trabalho como sendo um dos principais produtos do metabolismo em mamíferos da hesperetina.

A figura 48 mostra o cromatograma de incubação do hesperetina, onde no tempo de retenção de 25,67 é possível detectar o íon de m/z 381,02875, com erro de 3,335 indicando a formação do metabólito sulfatado no modo negativo.

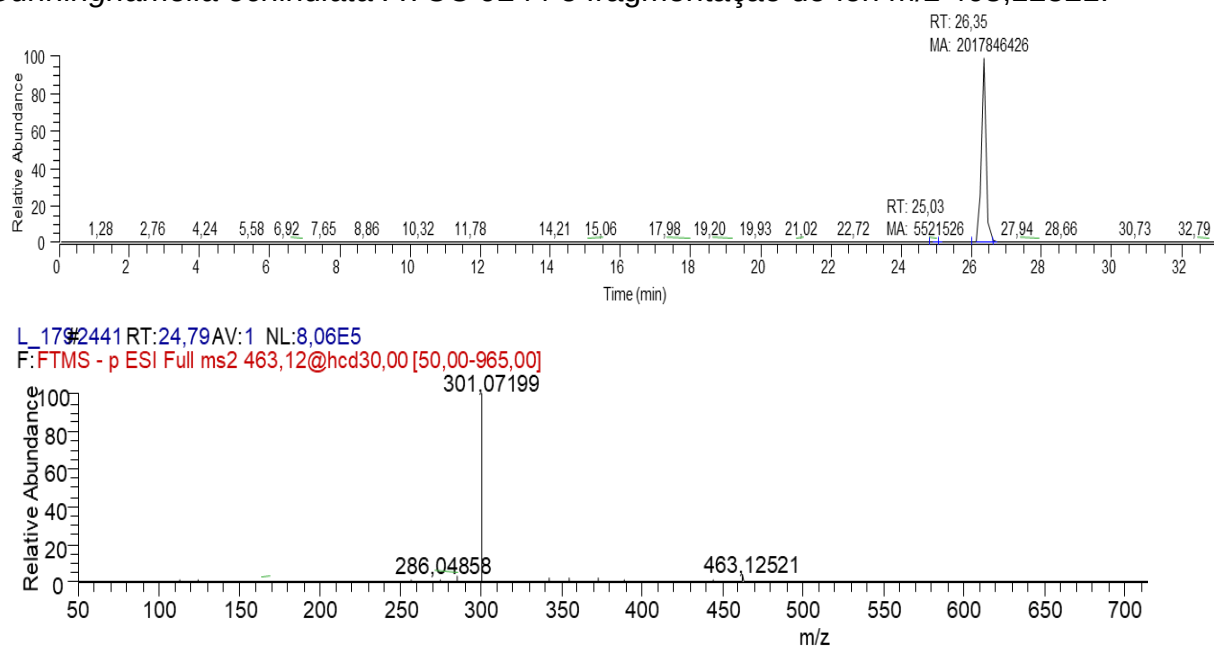
Figura 48- Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 381,02875.



A fragmentação do íon m/z 381,02875 produziu os íons m/z 301,07190 e 286,04855 que corrobora com o resultado do metabólito sulfatado, pela perda da porção sulfato.

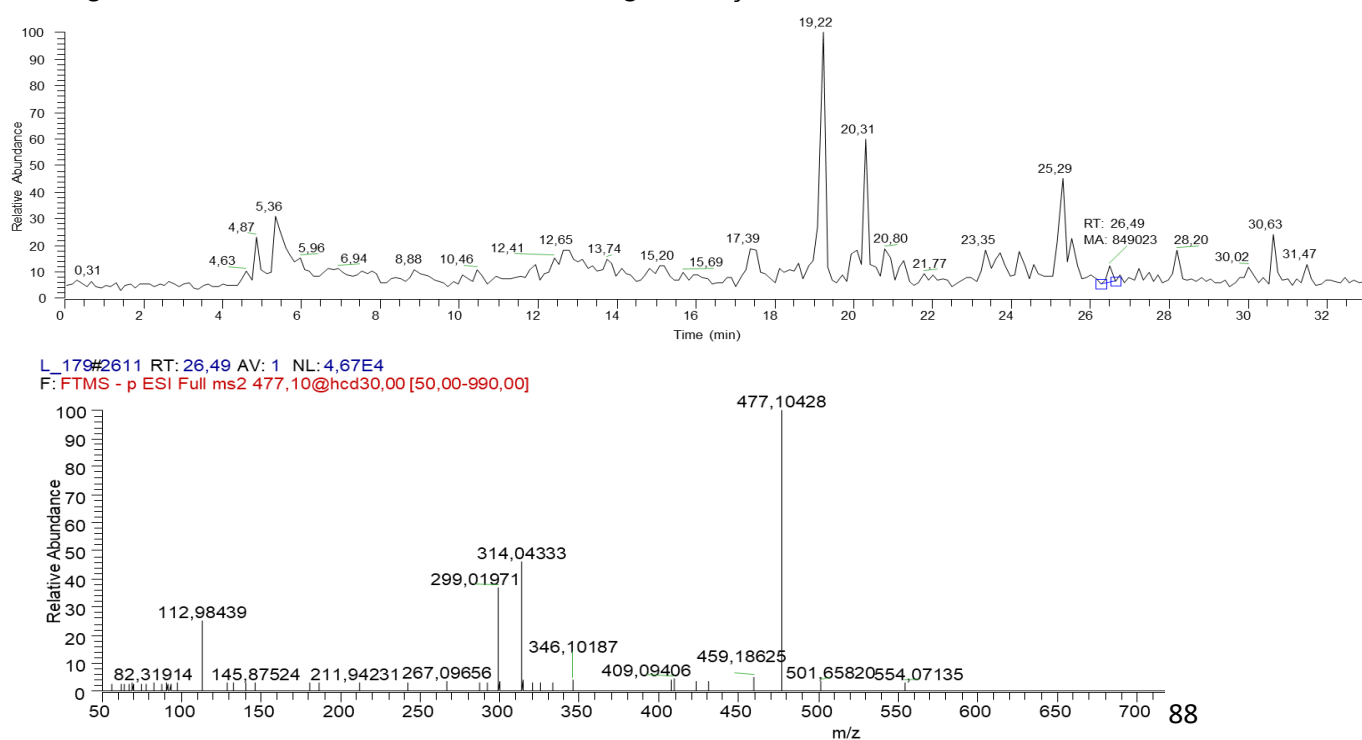
No tempo de retenção 26,35 minutos é possível detectar o íon m/z 463,12521 que corresponderia ao metabólito da hesperetina glicosilado no modo negativo (Fig. 49). Neste caso o erro seria de 3,718 ppm. O metabólito glicosilado já foi citado anteriormente neste trabalho e sua importância na biotransformação da hesperetina ocorre principalmente pelas suas várias atividades farmacológicas já relatadas.

Figura 49- Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 463,12521.



Outro metabólito de mamíferos da hesperetina foi detectado na biotransformação por micropilulas: a hesperetina glicuronidada. No tempo de retenção de 26,49 min. foi detectado o íon de m/z 477,10428, correspondente ao metabólito glicuronidado no modo negativo com erro de 3,202 ppm, como pode ser visto na figura 50.

Figura 50 Análise de CLAE-EMAR do produto reacional da incubação com a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e fragmentação do íon m/z 477,10428.

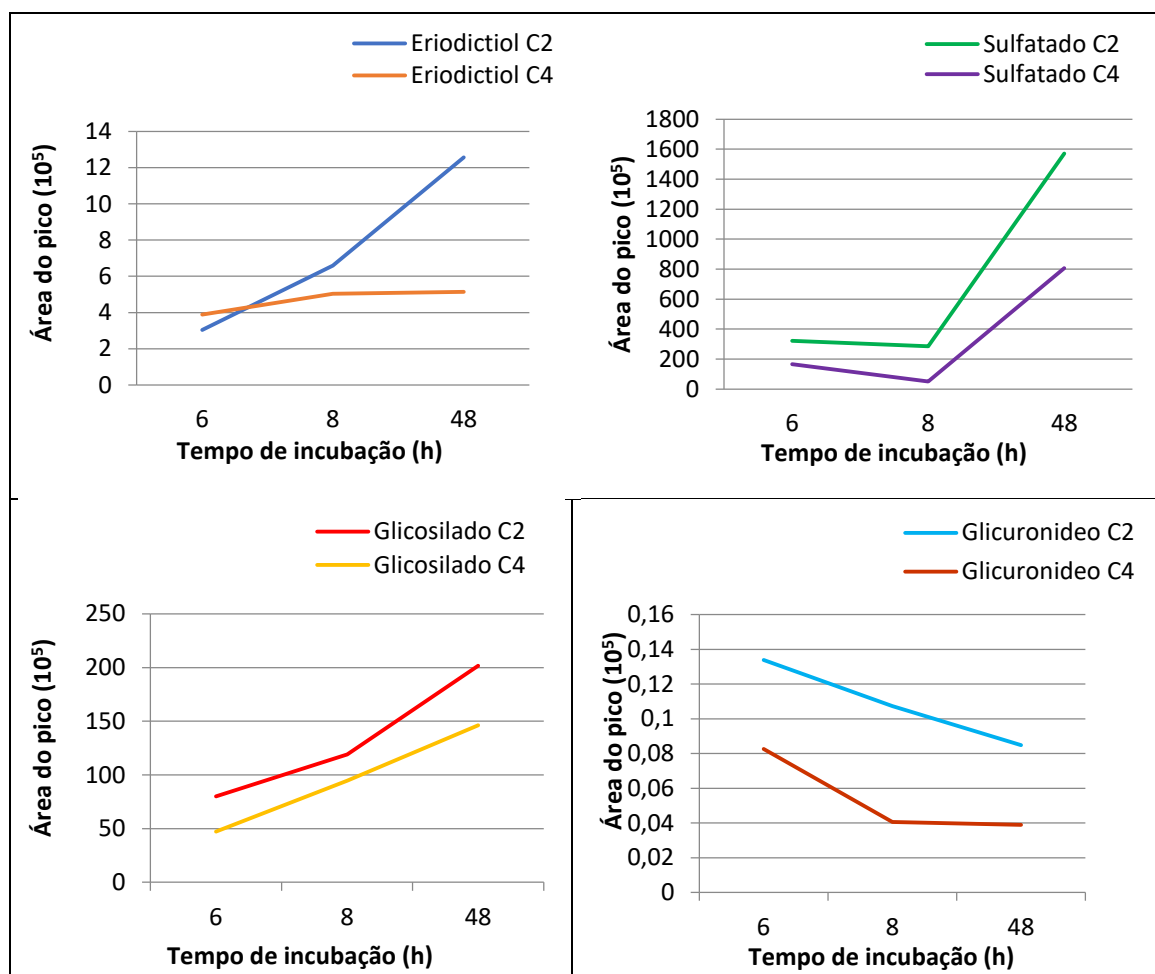


O monitoramento da cinética de reação nos processos de biotransformação é realizado comumente empregando-se técnicas cromatográficas, como CCD ou CLAE. No entanto, devido à sensibilidade relativamente baixa desses sistemas, pode ser interessante a combinação de técnicas, como a espectrometria de massas, para alcançar resultados mais satisfatórios. A aplicação da espectrometria de massas confere uma maior flexibilidade no método analítico por várias razões. Diferentes fenômenos físicos para ionização de moléculas podem ser aplicados nas fontes de íons, o que possibilita o uso desses instrumentos para análise de compostos com diversas propriedades físico-químicas. Vários métodos podem ser usados para a separação de íons em analisadores de espectrômetros de massa e na detecção de íons individuais. Além disso, os espectrômetros de massa de alta resolução oferecem uma dimensão adicional útil no processo de reconhecimento de entidades presentes na mistura analisada. A relação massa-carga exata (m/z) dos íons que atingem o detector de massa desses instrumentos pode ser medida com a precisão até o quarto ponto decimal (STOBIECKI, 2000; CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Assim, o uso da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução possibilitou a detecção de metabólitos da hesperetina em pequenas quantidades durante a biotransformação. Considerando que a utilização de microbiorreatores para bioconversão de produtos naturais utiliza uma quantidade reduzida de substrato durante a triagem das cepas fúngicas, esse método analítico seria determinante para o monitoramento e otimização das reações.

A figura 51 exibe a comparação da cinética reacional com as diferentes concentrações de hesperetina, demonstrando a formação dos metabólitos.

Figura 51- Cinética reacional (CLAE-EMAR) da biotransformação fúngica com diferentes concentrações de hesperetina e formação dos derivados com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.



Legenda: C2 – incubação com hesperetina a 0,25 mg/mL, C4 – incubação com hesperetina a 1,0 mg/mL.

Os resultados apresentados nos gráficos de cinética demonstraram que a maior concentração de hesperetina foi capaz de inibir parcialmente a formação de todos os metabólitos analisados.

A interação dos flavonoides com as enzimas citocromo p450 podem ocorrer principalmente por três formas: os flavonoides podem ser capazes de induzir a biossíntese de várias CYPs, a atividade enzimática das CYPs podem ser moduladas (inibidas ou induzidas) por esses compostos e os flavonoides podem ser metabolizados por várias CYPs (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002).

Diante disso, vários estudos foram conduzidos com o objetivo de se identificar a relação entre os CYPs e diversos flavonoides e em vários deles, a hesperetina foi relatada como inibidora da enzima CYP1A1, 1A2 e 2C9 (QUINTIERI et al., 2010; SRIDHAR et al., 2012, 2014). Dessa forma, esse comportamento da enzima pode explicar a inibição da formação dos derivados quando a concentração do substrato é aumentada nas incubações, uma vez que estudos com células recombinantes já demonstraram que o CYP 1A2 está envolvido no metabolismo da hesperetina para a formação do eriodictiol, por exemplo (BREINHOLT et al., 2002).

Walle e Walle (2002) também avaliaram a indução de UDP-glicuronosiltransferase por vários flavonoides, dentre eles a hesperetina. Os resultados indicaram que esta flavanona não foi capaz de induzir tais enzimas, diferentemente dos flavonoides crisina, diosmetina, apigenina e luteolina que apresentaram altas taxas de indução das UGTs.

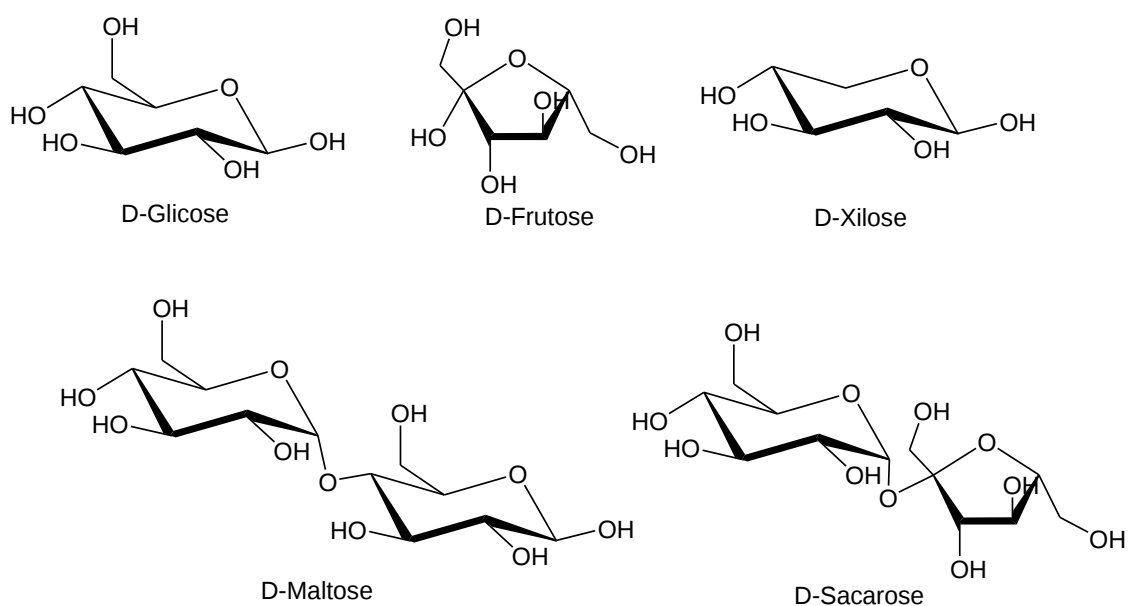
Neste trabalho foi possível verificar que uma maior concentração de substrato não induziu a formação de derivados glicosilados ou glicuronidados, ao contrário, essa concentração foi diminuída.

O modelo de cinética clássica de Michaelis-Menten, em que a velocidade de reação atinge um valor máximo no qual há um equilíbrio entre enzima e substrato, nem sempre é válida para todas as UGTs (WONG et al., 2009). A UGT1A1, por exemplo, exibiu cinética de inibição por substratos no flavonoide baicaleína enquanto todas as outras isoformas testadas mostraram comportamento cinético clássico. Embora a inibição por substrato pelo UGT1A1 não tenha sido investigada em detalhes, estudos anteriores sobre outras enzimas sugeriram os possíveis mecanismos para tal fenômeno. Foi proposto que existam duas regiões de ligação dentro do sítio ativo da enzima, e a ligação do segundo substrato provocaria mudança conformacional no sítio ativo da enzima resultando na diminuição das taxas de reação, fenômeno conhecido como inibição por substrato (TRACY, 2003). Contudo, investigações adicionais sobre o mecanismo de inibição do substrato seriam necessárias para se aplicar tal fenômeno no presente estudo.

4.5.2 Incubação em microbiorreator com diferentes meios de cultura

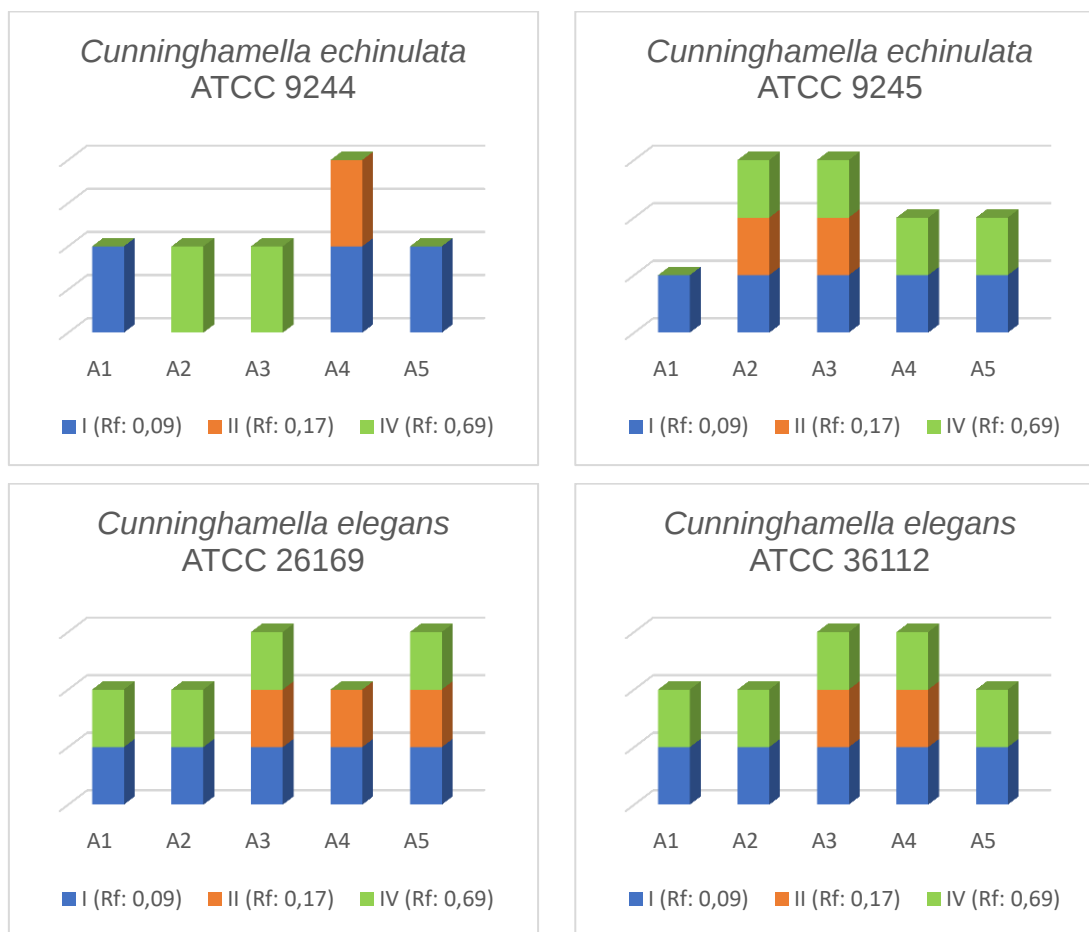
Cinco fontes de carbono (Figura 52) foram selecionadas para produzir meios de culturas diferentes, tais meios foram utilizados na biotransformação da hesperetina na concentração de 0,25 g/mL em microbiorreator com quatro cepas de *Cunninghamella* sp.

Figura 52- Estrutura química dos açúcares utilizados na composição dos meios de cultura



Alíquotas foram retiradas após o período de 48h e analisadas por CCD e espectrometria de massas. A figura 53 mostra a formação de metabólitos com diferentes meios de cultura de acordo com os resultados obtidos nas análises de CCD.

Figura 53- Análise da formação dos metabólitos na incubação com cepas de *Cunninghamella* em diferentes meios de cultura por CCD.



Legenda: meios de cultura com diferentes fontes de açúcar, sendo A1: glicose, A2: frutose, A3: xilose, A4: maltose, A5: sacarose.

Para o microrganismo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 o meio de cultura A4 (maltose) foi o que produziu uma maior variedade de derivados da hesperetina, este meio de cultura possui como substituto da glicose a maltose. A maltose é um dissacarídeo composto da junção de uma molécula de α -glicose e outra de β -glicose. Ela é transportada para o interior da célula com a ajuda de transportadores de membrana específicos e posteriormente é hidrolisada pela enzima intracelular maltase, gerando duas unidades de glicose que serão conduzidas na via glicolítica (Kovak 2004). A maior quantidade de moléculas de glicose disponível intracelularmente pode justificar a produção de maior variedade de derivados da hesperetina com esta cepa. Prasad e colaboradores (2011) relataram a influência da fonte de carbono na formação

de metabólitos do meloxicam. A maltose foi capaz de favorecer a formação do derivado 5'-OH metil meloxicam. Por outro lado, Abel e colaboradores (2003) avaliaram a atuação das fontes de carbono em reações de *N* e *O*-demetilação com *Cunninghamella echinulata*. Os resultados demonstraram que o meio de cultura com maltose teve menores rendimentos dos metabólitos quando comparado com outras fontes de carbono (glicose, sacarose e galactose).

Já para a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 os meios de cultura A2 e A3 produziram uma maior variedade de derivados da hesperetina. Os meios A2 e A3 foram preparados substituindo a glicose por frutose e xilose, respectivamente. A frutose é um monossacarídeo que geralmente é internalizado pelas células de fungos filamentosos através de transportadores de hexoses. Contudo transportadores específicos de frutose já foram descritos para cepas de *Saccharomyces* (DOEHLEMAN; MOLITOR; HAHN, 2005). Já a xilose é absorvida e sofre redução a xilitol através da xilose redutase. O xilitol é então convertido a L-xilulose e após fosforilação é degradada pela via pentose fosfato (LU et al., 2010).

Prasad e colaboradores (2011) descrevem a biotransformação do meloxicam com a cepa *Cunninghamella blakesleeana* e seus resultados revelam que o meio com frutose foi capaz de produzir três metabólitos. Já o meio contendo xilose foi específico para a produção do metabólito M2 (5-hidroximetil meloxicam). Em trabalhos anteriores com o albendazol, Prasad e colaboradores (2008) obtiveram resultados semelhantes, onde o meio com frutose foi capaz de produzir três metabólitos do albendazol, e o meio com xilose foi específico para a produção do metabólito M1 (albendazol sulfóxido). Todavia, neste trabalho a cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 foi capaz de produzir os mesmos derivados com meios contendo xilose e frutose. Além de as cepas *Cunninghamella elegans* produzirem uma maior variedade de metabólitos com o meio de xilose. Contudo, vale ressaltar que os ensaios foram realizados em microbiorreator, o que pode influenciar o crescimento do microrganismo, a reologia, a transferência de massa e consequentemente a formação dos metabólitos.

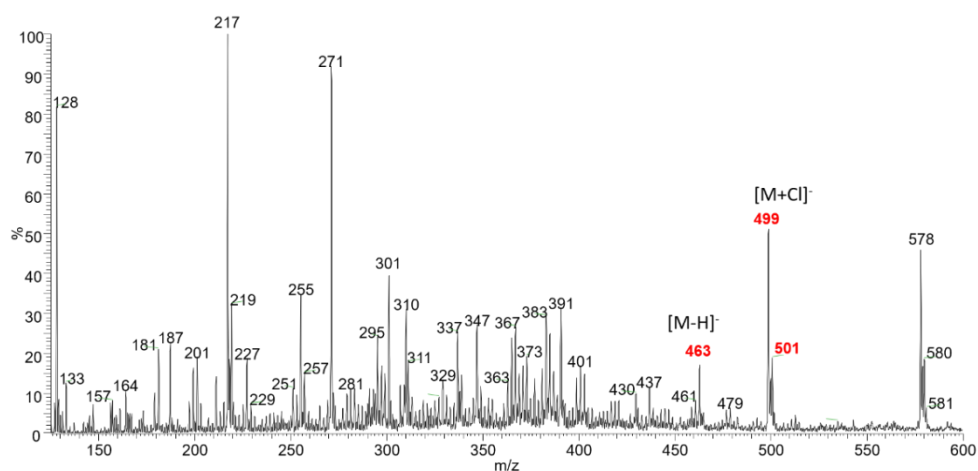
Na biotransformação da hesperetina com *Cunninghamella elegans* ATCC 26169, os meios de cultura contendo xilose e sacarose produziram uma

maior variedade de derivados. A sacarose é um glicídio formado por uma molécula de glicose e uma frutose. A utilização de sacarose em meios de cultura para a biotransformação de albendazol e meloxicam não foi capaz de produzir derivados com cepa de *Cunninghamella* (PRASAD et al., 2008, 2011). Contudo, neste trabalho, com o uso do microbiorreator os microrganismos foram capazes de produzir três derivados da hesperetina.

Os meios de cultura contendo xilose e maltose quando incubados com a *Cunnnighamella elegans* ATCC 36112 na biotransformação da hesperetina produziram uma maior variedade de derivados.

Nas análises de ESI-IT-MS das incubações foi observado que o produto glicosilado foi produzido independentemente do meio de cultura utilizado e da cepa utilizada. Sendo assim podemos inferir que o todas as cepas de *Cunninghamella* sp. foram capazes de produzir o derivado glicosilado. Além disso podemos propor que a glicose utilizada para a funcionalização da hesperetina não seria necessariamente advinda do meio de cultura utilizado, uma vez que incubações com fonte de carbono de frutose também produziram o derivado glicosilado (Figura 54).

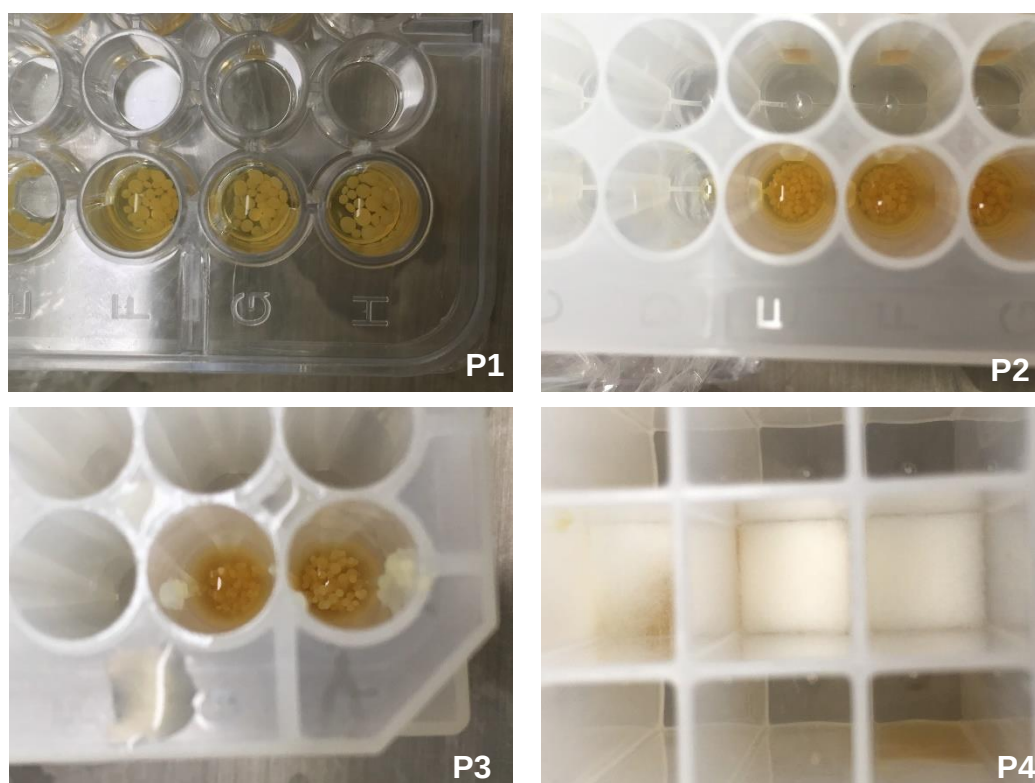
Figura 54- ESI-IT-MS de incubação da *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 em meio de frutose, em destaque o íon m/z 463 referente ao derivado hesperetina glicosilado e íon m/z 499 referente ao derivado glicosilado com aduto de cloro.



4.5.3 Avaliação do crescimento da *C. echinulata* ATCC 9245 em diferentes microbiorreatores

Ensaio foram realizados com diferentes microplacas a fim de se obter a melhor condição para o crescimento dos microrganismos em microbiorreatores. Microplacas de 96 poços com orifícios redondos e capacidade para 300 μ L, 1,5 mL e 2,2 mL foram testadas, além da placa com orifício quadrado. A forma do orifício da placa influenciou no crescimento do microrganismo. Placas com orifícios redondos favoreceram a formação de pellets, já a placa com orifícios quadrados propiciou o crescimento do fungo como massa amorfa (Figura 55).

Figura 55- Morfologia do microrganismo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 após 48 horas de crescimento em diferentes microplacas.



Legenda: P1 – Placa de orifício redondo com capacidade para 300 μ L, P2 - Placa de orifício redondo com capacidade para 1,5 mL, P3 - Placa de orifício redondo com capacidade para 2,2 mL C4 - Placa de orifício quadrado com capacidade para 2,2 mL.

A morfologia do microrganismo no processo de incubação depende de vários fatores como a cepa utilizada, a concentração do inóculo e agitação. O meio de cultura e seus nutrientes e a difusão de oxigênio no meio também

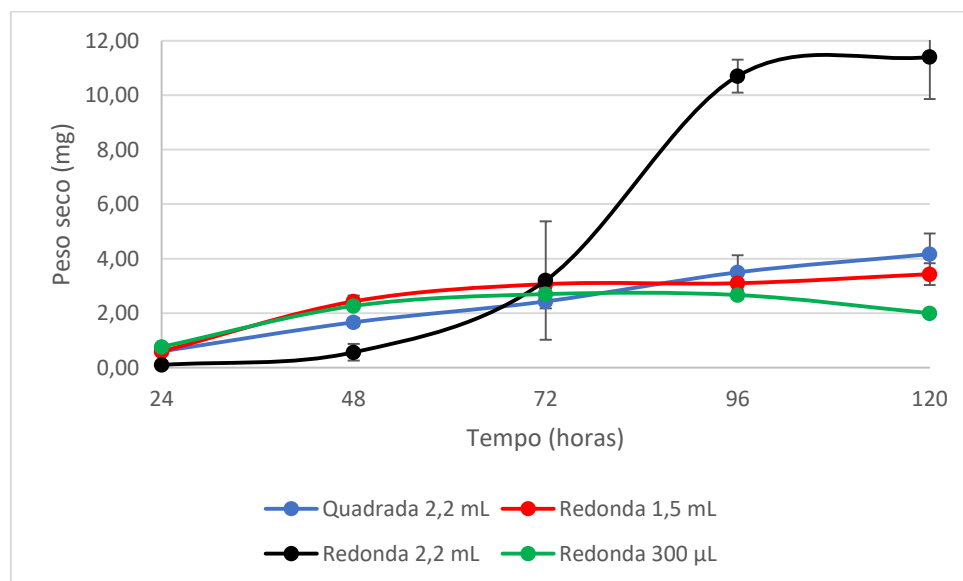
podem alterar a morfologia e a micromorfologia dos pellets. A reologia é outro fator que influencia a morfologia dos fungos. Fungos livremente dispersos causam aumento da viscosidade e atrapalham a transferência de oxigênio (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

Nos resultados apresentados neste trabalho foi possível verificar claramente que a placa de orifício quadrado provocou um crescimento amorfo do microrganismo. Por outro lado, as placas de fundo redondo favoreceram o crescimento de pellets. A morfologia em forma de pellets é preferida em processos de biotransformação devido à baixa viscosidade do meio de cultura. Porém o crescimento em pellets pode limitar a difusão do substrato em diâmetros críticos acarretando a lise das células (POSCH; SPADIUT; HERWIG, 2012). Em microbiorreatores este evento não é observado devido aos pequenos diâmetros dos pellets que são formados.

O crescimento como massa amorfa na placa quadrada pode ser explicado devido à alta tensão de cisalhamento provocada pela agitação neste tipo de placa. Dessa forma os micélios são fragmentados aumentando a quantidade de filamentos livres e consequentemente a viscosidade. Aumento da viscosidade pode gerar insuficiente transferência de massa e limitação de oxigênio, prejudicando o processo de biotransformação (KELLY et al., 2006).

A figura 56 apresenta a curva de crescimento do microrganismo em diferentes microplacas para o fungo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. A curva de crescimento mostrou uma fase logarítmica que ocorreu no período de 24 a 72 horas, com exceção à placa redonda de 2,2 mL na qual a fase logarítmica se prolongou até 96 horas. Em seguida observou-se uma estabilização no crescimento, caracterizando a fase estacionária que se manteve de 96 a 120 horas.

Figura 56- Curva de crescimento da *C. echinulata* ATCC 9245 em meio de glicose incubada em microbiorreator.



Nos últimos anos, microrganismos tem sido amplamente utilizados para biotransformar fármacos e compostos naturais. Analisar a curva de crescimento do microrganismo é importante para se otimizar o processo de biotransformação de xenobióticos. Algumas enzimas são sintetizadas na fase exponencial (fase logarítmica), enquanto alguns metabólitos secundários surgem na fase estacionária (MELGAR et al., 2013). Conhecer o comportamento do microrganismo e quais são seus períodos de fase logarítmica e estacionária pode auxiliar na definição do melhor momento para a adição do substrato a ser biotransformado e quando se finalizar a incubação.

Diante dos resultados obtidos podemos observar que a placa redonda com capacidade de 2,2 mL demonstrou uma maior produção de massa fúngica decorrente do crescimento da *C. echinulata* ATCC 9245 ao final da incubação, sendo selecionada para futuros experimentos. Além disso, o tempo de 48 horas seria o ideal para se adicionar o substrato nas microplacas, momento em que se inicia a fase logarítmica de crescimento e consequentemente há maior produção de enzimas de interesse no processo de biotransformação.

4.6 ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A imobilização dos microrganismos *Cunninghamella echinulata* e *Cunninghamella elegans* foi realizada em esponjas de aço inoxidável em erlenmeyer. Após 48 horas de crescimento foi observada a formação de biofilme aderido à esponja nos quatro microrganismos utilizados (Figura 57). Então, a hesperetina foi adicionada ao meio de incubação e o ensaio foi conduzido até 96 horas, quando o meio líquido foi extraído com acetato de etila e analisado por CCD e ESI-IT-MS.

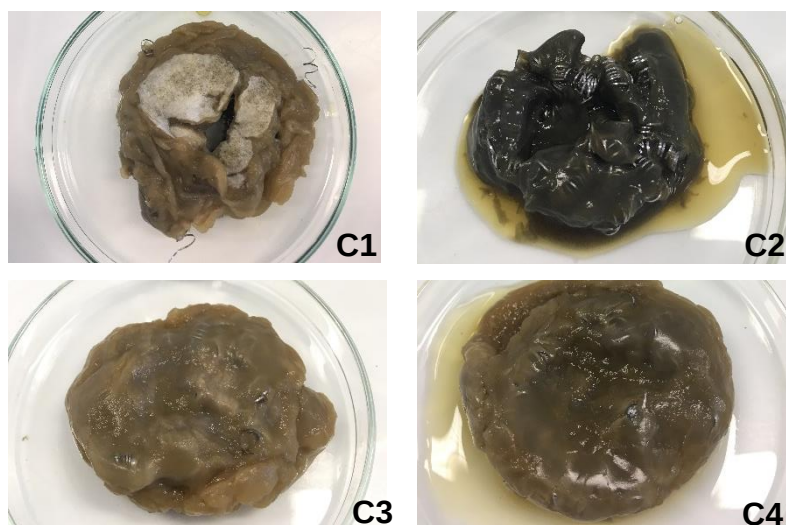
Figura 57- Microrganismos imobilizados em esponja de aço após 48 horas de crescimento.



Legenda: C1 - *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, C2 - *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, C3 - *Cunninghamella elegans* ATCC 26169, C4 - *Cunninghamella elegans* ATCC 36112

A figura 58 mostra os microrganismos aderidos à esponja ao final das 96h de incubação.

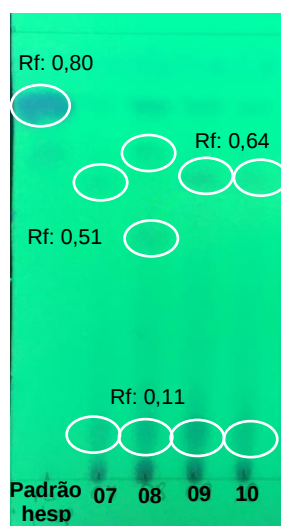
Figura 58- Microrganismos imobilizados em esponja de aço após 96 horas de incubação com a hesperetina.



Legenda: C1 - *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, C2 - *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, C3 - *Cunninghamella elegans* ATCC 26169, C4 - *Cunninghamella elegans* ATCC 36112.

Após extrair e analisar via CCD os sobrenadantes de incubação de cada microrganismo foi observado a formação de derivados da hesperetina como mostra a figura 59.

Figura 59- CCD da extração das aliquotas de 96 horas dos microrganismos.

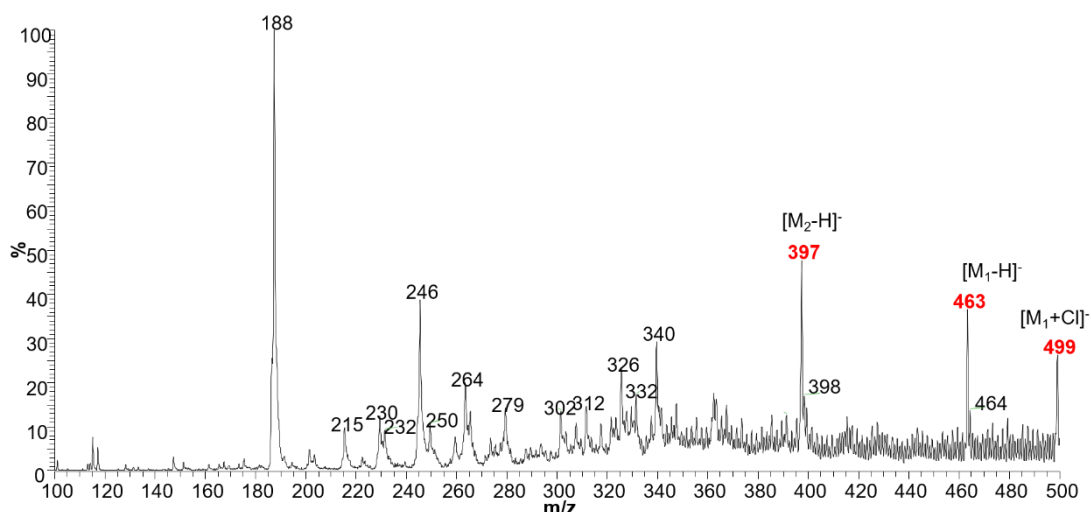


Fase móvel: AcOEt:Hexano (80:20), visualização em luz UV (254 nm).

Legenda: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (07) *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 (08), *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 (09), *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 (10).

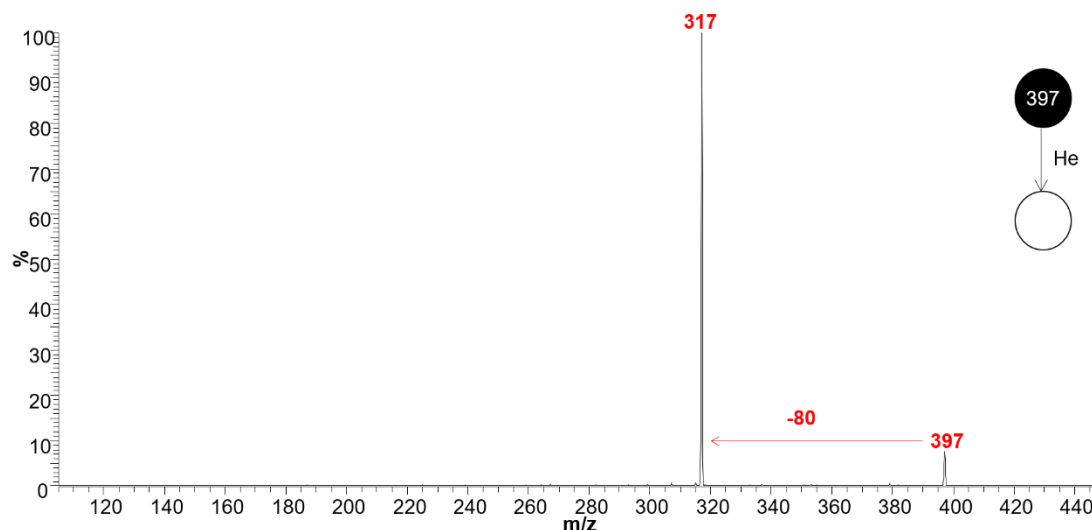
Após extração do meio de incubação foi obtido o produto reacional que analisado por ESI-IT-MS/MS indicou a formação de derivados como demonstrado na figura 60 e 61.

Figura 60- ESI-IT-MS do produto reacional extraído da incubação com microrganismos imobilizados em esponja de aço inoxidável.



O produto reacional da imobilização com as cepas de *Cunninghamella* sp demonstra em análises de ESI/MS a presença do íon molecular m/z 463 compatível com a massa do derivado glicosilado da hesperetina (M1), e do íon m/z 499 referente ao composto glicosilado com aduto de cloro. O íon em m/z 301 após análises de ESI/MS/MS confirma a fragmentação do derivado, correspondendo à perda da porção glicosídica deste. Ademais, o íon m/z 397 também observado na análise de ESI-IT-MS indica um provável composto hidroxilado e sulfatado (M2). A análise de ESI-IT-MS/MS demonstraram a perda da porção sulfato formando o íon m/z 317, que seria a hesperetina adicionada de uma hidroxila (Figura 61).

Figura 61- Análise de ESI-IT-MS/MS do íon m/z 397 no modo negativo do produto reacional extraído da incubação com microrganismos imobilizados em esponja de aço inoxidável.



Algumas vantagens da utilização do biofilme quando comparado às células inteiras seriam a facilidade de separação da biomassa do meio de cultura, a fácil recuperação do produto e a possibilidade de uso contínuo do reator, reduzindo o custo do processo em relação aos sistemas convencionais (WÖLTINGER et al., 2005, ROSCHE et al., 2009). Portanto, as molas de aço inoxidável, apresentaram-se como suporte alternativo viável para imobilização das células fúngicas, sendo capaz de preservar a atividade catalítica dos fungos testados e podendo ser aplicada como um processo vantajoso comparado à utilização células inteiras.

5. Conclusão

5 CONCLUSÃO

Os resultados da triagem dos microrganismos para a biotransformação da hesperetina utilizando a metodologia convencional de incubação (elenmeyers) demonstrou que 12 dos 15 fungos testados foram capazes de produzir derivados sob as condições reacionais utilizadas.

A previsão do metabolismo *in silico* utilizando o programa Meta Print 2D, indicou a possibilidade de reações de glicosilação, glicuronidação, sulfatação, oxidação e redução, sendo as posições 7 e 3' com maior propabilidade de modificações.

As cepas *Mortierella isabellina* NRRL 1757, *Cunninghamea echinulata* ATCC 9244 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram selecionadas para escala semi-preparativa uma vez que produziram a maior variedade de derivados nas incubações por erlenmeyers e analisados via CCD.

A *Mortierella isabellina* NRRL 1757 e *Beauveria bassiana* ATCC 7159 foram capazes de produzir os metabólitos da hesperetina sulfatado e glicuronidado, respectivamente. Os resultados foram obtidos através das análises de ESI-IT-MS e ESI-IT-MS/MS. Tais compostos são relatados da literatura como metabólitos de mamíferos resultantes da biotransformação da hesperetina com potencial atividade farmacológica.

Através das análises por ESI-IT-MS e ESI-IT-MS/MS foi observado que a cepa *Cunninghamea echinulata* ATCC 9244 produziu o derivado glicosilado da hesperetina.

Ao aplicar o uso de microbiorreatores como uma nova metodologia para triagem, se verificou alteração na morfologia da *C. echinulata* ATCC 9245 no crescimento em diferentes microplacas. A placa de orifício quadrado provocou um crescimento amorfo enquanto que as placas de fundo redondo favoreceram o crescimento de pellets. Além disso, de acordo com a curva de crescimento foi possível concluir que a placa redonda com capacidade de 2,2 mL demonstrou uma maior produção de massa fúngica e que o tempo de 48 horas seria o ideal para adição do substrato. Resultados que servirão para aperfeiçoar o processo de biotransformação em microescala.

As quatro cepas de *Cunninghamella* testadas para biotransformação em microplacas foram capazes de produzir o derivado glicosilado.

Alterações nas concentrações de hesperetina e no meio de cultura no processo em microescala foram capazes de modificar a produção de derivados, apesar de não interferir na produção do metabólito majoritário glicosilado.

A cinética reacional analisada por CLAE-EMAR demonstrou que maiores concentrações da hesperetina na incubação em microplacas com *C. echinulata* ATCC 9244 inibem a formação dos derivados, tais como eriodictiol, hesperetina glicosilada, hesperetina sulfatada e hesperetina glicuronidada. Além disso, esta técnica foi considerada apropriada para monitoramento das reações fúngicas em microescala.

Esponjas de aço inoxidável foram eficientes para a imobilização de cepas de *Cunninghamella echinulata* e *Cunninghamella elegans*, estando o biofilme já formado em 48 horas. Assim, este suporte pode ser considerado viável para aplicação da imobilização de células inteiras em processos de biotransformação fúngica. Análises de ESI-IT-MS e ESI-IT-MS/MS indicaram a produção de um derivado da hesperetina glicosilado e outro hidroxilado e sulfatado.

6. Referências

6 REFERÊNCIAS

- ABEL, A. M. et al. The synthesis of buprenorphine intermediates by regioselective microbial N-and O-demethylation reactions using *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 5, p. 743–748, 2003.
- ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review. **Current medicinal chemistry**, v. 6, n. 5, p. 359–374, 1999.
- ABOURASHED, E. A.; MIKELL, J. R.; KHAN, I. A. Bioconversion of silybin to phase I and II microbial metabolites with retained antioxidant activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 9, p. 2784–8, 2012.
- AL-HORANI, R. A.; DESAI, U. R. Chemical sulfation of small molecules—advances and challenges. **Tetrahedron**, v. 66, n. 16, p. 2907, 2010.
- 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. 5955–5963, 2013.
- AMADIO, J.; MURPHY, C. D. Biotransformation of fluorobiphenyl by *Cunninghamella elegans*. p. 345–351, 2010.
- ARANGANATHAN, S.; NALINI, N. Efficacy of the potential chemopreventive agent, hesperetin (citrus flavanone), on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 10, p. 2594–2600, 2009.
- ARRUDA, E. L. et al. A single-step O-glycosylation of azidothymidine in bioreactor catalysed by filamentous fungi. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 39, p. 4392–4394, 2016.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella*--a microbial model for drug metabolism studies--a review. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 16–29, 2009a.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16–29, 2009b.
- AZERAD, R. **Microbial Models for Drug Metabolism - Biotransformations**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999.
- BARBARA, A. et al. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 60, n. 1, p. 34–40, 1996.
- BARTMAŃSKA, A.; TRONINA, T.; HUSZCZA, E. Transformation of 8-

prenylnaringenin by *Absidia coerulea* and *Beauveria bassiana*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 20, p. 6451–6453, 2012.

BEDINI, E. et al. A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate polymers**, v. 174, p. 1224–1239, 2017.

BHATTACHARYA, S. S.; YADAV, J. S. **Microbial P450 Enzymes in Bioremediation and Drug Discovery: Emerging Potentials and Challenges** *Current Protein and Peptide Science*, 2018.

BOCK, K. W. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal–plant arms-race and co-evolution. **Biochemical Pharmacology**, v. 99, p. 11–17, 2016.

BRAND, W. et al. Phase II Metabolism of Hesperetin by Individual UDP-Glucuronosyltransferases and Sulfotransferases and Rat and Human Tissue Samples. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 4, p. 617 LP-625, 2010.

BREINHOLT, V. M. et al. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 5, p. 609–616, 2002.

BRETT, G. M. et al. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 664–675, 2008.

BUCHANAN, G. O.; REESE, P. B. Biotransformation of diterpenes and diterpene derivatives by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Phytochemistry**, v. 56, n. 2, p. 141–151, 2001.

CANFORA, L. et al. Development of a method for detection and quantification of *B. brongniartii* and *B. bassiana* in soil. **Scientific reports**, v. 6, p. 22933, 2016.

CAO, H. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 214–223, 2015.

CARLSSON, L. et al. Use of historic metabolic biotransformation data as a means of anticipating metabolic sites using MetaPrint2D and Bioclipse. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 362, 2010.

CHANET, A. et al. Flavanone metabolites decrease monocyte adhesion to TNF- α -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 587–598, 2013.

CHEN, Y.-C.; SHEN, S.-C.; LIN, H.-Y. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 1139–1150, 2003.

CHOUDHURY, R. et al. Interactions of the Flavonoid Naringenin in the

Gastrointestinal Tract and the Influence of Glycosylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, n. 2, p. 410–415, 1999.

CORDEIRO, K. C. F. A. et al. Biosynthesis and antioxidant activity of 4NRC β -glycoside. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 48, p. 6656–6659, 2013.

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.

COUTO, S. R. et al. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 1, p. 67–72, 2004.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DE CARVALHO, C. C. C. R. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 75–83, 2011.

DE CARVALHO, C.; DA FONSECA, M. M. R. Bacterial whole cell biotransformations: in vivo reactions under in vitro conditions. **Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol**, v. 1, p. 32–39, 2007.

DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K.; GAIKAR, V. G. **Biotransformations and bioprocesses**. [s.l.] Marcel Dekker, 2004.

DOCAMPO, M. et al. Glucuronidated flavonoids in neurological protection: Structural analysis and approaches for chemical and biological synthesis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 35, p. 7607–7623, 2017.

DOEHLEMANN, G.; MOLITOR, F.; HAHN, M. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Fungal genetics and biology**, v. 42, n. 7, p. 601–610, 2005.

ERLUND, I. et al. Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2, p. 235–241, 2001.

FELGINES, C. et al. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 6, p. G1148–G1154, 2000.

GALLO, M. et al. Novel microbial immobilization techniques. In: **Novel food fermentation technologies**. [s.l.] Springer, 2016. p. 35–55.

GARG, A. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655–669, 2001.

GAUR, R. et al. Bioreactors. In: SINGH, R. L. (Ed.). **Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future**.

Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 233–272.

GIMENEZ-BASTIDA, J. A. et al. Hesperetin and its sulfate and glucuronide metabolites inhibit TNF-[small alpha] induced human aortic endothelial cell migration and decrease plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. **Food & Function**, v. 7, n. 1, p. 118–126, 2016.

GONG, Y. et al. Inhibitory effect of hesperetin on α -glucosidase: Molecular dynamics simulation integrating inhibition kinetics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, n. Supplement C, p. 32–39, 2017.

GONZÁLEZ-BARRIO, R. et al. Production of Bioavailable Flavonoid Glucosides in Fruit Juices and Green Tea by Use of Fungal α -L-Rhamnosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6136–6142, 2004.

GRIFFITHS, D. A.; BEST, D. J.; JEZEQUEL, S. G. The screening of selected microorganisms for use as models of mammalian drug metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 373–381, 1991.

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

GURRAM, S. P. et al. Biotransformation of Albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: Influence of Incubation Time, Media, Vitamins and Solvents. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 205–215, 2009.

HACKETT, A. M. et al. The biliary excretion of flavanones in the rat. **Xenobiotica**, v. 9, n. 8, p. 491–501, 1979.

HAYTOWITZ, D. B.; WU, X.; BHAGWAT, S. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3.3. 2018.

HE, D.-X. et al. A new agent developed by biotransformation of polyphyllin VII inhibits chemoresistance in breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 31814–31824, 2016.

HE, P. et al. Eriodictyol Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Cognitive Impairments via the Inhibition of NF- κ B in Male C57BL/6J Mice and BV2 Microglial Cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 39, p. 10205–10214, 2018.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

HEMMERICH, J. et al. Microbioreactor systems for accelerated bioprocess development. **Biotechnology journal**, 2017.

HERATH, W.; KHAN, I. A. Microbial metabolism. Part 13.1 Metabolites of hesperetin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 19, p. 5784–5786, 2011.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-biological interactions**, v. 139, n. 1, p. 1–21, 2002.

HOLLMAN, P. C. H. et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, v. 31, n. 6, p. 569–573, 1999.

HUANG, G. et al. **Glycosylation and Activities of Natural Products** Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2016.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011.

HYUNG KO, J.; GYU KIM, B.; JOONG-HOON, A. Glycosylation of flavonoids with a glycosyltransferase from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 2, p. 263–268, 2006.

IBRAHIM, A.-R. S. Sulfation of naringenin by *Cunninghamella elegans*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 2, p. 209–212, 2000.

IBRAHIM, A.-R. S. et al. O-Demethylation and Sulfation of 7-Methoxylated Flavanones by *Cunninghamella elegans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 203–206, 2003.

IBRAHIM, A.-R. S. Biotransformation of Chrysin and Apigenin by *Cunninghamella elegans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 6, p. 671–673, 2005.

IKUSHIRO, S. et al. Biosynthesis of Drug Glucuronide Metabolites in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 2274–2282, 2016.

JANG, I.-S.; KIM, D.-H. Purification and Characterization of α -L-Rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a Human Intestinal Bacterium. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 12, p. 1546–1549, 1996.

JAYARAMAN, R. et al. Antihyperglycemic effect of hesperetin, a citrus flavonoid, extenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 98–106, 2018.

JUNTER, G.-A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 8, p. 633–658, 2004.

JUSTESEN, U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 2, p. 369–379, 2000.

KANAZE, F. I. et al. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones

hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. **European Journal Of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 472, 2006.

KELLY, S. et al. Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2113–2117, 2006.

KHETANI, S. R.; BHATIA, S. N. Microscale culture of human liver cells for drug development. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 120, 2007.

KIM, J. Y. et al. Hesperetin: A Potent Antioxidant Against Peroxynitrite. **Free Radical Research**, v. 38, n. 7, p. 761–769, 2004.

KIRK, T. V; SZITA, N. Oxygen transfer characteristics of miniaturized bioreactor systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 1005–1019, 2013.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 560–568, 2002.

KREN, V.; THIEM, J. Glycosylation employing bio-systems: from enzymes to whole cells. **Chemical Society Reviews**, v. 26, n. 6, p. 463–473, 1997.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 16, 2013.

KWON, E.-Y. et al. Elucidation of anti-obesity and anti-diabetic function of eriodictyol in diet-induced obese mice. **Clinical Nutrition**, v. 37, p. S146, 2018.

KWON, Y. S. et al. Modulation of suppressive activity of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by glycosidation of flavonoids. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 7, p. 751, 2004.

LEE, Y.-S. et al. Enzymatic bioconversion of citrus hesperidin by *Aspergillus sojae* naringinase: Enhanced solubility of hesperetin-7-O-glucoside with in vitro inhibition of human intestinal maltase, HMG-CoA reductase, and growth of *Helicobacter pylori*. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2253–2259, 2012.

LIPMANN, F. Biological Sulfate Activation and Transfer. **Science**, v. 128, n. 3324, p. 575 LP-580, 1958.

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

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D490–D495, 2014.

LORD, J. C. *Beauveria bassiana* infection of eggs of stored-product beetles. **Entomological research**, v. 39, n. 2, p. 155–157, 2009.

LU, X. et al. The intra-and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. **Microbial Cell**

Factories, v. 9, n. 1, p. 23, 2010.

LUO, J. et al. Biotransformation of bavachinin by three fungal cell cultures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 191–196, 2014.

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. 611–3, 2012.

LV, P. et al. Eriodictyol inhibits high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal ganglial cells. **Journal of cellular biochemistry**, 2018.

MA, B. et al. Efficient bioconversion of quercetin into a novel glycoside by *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 24–26, 2013.

MA, S. et al. Microbial transformation of prenylflavonoids from *Psoralea corylifolia* by using *Cunninghamella blakesleeana* and *C. elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 8–15, 2015.

MAATOOQ, G. T.; ROSAZZA, J. P. N. Metabolism of daidzein by *Nocardia* species NRRL 5646 and *Mortierella isabellina* ATCC 38063. v. 66, p. 1007–1011, 2005.

MACKENZIE, P. I. et al. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 15, n. 10, 2005.

MALTESE, F. et al. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 575–579, 2009.

MARKO, S. et al. The response of filamentous fungus *Rhizopus nigricans* to flavonoids. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 433–441, 2011.

MARVALIN, C.; AZERAD, R. Microbial glucuronidation of polyphenols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, n. 1, p. 43–52, 2011.

MATSUMOTO, H. et al. Identification and Quantification of the Conjugated Metabolites Derived from Orally Administered Hesperidin in Rat Plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6653–6659, 2004.

MELGAR, G. Z. et al. Growth Curves of Filamentous Fungi for Utilization in Biocatalytic Reduction of Cyclohexanones. **Global Journal of Science Frontier Research; Vol 13, No 5-B (2013): The Global Journal of Science Frontier Research**, 2013.

MIKELL, J. R.; KHAN, I. A. Bioconversion of 7-Hydroxyflavanone: Isolation, Characterization and Bioactivity Evaluation of Twenty-One Phase I and Phase II Microbial Metabolites. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 9, p. 1139–1145, 2012.

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.

MULLEN, W. et al. Bioavailability and Metabolism of Orange Juice Flavanones in Humans: Impact of a Full-Fat Yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 23, p. 11157–11164, 2008.

MURPHY, C. D. Drug metabolism in microorganisms. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 1, p. 19–28, 2015.

NAGHDI, M. et al. Biotransformation of carbamazepine by laccase-mediator system: Kinetics, by-products and toxicity assessment. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 147–154, 2018.

NENAAH, G. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 1255–1262, 2013.

NIELSEN, I. L. F. et al. Bioavailability Is Improved by Enzymatic Modification of the Citrus Flavonoid Hesperidin in Humans: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 2, p. 404–408, 2006.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications1–3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PARSHIKOV, I. A. et al. Transformation of cinoxacin by *Beauveria bassiana*. **FEMS microbiology letters**, v. 214, n. 1, p. 133–136, 2002.

PERVAIZ, I. et al. Microbial biotransformation: a tool for drug designing. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 437–450, 2013.

PISKA, K. et al. **Cunninghamella Biotransformation - Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process** *Current Drug Metabolism*, 2016.

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2013.

POSCH, A. E.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi. **Fungal genetics and biology**, v. 49, n. 7, p. 499–510, 2012.

PRASAD, G. S. et al. Biotransformation of albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: effect of carbon and nitrogen source. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2055–2059, 2008.

PRASAD, G. S. et al. Biotransformation of meloxicam by *Cunninghamella*

blakesleeana: significance of carbon and nitrogen source. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n. 1, p. 82–87, 2011.

QUINN, L. et al. Production of drug metabolites by immobilised *Cunninghamella elegans*: from screening to scale up. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 799–806, 2015.

QUINTIERI, L. et al. Flavonoids diosmetin and hesperetin are potent inhibitors of cytochrome P450 2C9-mediated drug metabolism in vitro. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 25, n. 5, p. 466–476, 2010.

R. CARVALHO, C. C. C. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 250–263, 2017.

RAO, K. V; WEISNER, N. T. Microbial Transformation of Quercetin by *Bacillus cereus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 42, n. 3, p. 450–2, 1981.

RAO, Y. K. et al. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 1, p. 57–66, 2006.

RICHES, Z. et al. Quantitative Evaluation of the Expression and Activity of Five Major Sulfotransferases (SULTs) in Human Tissues: The SULT “Pie”. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 11, p. 2255–2261, 2009.

ROSCHE, B. et al. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 636–643, 2009.

ROZZELL, J. D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 2253–2261, 1999.

SARMOKO et al. Increasing sensitivity of MCF-7/DOX cells towards doxorubicin by hesperetin through suppression of p-glycoprotein expression. **INDONESIAN JOURNAL OF PHARMACY; Vol 25 No 2, 2014**, 2014.

SCHREWE, M. et al. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6346–6377, 2013.

SEEBERGER, P. H. et al. **Chemical and Enzymatic Synthesis of Glycans and Glycoconjugates**. 2nd. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor (NY), 2009.

SHI, Y.-Q. et al. Microbial biotransformation of kurarinone by *Cunninghamella echinulata* AS 3.3400. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 11, p. 1002–1007, 2012.

SHIMODA, K.; HAMADA, H.; HAMADA, H. Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1135–1140, 2008.

SINGH, B. et al. Structure-guided discovery of 1, 3, 5-triazine–pyrazole conjugates as antibacterial and antibiofilm agent against pathogens causing human diseases with favorable metabolic fate. **Bioorganic & medicinal**

chemistry letters, v. 24, n. 15, p. 3321–3325, 2014.

SMITH, D. A. **Discovery and ADMET: Where Are We Now** **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2011.

SORDON, S.; POPŁOŃSKI, J.; HUSZCZA, E. Microbial Glycosylation of Flavonoids. **Polish journal of microbiology**, v. 65, n. 2, p. 137–151, 2016.

SOUZA, P. L. M. et al. One step N-glycosylation by filamentous fungi biofilm in bioreactor of a new phosphodiesterase-3 inhibitor tetrazole. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 13, p. 3177–3181, 2016.

SRIDHAR, J. et al. Insights on cytochrome p450 enzymes and inhibitors obtained through QSAR studies. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9283–9305, 2012.

SRIDHAR, V. et al. Evaluation of First-Pass Cytochrome P4503A (CYP3A) and P-glycoprotein Activities Using Felodipine and Hesperetin in Combination in Wistar Rats and Everted Rat Gut Sacs in Vitro. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 5, p. 699–705, 2014.

STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 237–256, 2000.

SUDHAKARAN, S.; ARCHANA, T. M.; AGUILAR, C. N. Biotransformation Enzymes BT - Bioresources and Bioprocess in Biotechnology: Volume 2: Exploring Potential Biomolecules. In: SUGATHAN, S.; PRADEEP, N. S.; ABDULHAMEED, S. (Eds.). . Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 129–150.

SUIKO, M. et al. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 63–72, 2017.

TRACY, T. S. Atypical enzyme kinetics: their effect on in vitro-in vivo pharmacokinetic predictions and drug interactions. **Current drug metabolism**, v. 4, n. 5, p. 341–346, 2003.

TRONINA, T. et al. Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 7, p. 1957–1960, 2013.

UWE, F.; L., K. A. The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions? **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 4, p. 365–373, 1995.

V. STACHULSKI, A.; V. JENKINS, G. The synthesis of O-glucuronides. **Natural Product Reports**, v. 15, n. 2, p. 173–186, 1998.

VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 2997–3006, 2018.

VENISETTY, R. K.; CIDDI, V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 153–67, 2003.

WALLE, U. K.; WALLE, T. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids—structural requirements. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 5, p. 564–569, 2002.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12–23, 2018.

WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 949, 2011.

WILFRIED, S.; THILO, F.; MATTHIAS, W. Terpene glucoside production: Improved biocatalytic processes using glycosyltransferases. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 4, p. 376–386, 2015.

WÖLTINGER, J. et al. Membrane reactors at Degussa. In: **Technology Transfer in Biotechnology**. [s.l.] Springer, 2005. p. 289–316.

WONG, Y. C. et al. Structure–activity relationships of the glucuronidation of flavonoids by human glucuronosyltransferases. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 5, n. 11, p. 1399–1419, 2009.

XIAO, J.; HOGGER, P. Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes. **Current drug metabolism**, v. 14, n. 4, p. 381–391, 2013.

XIAO, J.; MUZASHVILI, T. S.; GEORGIEV, M. I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1145–1156, 2014.

XIE, K. et al. Two Novel Fungal Phenolic UDP Glycosyltransferases from *Absidia coerulea* and *Rhizopus japonicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 8, p. e03103-16, 2017.

XU, J.-Q. et al. Biotransformation of quercetin by *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 8, p. 615–624, 2017.

YAMAMOTO, M. et al. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3[prime or minute]-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities. **Food & Function**, v. 4, n. 9, p. 1346–1351, 2013.

ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial transformation of amino- and hydroxyanthraquinones by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Journal of natural products**, v. 69, n. 10, p. 1525–1527, 2006.

ZHAN, J.; LESLIE GUNATILAKA, A. A. Selective 4'-O-methylglycosylation of

the pentahydroxy-flavonoid quercetin by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 5, p. 396–399, 2006.

ZHANG, D. et al. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella* : *elegans* for the metabolism of xenobiotics. v. 38, 1996.

ZHANG, S. et al. CYP52X1, representing a new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc-M111, 2012.

ZHU, S. et al. Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM-03986, 2014.

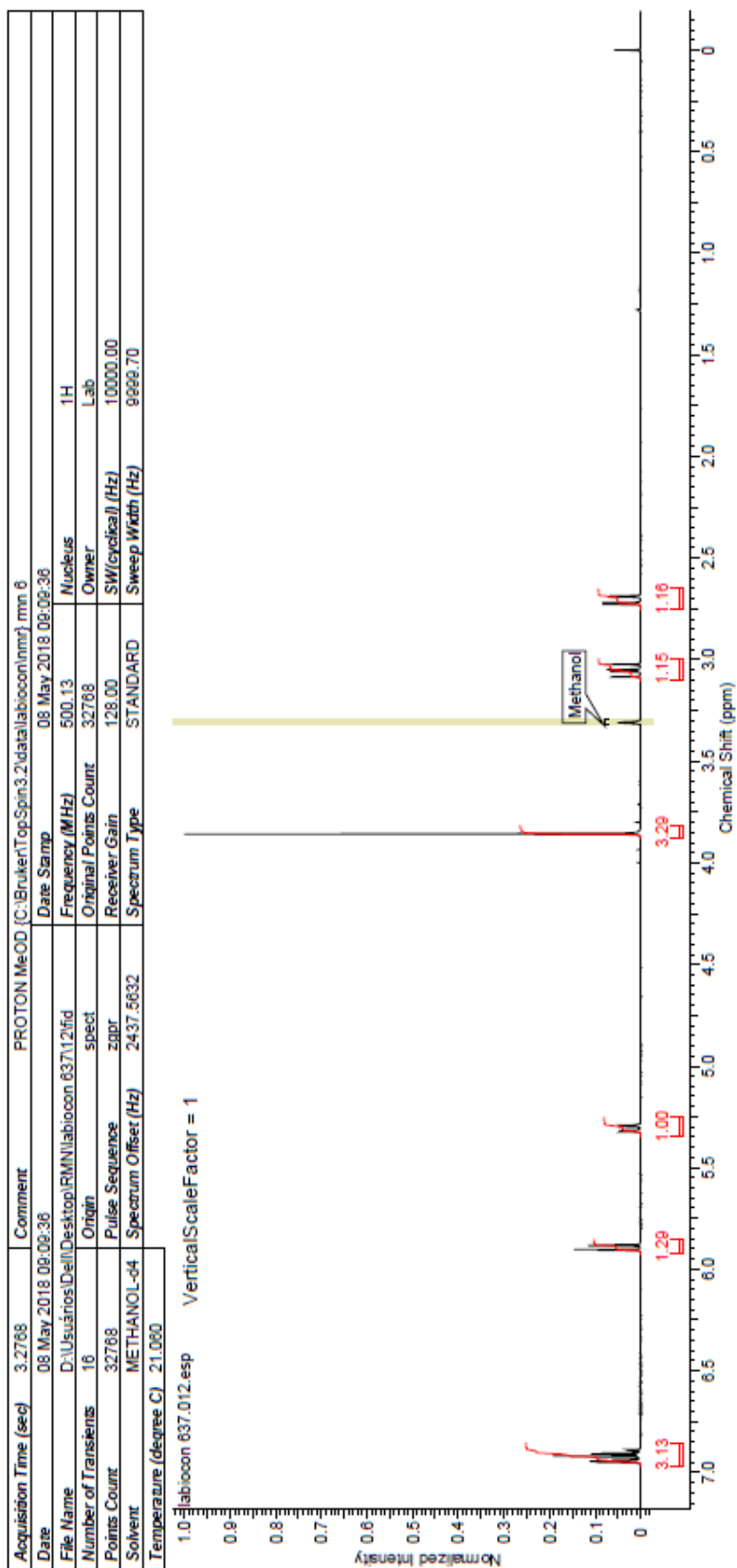
ZHU, Y. Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. In: **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 373–396.

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.

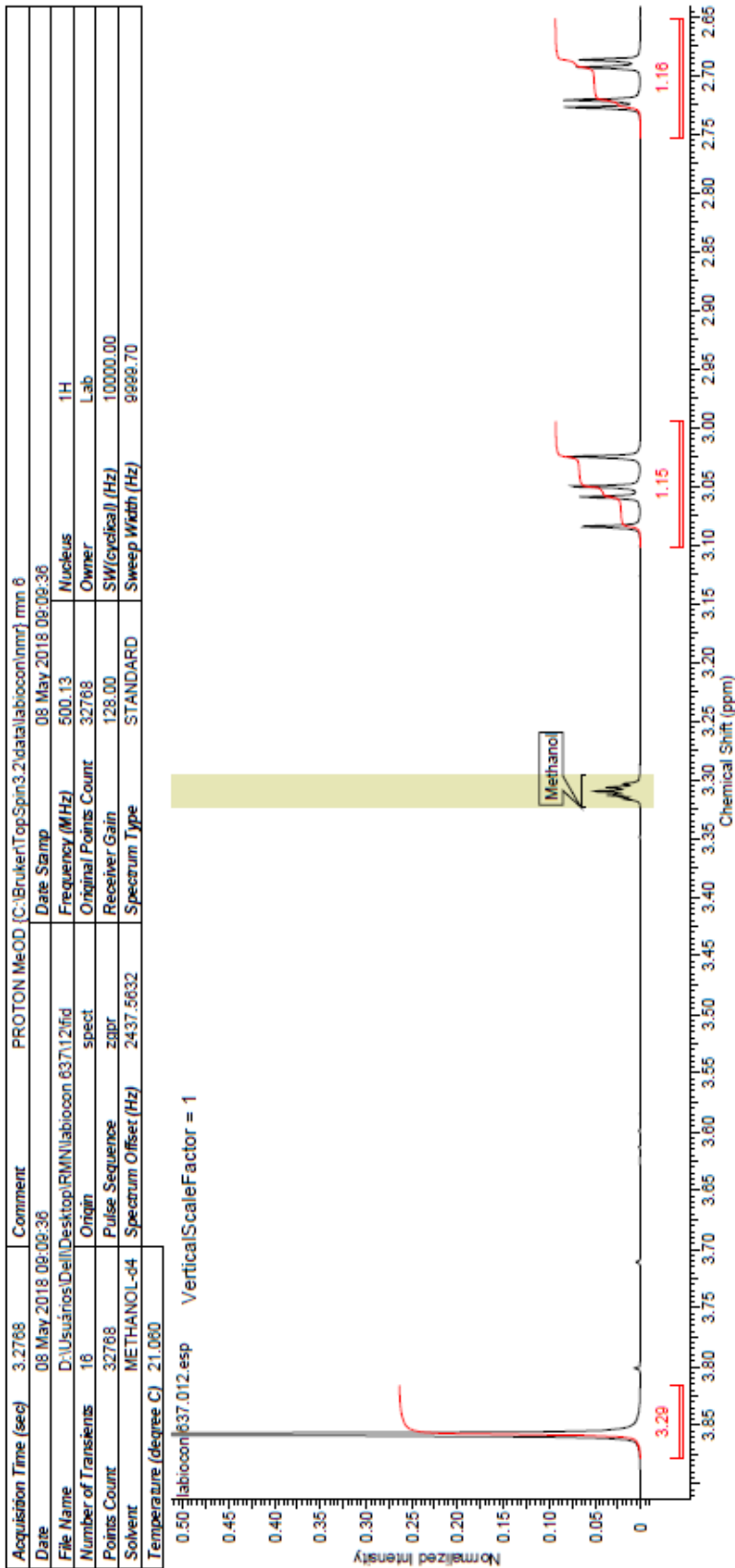
Anexos

ANEXOS

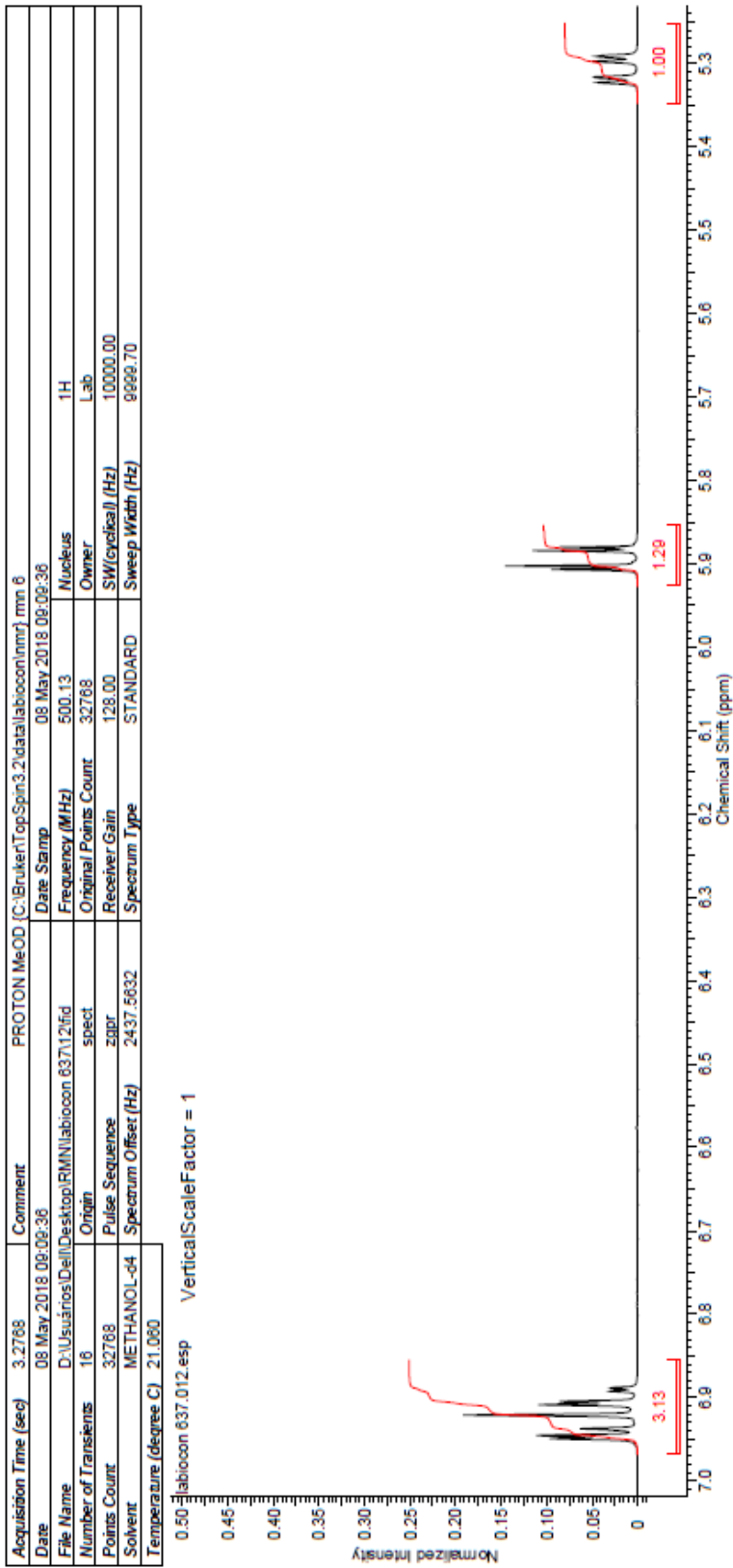
ANEXO A- Espectro integrado de ^1H RMN da hesperetina obtido em CD_3OD .
Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



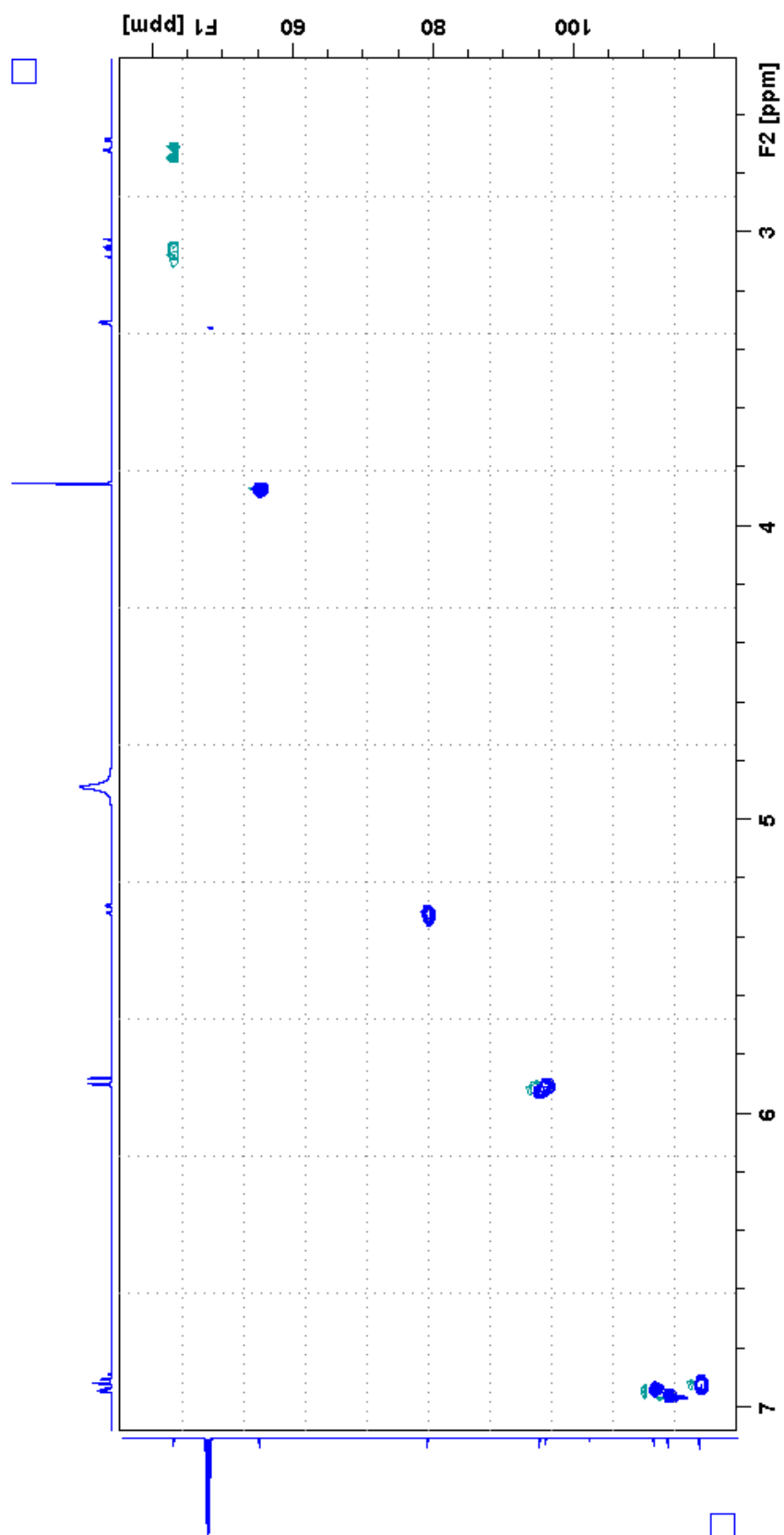
ANEXO B- Expansão na região de 2.6 a 3.9 ppm do espectro integrado de ¹H RMN da hesperetina obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



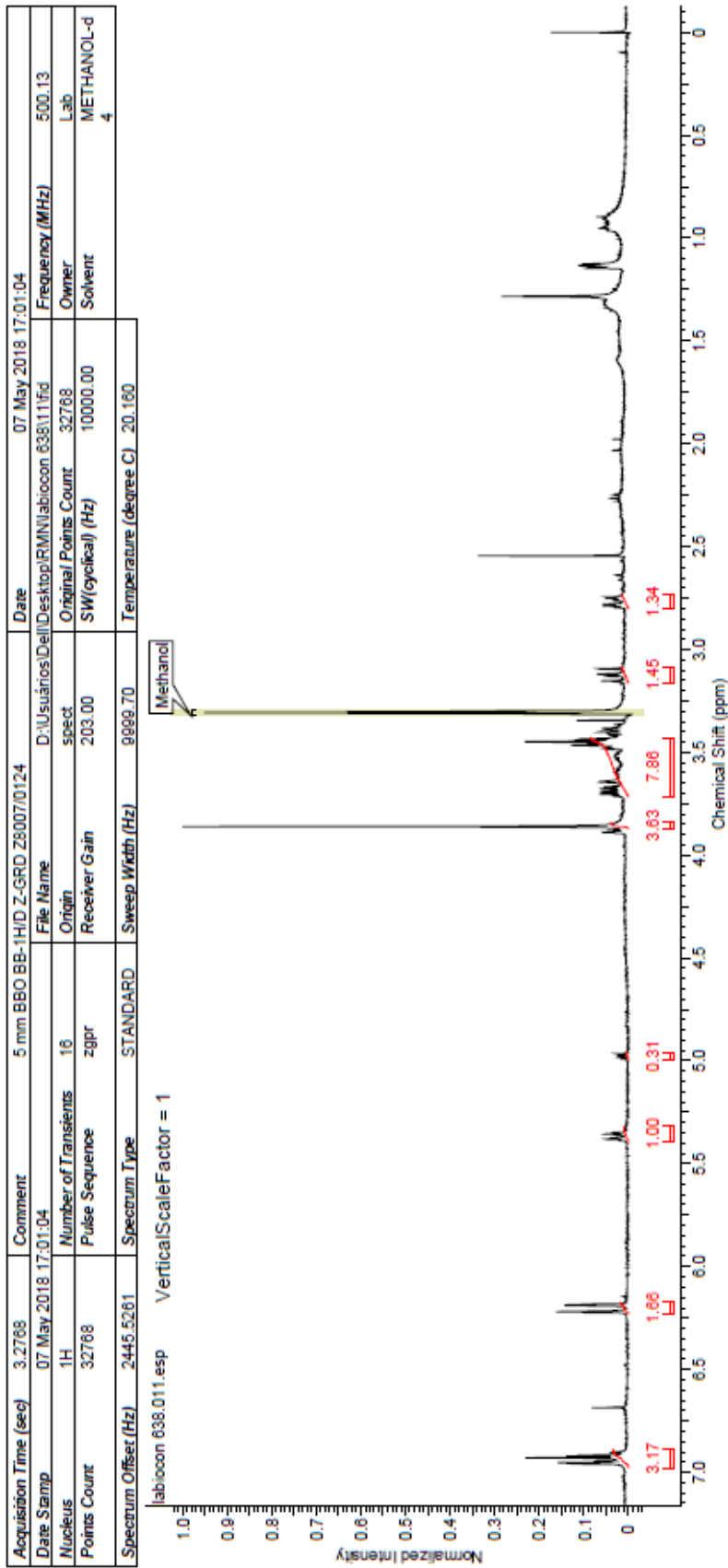
ANEXO C- Expansão na região de 5.3 a 7.0 ppm do espectro integrado de ¹H RMN da hesperetina obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



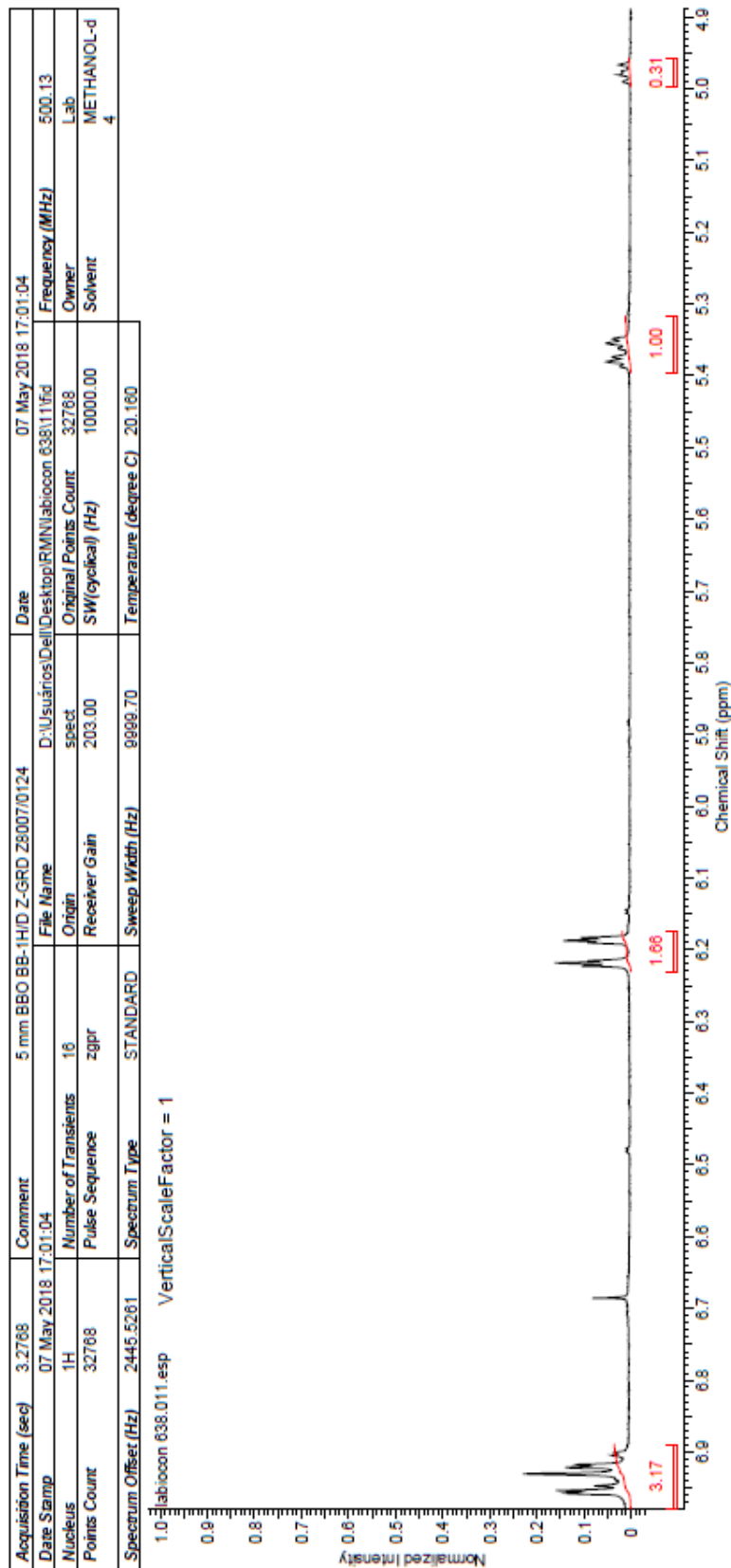
ANEXO D- Espectro integrado HSQC da hesperetina obtido em CD₃OD.
Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



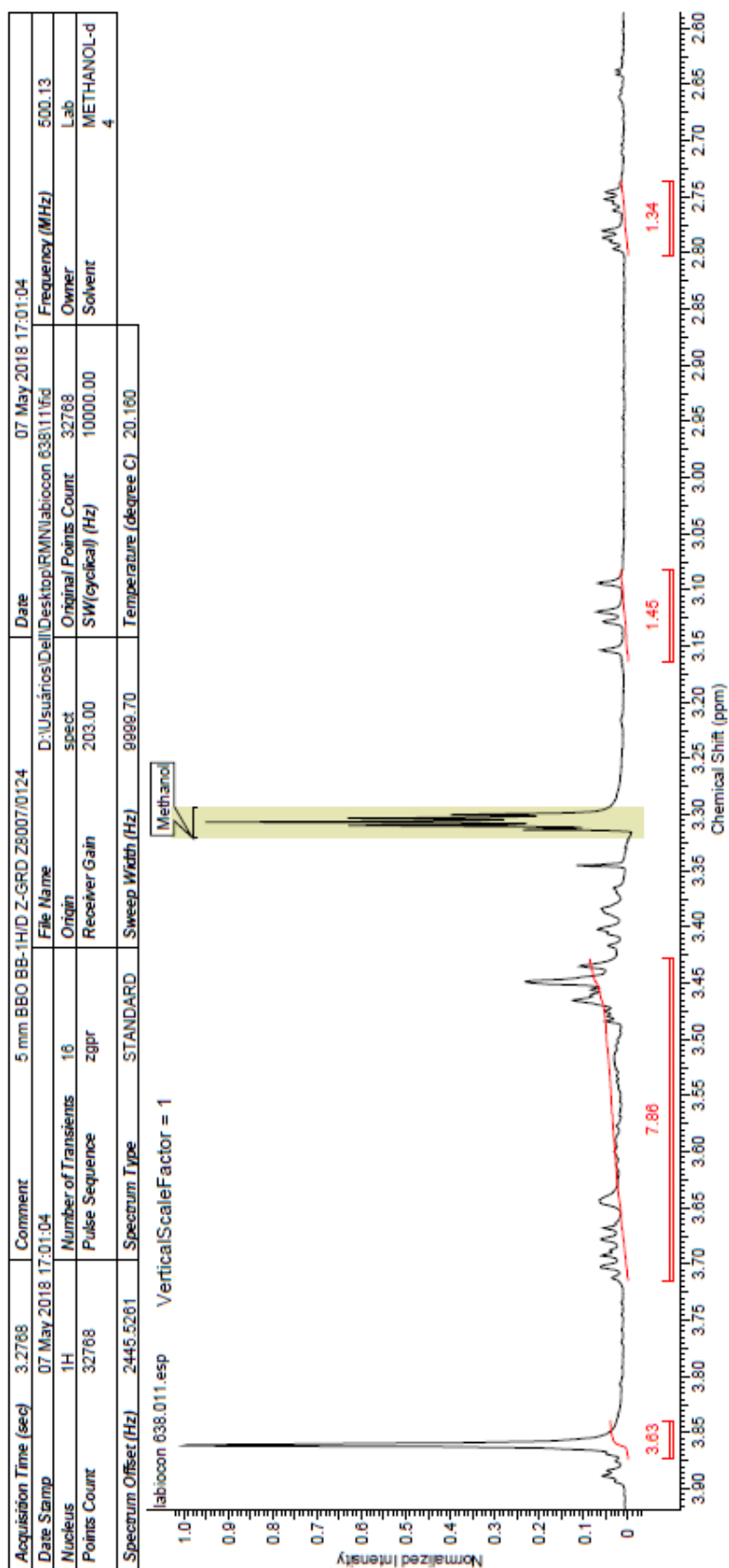
ANEXO E- Espectro integrado de ¹H RMN do derivado glicosilado obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



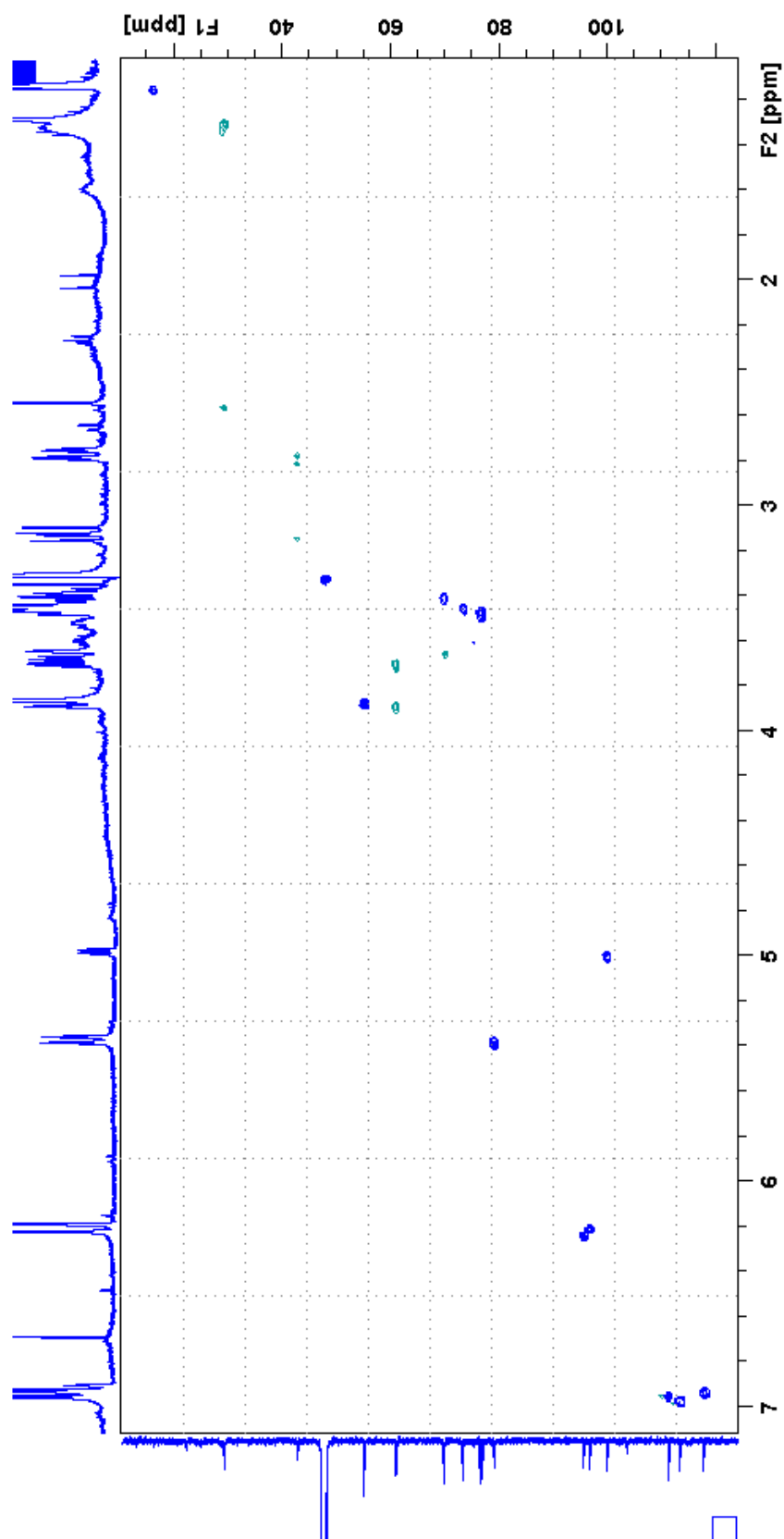
ANEXO F- Expansão na região de 4.9 a 7.0 ppm do espectro integrado de ¹H RMN do derivado glicosilado obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



ANEXO G- Expansão na região de 2.6 a 3.9 ppm do espectro integrado de ^1H RMN do derivado glicosilado obtido em CD_3OD . Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



ANEXO H- Espectro integrado de HSQC do derivado glicosilado obtido em CD_3OD . Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



ANEXO I - Espectro integrado de HMBC do derivado glicosilado obtido em CD_3OD . Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).

