



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

**PAULA LETÍCIA DE MELO SOUZA**

---

---

**Biofilmes de *Cunninghamella* e sua versatilidade como  
biocatalisador em estudos de quimiodiversidade,  
metabolismo e biorremediação**

---

---

**Goiânia**  
**2019**

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:

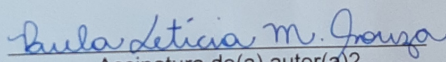
Nome completo do autor: Paula Letícia de Melo Souza

Título do trabalho: Biofilmes de *Cunninghamella* e sua versatilidade como biocatalisador em estudos de quimiodiversidade, metabolismo e biorremediação

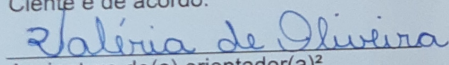
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO

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)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 06 / 08 / 19

1 Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. 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.

Versão atualizada em setembro de 2017.

**PAULA LETÍCIA DE MELO SOUZA**

---

---

**Biofilmes de *Cunninghamella* e sua versatilidade como biocatalisador em estudos de quimiodiversidade, metabolismo e biorremediação**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Doutora em Inovação Farmacêutica

Orientador: Dra. Valéria de Oliveira

Co-orientador: Dr. Cormac Declan Murphy

**Goiânia**

**2019**

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

Souza, Paula Leticia de Melo  
Biofilmes de Cunninghamella e sua versatilidade como biocatalisador em estudos de quimiodiversidade, metabolismo e biorremediação [manuscrito] / Paula Leticia de Melo Souza. - 2019. ccxxi, 221 f.

Orientador: Profa. Dra. Valéria de Oliveira; co-orientador Dr. Cormac Declan Murphy.

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. Cunninghamella. 2. quimiodiversidade. 3. metabolismo. 4. biorremediação. I. Oliveira, Valéria de, orient. II. Título.



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás  
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica  
UFG/UFAM/UNIFAP/UFPA



**ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE**

**Aluno (a):** Paula Leticia de Melo Souza

**Orientador (a):** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valeria Oliveira

**Título da Dissertação:** "Biofilmes de *Cunninghamella* e sua versatilidade como biocatalisador em estudos de quimiodiversidade, metabolismo e biorremediação".

**Data:** 01 de julho de 2019

**Horário:** 08:00 horas

**Local:** Miniáudatório da Faculdade de Farmácia/UFG

**Sugestões\*:**

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

---

---

---

---

**Parecer da Banca Examinadora**

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Presidente - Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Valeria Oliveira (FF/UFG)	Aprovado	Valeria de Oliveira
Titular - Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Carla Rosane Mendanha da Cunha (UEG)	Aprovada	Carla Rosane M. Cunha
Titular - Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Evilanna Lima Arruda (UNIRV)	Aprovada	Evilanna L. Arruda
Titular - Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Francine Pazini (UFMT)	Aprovada	Francine Pazini
Titular - Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Kelly Carolina Frauzino Araújo Cordeiro (ITEP)	Aprovada	Kelly Carolina A. Cordeiro
Suplente - Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Eula Maria de Melo Barcelos Costa (FF/UFG)		
Suplente - Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Mariangela Fontes Santiago (FF/UFG)		
<b>Parecer Final</b>	<b>Aprovado/Reprovado</b>	
	Aprovado	



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

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. José Realino de Paula

**Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

**Goiânia**

**2019**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA**

**Aluna:** Paula Letícia de Melo Souza

**Orientadora:** Dra. Valéria de Oliveira

**Co-Orientador:** Dr. Cormac Declan Murphy

**Valéria de Oliveira/Presidente**

Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,  
FF/UFG

**Carla Rosane Mendanha da Cunha/Membro Titular**

Professora da Universidade Estadual de Goiás, UEG

**Evilanna Lima Arruda/Membro Titular**

Professora da Universidade de Rio Verde, UniRV

**Francine Pazini/Membro Titular**

Professora Adjunta da Universidade Federal do Mato Grosso, UFMT

**Kelly Carolina Frauzino de Araújo Cordeiro/Membro Titular**

Perita Criminal na Seção de Toxicologia do Instituto de Criminalística Leonardo  
Rodrigues, Goiânia-GO

**Eula Maria de Melo Barcelos Costa/Membro Suplente**

Professora Associada IV da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,  
FF/UFG

**Mariangela Fontes Santiago/Membro Suplente**

Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,  
FF/UFG

Data: 01/07/2019

“Estou entre aqueles que acreditam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório [...] é também uma criança colocada frente a um fenômeno natural que a impressiona tanto quanto um conto de fadas”.

Marie Curie

## **AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEDGEMENTS**

Aos meus pais.

À Thaís, pela amizade.

À professora Valéria de Oliveira e aos amigos do Laboratório de Bioconversão.

*To Professor Cormac and my lab partners.*

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica.

Aos professores e secretários da Faculdade de Farmácia – UFG.

*To professors from University College Dublin.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>28</b>
1.1 <i>Cunninghamella</i> .....	<b>28</b>
1.2 SISTEMA ENZIMÁTICO DO CITOCROMO P450 (CYP450) .....	<b>31</b>
<b>1.2.1 Reações de hidroxilação</b> .....	<b>35</b>
<b>1.2.2 Reações de redução</b> .....	<b>44</b>
1.3 REAÇÕES DE CONJUGAÇÃO.....	<b>46</b>
<b>1.3.1 Glicosiltransferases e reações de glicosilação</b> .....	<b>46</b>
<b>1.3.2 Metiltransferases e reações de metilação</b> .....	<b>48</b>
<b>1.3.3 N-acetiltransferases e reações de N-acetilação</b> .....	<b>50</b>
1.4 EXPERIMENTOS DE INIBIÇÃO DO CYP450 .....	<b>50</b>
1.5 BIOTRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS.....	<b>52</b>
<b>1.5.1 Diversificação estrutural</b> .....	<b>54</b>
<b>1.5.2. Estudos de metabolismo utilizando modelos microbianos do metabolismo animal</b> .....	<b>56</b>
<b>1.5.3. Biorremediação</b> .....	<b>58</b>
<b>1.5.4. Imobilização fúngica</b> .....	<b>60</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>64</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	<b>64</b>
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>64</b>
CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO DE DERIVADOS	
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>66</b>
1.1 FLAVONOIDES.....	<b>66</b>
<b>1.1.1 Morina</b> .....	<b>69</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>71</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	<b>71</b>
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>71</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>72</b>
3.1 SUBSTRATO.....	<b>72</b>
<b>3.1.1 Morina</b> .....	<b>72</b>
3.2. PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL.....	<b>72</b>
<b>3.2.1 Cultivo de células livres em meio de cultura líquido</b> .....	<b>72</b>
<b>3.2.2 Cultivo de biofilmes em meio de cultura líquido</b> .....	<b>72</b>

3.3 CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	73
<b>3.3.1 Incubação em meio de cultura líquido PDSM.....</b>	<b>73</b>
3.4 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	73
<b>3.4.1 Preparação das amostras.....</b>	<b>73</b>
<b>3.4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR) .....</b>	<b>73</b>
3.5 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450).....	74
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
4.1. SUBSTRATO.....	75
<b>4.1.1 Morina.....</b>	<b>75</b>
4.2 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL.....	78
<b>4.2.1 Cultivo de células livres em meio de cultura líquido.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.2 Cultivo de biofilmes em meio de cultura líquido.....</b>	<b>79</b>
4.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	81
<b>4.3.1 Biotransformação de morina catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....</b>	<b>81</b>
4.3.1.1 Caracterização do derivado 7-metilmorina.....	82
4.3.1.1.1 <i>Reações de O-metilação.....</i>	<i>86</i>
4.3.1.1.2 <i>Estudo da cinética de formação do derivado metilado.....</i>	<i>88</i>
4.3.1.2 Caracterização dos derivados morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo.....	89
4.3.1.2.1 <i>Reações de glicosilação.....</i>	<i>93</i>
4.3.1.2.2 <i>Estudo da cinética de formação dos derivados glicosilados por células livres.....</i>	<i>95</i>
<b>4.3.2 Biotransformação de morina catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....</b>	<b>96</b>
4.3.2.1 Caracterização do derivado 7-metilmorina obtido a partir da biotransformação de morina catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	97
4.3.2.1.1 <i>Reações de metilação.....</i>	<i>99</i>
4.3.2.1.2 <i>Estudo da cinética de formação de derivado 7-metilmorina.....</i>	<i>100</i>
4.3.2.2 Caracterização dos derivados morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo por biofilme.....	102
4.3.2.2.1 <i>Reações de glicosilação.....</i>	<i>105</i>
4.3.2.2.2 <i>Estudo da cinética de formação dos derivados glicosilados por biofilme.....</i>	<i>106</i>
4.3.2.3 Caracterização de derivado hidroxí-morina por biofilme.....	108
4.3.2.3.1 <i>Reações de hidroxilação.....</i>	<i>110</i>
4.3.2.3.2 <i>Estudo da cinética de formação do derivado hidroxí-morina.....</i>	<i>113</i>

4.3.2.4 Caracterização de derivado hidroxiflavanona ou flavanonol por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	114
4.3.2.4.1 Estudo da cinética de formação do derivado hidroxiflavanona.....	116
<b>4.3.3 Técnicas de monitoramento, isolamento e caracterização.....</b>	<b>117</b>
4.3.3.1 Espectrometria de Massas.....	117
4.4 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450).....	118
<b>4.4.1 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....</b>	<b>120</b>
4.4.1.1 Influências na geração do derivado 7-metilmorina.....	120
4.4.1.2 Influência na geração dos derivados morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo.....	122
<b>4.4.2 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....</b>	<b>124</b>
4.4.2.1 Influência na geração do derivado 7-metilmorina.....	124
4.4.2.2 Influência na geração dos derivados morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo.....	126
4.4.2.3 Influência na geração dos derivados hidroximorina e hidroxiflavanona.....	128
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>130</b>
CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO METABOLISMO	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>132</b>
1.1 BENZODIAZEPÍNICOS.....	132
<b>1.1.1 Clonazepam.....</b>	<b>133</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>135</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	135
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	135
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>136</b>
3.1 SUBSTRATO.....	136
<b>3.1.1 Clonazepam.....</b>	<b>136</b>
3.2 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL, CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO, ANÁLISE DOS PRODUTOS E EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450). ....	136
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>138</b>
4.1 SUBSTRATO.....	138
<b>4.1.1 Caracterização do substrato clonazepam.....</b>	<b>138</b>
4.2 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE METABOLISMO.....	140

<b>4.2.1 Metabolismo de clonazepam catalisado por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244</b> .....	<b>140</b>
4.2.1.1 Caracterização do derivado 7-amino-clonazepam.....	141
4.2.1.1.1 Cinética de formação de 7-aminoclonazepam por células livres.....	143
4.2.1.2 Caracterização do metabólito 7-acetamido clonazepam.....	144
4.2.1.2.1 Cinética de formação de 7-acetamido clonazepam por células livres .....	146
<b>4.2.2 Metabolismo de clonazepam catalisado por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244</b> .....	<b>147</b>
4.2.2.1 Caracterização do metabólito 7-amino clonazepam por biofilme.....	148
4.2.2.1.1 Estudo da cinética de formação do metabólito 7-amino clonazepam.....	150
4.3 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450).....	152
<b>4.3.1 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244</b> .....	<b>152</b>
4.3.1.1 Influência na geração do metabólito 7-amino clonazepam.....	152
4.3.1.2 Influência na geração do metabólito 7-acetoamida clonazepam.....	155
<b>4.3.2 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244</b> .....	<b>157</b>
4.3.2.1 Influências na geração do metabólito 7-amino clonazepam.....	157
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>160</b>
CAPÍTULO 3 – BIORREMEDIAÇÃO	
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>162</b>
1.1 COMPOSTOS ORGANOFUORADOS.....	162
<b>1.1.1 Piretróides</b> .....	<b>162</b>
1.1.1.1 $\lambda$ -Cialotrina.....	164
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>165</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	165
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	165
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>166</b>
3.1 SUBSTRATO.....	166
<b>3.1.1 <math>\lambda</math>-Cialotrina</b> .....	<b>166</b>
3.2 PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO FÚNGICO.....	166
3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL.....	166
<b>3.3.1 Cultivo de biofilmes</b> .....	<b>166</b>
<b>3.3.2 Cultivo de células livres</b> .....	<b>167</b>

3.4 CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	167
<b>3.4.1 Incubação em meio de cultura líquido Sabourad Dextrose.....</b>	<b>167</b>
3.5 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	167
<b>3.5.1 CG-MS.....</b>	<b>167</b>
<b>3.5.2 <sup>19</sup>F RMN.....</b>	<b>168</b>
3.6 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CYP450.....	168
3.7 INCUBAÇÃO COM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS ( <i>RLM</i> ).....	168
3.8 TRATAMENTO COM $\beta$ -GLUCOSIDASE E SULFATASE.....	169
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>170</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO.....	170
4.2 BIODEGRADAÇÃO DE $\lambda$ -CIALOTRINA.....	171
<b>4.2.1 <sup>19</sup>F RMN.....</b>	<b>171</b>
<b>4.2.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (<i>GC-MS</i>).....</b>	<b>173</b>
<b>4.2.3 Reações de hidrólise de éster.....</b>	<b>177</b>
4.3 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DO CYP450.....	178
4.4 INCUBAÇÃO COM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS ( <i>RLM</i> ).....	180
4.5 TRATAMENTO COM $\beta$ -GLUCOSIDASE E SULFATASE.....	181
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>185</b>
REFERÊNCIAS.....	186
ANEXOS.....	211

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempos de retenção e dados espectrais de massa dos quatro novos picos observados após análise por <i>CG-MS</i> dos extratos de culturas de <i>C. elegans</i> incubadas com $\lambda$ -cicalotrina por 120 h.....	180
---	-----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, oriunda da coleção de cepas do Laboratório de Bioconversão – Labiocon, em meio de cultura sólido ágar batata inclinado, após 7 dias de repique .....	31
Figura 2 - Proposição de via metabólica de 4,5-dimetoxil-catin-6-ona por <i>C. blakesleeana</i> CGMCC 3.970 (Adaptado de FAN, 2017).....	33
Figura 3 - Estrutura cristalográfica do CYP3A4 humano (PDB 4K9W); unidade prostética heme representada em cinza; parte proteica representada pelas alfa-hélices (em rosa), folhas beta (em amarelo) e alças (em cinza).....	35
Figura 4 - Proposição do mecanismo de monoxigenação catalisada pelas enzimas da superfamília CYP450 .....	36
Figura 5 - Esquema representativo de diversificação funcional e classificação de sistemas CYP fúngicos .....	37
Figura 6 - Esquema de biotransformação de ácido fusídico por <i>C. echinulata</i> NRRL 1382 .....	40
Figura 7 - Esquema de biotransformação de esqueletos limonóides por <i>C. echinulata</i> .....	41
Figura 8 - Esquema de biotransformação de drospirenona por <i>C. elegans</i> ATCC 36114 .....	42
Figura 9 - Esquema de biotransformação de etonogestrel por espécies de <i>Cunninghamella</i> .....	43
Figura 10 - Esquema de biotransformação de carvedilol por <i>C. echinulata</i> .....	44
Figura 11 - Esquema de biotransformação de quinolina por <i>C. elegans</i> IM 1785/21Gp .....	44
Figura 12 - Esquema de biotransformação de flurbiprofeno por <i>C. elegans</i> DSM 1908 .....	45
Figura 13 - Esquema de biotransformação de isoimperatorina por <i>C. blakesleeana</i> AS 3.970.....	46
Figura 14 - Esquema de biotransformação de triptaminas sintéticas por <i>C. elegans</i> .....	46
Figura 15 - Esquema de biotransformação de purina-2,6-diona por espécies de <i>Cunninghamella</i> .....	47

Figura 16 - Esquema de biotransformação de 3,4-dihidroxicumarina por <i>C. elegans</i>	48
Figura 17 - Esquema de biotransformação de verde malaquita por <i>C. elegans</i> .....	48
Figura 18 - Esquema de biotransformação de ambrisentan por <i>C. elegans</i> ATCC 9245 .....	50
Figura 19 - Esquema de biotransformação de quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicopiranosídeo por <i>C. elegans</i> ATCC 9245 .....	52
Figura 20 - Esquema de biotransformação de norcurarinona por <i>C. blakesleeana</i> AS 3.970.....	52
Figura 21 - Esquema de biotransformação de ácido equinocístico por <i>C. blakesleana</i> CGMCC 3.910.....	58
Figura 22 - Métodos básicos de imobilização celular baseados na localização da célula fúngica.....	63
Figura 23 - Estrutura química básica dos flavonóides .....	69
Figura 24 - Estrutura química de morina.....	72
Figura 25 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra padrão de morina, com íon molecular $[M - H^+]^-$ 301,03481 monitorado .....	79
Figura 26 - Mecanismo de fragmentação Retro-Diels-Alder .....	80
Figura 27 - Aspecto morfológico de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 cultivada livremente em meio de cultura líquido PDSM.....	82
Figura 28 - Aspecto morfológico dos biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 imobilizados em molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo .....	83
Figura 29 - Cinética de biotransformação da morina e formação dos derivados 7-metilmorina, morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo catalisadas por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	84
Figura 30 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação, com íon molecular $[M - H^+]^-$ 315,05121 monitorado....	86
Figura 31 - Expansão do espectro de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com íon molecular $[M - H^+]^-$ 315,05121 monitorado .....	88

Figura 32 - Proposição da biotransformação de morina a 7-metilmorina por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	88
Figura 33 - Cinética de formação do derivado 7-metilmorina catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	91
Figura 34 - Cromatogramas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com íon molecular $[M - H]^+$ 463,08766 monitorado .....	92
Figura 35 - Espectros de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação, dos tempos de retenção 24,95 minutos (a) e 25,66 minutos (b), com íon molecular $[M - H]^+$ 463,08766 monitorado, e expansões.....	93
Figura 36 - Esquema da quebra homolítica da ligação glicosídica entre a aglicona e a porção do açúcar .....	94
Figura 37 - Proposição da biotransformação de morina a morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	96
Figura 38 - Esquema de biotransformação de quercetina a isoquercitrina por <i>Gliocadium deliquescens</i> .....	98
Figura 39 - Cinética de formação dos derivados glicosilados da morina (morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo) catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	99
Figura 40 - Cinética de biotransformação da morina e formação dos derivados 7-metilmorina, morina-3- <i>O</i> -glicosídeo, morina-7- <i>O</i> -glicosídeo, hidroximorina e hidroxiflavanona catalisadas por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	100
Figura 41 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com íon molecular $[M - H]^+$ 315,05048 monitorado .....	101
Figura 42 - Expansão do espectro de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com íon molecular $[M - H]^+$ 315,05048 monitorado .....	102

Figura 43 - Cinética de formação do derivado 7-metilmorina catalisada por biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	103
Figura 44 - Comparativo do rendimento durante a cinética de biotransformação da morina a 7-metilmorina catalisada por células livres e biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	104
Figura 45 - Cromatogramas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com íon molecular $[M - H^+]$ 463,08766 monitorado .....	106
Figura 46 - Espectros de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, dos tempos de retenção 24,98 minutos (a) e 25,54 minutos (b), com íon molecular $[M - H^+]$ 463,08766 monitorado, e expansões .....	107
Figura 47 - Proposição da biotransformação de morina a morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	108
Figura 48 - Cinética de formação dos derivados glicosilados de morina (morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo) catalisada por biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	110
Figura 49 - Comparativo do rendimento durante a cinética de biotransformação da morina a morina-3- <i>O</i> -glicosídeo catalisada por células livres e biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	111
Figura 50 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com íon molecular $[M - H^+]$ 317,02975 monitorado .....	112
Figura 51 - Proposição da biotransformação de morina a hidroximorina por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	113
Figura 52 - Esquema de biotransformação de daidzeína por <i>Nocardia farcinica</i> IFM10152.....	114
Figura 53 - Esquema de obtenção de derivados hidroxilados de fármacos catalisada por <i>C. elegans</i> sob forma de biofilme e imobilizada em alginato de cálcio .....	115

Figura 54 - Cinética de formação do hidroximorina catalisada por biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	116
Figura 55 - Espectro de massas CLAE-EMAR do pico com tempo de retenção 25 minutos da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com íon molecular $[M - H^+]^-$ 317,02975 monitorado.....	117
Figura 56 - Proposição da biotransformação de morina a hidroxiflavanona por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	118
Figura 57 - Cinética de formação do hidroxiflavanona catalisada por biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	119
Figura 58 - Proposição dos derivados formados a partir da biotransformação de morina por células livres e biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	120
Figura 59 - Complexo de clotrimazol do Citocromo P450 46A1 humano (PDB 46A1) .....	122
Figura 60 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com inibidor clotrimazol (a) e sem inibidor clotrimazol (b), e íon molecular $[M - H^+]^-$ 315,05048 monitorado.....	124
Figura 61 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do derivado 7-metilmorina (72 horas), catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol ....	125
Figura 62 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com inibidor clotrimazol (a) e sem inibidor clotrimazol (b), e íon molecular $[M - H^+]^-$ 463,08766 monitorado.....	126
Figura 63 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação dos derivados morina-3-O-glicosídeo e morina-7-O-glicosídeo (72 horas), catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol .....	127
Figura 64 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilmes de	

<i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular $[M - H]^-$ 315,05048 monitorado .....	128
Figura 65 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do derivado 7-metilmorina (72 horas), catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol ....	129
Figura 66 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, com inibidor clotrimazol (a) e sem inibidor clotrimazol (b), e íon molecular $[M - H^+]^-$ 463,08766 monitorado.....	130
Figura 67 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação dos derivados morina-3- <i>O</i> -glicosídeo e morina-7- <i>O</i> -glicosídeo (72 horas), catalisada por biofilmes de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol.....	131
Figura 68 - Estrutura química básica das benzodiazepinas .....	135
Figura 69 - Estrutura química de clonazepam .....	136
Figura 70 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra clonazepam, com íon molecular $[M + H^+]^+$ 316,04891 monitorado.....	142
Figura 71 - Cinética de metabolismo de clonazepam e geração dos metabólitos 7-amino clonazepam e 7-acetoamida clonazepam catalisadas por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	143
Figura 72 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de <i>C. echinulata</i> , com íon molecular $[M + H^+]^+$ 286,07471 monitorado.....	145
Figura 73 - Cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244 .....	147
Figura 74 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de <i>C. echinulata</i> , com íon molecular $[M + H^+]^+$ 328,08528 monitorado.....	148
Figura 75 - Cinética de formação do metabólito 7-acetamido clonazepam catalisada por células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244.....	149

Figura 76 - Cinética de metabolismo de clonazepam e formação do metabólito 7-aminoclonazepam catalisadas por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244..... 150

Figura 77 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M + H^+]^+$  286,07471 monitorado..... 152

Figura 78 - Cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 ..... 154

Figura 79 - Comparativo do rendimento durante a cinética de metabolismo de clonazepam a 7-aminoclonazepam catalisada por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244..... 154

Figura 80 - Proposição dos metabólitos formados a partir do metabolismo de clonazepam por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244 ..... 155

Figura 81 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular  $[M + H^+]^+$  286,07471 monitorado..... 156

Figura 82 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam (72 horas), catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol ..... 157

Figura 83 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular  $[M + H^+]^+$  328,08528 monitorado..... 158

Figura 84 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do metabólito 7-acetoamida clonazepam (72 horas), catalisada por células livres, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol..... 159

Figura 85 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular  $[M + H^+]^+$  286,07471 monitorado..... 161

Figura 86 – Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam (72 horas), catalisada por biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol .....	162
Figura 87 - Estrutura química básica das piretrinas naturais.....	166
Figura 88 - Estrutura química de $\lambda$ -cialotrina .....	167
Figura 89 - Espectro de RMN $^{19}\text{F}$ do substrato $\lambda$ -cialotrina .....	173
Figura 90 - Faixas de deslocamentos químicos esperados para os compostos organofluorados.....	174
Figura 91 - Espectros de RMN $^{19}\text{F}$ das amostras dos sobrenadantes de incubação (A) e biomassa (B) obtidos nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de degradação de $\lambda$ -cialotrina por biofilmes de <i>C. elegans</i> DSM1908.....	175
Figura 92 - Expansão do espectro RMN $^{19}\text{F}$ das amostras dos sobrenadantes de incubação (A) e biomassa (B) obtidos nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de degradação de $\lambda$ -cialotrina por biofilmes de <i>C. elegans</i> DSM1908, mostrando fluorometabólitos transitórios .....	177
Figura 93 - Cromatogramas de íons totais <i>GC-MS</i> da amostra controle (a) contendo meio de cultura SDB e do sobrenadante de incubação (b) obtidas no tempo de 120 h de degradação de $\lambda$ -cialotrina por biofilmes de <i>C. elegans</i> DSM1908.....	179
Figura 94 - Esquema proposto para a degradação de vinclozolin catalisada por <i>C. elegans</i> via hidrólise .....	181
Figura 95 - Cromatogramas de íons totais <i>GC-MS</i> das amostras do sobrenadante de incubação e biomassa, na ausência e presença de inibidor, obtidas no tempo de 120 h de degradação de $\lambda$ -cialotrina por biofilmes de <i>C. elegans</i> DSM1908 .....	182
Figura 96 - Espectros $^{19}\text{F}$ RMN das frações orgânicas dos sobrenadantes e das biomassas, obtidas nos tempos de 72 e 120 horas de incubação com <i>C. elegans</i> DSM1908 e o inibidor 1-aminobenzotriazol .....	183
Figura 97 - Cromatograma <i>CG-MS</i> de íon total das amostras controle contendo meio de cultura SDB e dos extratos dos sobrenadantes de incubação obtidos no tempo de 120 h do experimento de incubação com <i>RLM</i> .....	184
Figura 98 - Espectros RMN $^{19}\text{F}$ dos extratos orgânicos dos produtos da reação de tratamento com $\beta$ -Glucosidase ativa (a) e desnaturada (b).....	185

Figura 99 - Espectros RMN $^{19}\text{F}$ dos extratos orgânicos dos produtos da reação de tratamento com sulfatase ativa (a) e desnaturada (b).....	186
Figura 100 - Proposição para a biodegradação $\lambda$ -cicalotrina por <i>C. elegans</i> .....	187

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 301,03 481.....	214
Anexo B - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 315,05048.....	215
Anexo C - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 463,08766.....	216
Anexo D - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 301,03 481.....	217
Anexo E - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 315,05048.....	218
Anexo F - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 463,08766.....	219
Anexo G - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 317,02975.....	220
Anexo H - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam com células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> 316,04891.....	221
Anexo I - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam com células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M + H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> 286,07471.....	222
Anexo J - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam com células livres de <i>C. echinulata</i> ATCC 9244; íon monitorado [M + H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> 328,08528.....	223

Anexo K - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam catalisado por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M + H]^+$  286,07471 ..... 224

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AS	<i>American strain</i>
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	2,6-bis(1,1-dimetil-etil)-4-metilfenol
BL	Beta-lactamase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBS	<i>Central Bureau of Fungal Cultures</i>
CGMCC	<i>China General Microbiological Culture Collection Center</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYP	Citocromo P450
DMF	Dimetilformamida
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DSM	<i>Dekkera Selective Medium</i>
DSM	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
ESI	Electrospray ionisation
ETBE	Éter etil-terc-butílico
GST	Glutathione-S-transferases
HP	Polidimetilsiloxano
HRESIMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução com ionização por eletropulverização
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IFM	<i>Medical Mycology Research Center</i>
LaBiocon	Laboratório de Bioconversão
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
<i>m/z</i>	massa/carga
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTBE	Éter metil-terc-butílico

NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NAT	N-acetiltransferases
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
OAT1	<i>Organic Anion Transporter 1</i>
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDSE	Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
PDSM	<i>Potato Dextrose Soy Medium</i>
PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
RDA	Retro-Diels-Alder
RDBE	<i>Ring Double Bond Equivalents</i>
RLM	<i>Rat liver microsome</i>
RMN	Resonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
sp.	Espécie
TAME	Éter metil-terc-amílico
TIIA	Tanshinona IIA
UCD	<i>University College Dublin</i>
UGTs	Glucuroniltransferases
UV	Ultra-violeta

## **Biofilme de *Cunninghamella* e sua versatilidade como biocatalisador em estudos de quimiodiversidade, metabolismo e biorremediação**

**Souza P. L. M.**<sup>1</sup>; **Murphy, C. D.**<sup>2</sup>; **Oliveira V.**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioconversão - LaBiocon, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. <sup>2</sup>UCD School of Biomolecular and Biomedical Science, University College Dublin, Belfield, Ireland

### **RESUMO**

**Introdução:** *Cunninghamella* é um gênero de fungo filamentosos capaz de metabolizar uma variedade de xenobióticos regio- e estereosseletivamente, em virtude de seu sistema monooxigenase Citocromo P450 análogo ao de mamíferos e suas enzimas de conjugação. Pode ser considerado, então, um dos melhores modelos microbianos documentados e é notável sua aplicação em biotransformações na produção de derivados quimicamente diversos, metabólitos de mamíferos e como biocatalisador em biorremediações de poluentes ambientais. **OBJETIVO:** Assim, objetivo geral deste trabalho foi utilizar espécies de *Cunninghamella* como biocatalisador na geração de derivados quimiodiversos de morina, modelo microbiano do metabolismo animal de clonazepam e biorremediador de  $\lambda$ -cialotrina. **Metodologia:** Células livres e imobilizadas de *C. echinulata* ATCC 9244 e *C. elegans* DSM1908 foram cultivadas em meio de cultura líquido PDSM e SDB e aplicadas como biocatalisadores dessas reações. Os derivados de morina e os metabólitos benzodiazepínicos de mamíferos obtidos foram identificados e caracterizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução, e suas cinéticas de biotransformação foram estudadas. Os produtos de degradação de  $\lambda$ -cialotrina foram identificados e caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear <sup>19</sup>F. **Resultados e discussões:** Foram obtidos os derivados 7-metilmorina, morina-3-O-glicosídeo e morina-7-O-glicosídeo, hidroximorina e hidroxiflavanona a partir da biotransformação com células fúngicas livres e biofilmes, sendo destes, hidroximorina e hidroxiflavanona derivados exclusivos da biotransformação com biofilmes. Como metabólitos de mamíferos, foram obtidos 7-aminoclonazepam e 7-acetoamida clonazepam, sendo os biofilmes fúngicos capazes de produzir exclusivamente o 7-aminoclonazepam. Nestes estudos, as reações catalisadas por biofilmes apresentaram maior rendimento. O pesticida  $\lambda$ -cialotrina foi degradado via hidrólise da ligação éster biocatalisada por células fúngicas imobilizadas, dando origem às suas porções ácida e álcool. **Conclusões:** *Cunninghamella* mostrou-se um biocatalisador efetivo, nas três vertentes propostas neste estudo, sendo os biofilmes evidenciados como uma estratégia importante para a maior atividade catalítica e quando da seletividade reacional.

**Palavras-Chave:** *Cunninghamella*; quimiodiversidade; metabolismo, biorremediação.

**Agradecimentos:** LaBiocon, UCD – Irlanda, CAPES, PDSE-CAPES.

## ***Cunninghamella* biofilms as biocatalyst for chemodiversity, metabolism studies and bioremediation**

**Souza P. L. M.**<sup>1</sup>; Murphy, C. D.<sup>2</sup>; **Oliveira V.**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioconversão - LaBiocon, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. <sup>2</sup>UCD School of Biomolecular and Biomedical Science, University College Dublin, Belfield, Ireland

### **ABSTRACT**

**Introduction:** *Cunninghamella* is a filamentous fungi genus capable of metabolizing a huge variety of xenobiotics in a regio- and stereoselectively manner, due to its monooxygenase enzymatic system Cytochrome P450, analogue to mammals, and its conjugation enzymes. It can be considered, then, as one of the best microbial models documented in biotransformations aiming production of chemodiverse derivatives, mammalian metabolites and in environmental pollutants bioremediation.

**OBJECTIVES:** Thus, the general objective was to apply *Cunninghamella* species as biocatalyst in generation of quimiodiverse derivatives from morin, microbial model of mammalian metabolism of clonazepam and bioremediator of  $\lambda$ -cyhalothrin.

**Methodology:** Free cells and biofilms of *C. echinulata* ATCC 9244 and *C. elegans* DSM1908 were grown in PDSM and SDB liquid medium and applied as biocatalysts in these reactions. Flavonoid derivatives and mammalian benzodiazepine metabolites were identified and characterized by High Performance Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry, and their biotransformation kinetics were studied. Pesticide degradation products were identified and characterized by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance <sup>19</sup>F.

**Results and discussion:** 7-methylmorin, morin-3-*O*-glycoside, morin-7-*O*-glycoside, hydroxy-morin and hydroxy-flavanone derivatives were obtained from biotransformation with free fungal cells and biofilms, being hydroxy-morin and hydroxy-flavanone derivatives derived exclusively from bioprocessing with biofilms. As mammalian metabolites, 7-aminoclonazepam and 7-acetoamide clonazepam were obtained, and fungal biofilms were capable of exclusively producing 7-aminoclonazepam. In these studies, reaction catalyzed by biofilms showed higher yield. The pesticide  $\lambda$ -cyhalothrin was degraded via hydrolysis of central ester bond biocatalysed by fungal cells, yielding its acid and alcohol moieties. **Conclusions:** *Cunninghamella* proved to be an effective biocatalyst in these three fields here proposed, with biofilms evidenced as an important strategy for greater enzymatic production and reactional selectivity.

**Keywords:** *Cunninghamella*; chemodiversity; metabolism, bioremediation

**Acknowledgements:** LaBiocon, UCD – Ireland, CAPES, PDSE-CAPES

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Cunninghamella*

*Cunninghamella* é um gênero de fungo filamentoso dos mais comuns da Ordem Mucorales, particularmente encontrado em solos e plantas das regiões mediterrâneas e subtropicais, queijos, algumas castanhas brasileiras e outros substratos orgânicos (BAIJAL E MEHEOTBA, 1980; ASHA E VIDYAVATHI, 2009).

Compreende 15 taxa, 14 espécies e três variedades, baseando-se no exame de cepas alhures. Suas colônias apresentam crescimento rápido, micélio algodinoso e variação de cor entre branco, cinza e marrom (Figura 1) (RUYONG E GUIQING, 2001; SHIOSAKI *et al.*, 2001; ASHA E VIDYAVATHI, 2009).

Figura 1 - Exemplar de *C. echinulata* ATCC 9244, oriunda da coleção de cepas do Laboratório de Bioconversão – Labiocon, em meio de cultura sólido ágar batata inclinado, após 7 dias de repique



Fonte: autor

Asha e Vidyavathi (2009) descrevem as 14 espécies do gênero *Cunninghamella* como: *C. bainieri*, *C. bertholletiae*, *C. blakesleeana*, *C. clavata*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *C. homothallica*, *C. intermedia*, *C. multiverticillata*, *C. phaeospora*, *C.*

*polymorpha*, *C. septata*, *C. CL023* e *C. vesiculosa*. *C. bertholletiae*, *C. elegans* e *C. echinulata* estão entre as espécies mais comuns, ao passo que *C. bertholletiae* é o único exemplar do gênero com patogenicidades humana e animal conhecidas (ASHA E VIDYAVATHI, 2009).

Os fungos são complexos em morfologia, exibindo diferentes estruturas e formas ao longo do seu ciclo de vida. O desempenho biocatalítico fúngico pode ser afetado por vários parâmetros de cultivo, por isso devem ser considerados criteriosamente durante as biotransformações, tais quais velocidade de agitação do meio de cultura, quantidade de oxigênio dissolvido, concentração fúngica, pH, temperatura e traços de minerais, por exemplo (PAPAGIANNI, 2004; SPONCHIADO *et al.*, 2019).

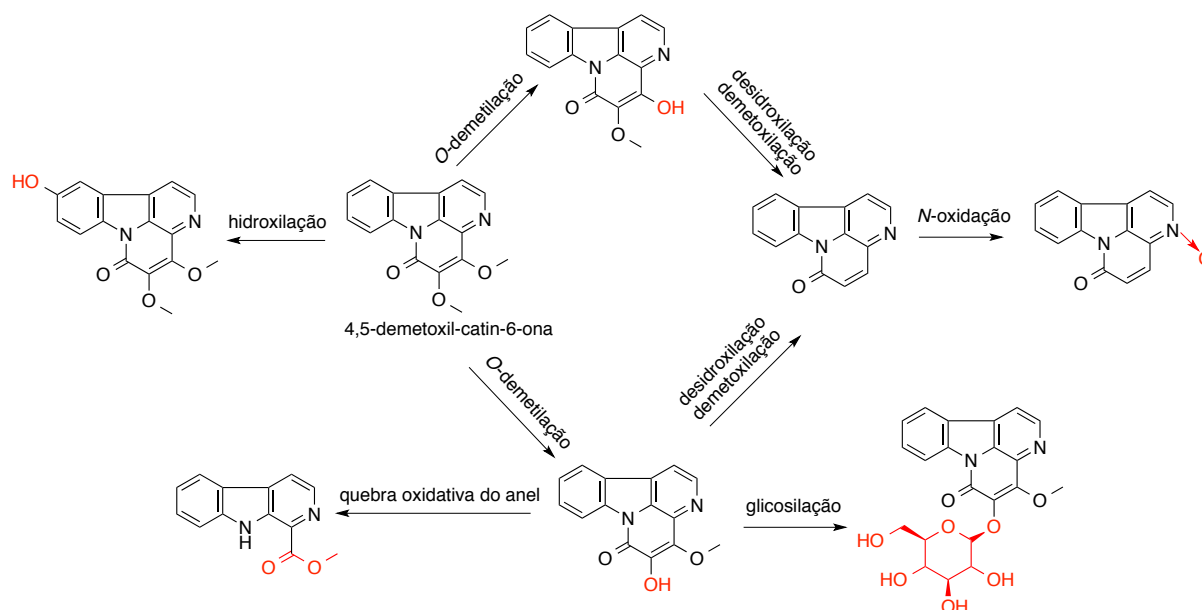
Primeiramente descrito como filamentosos em 1903, o gênero contém espécies de notável importância tanto para a micologia médica, quanto em processos biotecnológicos. Nesta perspectiva, cepas de *Cunninghamella* apresentam a capacidade de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos regio- e estereosseletivamente, a exemplo de compostos aromáticos e fármacos (SHIOSAKI *et al.*, 2001; ASHA E VIDYAVATHI, 2009; MURPHY, 2010; RYDEVIK, 2014; PALMER-BROWN *et al.*, 2017).

Esta ampla capacidade catalítica deve-se ao seu sistema monooxigenase Citocromo P450 análogo ao de mamíferos e suas enzimas de conjugação, citando as glicosiltransferases. Os metabólitos produzidos são derivados das reações de oxidação de Fase I – hidroxilação, oxidação de heteroátomos e *N*- e *O*-demetilação, por exemplo –, ao passo que o isolamento de sulfatados, glicosídeos e glucuronídeos indicam seu potencial para as biotransformações de Fase II (ZHANG *et al.*, 1996; SHIOSAKI *et al.*, 2001; ASHA E VIDYAVATHI, 2009; MURPHY, 2010; 2015; PALMER-BROWN *et al.*, 2017; ARRUDA, 2018).

Fan e colaboradores (2017), por exemplo, empregaram *C. blakesleeana* CGMCC 3.970 como biocatalisador no estudo pioneiro do metabolismo de 4,5-dimetoxil-catin-6-ona. Foram obtidos seis metabólitos e um derivado independente do metabolismo, caracterizados por análise espectrofotométrica de absorvância no ultra-violeta (UV), Espectrometria de Massas de Alta Resolução com ionização por eletropulverização (*HRESIMS*) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As vias metabólicas

propostas estão descritas na Figura 2 e envolvem *O*-demetilação, desidroxilação, demetilação, *N*-oxidação, hidroxilação, quebra oxidativa do anel e glicosilação microbianas.

Figura 2 - Proposição de via metabólica de 4,5-dimetoxil-catin-6-ona por *C. blakesleeana* CGMCC 3.970 (Adaptado de FAN, 2017)



Fonte: autor

Interessantemente, apesar de não haver dados relatados sobre o metabolismo de alcaloides catin-6-ona em mamíferos e poucos relatos sobre sua farmacocinética, a maioria dos metabólitos de mamíferos esperados foram obtidos neste estudo, enfatizando a capacidade dos sistemas microbianos *Cunninghamella* na produção de metabólitos de Fases I e II do metabolismo e derivados químicos (FAN *et al.*, 2017).

*Cunninghamella* sp. pode ser considerado um dos melhores modelos microbianos documentados e, apesar da ampla diversidade de biocatalisadores, o emprego dessas culturas é bem estabelecido e é o mais relatado (PISKA *et al.*, 2016; PALMER-BROWN *et al.*, 2017; B *et al.*, 2018).

## 1.2 SISTEMA ENZIMÁTICO DO CITOCROMO P450 (CYP450)

O citocromo (CYP) P450 constitui a superfamília de monooxigenases, capazes de mediar as alterações de grupos funcionais provenientes do metabolismo oxidativo da maioria dos fármacos e de outros xenobióticos. O sistema enzimático é nomeado como P450 em função de seu característico pico de absorção espectral em 450 nm (OMURA E SATO, 1962; ASHA E VIDYAVATHI, 2009; LAH *et al.*, 2011; ZANGER E SCHWAB, 2013; BHATTACHARYA E YADAV, 2018).

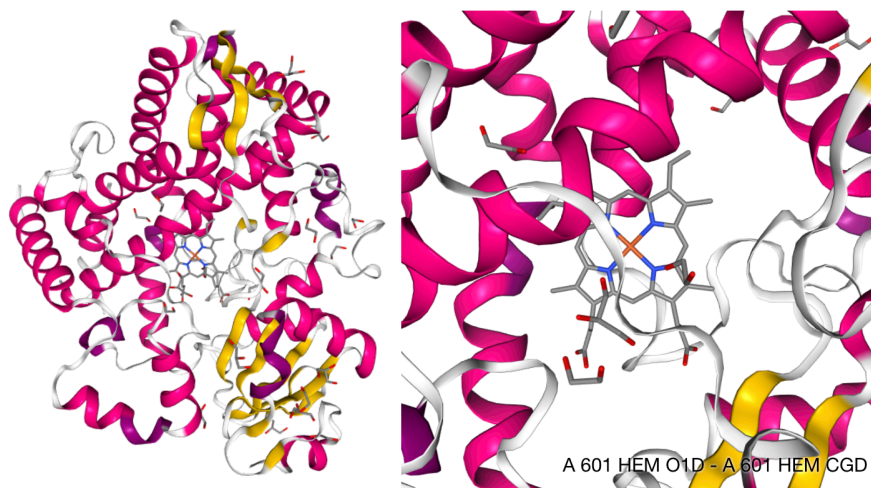
Tais monooxigenases apresentam um grupo prostético heme e são capazes de catalisar uma ampla variedade de reações, tais quais hidroxilação, epoxidação, oxidação, redução, desaminação, desalogenação, desalquilação, desidrogenação e demetilação (LAH *et al.*, 2011).

A nomenclatura do CYP450 é baseada na similaridade da sequência homóloga de nucleotídeos, podendo sua divisão ser feita em família e subfamília. São consideradas da mesma família genética proteínas CYP que apresentem identidade maior que 40% na sequência de aminoácidos, ao passo que identidade maior que 55% codificam proteínas da mesma subfamília (KELLY E KELLY, 2013; CHEN, W. *et al.*, 2014; SILVA, 2015).

A recente revolução do sequenciamento genômico representou um aumento repentino no conhecimento do número de CYPs provenientes de microrganismos e formas de vida superiores. Atualmente, mais de 20.000 sequências já foram identificadas pelo *P450 Nomenclature Committee* em todos os sete reinos biológicos, incluindo animais, plantas, protistas, fungos, bactérias, arqueas e vírus, sendo 18 famílias e 44 subfamílias codificadas (KELLY E KELLY, 2013; BHATTACHARYA E YADAV, 2018).

A nível molecular, o CYP constitui-se de um grupo prostético heme e uma parte proteica (Figura 3), formados por um macrociclo tetrapirrólico ligado por grupos CH, com quatro radicais metila, dois radicais vinila e dois ácidos propiônicos como substituintes. No centro do macrociclo, localiza-se o átomo de Fe (II ou III), coordenado aos 4 nitrogênios do anel pirrólico e a um quinto ligante axial, que define o tipo de heme proteína (TESTA E JENNER, 1981; GUENGERICH, 2001).

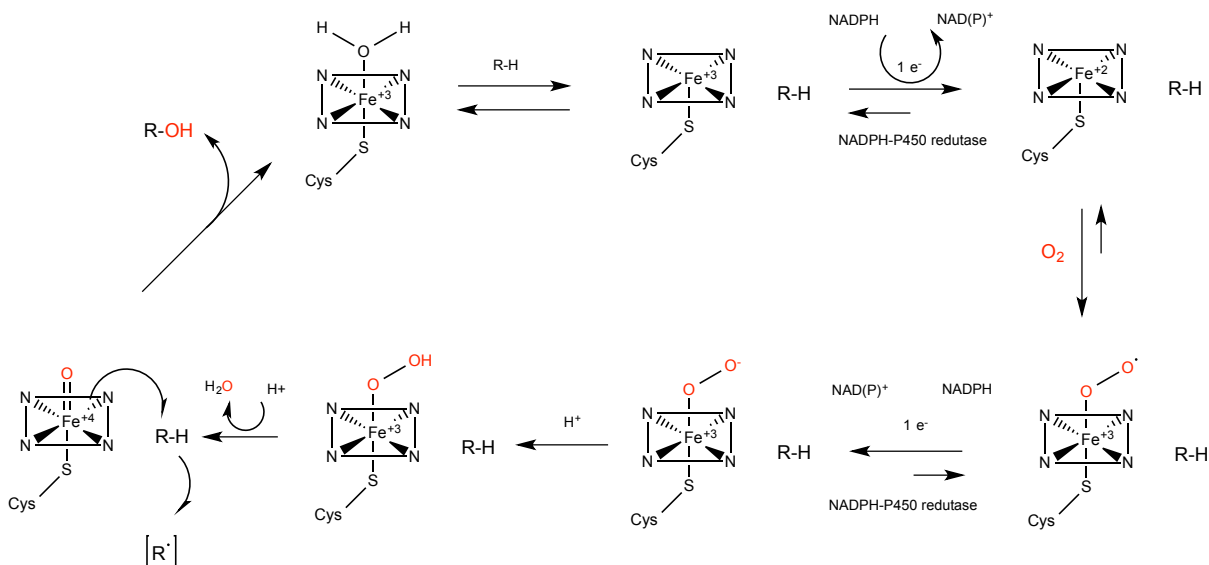
Figura 3 - Estrutura cristalográfica do CYP3A4 humano (PDB 4K9W); unidade prostética heme representada em cinza; parte proteica representada pelas alfa-hélices (em rosa), folhas beta (em amarelo) e alças (em cinza)



Fonte: <http://www.rcsb.org/structure/4K9W>

Quando em condição de inatividade, o grupo heme apresenta, além das cinco coordenações características, um sexto ligante axial, apresentando-se como  $\text{Fe}^{3+}$ . A entrada de um substrato no sítio ativo promove modificações conformacionais e a redução a  $\text{Fe}^{2+}$ , catalisada por NADPH-CYP450 redutase. O complexo reduzido reage com oxigênio molecular, por reação radicalar, em que o radical formado será novamente reduzido, gerando o ânion  $\text{Fe(III)peróxido}$ . O novo complexo, de característica nucleofílica, é rapidamente protonado, resultando na perda de uma molécula de água, com conseqüente geração de espécie eletrofílica, altamente reativa, com ferro em estado de oxidação +4. Por fim, esta espécie reage com o substrato, promovendo a cisão homolítica da ligação C-H e a formação de um intermediário radicalar, que sofre, em seguida, a adição de um grupamento hidroxila, regenerando a enzima em seu estado de repouso inicial (Figura 4) (TESTA E JENNER, 1981).

Figura 4 - Proposição do mecanismo de monoxigenação catalisada pelas enzimas da superfamília CYP450



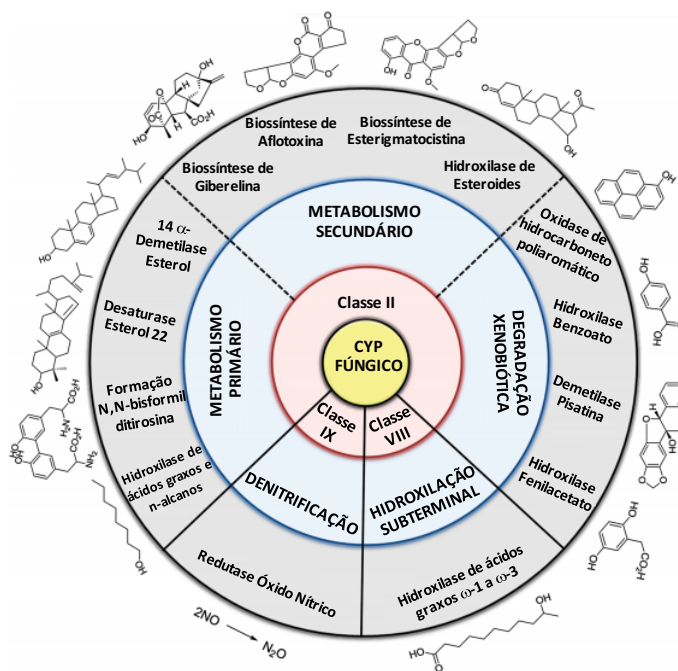
Adaptado de ORTIZ DE MONTELLANO (2015)

Resumidamente, então, o ciclo catalítico compreende pelo menos sete passos: a) ligação do substrato à forma férrica da enzima; b) redução do grupo prostético heme férrico a estado ferroso pela transferência de um elétron mediada por NADPH-CYP450 redutase; c) ligação do oxigênio molecular; d) transferência de um elétron proveniente da CYP-redutase, e) clivagem da ligação O-O; f) oxigenação do substrato; e g) "lançamento" do produto (LIN E LU, 1998).

Nos sistemas biológicos, é considerável o papel dessas heme-proteínas microbianas como monooxigenases, mas são atribuídas a elas, também, uma série de outras reações de metabolismo primário, incluindo a biossíntese do ergosterol, a biogênese meiótica da parede do esporo e a síntese de produtos naturais complexos, como hormônios e micotoxinas, por exemplo (Figura 5) (DURAIRAJ *et al.*, 2016; DUBE E KUMAR, 2017).

As CYPs, ainda, participam extensivamente de uma grande variedade de reações fisiológicas em fungos, que contribuem para a aptidão e reprodução fúngicas em vários nichos ecológicos. Fungos, especialmente os filamentosos, produzem uma vasta gama de metabólitos secundários de notoriedade biomédica, agrícola e industrial, muitos dos quais biossintetizados como o envolvimento de vários tipos de CYPs (CHEN, *et al.*, 2014).

Figura 5 - Esquema representativo de diversificação funcional e classificação de sistemas CYP fúngicos



Fonte: Adaptado de DURAIRAJ (2016)

Por exemplo, os compostos aflatoxinas e lovastatina, produzidos por fungos, são modificados pela ação de CYPs em suas vias biossintéticas. Além disso, a patogenicidade fúngica e seus papéis ecológicos como sapróbios e decompositores também estão associados a estas enzimas (CHEN, *et al.*, 2014).

O Citocromo P450, ademais, desempenha um papel importante no metabolismo de fármacos, representando a classe mais expressiva de enzimas envolvidas nas reações de Fase I e sendo responsáveis por aproximadamente 80 % do metabolismo dos fármacos comerciais (DUBE E KUMAR, 2017).

Assim, os sistemas microbianos (fungos e bactérias) são frequentemente empregados em testes de toxicidade e eficácia e nestes estudos de metabolismo em virtude do seu sistema P450 endógeno (KELLY E KELLY, 2013; BHATTACHARYA E YADAV, 2018).

O "Modelo Microbiano do Metabolismo Animal" foi pioneiramente proposto por Smith e Rosazza (1974), quando foi descrita e reconhecida a forte correlação entre os perfis metabólicos em sistemas de mamíferos *in vitro* e *in vivo* e o modelo microbiano,

frente à expressiva similaridade entre seus citocromos P450 (PATIL *et al.*, 2014; MURPHY, 2015; DUBE E KUMAR, 2017).

Estes metabólitos, advindos da produção microbiana, foram extremamente importantes para a avaliação farmacológica e toxicológica no processo de desenvolvimento de fármacos, particularmente na época em que os citocromos humanos heterólogos P450 ainda não estavam disponíveis comercialmente (CHEN, *et al.*, 2014).

Uma única espécie de fungo pode, frequentemente, conter mais de uma centena de genes CYP, quando comparados com os 57 encontrados em humanos. Estima-se que mais de 2.500 sequências de DNA foram identificadas como CYPs fúngicas (KELLY E KELLY, 2013).

Nos últimos anos, vários estudos mostraram que fungos, particularmente as espécies de *Cunninghamella*, possuem sistemas de monooxigenases do CYP450 análogos aos de mamíferos e a maioria dos estudos (baseados em testes de inibição e indução) focam na similaridade entre as reações metabólicas e ao CYP de *Cunninghamella* (ASHA E VIDYAVATHI, 2009; PISKA *et al.*, 2016).

Dube e Kumar (2017) triaram, frente à sua maior eficiência, cepas de *Cunninghamella* capazes de gerar metabólitos de bromexina e avaliaram o envolvimento da isoforma CYP3A4 no metabolismo, através de estudos com microsomas hepáticos. Foram obtidos, então, 3 metabólitos similares aos de mamíferos com confirmação da presença de enzimas CYP nas espécies fúngicas.

A promessa da aplicação do citocromo P450 nos processos biotecnológicos industriais abrange, também, no sentido da toxicologia, biorremediações, produções químicas usando células inteiras e sob perspectivas biossintéticas (KELLY E KELLY, 2013; BHATTACHARYA E YADAV, 2018).

### **1.2.1 Reações de hidroxilação**

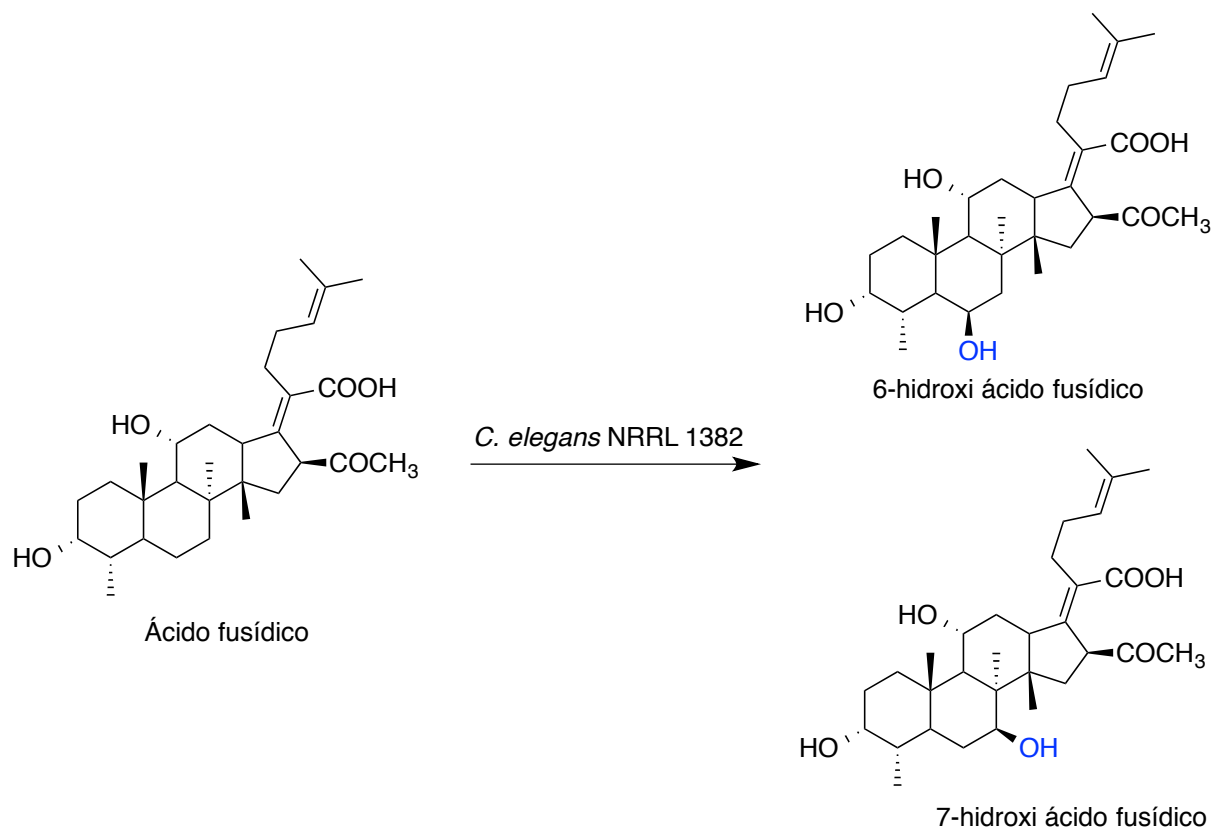
A introdução de um grupamento funcional hidroxila em uma molécula orgânica compreende a conversão direta da ligação C-H para a formação de um álcool, e pode ocorrer em diversos pontos da molécula. Estas reações em especial em centros não ativados e com especificidades regio- e estereoquímicas são difíceis de ser alcançadas

por métodos químicos clássicos, já que, por vezes, a Química Orgânica Clássica apresentou complexidade e inabilidades sintéticas para esses casos (HOLLAND, 1982; BORGES *et al.*, 2009).

A hidroxilação catalisada por microrganismos, com relevância industrial, foi pioneiramente aplicada e relatada na biotransformação de esteroides catalisada por espécies de *Rhizopus* e mediada pelas enzimas CYP450. A introdução de um átomo de oxigênio em núcleos esteroidais, principalmente na posição C-11, é uma das reações mais importantes na síntese e produção de corticosteroides anti-inflamatórios. (PETERSON *et al.*, 1952; HOLLAND, 1982). Este processo, realizado sob condições brandas, com alto rendimento e regio- e estereosseletividade perfeitas, é praticamente inviável para a síntese química (KELLY E KELLY, 2013; KEERTHANA E VIDYAVATHI, 2018; NICKAVAR *et al.*, 2018).

Ibrahim e Ragab (2018) observaram a hidroxilação regioseletiva do ácido fusídico catalisada por *C. echinulata* NRRL 1382 (Figura 6). Neste estudo, os metabólitos 6-hidroxi ácido fusídico e 7-hidroxi ácido fusídico foram exclusivamente obtidos e caracterizados por *HRESIMS* e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo os sítios de hidroxilação esperados, por via sintética, em C-1, C-2, C-6, C-7, C-22 e C-23.

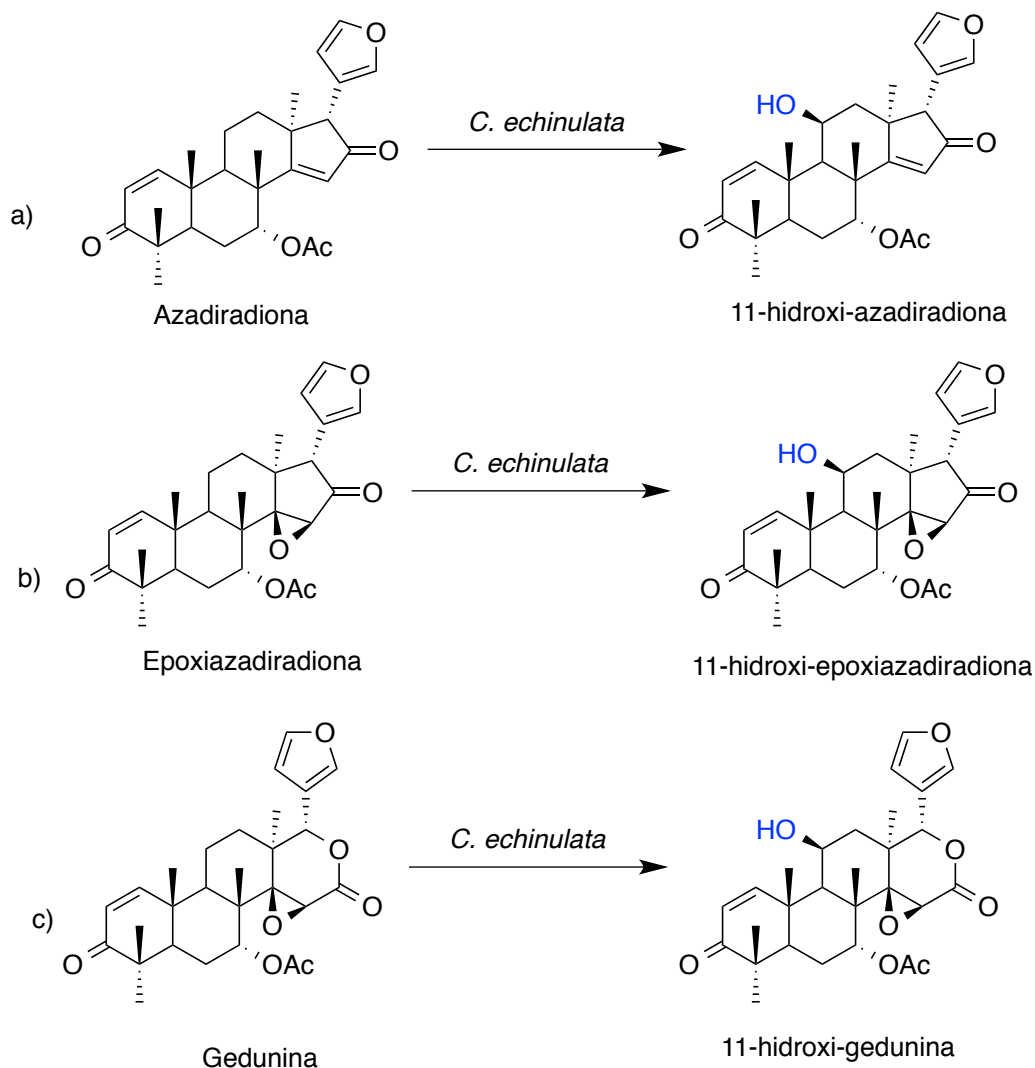
Figura 6 - Esquema de biotransformação de ácido fusídico por *C. echinulata* NRRL 1382



Fonte: autor

A obtenção de derivados hidroxilados com regio- e estereosseletividades, catalisada por células de *Cunninghamella*, também foi observada no estudo utilizando esqueletos limonóides como substrato – uma transformação altamente desafiadora, uma vez que os esqueletos esteroidais tornam suas estruturas mais sensíveis a reagentes químicos externos e apresentam uma complexidade maior frente aos grupamentos metila e o anel furano (Figura 7) (HALDAR *et al.*, 2015).

Figura 7 - Esquema de biotransformação de esqueletos limonóides por *C. echinulata*



Fonte: autor

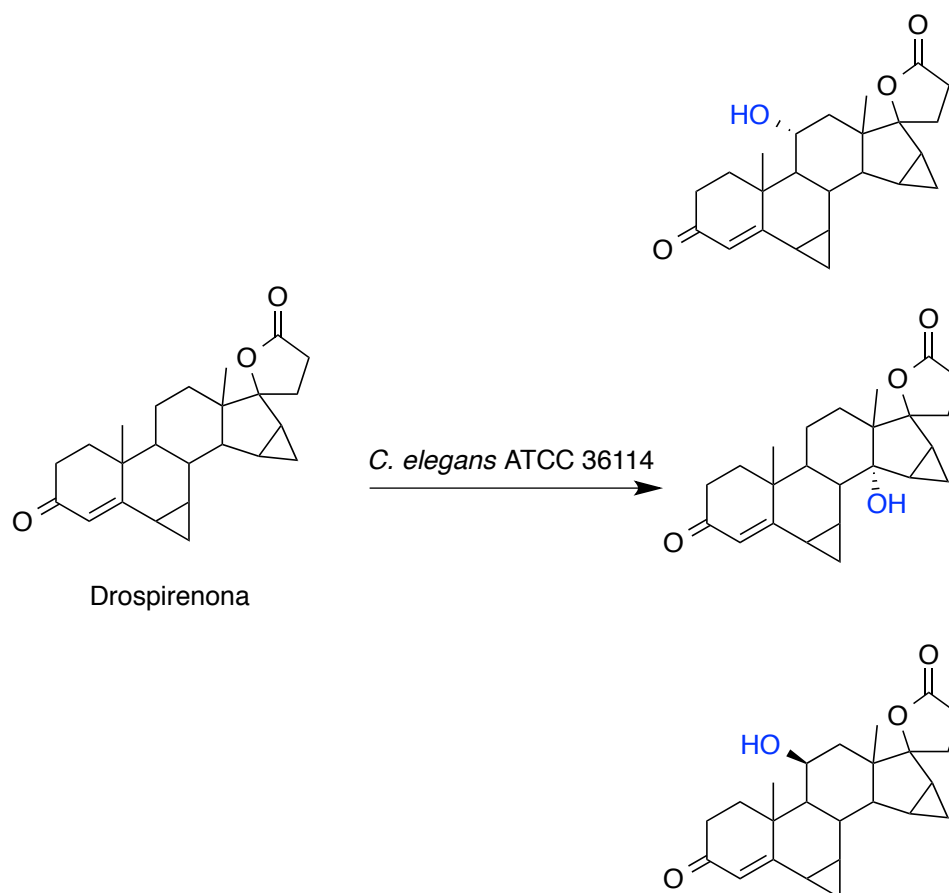
Neste estudo, a 11- $\beta$ -hidroxilação, sob condições reacionais brandas, foi alcançada com conversão de 91,5 % para a formação de derivados funcionalizados e estruturalmente inéditos, evidenciando a potencialidade dos sistemas microbianos, especialmente as espécies de *Cunninghamella* (HALDAR *et al.*, 2015).

A competência destas culturas em catalisar a hidroxilação de compostos esteroidais também foi salientada por Özçinar e colaboradores (2018), cujo estudo descreveu a formação de metabólitos hidroxilados como os principais produtos de biotransformação de ruscogeninas.

Baydoun e colaboradores (2017) igualmente descreveram hidroxilações regio- e estereosseletivas, mediadas pelo citocromo P450 e catalisadas por *Cunninghamella*.

Drospirenona foi submetida à biotransformação com *C. elegans* ATCC 36114, gerando dois novos derivados hidroxilados e um já descrito na literatura (Figura 8). Os produtos obtidos foram purificados por coluna cromatográfica e caracterizados por seus pontos de fusão, absorvância por espectrofotometria na região UV,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN e *HRESIMS*.

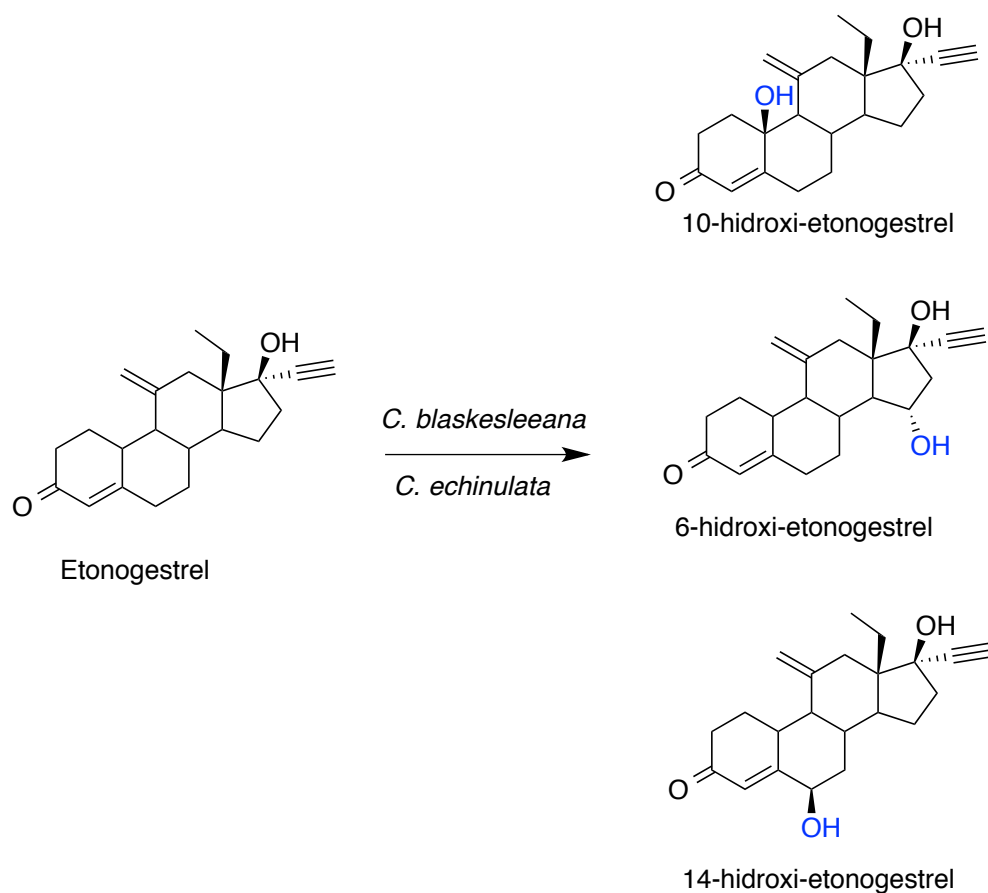
Figura 8 - Esquema de biotransformação de drospirenona por *C. elegans* ATCC 36114



Fonte: autor

As hidroxilações regio- e estereosseletivas podem ser claramente verificadas, também, no estudo do metabolismo do etonogestrel, um fármaco esteroidal contraceptivo, em que *C. echinulata* e *C. blakesleeana* foram empregados como biocatalisadores. Os produtos foram purificados em coluna cromatográfica, identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e caracterizados por Espectrofotometria de absorção na região do UV,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN e *HRESIMS* (Figura 9) (BAYDOUN *et al.*, 2016).

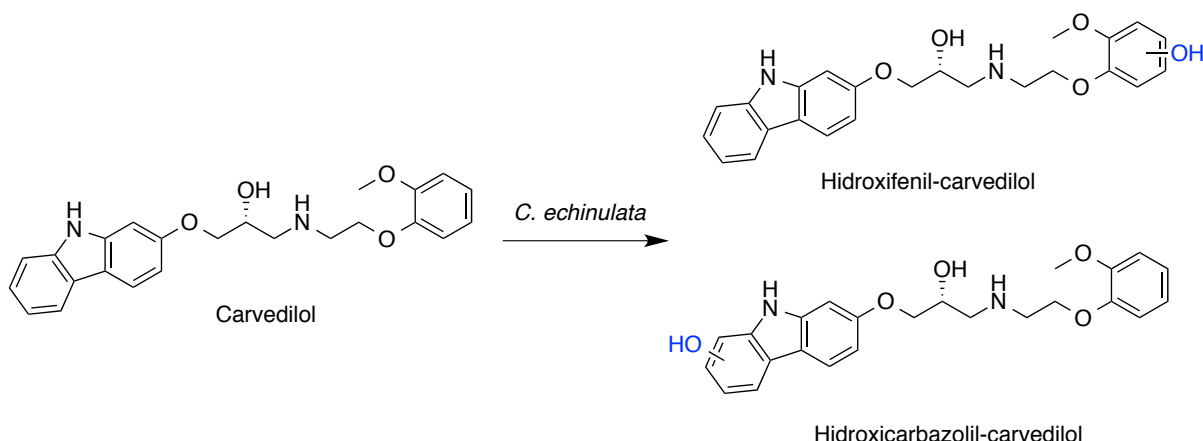
Figura 9 - Esquema de biotransformação de etonogestrel por espécies de *Cunninghamella*



Fonte: autor

*Cunninghamella* também foi capaz de catalisar a hidroxilação de carvedilol, medida pelas enzimas CYP (Figura 10), até então não relatada por metodologias microbianas e, apesar da toxicidade do substrato, o biocatalisador mostrou-se tolerante (ZAWADZKA *et al.*, 2017).

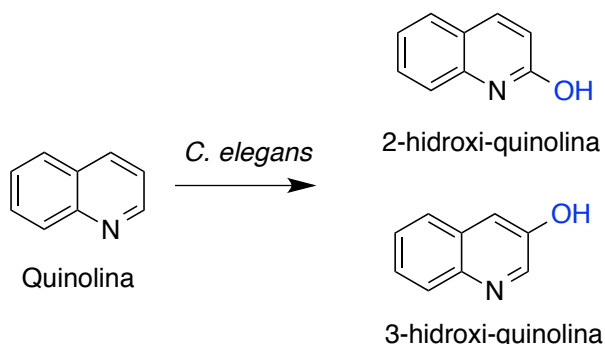
Figura 10 - Esquema de biotransformação de carvedilol por *C. echinulata*



Fonte: autor

2-hidroxiquinolina e 3-hidroxiquinolina foram obtidos da biotransformação de quinolina por *C. elegans* IM 1785/21Gp, em que o biocatalisador também apresentou alta tolerância ao substrato, verificando-se capacidade de crescimento mesmo em altas concentrações de quinolina. Os derivados foram analisados por CLAE-MS/MS e os autores comprovaram que *Cunninghamella* também é capaz de promover modificações moleculares em compostos *N*-heterocíclicos, além da *N*-oxidação descrita anteriormente na literatura (Figura 11) (SUTHERLAND *et al.*, 1994; FELCZAK *et al.*, 2016).

Figura 11 - Esquema de biotransformação de quinolina por *C. elegans* IM 1785/21Gp

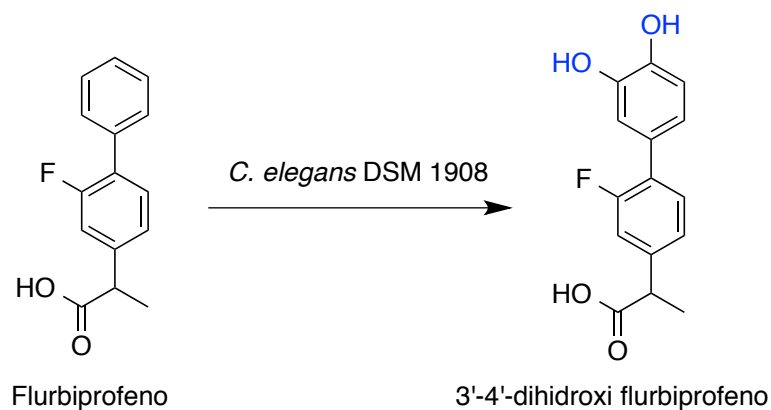


Fonte: autor

Derivados di-hidroxilados também são passíveis de serem obtidos por biotransformações catalisadas por espécies fúngicas (AMADIO *et al.*, 2010; SHAUGHNESSY *et al.*, 2014). Amadio e colaboradores (2010) obtiveram o 3',4'-

dihidroxi-flurbiprofeno a partir do estudo do metabolismo de flurbiprofeno por *C. elegans* DSM 1908. O derivado, identificado e caracterizado por CLAE and Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), respectivamente, está descrito na Figura 12.

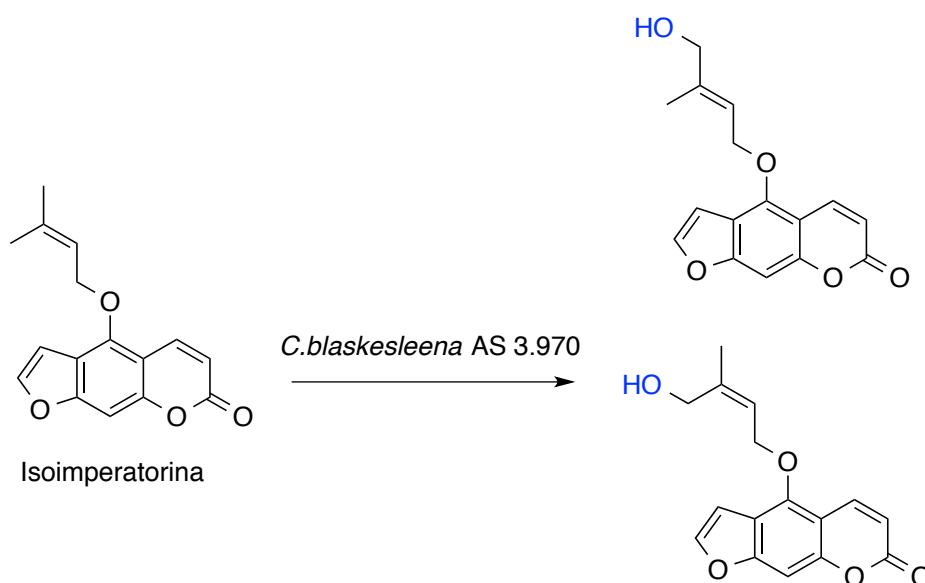
Figura 12 - Esquema de biotransformação de flurbiprofeno por *C. elegans* DSM 1908



Fonte: autor

A biotransformação de isoimperatorina catalisada por *C. blakesleeana* AS 3.970 também foi relatada, fornecendo dois produtos hidroxilados. Os derivados apresentam a mesma estrutura planar e a diferença está na configuração da ligação oléfica em C-2'' e C-3'' (Figura 13) (YANG *et al.*, 2013).

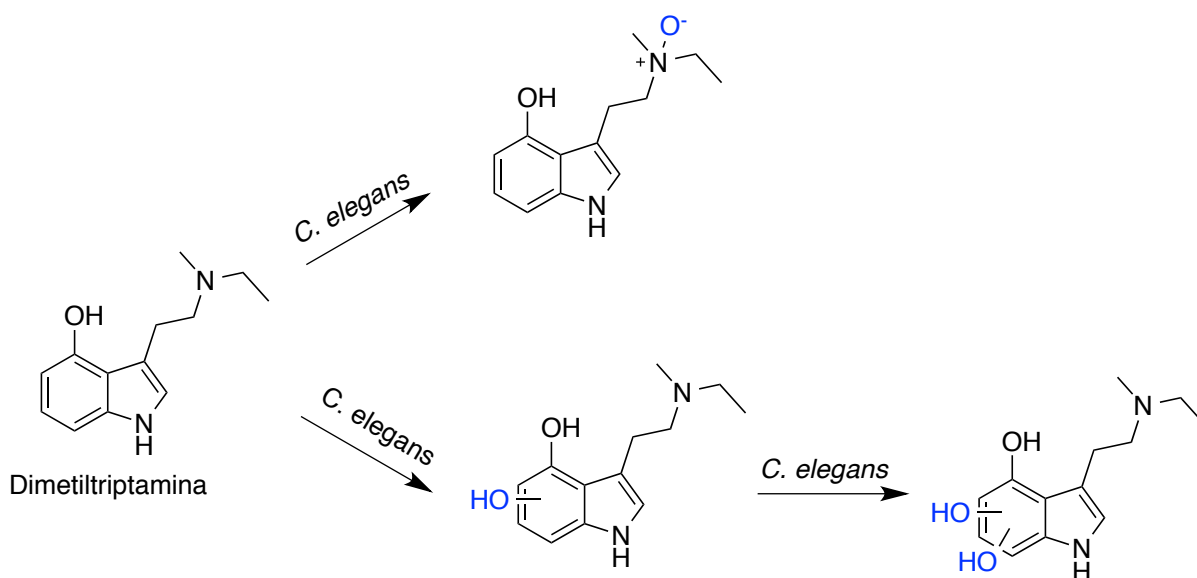
Figura 13 - Esquema de biotransformação de isoimperatorina por *C. blakesleena* AS 3.970



Fonte: autor

Já no estudo do metabolismo de triptaminas sintéticas, *C. elegans* foi empregada como modelo microbiano e as principais vias de biotransformação foram a monohidroxilação, a dihidroxilação e a *N*-oxidação (Figura 14) (GRAFINGER *et al.*, 2019).

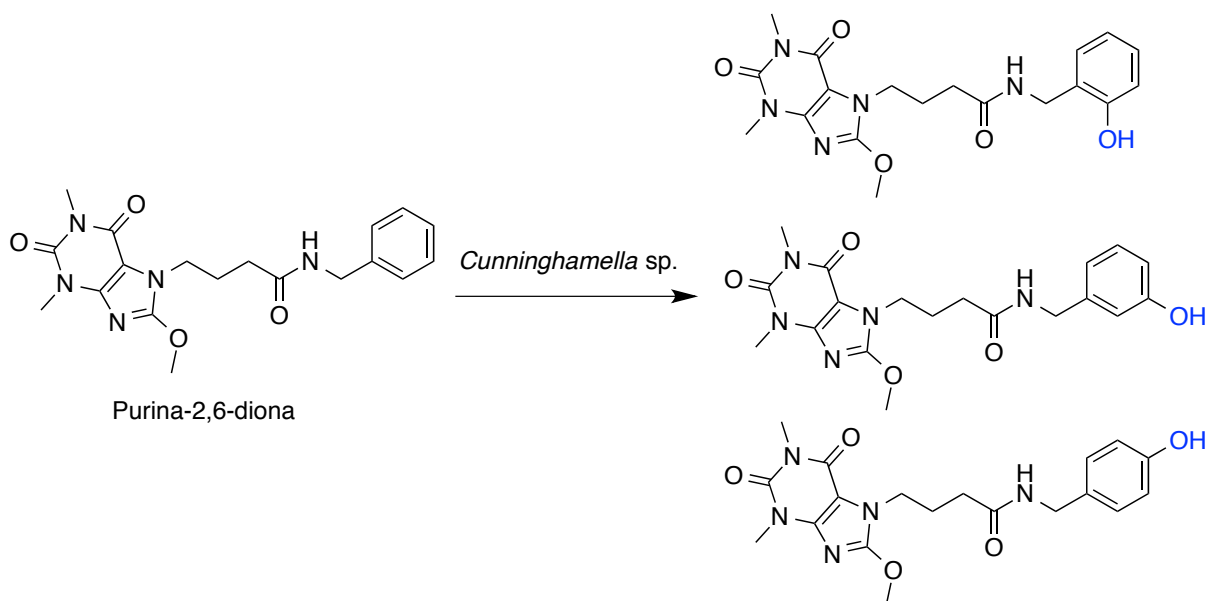
Figura 14 - Esquema de biotransformação de triptaminas sintéticas por *C. elegans*



Fonte: autor

Por fim, Marc e colaboradores (2018) empregaram espécies de *C. elegans*, *C. blakesleeana* e *C. echinulata* na biotransformação de derivados de purina-2,6-diona. Os compostos obtidos, caracterizados por CLAE-MS/MS, são produtos de hidroxilação aromática (Figura 15).

Figura 15 - Esquema de biotransformação de purina-2,6-diona por espécies de *Cunninghamella*



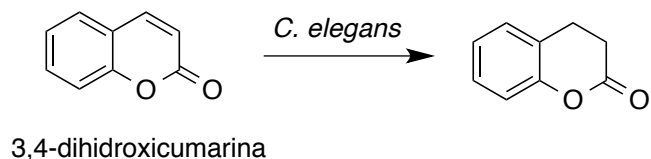
Fonte: autor

### 1.2.2 Reações de redução

As reações de redução compreendem as modificações estruturais por adição de hidrogênio em sistemas insaturados, ocorrendo frequentemente em grupamentos nitro, aldeído e cetonas. E, embora os CYP450 não participem das reduções biológicas de substratos endógenos, uma vez que as flavoproteínas catalisam este tipo de reação, a diversidade de reações de redução mediadas pelas enzimas CYP são consideráveis (GUENGERICH, 2001).

Attia e colaboradores (2016) obtiveram o derivado 3,4-dihidroxicumarina, confirmado por *GC-MS*, a partir da redução de cumarina por *C. elegans* (Figura 16).

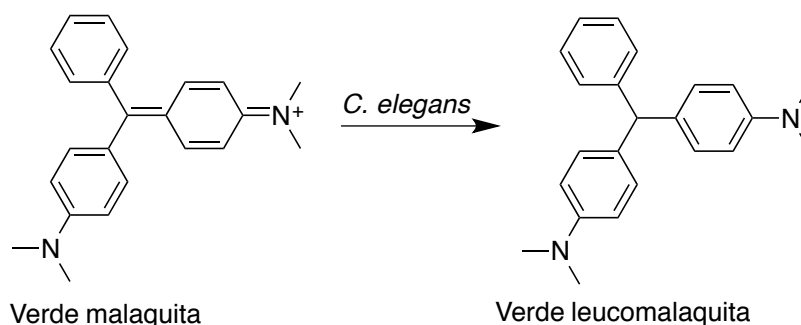
Figura 16 - Esquema de biotransformação de 3,4-dihidroxicumarina por *C. elegans*



Fonte: autor

Hussain *et al.* (2017) descreveram a redução do corante verde malaquita a verde leucomalaquita catalisada por *C. elegans*, na forma de biofilmes (Figura 17). Pelos testes microssomais, verificou-se que a reação é mediada pelas enzimas CYP450 fúngicas. Cha e colaboradores (2001) também verificaram o envolvimento das enzimas CYP, na redução deste corante por células livres de *C. elegans*, por ensaios de inibição com 1-aminobenzotriazol.

Figura 17 - Esquema de biotransformação de verde malaquita por *C. elegans*



Fonte: autor

A biotransformação de representantes aromáticos vitanolidos, catalisada por *C. elegans*, por sua vez, produziu derivados reduzidos em diferentes posições dos anéis constituintes, além de hidroxilados estereosseletivos e oxidados – derivados particularmente valiosos, não só pelo seu potencial biológico, mas também pela expansão em números e variedade de derivados (BASSO *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos no estudo acima mencionado mostraram, mais uma vez, que a aplicação de biotransformações fúngicas é uma ferramenta eficiente para a obtenção de diversidade estrutural, principalmente a partir de substratos pouco reativos como os vitanolidos (BASSO *et al.*, 2016).

## 1.3 REAÇÕES DE CONJUGAÇÃO

### 1.3.1 Glicosiltransferases e reações de glicosilação

As glicosilações de compostos bioativos, catalisadas, principalmente, por fungos filamentosos, juntamente com os glicosídeos obtidos, tem sido extensivamente estudados, frente às suas inúmeras vantagens, tais como as reações em uma única etapa e a produção ambientalmente amigável. O gênero *Cunninghamella* é frequentemente empregado como biocatalisador para estes tipos de reação e é uma ferramenta interessante para a produção de compostos com perfis farmacológicos melhorados (LI *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019; SPONCHIADO *et al.*, 2019).

As reações de glicosilação ocorrem em grupamentos hidroxila, ácidos carboxílicos e grupos sulfidrilas livres e são catalisadas por glicosiltransferases (SPONCHIADO *et al.*, 2019). As conjugações catalisadas por essa família de enzimas é uma importante via de detoxificação e de função homeostática em todos os organismos vivos, e, em geral, os glicosídeos são os metabólitos mais comumente encontrados no metabolismo fúngico de xenobióticos (PALCIC, 2011; BOCK, 2016; SPONCHIADO *et al.*, 2019).

As glicosiltransferases catalisam a formação da ligação glicosídica pela transferência de porções de açúcar de moléculas doadoras para agliconas específicas, com estritas regio- e estereosseletividades. Os aceptores podem ser tanto moléculas de açúcares, quanto proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, esteroides, e polifenóis, por exemplo (PALCIC, 2011; XU *et al.*, 2016; SORDON *et al.*, 2019).

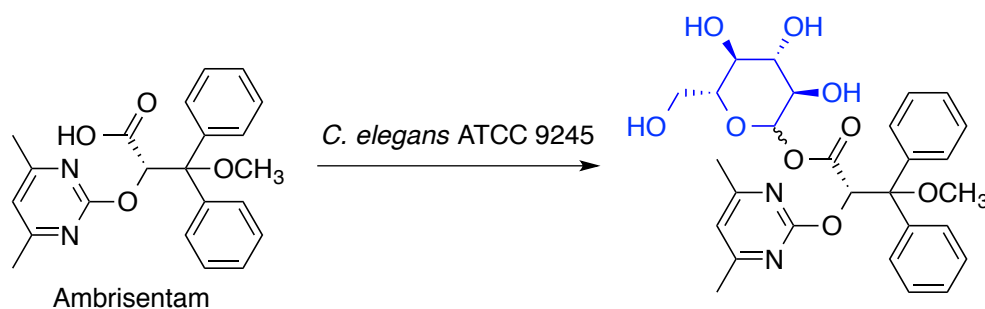
Algumas glicosiltransferases, especialmente aquelas isoladas de fontes microbianas fúngicas, apresentam baixa regioespecificidade quanto aos substratos. Dessa forma, tais microrganismos podem ser explorados como biocatalisadores efetivos na glicorandomização de produtos estruturalmente diversos (DAI *et al.*, 2018).

Embora algumas enzimas importantes já tenham sido purificadas e empregadas isoladas ou como extratos proteicos brutos nos processos conhecidos como biocatálise, o uso de células microbianas inteiras ainda fornece melhores resultados (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Dessa feita, as culturas microbianas são altamente vantajosas na catálise deste tipo de reação, uma vez que não apresentam a necessidade de isolamento e purificação das enzimas, tampouco de cofatores específicos (disponíveis nos organismos vivos); e as vias biossintéticas doadoras inteiras podem ser expressas nos próprios biocatalisadores (PALCIC, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2019; SORDON *et al.*, 2019).

Sponchiado e colaboradores (2019) relataram a obtenção do derivado glicosídeo, até então não descrito na literatura, a partir da biotransformação de ambrisentan catalisada por *C. elegans* ATCC 9245. O mecanismo apresentado neste estudo, esquematizado na Figura 18, propõe a formação do glicosídeo pela ação das glicosiltransferases fúngicas em uma reação direta num ácido carboxílico atuando como nucleófilo, na reação de esterificação (SPONCHIADO *et al.*, 2019).

Figura 18 - Esquema de biotransformação de ambrisentan por *C. elegans* ATCC 9245



Fonte: autor

Dados do estudo da glicosilação microbiana de tanshinona IIA (TIIA) – o maior constituinte bioativo de *Salvia multiorrhiza* – mostraram taxa de conversão maior que 95% por *C. elegans* AS 3.2028. Até então, muitos esforços tinham sido despendidos na tentativa de melhorar as propriedades farmacocinéticas e de solubilidade de TIIA, através de modificações moleculares clássicas, a exemplo de sulfonação, bromação e modificações no esqueleto fenantrenoquinona, que exigem condições reacionais adversas e reagente tóxicos. Os biocatalisadores, mais uma vez, demonstraram ser uma abordagem poderosa (LIANG *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Metiltransferases e reações de metilação

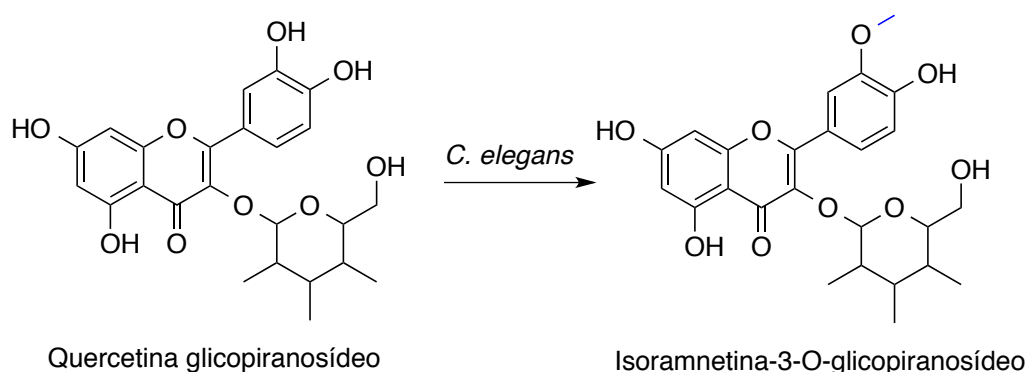
A introdução de um grupamento metila em subunidades amina, álcool ou sulfidrilas de compostos orgânicos é uma das mais importantes modificações moleculares e é ubíqua nas Químicas Orgânica e Medicinal. Geralmente, estes grupos são considerados quimicamente inertes, mas influenciam fortemente as propriedades farmacológicas dos compostos biologicamente ativos e tem um papel fundamental nos processos biológicos (BARREIRO E FRAGA, 2015; YAN *et al.*, 2015).

Geralmente, a *O*-metilação de grupamentos hidroxila de flavonóides diminui sua capacidade de eliminação de radicais livres – um dos mecanismos da atividade antioxidante, uma importante estratégia, portanto, para aumentar a estabilidade desta classe de compostos (KUMAR E PANDEY, 2013).

Os métodos sintéticos tradicionais baseiam-se na metilação de *O*-, *S*-, *C*- e *N*-nucleófilos, utilizando iodometano, dimetilsulfato, dimetilcarbonato e diazometano, por exemplo, como agentes eletrofílicos metilantes. Apesar de ainda muito utilizados industrial e academicamente, estes reagentes são perigosos e tóxicos e exigem ambientes reacionais fortemente básicos (YAN *et al.*, 2015). As biotransformações, então, seriam uma tecnologia economicamente competitiva e uma alternativa interessante de modificação molecular (PISKA *et al.*, 2016).

A *O*-metilação de quercetina-3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (também obtido a partir da biotransformação de quercetina) por *C. elegans* ATCC 9245 foi descrita por Zi e colaboradores (2011) (Figura 19). O derivado isoramnetina-3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi purificado por coluna cromatográfica, identificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e caracterizado por Espectrometria de Massas (EM).

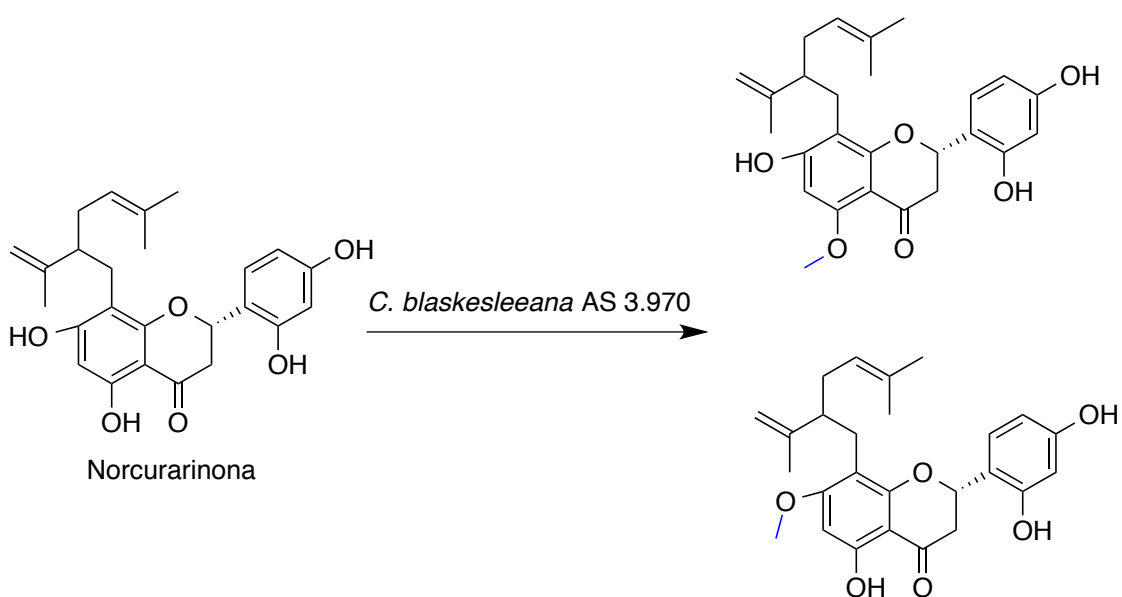
Figura 19 - Esquema de biotransformação de quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo por *C. elegans* ATCC 9245



Fonte: autor

Ao se considerar os flavonoides como exemplo, temos que as biotransformações microbianas majoritariamente acontecem nos anéis A e B do esqueleto básico dessa classe de compostos e, essencialmente, dentre as reações mais recorrentes estão a *O*-metilação e, menos frequentemente, a *C*-metilação (PATEL 2006; CAO *et al.*, 2015). *C. blakesleeana* AS 3.970 foi satisfatoriamente empregada na biotransformação de norcurarinona a curarinona e 7-metoxinorcurarinona – 2 derivados *O*-metilados (Figura 20).

Figura 20 - Esquema de biotransformação de norcurarinona por *C. blakesleeana* AS 3.970



Fonte: autor

### 1.3.3 *N*-acetiltransferases e reações de *N*-acetilação

As *N*-acetiltransferases (NATs) catalisam a transferência da porção acetil ( $-\text{COCH}_3$ ) da acetil coenzima A (acetil-CoA) para uma amina primária de substratos aceitadores, que vão desde moléculas pequenas como os aminoglicosídeos a macromoléculas, incluindo as proteínas. As NATs são responsáveis pela biotransformação de aminas aromáticas e aminas heterocíclicas, incluindo fármacos e alguns importantes carcinógenos ambientais (ZHANG *et al.*, 2019).

NATs microbianas haviam sido estudadas quanto ao seu envolvimento em rotas de metabolismo fúngicas, por exemplo, sendo mais recentemente atribuído a elas, também, um papel endógeno. Ademais, sua atividade em fungos tem um potencial especial para as biorremediações (ZHANG *et al.*, 2019).

As espécies de *Cunninghamella* são biocatalisadores eficientes deste tipo de reação e há inúmeros relatos de derivados *N*-acetilados em biotransformações microbianas (PISKA *et al.*, 2016; MURPHY *et al.*, 2019).

*C. echinulata* ATCC 9244 foi satisfatoriamente empregada como modelo do metabolismo de mamíferos, quando da produção dos metabólitos *N*-acetil-anfetamina e *N*-acetilbenzilamina, a partir dos fármacos deprenil e pargilina (COUTTS *et al.*, 1981).

*N*-acetildidemetildoxepina e *N*-acetil-*N*-demetildoxepina também foram obtidos através da biotransformação de doxepina por *C. elegans* (MOODY *et al.*, 1999).

Muitos relatos na literatura descrevem espécies de *Cunninghamella* empregadas como biocatalisadores de reações de *N*-acetilação a partir de substratos como silegilina (SHIN, 1997), fenacetina (REDDY *et al.*, 1990; NICHOLLS *et al.*, 2006), difenidramina (MOODY *et al.*, 2000; AKUTSU *et al.*, 2007) e mosaprida (SUN *et al.*, 2009).

### 1.4 EXPERIMENTOS DE INIBIÇÃO DO CYP450

O comprometimento de qualquer uma das etapas do ciclo catalítico do CYP450 pode levar à inibição da atividade enzimática, sendo as etapas "ligação do substrato à forma férrica do grupo prostético da enzima", "ligação de oxigênio molecular" e "oxigenação do substrato" particularmente mais vulneráveis à inibição (LIN E LU, 1998).

De forma geral, o mecanismo de inibição do CYP450 pode ser dividido em inibição reversível, inibição *quasi*-irreversível e inibição irreversível. Destas, a inibição reversível é provavelmente o mecanismo mais comum para as interações de fármacos documentadas (LIN E LU, 1998).

Os inibidores reversíveis podem tanto se ligar ao grupo prostético heme das enzimas CYP, quanto às suas regiões lipofílicas e, quando isto acontece simultaneamente, a inibição é conhecidamente mais eficiente (LIN E LU, 1998).

A inibição deste tipo de enzima é uma resposta quase imediata à exposição a um agente inibidor e, em termos mecanísticos, as interações reversíveis surgem como resultado da competição pelo sítio ativo do CYP e, provavelmente, envolver apenas o primeiro passo do ciclo catalítico. Além disso, é uma estratégia amplamente utilizada quando se deseja aumentar a biodisponibilidade de um fármaco, sua exposição e eficácia (LIN E LU, 1998; MERINO *et al.*, 2003).

Devido ao enorme número de fármacos e xenobióticos metabolizados pela subfamília CYP3A, é mais provável que existam muitos destes agindo como inibidores, que compartilham entre si características comuns, como a lipofilicidade e o tamanho molecular relativamente grande. São vários os mecanismos de inibição possíveis e alguns destes compostos podem exibir mais de um tipo (LIN E LU, 1998; THUMMEL E WILKINSON, 1998; ONG *et al.*, 2000).

As inibições competitivas e não-competitivas podem ser resultado de uma ligação direta, reversível e rápida entre o agente inibidor e o sítio do CYP3A, em que a eficiência de inibição é determinada pelas constantes de ligação entre substrato-inibidor e pela concentração do inibidor (LIN E LU, 1998; THUMMEL E WILKINSON, 1998; ONG *et al.*, 2000).

Outro mecanismo de inibição é a formação de complexos com compostos *N*-alquila-substituídos, caracterizando uma inibição reversível, devido à oxidação do inibidor. Isto leva à geração de "complexos lentamente reversíveis" com o grupo prostético heme reduzido da molécula CYP3A, sendo observada, dessa maneira, a persistência da inibição além da exposição ao inibidor, já que, embora reversível, o tempo de vida do complexo geralmente é muito longo (LIN E LU, 1998; THUMMEL E WILKINSON, 1998; ONG *et al.*, 2000).

Os estudos de inibição associados a biotransformações diminuem a atividade catalítica enzimática e fornecem informações acerca das enzimas envolvidas no metabolismo primário e sua especificidade, ao passo que a indução demonstra o aumento desta atividade – a principal consequência de um aumento na respectiva expressão gênica e/ou diminuição de degradação proteica (GRANT *et al.*, 1987; VON MOLTKE *et al.*, 2001; VELÍK *et al.*, 2004).

Agentes antifúngicos imidazólicos são reconhecidamente potentes ligantes do átomo de ferro das enzimas CYPs e caracterizam-se por inibição não-competitiva, característica dos azóis (ONG *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002).

## 1.5 BIOTRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS

As biotransformações podem ser entendidas como modificações moleculares específicas de um substrato, promovidas por catalisadores biológicos, cujo produto apresentará similaridade estrutural com o composto de partida. Enzimas isoladas e microrganismos – inteiros ou inativados – podem ser aplicados como biocatalisadores (HEGAZY *et al.*, 2015).

Tal ferramenta pode servir de alternativa tanto para a síntese química clássica, quanto para as biotransformações *in vivo*, uma vez que os biocatalisadores, a exemplo dos fungos filamentosos, são capazes de produzir derivados funcionalizados e mimetizar o metabolismo de mamíferos, pelas reações de Fase I (oxidação, redução e hidrólise) e Fase II (conjugação) (FURA *et al.*, 2004; ASHA E VIDYAVATHI, 2009; CUSACK *et al.*, 2013; HEGAZY *et al.*, 2015).

Esses microrganismos possuem enzimas similares ao sistema CYP450 dos mamíferos, essencial para as reações de Fase I e II (SEVIOR *et al.*, 2012), e outras enzimas associadas à conjugação, como, por exemplo sulfotransferases e glicosiltransferases (ASHA E VIDYAVATHI, 2009; AMADIO *et al.*, 2010).

As maiores vantagens associadas às biotransformações microbianas devem-se ao fato de possuírem a habilidade de produção seletiva de metabólitos e produtos de degradação, em condições brandas de reação, tais como pH próximo à neutralidade, temperatura ambiente e pressão atmosférica (WOODLEY, 2008; HEGAZY *et al.*, 2015).

Em adição, os biocatalisadores são altamente específicos – regio e enantiomericamente. Assim, muitos microrganismos podem ser empregados, de uma maneira muito versátil, na catálise de biotransformações extremamente específicas, a partir de substratos pouco onerosos, e viabilizar reações inexecutáveis por métodos sintéticos tradicionais. Além disso, devido ao seu metabolismo restrito, acontecem menos reações colaterais (FABER, 2011; HEGAZY *et al.*, 2015)

As culturas microbianas, ainda, apresentam atividade enzimática mais expressiva, estabilidade a longo prazo, facilidade de escalonamento, manutenção simples e não-onerosa e triagem fácil e reprodutível (CUSACK *et al.*, 2013; PERVAIZ *et al.*, 2013; HEGAZY *et al.*, 2015). Essas características fazem das biotransformações uma estratégia ambientalmente amigável e industrialmente desejável, assumindo um papel fundamental, também, na Química Verde (HEGAZY *et al.*, 2015).

Desvantagens também estão associadas às reações catalisadas por microrganismos quando as enzimas advindas de fontes naturais estão disponíveis apenas em uma forma enantiomérica. Assim, quando há a necessidade de produção do outro enantiômero, demanda-se um caminho incerto na busca de sistemas enzimáticos com seletividade estereoquímica exatamente oposta (FABER, 2011).

Noda *et al.* (2017) e Wang *et al.* (2018) destacam a importância da produção microbiana como estratégia para a obtenção de inúmeros compostos químicos produzidos a partir de fontes renováveis. Os compostos aromáticos, em particular, possuem, geralmente, o petróleo como matéria-prima e, frente aos problemas ambientais e a oferta limitada de combustíveis fósseis, a produção microbiana pode permitir a independência desses recursos e prevenir o aquecimento global, por exemplo.

A produção microbiana também mostra-se altamente vantajosa, quando permite o emprego de resíduos agroindustriais e outras fontes de matérias-primas menos dispendiosas – o que reduz custos de produção e a contaminação ambiental (SAINI E KEUM, 2017; GHAFAR *et al.*, 2018; KOLLER, 2018), o desenvolvimento de metodologias de triagem de alta produtividade (*High-throughput Screening*) (DUARTE *et al.*, 2017; PREETI *et al.*, 2017), o aumento para escalas industriais (WANG, *et al.*, 2018) e altos rendimentos de bioprodutos a partir de tecnologias de engenharia

genômicas (CRUZ *et al.*, 2017; NEVALAINEN *et al.*, 2018; SCHAERLI, 2018; WOODLEY, 2018).

Os rápidos avanços da biologia molecular tem facilitado enormemente o uso de células inteiras e tipos selvagens de microrganismos, por exemplo. Essas fontes microbianas advindas de ambientes naturais possuem, frequentemente, mais de 4.000 genes, que podem diminuir o rendimento das biotransformações e/ou estereosseletividades devido à competição enzimática (FABER, 2011).

A aplicação de células recombinantes superexpressando as proteínas catalíticas requeridas torna esta fração dominante no proteoma e, dessa maneira, as reações colaterais tornam-se insignificantes. É possível, ainda, eliminar completamente enzimas concorrentes, desde que não sejam imprescindíveis para o metabolismo microbiano primário (FABER, 2011).

### **1.5.1 Diversificação estrutural**

As biotransformações podem ser consideradas como uma técnica eficiente e complementar à síntese orgânica clássica para a produção de compostos estruturalmente diversificados e que apresentam uma extensa gama de atividades biológicas (DAI *et al.*, 2008; ZAFAR *et al.*, 2016).

O arsenal enzimático microbiano promove inúmeras reações importantes nas estruturas químicas dos substratos, tendo como resultado várias classes de compostos, diversos grupos funcionais e moléculas complexas naturais e não-naturais, além da alta diversidade química independente do metabolismo (DAI *et al.*, 2008; LI E LOU, 2018).

Embora os métodos químicos mostrem-se muitas vezes úteis na produção de derivados funcionalizados, essas técnicas podem apresentar limitações no caso de substratos lábeis ou que requerem proteção. Assim, a geração biocatalítica de derivados oferece uma série de vantagens quando comparada com a síntese química convencional (DAI *et al.*, 2008).

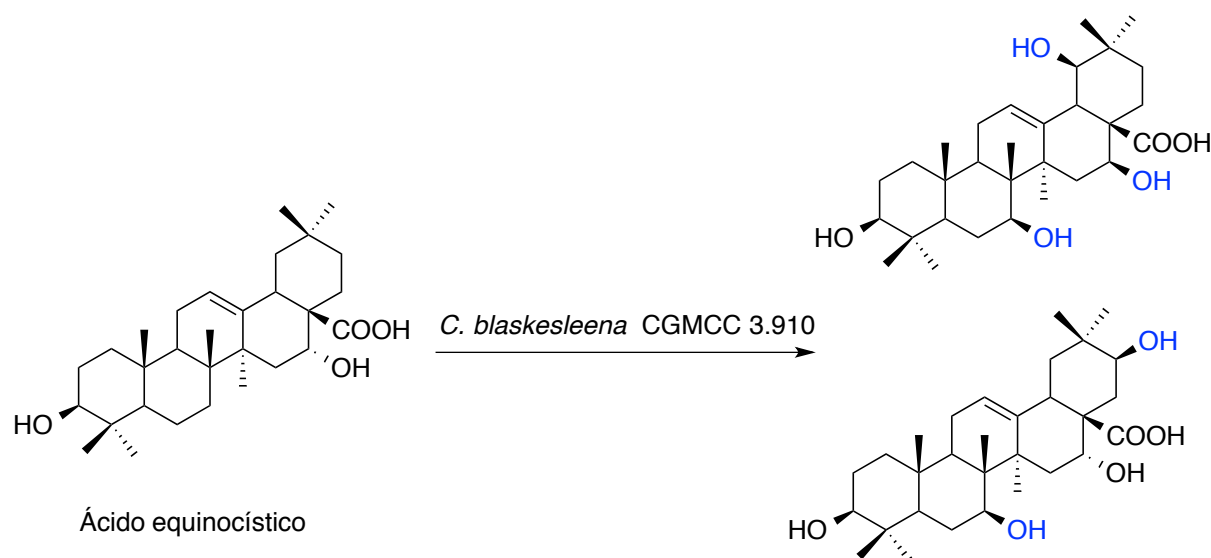
Quando os biocatalisadores microbianos são aplicados isoladamente ou combinados com outras técnicas de biotransformação, permitem o acesso a derivados não facilmente disponíveis por meios sintéticos clássicos, o uso de substratos

complexos e a formação de produtos com notáveis regio- e estereosseletividade e não disponíveis naturalmente (ZAFAR *et al.*, 2016; LI E LOU, 2018).

Os microrganismos são capazes de catalisar inúmeros tipos de reações químicas e tal abordagem enzimática poderia produzir diretamente não só numerosos compostos, mas também gerar potenciais alternativas e “inspirações” para posteriores modificações moleculares (DAI *et al.*, 2008).

Fu e colaboradores (2018) descreveram a obtenção de 2 derivados inéditos do ácido equinocístico, além de outros 2 já descritos na literatura, a partir da biotransformação catalisada por *C. blakesleena* CGMCC 3.910 (Figura 21). O composto de partida deste estudo apresenta complexidade estrutural frente aos seus cinco anéis hexatômicos, muitas ligações C-H saturadas e ligações sp<sup>3</sup> inativas, impossibilitando a síntese clássica, especialmente regio- e estereosseletiva, de derivados hidroxilados, por exemplo. A biotransformação, então, mostrou-se altamente vantajosa quando tornam os substratos passíveis de modificação molecular e de triagem de *leads* (FU *et al.*, 2018).

Figura 21 - Esquema de biotransformação de ácido equinocístico por *C. blakesleena* CGMCC 3.910



Fonte: autor

### **1.5.2. Estudos de metabolismo utilizando modelos microbianos do metabolismo animal**

O metabolismo de fármacos, xenobióticos e muitos compostos endógenos facilita a eliminação, desintoxicação e excreção – como produtos de biotransformação – de uma miríade de compostos estruturalmente diversos (RYDEVIK, 2014; MACKENZIE *et al.*, 2017).

O estudo do metabolismo é um aspecto essencial do processo de desenvolvimento de fármacos, visto que permite uma compreensão mais apurada em relação às características do candidato e de sua segurança e eficácia, bem como um melhor entendimento sobre mecanismo de ação, toxicidade, distribuição e acumulação no organismo, além das possíveis interações medicamentosas, por exemplo (ASHA E VIDYAVATHI, 2009; BARREIRO E FRAGA, 2015; BANDU E KIM, 2016; DUBE E KUMAR, 2017; UNDERHILL E KHETANI, 2018).

Tradicionalmente, os estudos *in vivo* de metabolismo de fármacos, em que metabólitos são analisados e identificados em plasma, tecidos selecionados, órgãos perfundidos, bile e urina, baseiam-se no uso de animais inteiros, especialmente modelos pequenos de animais de laboratório, como ratos, cães, gatos e coelhos (LIU E JIA, 2007; ASHA E VIDYAVATHI, 2009; DE PAULA *et al.*, 2015; MURPHY, 2015; DUBE E KUMAR, 2017; SPONCHIADO *et al.*, 2019).

O Citocromo P450 desempenha um papel notável no metabolismo de fármacos e xenobióticos e representa a classe de enzimas mais importante no metabolismo de Fase I (DUBE E KUMAR, 2017).

As biotransformações microbianas podem, então, ser usadas como ferramenta suplementar para mimetizar e prever o destino do metabolismo oxidativo dos mamíferos, mecanismo de ação e toxicidade de agentes farmacêuticos e outros xenobióticos, através de um modelo biológico *in vitro*, minimizando, assim, o uso de animais e seres humanos (MURPHY, 2015; ATTIA *et al.*, 2016; HAN E LEE, 2016; DUBE E KUMAR, 2017).

Uma das grandes vantagens associadas à aplicação desses modelos no estudo de metabolismo é a superação de vários entraves relacionados ao baixo rendimento,

alto custo, variações interespecie, controvérsias éticas, toxicidade e impureza de metabólitos (ASHA E VIDYAVATHI, 2009; DE PAULA *et al.*, 2015; ATTIA *et al.*, 2016).

O uso de modelos microbianos na predição do metabolismo de mamíferos destaca-se, frente ao uso de animais, em virtude da simplicidade, facilidade e preço mais acessível; da possibilidade e reprodutibilidade de triagem de um grande número de cepas; das quantidades de metabólitos formados, o que favorece sua detecção, isolamento e caracterização estrutural; do isolamento de novos metabólitos e das especificidades regio e estereosseletiva. Além disso, a manutenção de coleções microbianas é menos onerosa que a de culturas de células e tecidos e a de animais de laboratório (ASHA E VIDYAVATHI, 2009; PISKA *et al.*, 2016; FOGAÇA *et al.*, 2017).

Atualmente, muitos modelos microbianos para o estudo do metabolismo são compostos por fungos, entre os quais espécies de *Cunninghamella* são as mais comumente empregadas (ASHA E VIDYAVATHI, 2009; PISKA *et al.*, 2016; DUBE E KUMAR, 2017).

Há inúmeros estudos que mostram que espécies de *Cunninghamella* produzem metabólitos de mamíferos a partir de diferentes substratos, por exemplo carvedilol (ZAWADZKA *et al.*, 2017), diazepam (DE PAULA *et al.*, 2015), bromexina (DUBE E KUMAR, 2017),  $\lambda$ -cialotrina (PALMER-BROWN *et al.*, 2018), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (GHOSAL *et al.*, 2016), flurbiprofeno (AMADIO *et al.*, 2013; QUINN *et al.*, 2015), efedrina (FOGAÇA *et al.*, 2017), flutamida (AMADIO E MURPHY, 2011; MURPHY *et al.*, 2019), ciazofamida (LEE *et al.*, 2016), fenitrotona (ZHU *et al.*, 2017) e ácido fusídico (IBRAHIM E RAGAB, 2018).

Palmer-Brown e colaboradores (2017) avaliaram o metabolismo de vários ácidos carboxílicos da fenilpiridina a partir da incubação com o fungo *C. elegans* e compararam-no com biotransformações realizadas com microsomas hepáticos de ratos. Concluiu-se que o conjunto de células fúngicas é mais resistente aos efeitos inibitórios dos substratos em estudo, ressaltando a eficácia do sistema biológico para a avaliação *in vitro* do metabolismo de xenobióticos (PALMER-BROWN *et al.*, 2017).

Centenas de estudos de biotransformação foram realizadas com estes modelos e inúmeras atividades biológicas, já investigadas (PISKA *et al.*, 2016; B *et al.*, 2018).

### 1.5.3. Biorremediação

Biorremediação é o termo utilizado para designar o uso de microrganismos na degradação de compostos tóxicos ou contaminantes ambientais, transformando-os em substâncias inócuas. Processos industriais e práticas agrícolas, por exemplo, tem como resultado a liberação deliberada ou acidental de substâncias químicas potencialmente tóxicas no meio ambiente, podendo ser transportadas através da atmosfera, da água ou depositados no solo (BRAR *et al.*, 2006; HARMS *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2018).

Atualmente, processos físicos, químicos e biológicos – isolados ou em associação – estão disponíveis para serem empregados no tratamento e gerenciamento desses resíduos. Todavia, alguns métodos físico-químicos são altamente onerosos e acabam apresentando problemas inerentes de contaminação secundária e controle não-sustentável (BRAR *et al.*, 2006).

Para se tornarem biologicamente degradáveis ou desintoxicáveis, os contaminantes ambientais precisam ser expostos a catalisadores microbianos adequados, que suportem possíveis condições e ambientes extremos (secos, tóxicos ou ácidos) (HARMS *et al.*, 2011). A biorremediação é a rota mais sustentável e verde para a limpeza de ambientes contaminados e os fungos são um constituinte importante deste ecossistema (DESHMUKH *et al.*, 2016).

Os fungos apresentam características importantes nesse aspecto, já que seus habitats aquáticos e terrestres estão fortemente expostos a substâncias químicas antropogênicas, das quais as orgânicas podem suprir adequadamente as suas necessidades nutricionais e as inorgânicas servir de micronutrientes naturais. Além disso, apresentam extensas capacidades metabólicas, podendo atuar como biocatalisadores eficientes na remediação de solos, água e ar poluídos (HARMS *et al.*, 2011).

O complexo oxidativo e o sistema enzimático dos fungos atuam diretamente no sentido de detoxificar compostos tóxicos e poluentes no meio ambiente e, geralmente, pertencem a famílias como as monoxigenases do Citocromo P450, servindo como catalisadores versáteis na oxidação regio- e estereoespecífica de hidrocarbonetos não ativados e como substitutos para os catalisadores químicos (DESHMUKH *et al.*, 2016).

As CYPs fúngicas mostraram grande sucesso nas atividades de degradação de PAHs e outros poluentes, mesmo aqueles de alto peso molecular, em adição à sua capacidade de degradar simultaneamente vários outros tipos de substâncias tóxicas (CHEN *et al.*, 2014; BHATTACHARYA E YADAV, 2018). A capacidade de alguns fungos de degradar a lignina, também associada às atividades do CYP, acentuam seu interesse em relação à biorremediação comercial (CHEN *et al.*, 2014).

Malandain e colaboradores (2010) verificaram o envolvimento da isoforma CYP2C9 fúngica na degradação de aditivos de gasolina (éter metil-terc-butílico (MTBE), éter etil-terc-butílico (ETBE) e éter metil-terc-amílico (TAME)). Tanto o MTBE, quanto o ETBE, são altamente solúveis em água e geralmente recalcitrantes à biodegradação. O primeiro sistema monooxigenase capaz de degradar o ETBE e caracterizado a nível fisiológico e genético foi uma monooxigenase do Citocromo P450 (MALANDAIN *et al.*, 2010).

A biorremediação do corante verde malaquita, presente frequentemente em águas residuais de vários processos industriais – indústrias têxtil, de alimentos, de papel e curtumes, por exemplo – foi satisfatoriamente alcançada por culturas de *C. elegans*. O tratamento deu-se tanto por adsorção, quanto por biodegradação, sendo a completa remoção observada em 24 horas, e a atribuição à mediação por enzimas CYP deu-se por ensaios microssomais (HUSSAIN *et al.*, 2017).

*C. elegans* ATCC 36112 foi capaz de degradar 81% de fenitrotona, um inseticida organofosforado em cinco dias de remediação, o que comprova, novamente, seu potencial para a aplicação em biorremediações. Além disso, os metabólitos humanos obtidos neste estudo ajudaram a elucidar o metabolismo deste substrato e avaliar sua toxicidade e possíveis efeitos adversos à saúde humana (ZHU *et al.*, 2017).

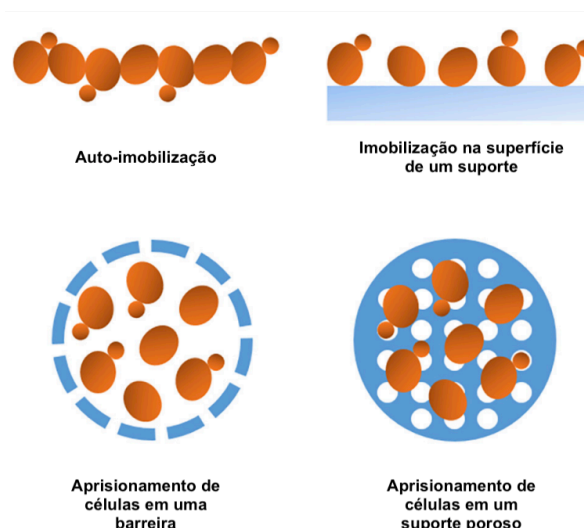
Vários avanços tecnológicos foram alcançados na área de biorremediação empregando fungos como catalisadores. A imobilização, por exemplo, aumenta a estabilidade enzimática, aumentando, assim seu prazo de validade e, portanto, levando à reutilização das células microbianas (DESHMUKH *et al.*, 2016).

#### 1.5.4. Imobilização fúngica

Os biofilmes são definidos como comunidades cooperantes e bem-montadas de microrganismos associados a uma superfície, capazes de desempenhar funções catalíticas mais variadas, devido à menor susceptibilidade à toxicidade dos substratos (HARDING *et al.*, 2009; HAYAT *et al.*, 2017; MIKUŠOVÁ *et al.*, 2018). Este processo de imobilização celular é empregado, por exemplo, em organismos fúngicos, geralmente, a fim de preservar sua atividade catalítica e aumentar a sua usabilidade (GEOFFRY E ACHUR, 2018).

A imobilização é um termo genérico empregado na descrição de várias maneiras de fixação, encapsulamento ou aprisionamento de células ou enzimas em um suporte sólido, ou ainda a auto-imobilização (Figura 22). Mais especificamente, essa adesão celular dá-se por meio de ligações naturais ou físico-químicas (CORTEZ *et al.*, 2017; MORENO-GARCÍA *et al.*, 2018).

Figura 22 - Métodos básicos de imobilização celular baseados na localização da célula fúngica



Adaptado de MORENO-GARCÍA (2018)

Na microbiologia, a existência de comunidades multicelulares associadas a uma superfície é extremamente comum e a adesão celular é uma habilidade complexa encontrada na maioria das células dos reinos biológicos. Nessas formações, as células constituintes estão envolvidas e unidas por uma matriz extracelular, que, em geral, é

composta por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (GUTIÉRREZ-CORREA *et al.*, 2012; ZARNOWSKI *et al.*, 2014; SHARMA E CHOWDHARY, 2017).

Esta matriz representa várias funções, incluindo coesão celular, estrutura da comunidade, recursos nutricionais e resistência contra xenobióticos, por exemplo (ZARNOWSKI *et al.*, 2014).

Os fungos são especialmente adaptados para o crescimento em superfície, pelo seu próprio modo de nutrição absorptiva, secreção de enzimas extracelulares na catálise de moléculas complexas, afinidade natural para anexar às estruturas e crescimento de hifa apical (HARDING *et al.*, 2009). A maioria dos fungos filamentosos constroem redes densas, flexíveis, complexas e tridimensionais em culturas imobilizadas, de maneira similar à formação de biofilmes bacterianos (MIQUEL GUENNOC *et al.*, 2017).

Frente ao aumento da resistência a estresses químicos, físicos e biológicos, os biofilmes são, frequentemente, percebidos como um problema, tanto em âmbitos médicos, quanto industriais. Todavia, há inúmeros relatos na literatura destacando que essas mesmas características fazem deles plataformas biocatalíticas atrativas, já que são capazes de suportar condições mais extremas que as células livres (WINN *et al.*, 2012; QUINN *et al.*, 2015).

Outras desvantagens notadas em estratégias de imobilização celular são crescimento exacerbado da massa fúngica, o que pode comprometer a integridade da matriz imobilizadora, a absorção de nutrientes e transferência de massa; a escolha equivocada do suporte, que pode acarretar, por conseguinte, a difusão entre células e meio de cultura, além de problemas de fornecimento de oxigênio, que direcionam a técnica para processos anaeróbios (EŞ *et al.*, 2015).

Todavia, na forma de biofilmes, os fungos beneficiam-se de uma alta taxa de crescimento, alta densidade celular, maior produção de enzimas extracelulares e compostos bioativos próprios do metabolismo e aumento da atividade catalítica, bem como melhor receptividade ao controle de processo, facilidade de purificação e custos mais baixos de recuperação de produtos, maior estabilidade e aumento de escala para aplicações industriais (KALIEVA *et al.*, 2017; GEOFFRY E ACHUR, 2018; MUNCK *et al.*, 2018).

Um outro aspecto de interesse biotecnológico para a aplicação de células fúngicas imobilizadas é a capacidade de excreção aumentada quando a biomassa

fúngica é cultivada anexada a um suporte (MUSONI *et al.*, 2015), sugerindo uma maior capacidade de metabolismo e produtividade e/ou aumento da atividade enzimática em biofilmes (AMADIO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; DE MELO SOUZA *et al.*, 2016; KALIEVA *et al.*, 2017).

Spennati e colaboradores (2018) avaliaram a performance e a estabilidade de comunidades fúngicas, imobilizadas em cubos de espumas de poliuretano, para o tratamento de taninos em biorreatores. Neste trabalho, os biofilmes de *Aspergillus tubingensis* MUT990 permaneceram estáveis e ativos por 5 meses em operações sob condições não-estéreis e seu desempenho em biorreatores mostrou-se promissor.

A alta atividade enzimática por um longo período de tempo também foi observada na imobilização de *Aspergillus niger* em hastes de bases arredondas. Verificou-se, também, que a atividade enzimática foi consideravelmente aumentada e o sistema imobilizado mostrou uma estabilidade significativa em comparação com o cultivo livre (KALIEVA *et al.*, 2017).

De Melo Souza e colaboradores (2016) destacaram os efeitos sobre a atividade enzimática e a estabilidade como exemplos das principais vantagens associadas ao uso de conjuntos imobilizados.

A imobilização celular pode também, por sua vez, minimizar ou solucionar problemas relacionados à reutilização do biocatalisador (MURPHY *et al.*, 2019). Quinn e colaboradores (2015) otimizaram a aplicação de biofilmes de *C. elegans* através de etapas de rejuvenescimento – a exemplo da adição de meio de cultura fresco – que permitem que o fungo filamentosos seja ativo por mais tempo, na produção semicontínua do metabólito hidroxiflurbiprofeno. A mesma estratégia foi utilizada por Souza (2015) e Freitas *et al.* (2017).

Na reação de redução de citronelal a citronelol a partir dessas ferramentas microbianas, a imobilização fúngica foi considerada uma alternativa à toxicidade do substrato e apresentaram-se como uma estratégia para otimização do processo, considerando a volatilidade do substrato, formação de subprodutos, imiscibilidade e baixos rendimentos do produto (VELANKAR E HEBLE, 2003). Velankar e Heble (2003) destacam, ainda, como vantagens das células imobilizadas, sua separação e reutilização mais fáceis, manutenção de concentrações celulares mais altas e estabilização de várias funções celulares.

Considerando o sistema enzimático CYP450, a atividade catalítica desta superfamília é consideravelmente maior em sistemas fixados em suportes imobilizadores e, quando imobilizados, apresentam uma ótima reusabilidade e um tempo de meia-vida otimizado – por exemplo, quando imobilizado, o CYP102 apresentou meia-vida de 29 dias, a 25 °C, frente aos 2 dias quando na forma livre. Além disso, apresentam estabilidade aumentada quando comparados com sistemas livres contendo CYPs (KUMAR, 2010; YANG *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2016).

Lamb e colaboradores (1998) estudaram a imobilização do CYP450, juntamente com redutases NADPH, em uma emulsão óleo-água, conhecida como polyaphron. O sistema CYP imobilizado apresentou capacidade catalítica aumentada por volta de 5 vezes. Este resultado mostra que o CYP450 se torna “superativo” na imobilização, fenômeno também observado na imobilização de outras enzimas (LAMB *et al.*, 1998).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho consiste em utilizar as espécies de *Cunninghamella*, nas formas livre e imobilizada, como biocatalisador na geração de derivados quimiodiversos do flavonóide morina, modelo microbiano do metabolismo animal da benzodiazepina clonazepam e biorremediador do pesticida  $\lambda$ -cialotrina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar espécies de *Cunninghamella* nas formas livre e imobilizada;
- Estudar e comparar as eficiências catalíticas das células livres e imobilizadas;
- Proceder a biotransformações, em escala semi-preparativa, de três diferentes substratos orgânicos catalisadas por células livres e imobilizadas;
- Estudar a cinética de formação dos derivados, metabólitos e produtos de degradação dos respectivos substratos em estudo;
- Verificar o envolvimento das enzimas oxidativas do Citocromo P450 e de conjugação nas biotransformações;
- Caracterizar estruturalmente os derivados, metabólitos e produtos de degradação obtidos, através de técnicas sensíveis de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR), Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear  $^{19}\text{F}$  ( $^{19}\text{F}$  RMN).

CAPÍTULO 1  
PRODUÇÃO DE DERIVADOS

# 1. INTRODUÇÃO

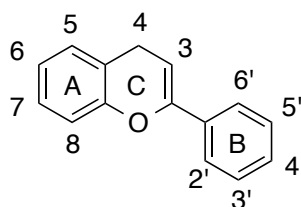
## 1.1 FLAVONOIDES

Os flavonoides são compostos fenólicos, que constituem o maior grupo de fitoquímicos. Sua estrutura química básica consiste em dois anéis aromáticos com seis átomos de carbono (anéis A e B), ligados por um heterociclo com mais três átomos de carbono (anel C) e diferentes números de grupos hidroxilas adicionados a esses anéis (Figura 23) (HVATTUM E EKEBERG, 2003; KARABÍN *et al.*, 2015; DE VILLIERS *et al.*, 2016; VIÑAS E CAMPILLO, 2019).

A eles estão atribuídas uma vasta gama de funções de grande importância na natureza, tais como pigmentação, interação planta-patógeno, fertilidade e proteção contra radiação ultravioleta, por exemplo (KARABÍN *et al.*, 2015; VIÑAS E CAMPILLO, 2019).

Além da sua presença em plantas, apresentam uma vasta gama de atividades biológicas de suma importância. A maioria dos flavonoides não apresenta toxicidade e os benefícios para a saúde humana estão nas suas propriedades antioxidantes e de prevenção de doenças cardiovasculares, alergias, fragilidades vasculares, infecções virais e bacterianas, alguns distúrbios patológicos de úlceras gástricas e duodenais e câncer (MEMON *et al.*, 2018).

Figura 23 - Estrutura química básica dos flavonóides



Fonte: autor

Modificações no anel central C classificam os flavonoides em diferentes classes: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonoides, antocianinas, flavanóis, compostos poliméricos e oligoméricos, chalconoides, dihidrochalconas e auronas; sendo os

flavonóis e os flavanóis os mais comuns (CUYCKENS E CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; MEMON *et al.*, 2018; VIÑAS E CAMPILLO, 2019).

A grande variedade dos flavonoides deve-se às possíveis modificações enzimáticas, próprias do metabolismo secundário, no seu esqueleto básico, em que os grupos hidroxilas são frequentemente metilados, acetilados, prenilados ou sulfatados, permitindo, assim, uma significativa versatilidade de propriedades biológicas (CUYCKENS E CLAEYS, 2004; DE VILLIERS *et al.*, 2016; PANCHE *et al.*, 2016; MEMON *et al.*, 2018).

Os glicosídeos são as formas em que os flavonoides são mais predominantemente encontrados nas plantas, sendo observados comumente mono ou dissacarídeos em suas estruturas (VIÑAS E CAMPILLO, 2019). A glicosilação é uma estratégia essencial de proteção das plantas no sentido de prevenir os danos citoplasmáticos e armazenar esses compostos com mais eficiência no vacúolo celular, uma vez que, glicosilados, passam a ser mais estáveis e mais solúveis em água (CUYCKENS E CLAEYS, 2004; CAO *et al.*, 2015; VIÑAS E CAMPILLO, 2019).

As biotransformações são uma alternativa estratégica e com um enorme potencial para a produção de novos desses compostos com atividade biológica. Para tanto, as biotransformações microbianas estão entre as propostas biotecnológicas disponíveis e altamente interessantes, uma vez que permitem a geração de flavonoides inéditos e não existentes na natureza (CAO *et al.*, 2015; XIAO E LEE, 2017).

Muitos produtos do metabolismo de flavonóides apresentam propriedades biológicas interessantes e essas reações de biotransformação podem ser o primeiro passo para a aplicação industrial dessa classe de compostos. Quando do metabolismo *in vivo*, eles sofrem modificações em suas estruturas, sendo oxidações mediadas pelo CYP450 e conjugações as reações mais comuns (KARABÍN *et al.*, 2015).

Inúmeros estudos já foram relatados na literatura, em que as biotransformações microbianas de flavonóides aparecem sempre como uma ferramenta eficaz em termos de custo e exequibilidade, inclusive, para o desenvolvimento de fármacos (ASHA E VIDYAVATHI, 2009; PERVAIZ *et al.*, 2013; CAO *et al.*, 2015; KARABÍN *et al.*, 2015).

As espécies de *Cunninghamella*, por sua vez, atuam como um notável biocatalisador, sendo capazes de executar reações de hidroxilação, desidroxilação, O-

metilação, *O*-demetilação, glicosilação, desidrogenação, hidrogenação, clivagem do anel C, ciclização e redução de carbonilas, proporcionando excelentes rendimentos (HUERTA-OCHOA *et al.*, 2018).

*C. elegans* forneceu derivados *O*-demetilados e sulfatados específicos na biotransformação de flavanonas, como naringenina, crisina e apigenina (IBRAHIM *et al.*, 2003). Ibrahim e colaboradores (2003) afirmam que o uso de *C. elegans* no estudo do metabolismo dessas flavanonas vegetais é capaz de originar uma série de novos flavonóides sulfatados potencialmente úteis, que podem ser aplicados, também, como padrões de referência na verificação de equivalência quando da sua produção por meios sintéticos. Derivados hidroxilados provenientes destes substratos também participam dos produtos de biotransformações catalisadas por espécies de *Cunninghamella* (WRÓBLEWSKI E USHAKOU, 2019)

Prenilflavonóides, tais quais bavaquinina, bavaquina e isobavachalcona, foram submetidos a biotransformação com *C. blakesleeana* AS 3.0970, *C. blakesleeana* AS 3.0910 e *C. elegans* AS 3.2028, fornecendo derivados hidroxilados, dihidroxilados e glicosilados com regio- e estereosseletividades e rendimentos variando entre 5 % e 28 % (MA *et al.*, 2015).

A biotransformação de flavonóis catalisada por *C. echinulata* produziu eficientemente derivados *O*-glicosilados. Observaram-se que a posição de substituição esperada foi a C-3, comum em todos os substratos estudados, e a estrutura do anel B pode ter influência na especificidade da reação (MIYAKOSHI *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* mostraram também a produção de glicopiranosídeos derivados de quercetina, kaempferol e morina por cepas de *Cunninghamella*, envolvendo reações de desidroxilação e *O*-metilação, e com rendimento de 55 %, 67 % e 20 %, respectivamente (MIYAKOSHI *et al.*, 2010; ZI *et al.*, 2011; MARY E MERINA, 2014; SORDON *et al.*, 2016; CARULLO *et al.*, 2018).

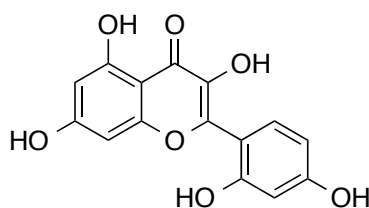
Biotransformações microbianas de flavonóides como quercetina, naringenina e daidzeína, empregando outros tipos de microrganismos, também já foram descritas, em que os derivados inéditos obtidos, não reportados até então por fontes naturais ou por abordagens de síntese ou biotransformação, apresentaram atividades biológicas melhoradas (XIAO E LEE, 2017; XU *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018).

Comumente, vários precursores fenólicos ou flavonoides simples, tais quais daidzina, daidzeína, genistina, resveratrol, apigenina, naringina, naringenina, morina, arbutina, hordenina e sinedrina, são submetidos a biotransformações microbianas, a fim de se obter uma biblioteca com vários derivados. Além da produção de compostos inéditos, novas e múltiplas bioatividades seria um campo interessante de pesquisa (CHIANG *et al.*, 2017).

### 1.1.1 Morina

Morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavona) (Figura 24) é um dos flavonoides mais comuns da família Moraceae, do tipo flavonol, isolado de várias espécies vegetais como um pigmento amarelo, presente em folhas de amoreiras, uvas, figos e em ervas medicinais. Possui, além de citotoxicidade muito baixa, excelentes efeitos farmacológicos, tais como propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais, cardioprotetoras e de prevenção de doenças coronarianas, anti-inflamatórias, anti-histamínicas, antivirais e antiúlcera (HOU *et al.*, 2003; BÉRDY, 2005; PEREIRA *et al.*, 2015; CASELLI *et al.*, 2016; JI *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2018; AKSHAYA *et al.*, 2019).

Figura 24 - Estrutura química de morina



Fonte: autor

Por ser um isômero estrutural da quercetina, apresentam perfis cromatográficos e espectrométricos muito semelhantes, além das atividades biológicas comparáveis. Os dois compostos apresentam dois grupamentos hidroxilas no anel B e uma fração resorcinol no anel A (HOU *et al.*, 2003; ANOUAR *et al.*, 2009; GÓMEZ *et al.*, 2018; JAPIASSU, 2018).

Depois de administrada oralmente, a morina é convertida em seus metabólitos glucuronidado, metilado e sulfatado. Estudos *in vivo* demonstraram que enzimas

hepáticas, como glucuroniltransferases e sulfotransferases, ou CYP450 não-hepáticas são responsáveis pelo seu metabolismo (CASELLI *et al.*, 2016).

Quando testadas a atividade inibitória de xantina oxidase, a peroxidação do ácido linoleico e a capacidade de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), a uma concentração de 100 µg/mL, morina apresentou atividades de 100%, 56 % e 100 %, respectivamente. Já comparada com o antioxidante sintético 2,6-bis(1,1-dimetil-etil)-4-metilfenol (BHT), a atividade antioxidante de morina foi examinada em 63%, uma propriedade considerada pronunciada quando comparada também com a faixa de 88 – 95 % dos flavonóides obtidos por meios sintéticos (RUIZ-CRUZ *et al.*, 2017).

A administração dietética de morina aumentou a atividade de glutathione-S-transferases (GST) no fígado e no intestino grosso e promoveu a proteção contra adenocarcinomas do intestino grosso. As GSTs são fortemente expressas na mucosa gastrointestinal e desempenha uma importante função de detoxificação de uma enorme variedade de carcinógenos e de prevenção do câncer (MIRON *et al.*, 2017).

Morina também mostrou-se potente como inibidor de polipetídeos transportadores de ânios orgânicos (*OAT1*) em células renais que expressam esse tipo de transportador – uma abordagem importante na gestão de nefrotoxicidade induzida por drogas –, com *IC50* muito baixa (< 0,3 M) (MIRON *et al.*, 2017).

Ma e colaboradores mostraram a capacidade da morina na restauração significativa à normalidade dos níveis de marcadores bioquímicos alterados. Dessa forma, o potencial neuroprotetor da morina pode estar relacionado à sua pronunciada atividade antioxidante, ao seu efeito de peroxidação antilipídica e através da inibição de proteínas apoptóticas (MA *et al.*, 2017).

Sua aplicação clínica, no entanto, limita-se à sua baixa solubilidade em água e a biossíntese de estruturas derivadas deste flavonóide pode inserí-la potencialmente no desenvolvimento de agentes mais promissores, por exemplo, tumorais (LI *et al.*, 2016).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Aplicar células livres e biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 como biocatalisador da biotransformação do flavonóide morina a derivados quimicamente diversos independentes do metabolismo.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar células de *C. echinulata* ATCC 9244 em meio de cultura líquido PDSM, livremente e imobilizadas em molas de aço inoxidável, sob forma de biofilmes;
- Proceder à biotransformação de morina em escala semi-preparativa;
- Comparar as eficiências catalíticas, em termos de rendimento, de células livres e biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 através do estudo das cinéticas de obtenção dos derivados;
- Estudar o envolvimento das enzimas do Citocromo P450 através de estudos de inibição com o composto clotrimazol;
- Identificar e caracterizar os derivados de morina obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 SUBSTRATO**

##### **3.1.1 Morina**

O substrato morina (2',3,4',5,7-pentahidroxi-flavona dihidratada) foi adquirido de Sigma Aldrich (Brasil), com pureza de 95%.

#### **3.2. PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL**

##### **3.2.1 Cultivo de células livres em meio de cultura líquido**

Erlenmeyers de boca larga com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido de cultura *Potato Dextrose Soy Medium* – PDSM (5 g de peptona bacteriológica (BD®), 20 g de dextrose (Synth), 5 g de lecitina de soja (Vetec®), 5 g de fosfato monopotássico (Synth), 5 g de cloreto de sódio (Vetec®) e 3 g de extrato de levedura (BD®) para 1000 mL de água destilada) – foram semeados com uma gota de esporos de *C. echinulata* ATCC 9244 ressuspendidos do ágar batata inclinado e mantidos em incubadora rotativa (Tecnal® Modelo TE 420), a 27 °C, 150 rpm, por 65 horas. Durante esse período, foram observadas as características morfológicas das cepas, bem como temperatura e agitação.

##### **3.2.2 Cultivo de biofilmes em meio de cultura líquido**

Para o cultivo de biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, procedeu-se à metodologia descrita no subitem 3.2.1, à exceção das molas de aço inoxidável acomodadas firmemente no fundo dos frascos de cultivo e em contato com sua parede de vidro e o volume do meio de cultura de 50 mL. As condições de incubação também foram as mesmas descritas. Durante o período de crescimento microbiano, foram observados a formação do biofilme pela extensão da mola de aço inoxidável, seu aspecto morfológico, agitação e temperatura de incubação.

### 3.3 CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO

#### 3.3.1 Incubação em meio de cultura líquido PDSM

Transcorridas 65 horas de crescimento fúngico, 10 mg de morina solubilizados em dimetilformamida (DMF), foram adicionados às culturas (livres e biofilme), e os frascos de cultivo foram reincubados, nas mesmas condições por mais 72 horas. Os sobrenadantes de incubação dos tempos 0, 24, 48 e 72 h (T0, T24, T48 e T72) foram, então, filtrados em filtro micropore e armazenados em freezer até à análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR).

### 3.4 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

#### 3.4.1 Preparação das amostras

As amostras dos sobrenadantes de incubação (T0, T24, T48 e T72) foram filtradas com membrana PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*, 0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm).

#### 3.4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR)

Os equipamentos utilizados foram Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, com coluna ACE - C18 (4,6 x 100 mm; 3  $\mu\text{m}$ ), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte *H-ESI*, operando em 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 de 33 minutos com fluxo de 0,3 mL/min, volume injeção 10  $\mu$ L 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 301,03481, 315,05048; 317,02975; 343,04540; 380,99165; 461,07201 e 463,08766.

### 3.5 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450)

O composto clotrimazol (10 mg), em DMF, foi adicionado aos frascos de cultivo contendo células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, cultivadas em meio de cultura líquido PDSM, imediatamente antes da adição do substrato. Alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes de incubação, nos tempos T0 e T72, foram então filtradas em filtro micropore e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de alta resolução (CLAE-EMAR). Antes da análise de CLAE-EMAR, as amostras foram preparadas conforme o subitem 3.4.1.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

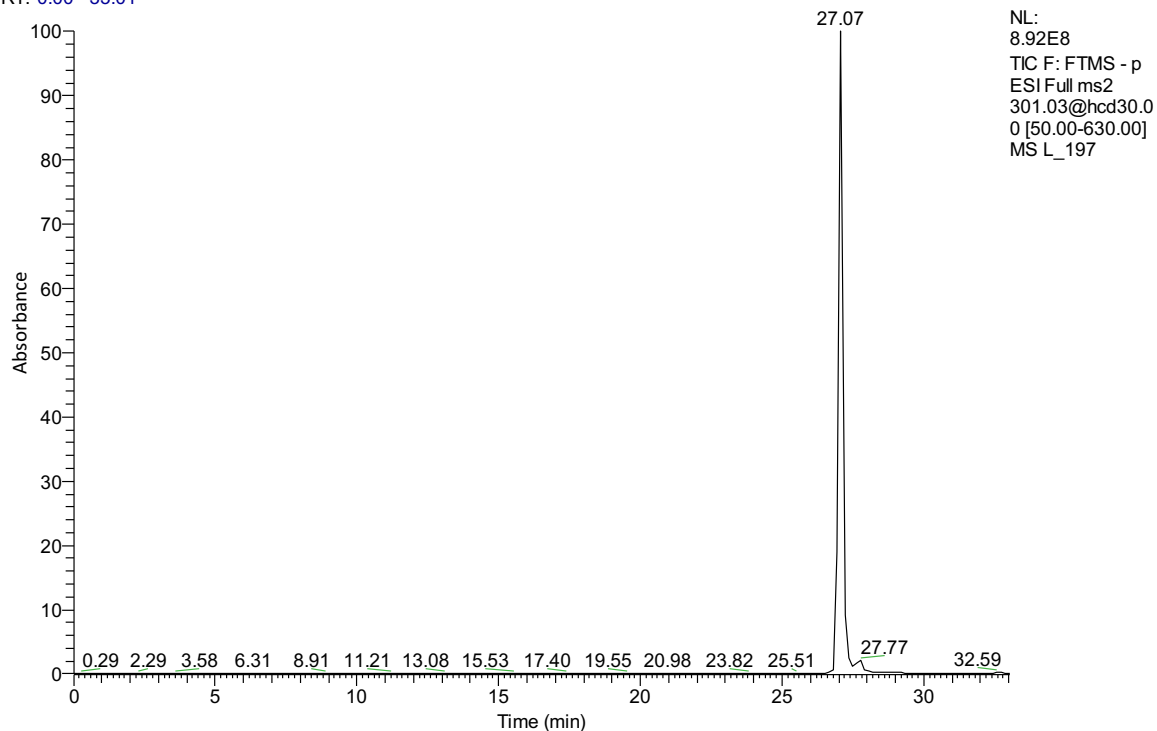
### 4.1. SUBSTRATO

#### 4.1.1 Morina

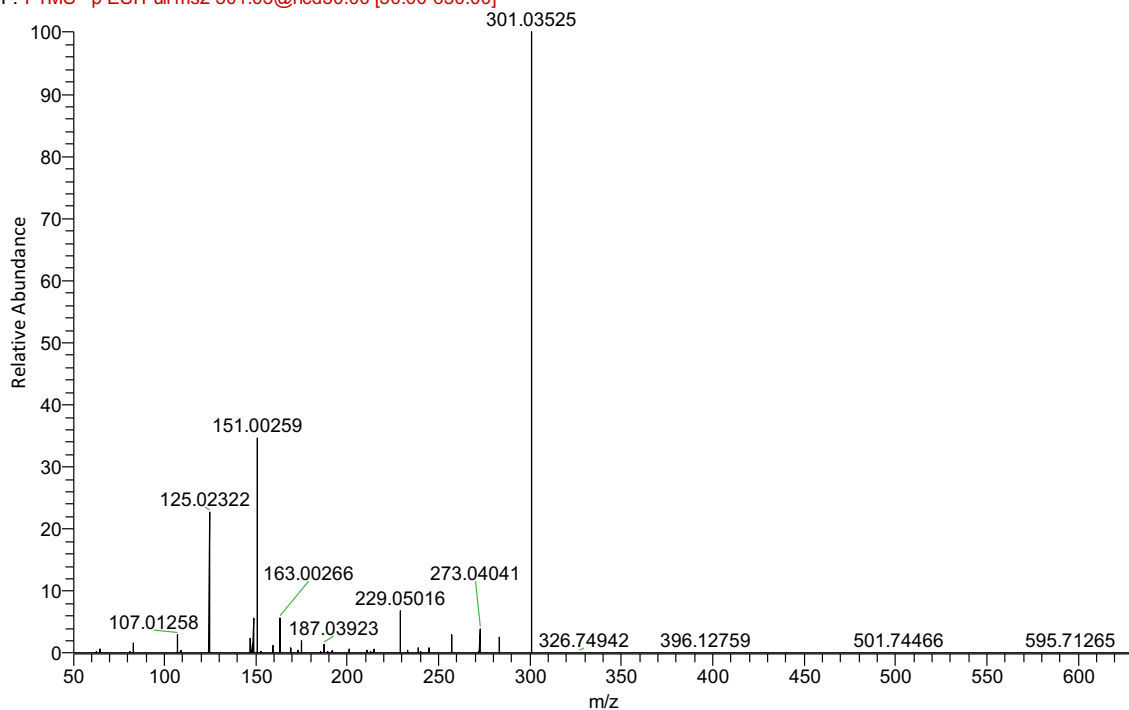
As análises, por CLAE-EMAR, de morina permitiram a identificação da transição do íon precursor para os íons referentes aos fragmentos. O espectro de massas (CLAE-EMAR) mostra um íon molecular  $[M - H^+]^-$  301,03525, com erro 0,971 ppm, referente ao composto desprotonado, e os íons fragmento característicos  $m/z$  151,00259 e  $m/z$  125,02322, no tempo de retenção 27,07 minutos (Figura 25).

Figura 25 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra padrão de morina, com íon molecular  $[M - H^+]^-$  301,03481 monitorado

RT: 0.00 - 33.01



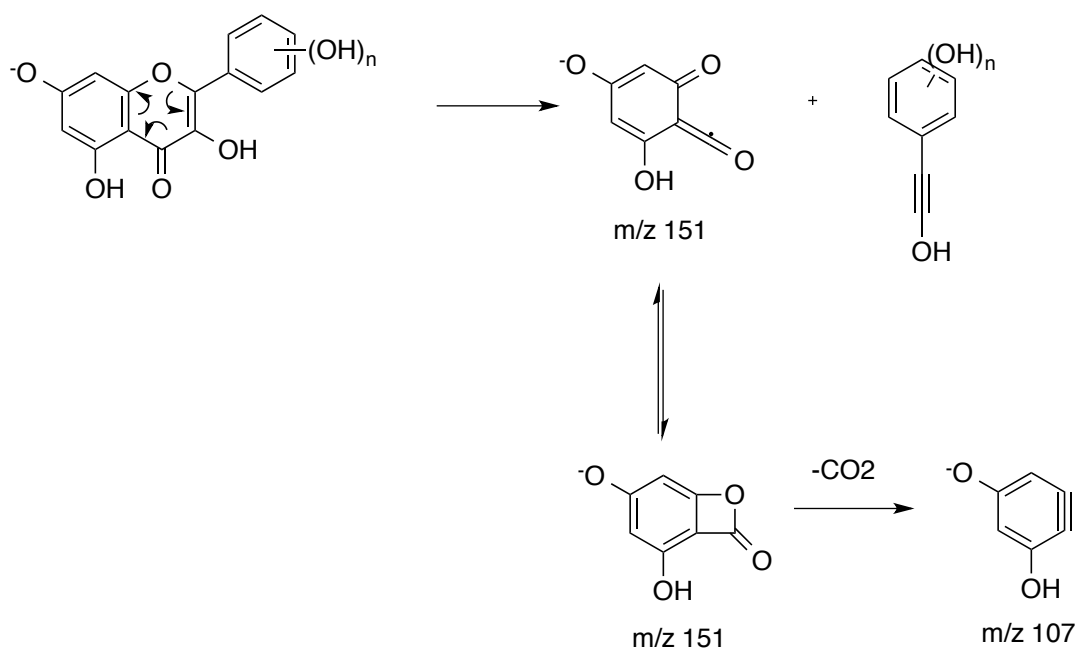
L\_197 #2647 RT: 27.07 AV: 1 NL: 4.14E8  
F: FTMS - p ESI Full ms2 301.03@hcd30.00 [50.00-630.00]



Fonte: autor

Tipicamente, o íon fragmento  $m/z$  151 corresponde à clivagem heterocíclica pela reação retro-Diels-Alder (RDA), esquematizada na Figura 26 (SUN *et al.*, 2007; MCNAB *et al.*, 2009; SILVA E LOPES, 2015; CHEN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017; GÓMEZ *et al.*, 2018). O mecanismo de fragmentação proposto é considerado comum para um número expressivo de flavonas e flavonóis, com diferenças observadas nas intensidades dos fragmentos (MCNAB *et al.*, 2009).

Figura 26 - Mecanismo de fragmentação Retro-Diels-Alder



Adaptado de MCNAB *et al.* (2009)

O íon fragmento  $m/z$  125 corresponde ao ânion floroglucinol e é exclusivo dos compostos 2'-hidroxiflavonóis (MCNAB *et al.*, 2009). Os fragmentos  $m/z$  273,  $m/z$  229,  $m/z$  187,  $m/z$  163 e  $m/z$  107, observados no espectro de massas, (CLAE-EMAR), também são fragmentos característicos do flavonóide morina (MCNAB *et al.*, 2009). Fridén e Sjöberg (2014), no estudo de diferenciação de flavonoides isobáricos, usando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com ionização por eletropulverização, observaram o íon fragmento  $m/z$  229 em energias de colisão maiores de 20 eV.

## 4.2 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL

### 4.2.1 Cultivo de células livres em meio de cultura líquido

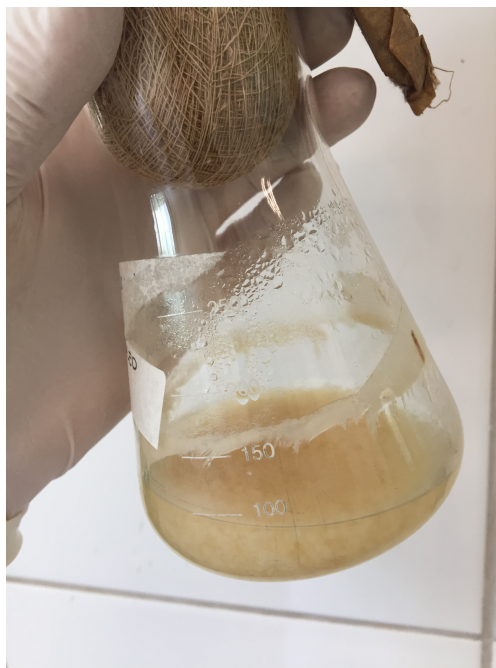
Os fungos filamentosos são morfologicamente complexos, exibindo diferentes formas estruturais ao longo de seus ciclos de vida. Suas características morfológicas podem variar de micélios dispersos no meio de cultura a pellets de biomassa agregada, o que pode influenciar na obtenção do produto desejado. Assim sendo, a morfologia mais adequada para um processo biotecnológico pode ser diversa, não pode ser generalizada e pode ser escolhida para atingir o desempenho máximo (PAPAGIANNI, 2004; KRULL *et al.*, 2013).

As condições ambientais e de cultivo – nutrientes, pH, temperatura, estresse mecânico e concentração do inóculo, por exemplo – influenciam fortemente o tipo morfológico e a fisiologia dos sistemas fúngicos. O sucesso da biotransformação, portanto, requer conhecimento, padronização e monitoramento destes parâmetros (PAPAGIANNI, 2004; KRULL *et al.*, 2013).

O meio de cultura PDSM mostrou-se adequado para o crescimento uniforme de *C. echinulata* ATCC 9244, além de apresentar baixo custo e facilidade de preparo. As condições nutricionais de células livres são extremamente importantes, pois dependendo do meio de cultura, a susceptibilidade química microbiana pode apresentar alterações (SERRANO-FUJARTE *et al.*, 2015).

Observaram-se, durante o processo de incubação, temperatura, agitação, aspecto e crescimento da cepa. Após 65 horas de cultivo livre no meio de cultura líquido, a 27 °C e 150 rpm, as células livres de *C. echinulata* ATCC 9244 apresentaram-se como massa amorfa (Figura 27).

Figura 27 - Aspecto morfológico de *C. echinulata* ATCC 9244 cultivada livremente em meio de cultura líquido PDSM



Fonte: autor

#### 4.2.2 Cultivo de biofilmes em meio de cultura líquido

Os biofilmes são sistemas tipicamente complexos, que se caracterizam principalmente pelo crescimento e adesão de matrizes extracelulares em uma estrutura imobilizadora. Assim sendo, quando da imobilização de células fúngicas, são compartilhadas entre si algumas características morfológicas comuns essenciais para seu desempenho e eficiência catalítica (VILLENA *et al.*, 2010).

As mudanças estruturais e fenotípicas associadas à imobilização celular auxiliam as células microbianas em vários aspectos de seus ciclos de vida. Dentre os benefícios observados nos biofilmes fúngicos quando comparados às células livres, estão a proteção contra estresses – químicos, físicos e biológicos –, melhor captura de nutrientes e sobrevivência em condições adversas (HARDING *et al.*, 2009; VILLENA *et al.*, 2010).

A formação de biofilmes é influenciada por vários fatores celulares, de superfície e ambientais, incluindo espécies microbianas, disponibilidade de nutrientes,

concentração de inóculo, composição superficial e temperatura, por exemplo (LI *et al.*, 2007).

Neste estudo, o meio de cultura PDSM mostrou-se viável para o crescimento e formação dos biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, além de possibilitar um espessamento controlado, mantendo a eficiência de biotransformação (AMADIO *et al.*, 2013). A escolha do meio de cultura para cultivo de células imobilizadas deve garantir crescimento homogêneo e uniforme ao longo da matriz imobilizadora e, preferencialmente, estar aliado a maiores taxas de biotransformação (SOUZA, 2015).

Outro fator determinante para a satisfatória formação do biofilme, neste estudo, é o contato da matriz imobilizadora com o vidro dos frascos de cultivo. As “folgas” das molas de aço inoxidável e tamanhos maiores do suporte podem promover aglomerações de massas amorfas, que comprometem o rendimento das biotransformações (AMADIO *et al.*, 2013; SOUZA, 2015).

Os biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, neste estudo, apresentaram aspecto algodinoso, levemente amarelados (Figura 28).

Figura 28 - Aspecto morfológico dos biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 imobilizados em molas de aço inoxidável em contato com o vidro dos frascos de cultivo



Fonte: autor

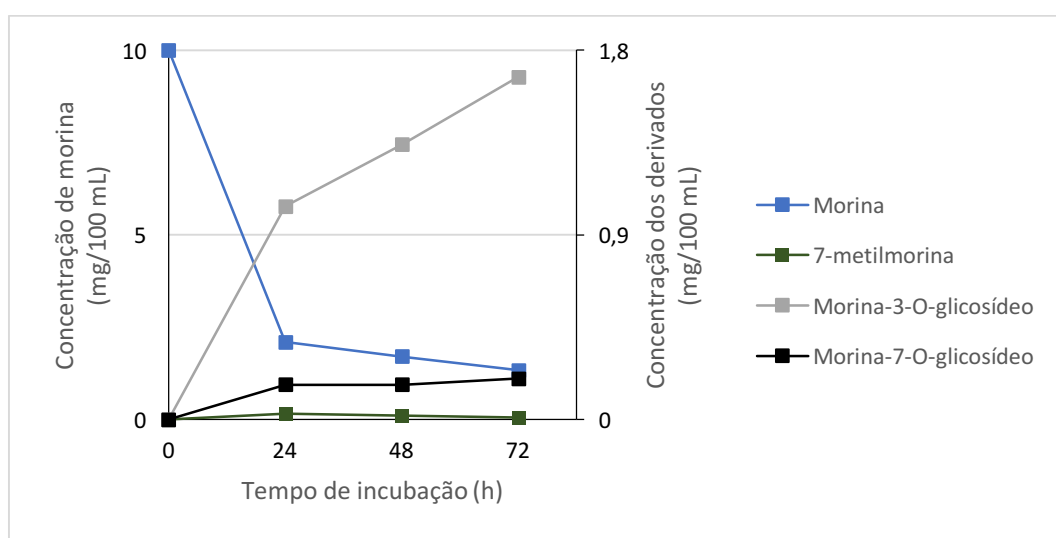
### 4.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

#### 4.3.1 Biotransformação de morina catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244

As análises dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras dos sobrenadantes de incubação, T0, T24, T48 e T72 (Anexo A), permitiram o estudo da cinética de biotransformação da morina, durante o período de incubação com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, e a construção do gráfico da Figura 29.

A partir de sua análise, é possível verificar que, já nas primeiras 24 horas, há a formação dos derivados 7-metilmorina, morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo.

Figura 29 - Cinética de biotransformação da morina e formação dos derivados 7-metilmorina, morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo catalisadas por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

\*dados referentes aos derivados plotados em eixo secundário

É possível verificar, também, uma brusca queda na concentração do substrato morina durante as primeiras 24 horas de experimento. Estes dados sugerem que o

flavonóide pode ter sido adsorvido à massa fúngica e/ou internalizado pelas células para, então, ser metabolizado.

Araújo e colaboradores (2013) verificaram o desaparecimento do flavonoide quercetina do sobrenadante de incubação, nas análises por CLAE-UV. O fenômeno foi justificado pela adsorção física do substrato à massa fúngica.

A biossorção pode ser definida como a captação passiva de espécies orgânicas ou inorgânicas de soluções aquosas por biomassas microbianas (bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas). O processo engloba vários fenômenos independentes do metabolismo – adsorções físicas e químicas e interações eletrostáticas, por exemplo –, que ocorrem principalmente a nível de parede celular (RUSSO *et al.*, 2010).

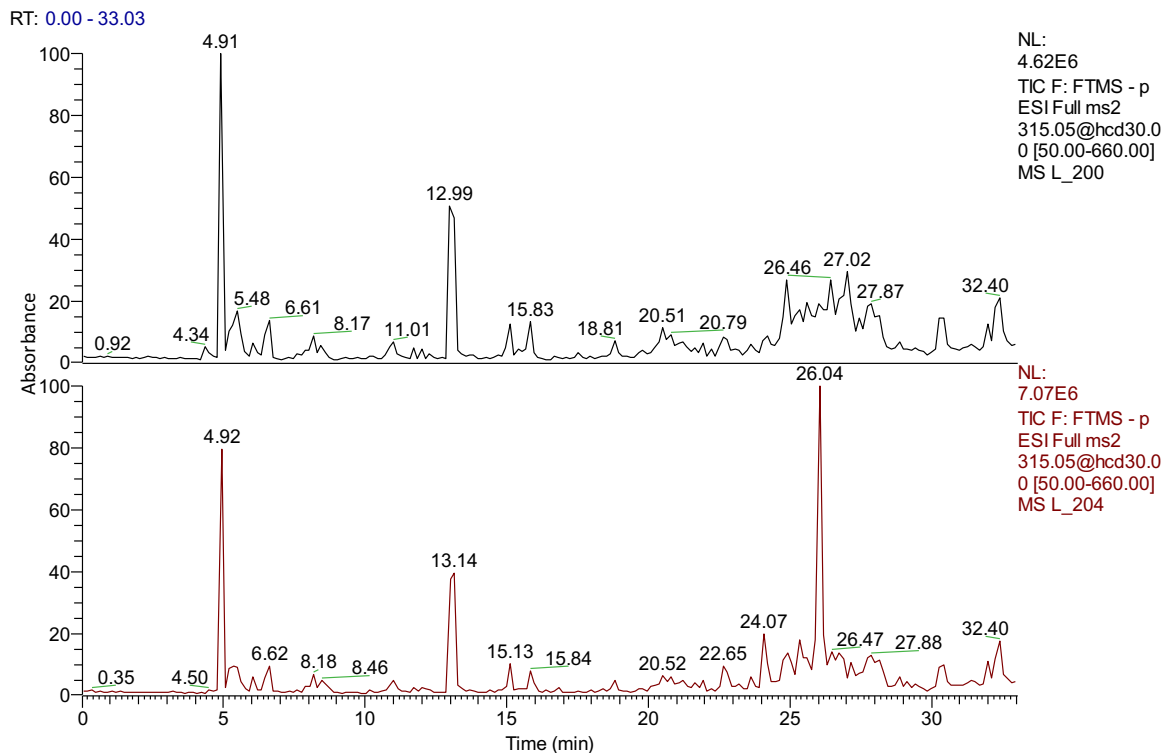
Nos últimos anos, estudos sobre adsorção em biomassa fúngica evidenciaram sua potencialidade como uma ferramenta para remediação de água, por exemplo. Gao e colaboradores (2018) investigaram o efeito da adsorção aos micélios fúngicos de antibióticos e verificaram que sua biomassa é capaz de adsorver poluentes e compostos orgânicos. O mesmo fenômeno foi observado por Palmer-Brown *et al.* (2018) e Hussain *et al.* (2017).

#### 4.3.1.1 Caracterização do derivado 7-metilmorina

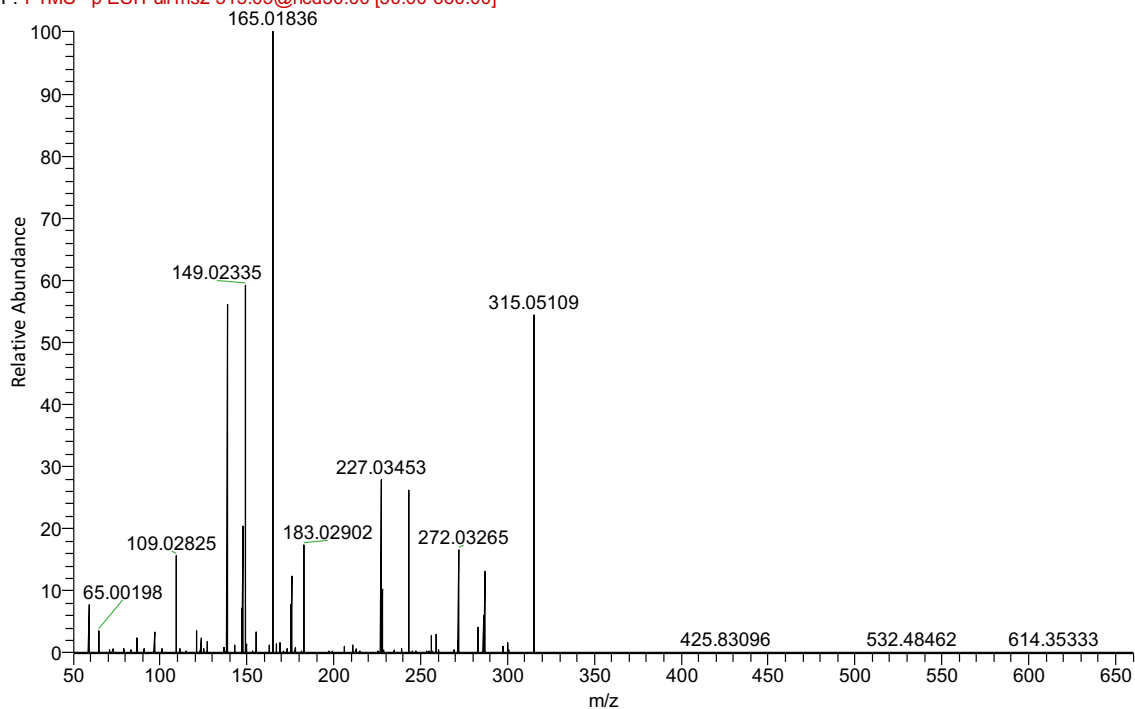
As análises, por CLAE-EMAR, das amostras dos sobrenadantes de incubação (T0, T24, T48 e T72) da biotransformação de morina catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244 possibilitaram verificar a formação do derivado metilado já nas primeiras 24 horas de incubação.

O espectro de massa (CLAE-EMAR) (Figura 30), no tempo de retenção 26,04 minutos (pico cromatográfico ausente nas amostras controle), apresentou íon molecular  $[M - H^+]^-$  315,05121, com erro de 1,161 ppm, representando um acréscimo de  $m/z$  14 quando comparado com o composto morina. Em geral, a produção do íon molecular  $m/z$  301 + 14 sugere a metilação do composto de partida (ARAÚJO *et al.*, 2013; AGHAKHANI *et al.*, 2018).

Figura 30 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação, com íon molecular  $[M - H^+]$  315,05121 monitorado



L\_204 #2569 RT: 26.04 AV: 1 NL: 1.24E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 315.05@hcd30.00 [50.00-660.00]

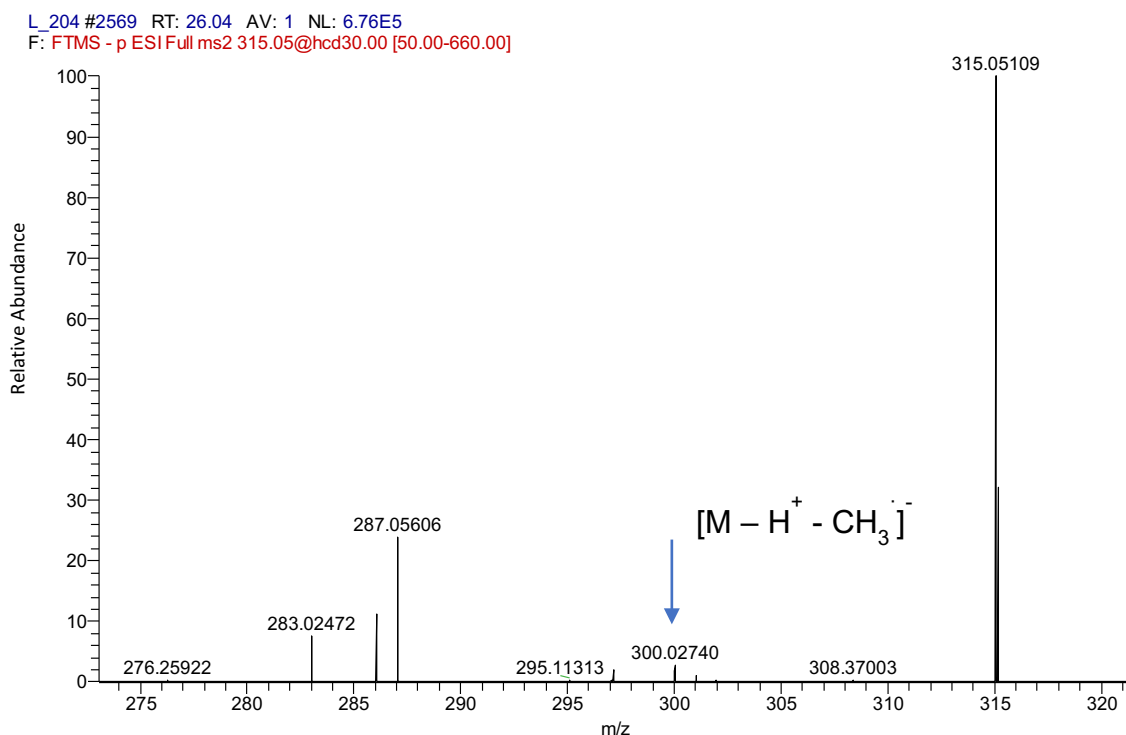


Fonte: autor

A fragmentação dos padrões disponíveis de derivados metilados do flavonóide quercetina – um isômero estrutural da morina – demonstrou que tais produtos seguem o mesmo padrão de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) do substrato. Os íons precursores característicos ( $[M - H^+]^-$  e  $[M - H^+ - CH_3]^-$ ) referem-se ao produto metilado e ao produto de partida, indicando uma monometilação. Ademais, o íon  $m/z$  165 em maior abundância indica, para este estudo, posição de substituição em C-7 (LI *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2013).

É possível observar, também, nos espectros obtidos atribuídos o derivado metilado, a presença do íon molecular  $m/z$  300,02740 (erro 0,946 ppm), que pode ser atribuído à perda metil-radicalar durante a fragmentação (Figura 32). A flavanona hesperetina possui um grupamento metoxila no anel aromático e apresenta, também, a perda do radical metila ( $\bullet CH_3$ ) na análise do seu padrão de fragmentação por espectrometria de massas (GATES E LOPES, 2012).

Figura 31 - Expansão do espectro de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M - H^+]^-$  315,05121 monitorado



Fonte: autor

A proposta, então, para o derivado produzido a partir da biotransformação da morina catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244 é 7-metilmorina e está esquematizada na Figura 32.

Figura 32 - Proposição da biotransformação de morina a 7-metilmorina por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

#### 4.3.1.1.1 Reações de O-metilação

As reações de O-metilação de flavonóides são uma modificação enzimática usual nesse tipo de substrato, catalisada pelas O-metiltransferases, que transferem um grupamento metila de metil-doadores (tomando como exemplo S-adenosil-L-metionina) para grupamentos hidroxila de moléculasceptoras desse tipo de substituinte. A reação reversa, O-demetilação, *in vivo*, pode ser mediada pelas enzimas CYP do sistema enzimático CYP450 (KARABÍN *et al.*, 2015).

Uma vez que várias modificações moleculares em flavonóides tem por objetivo aumentar a sua estabilidade e atividade biológica, as metilações ganharam atenção frente às glicosilações na obtenção de derivados farmacologicamente relevantes, já que a maioria dos produtos glicosilados mostraram apenas aumento de solubilidade e falta de atividade proeminente (KOIRALA, 2016).

As várias hidroxilas livres comumente presente em flavonóides atuam, geralmente, como aceptores para reações rápidas de conjugação, o que resulta numa baixa biodisponibilidade desse tipo de composto quando administrado oralmente (KARABÍN *et al.*, 2015). As metilações destes grupamentos hidroxila, por sua vez, aumentam sua estabilidade metabólica e seu transporte de membrana, levando a uma absorção facilitada e aumentando a biodisponibilidade oral (KOIRALA, 2016).

Kushwaha e colaboradores (2018) verificaram que a metilação protege os substratos do rápido metabolismo hepático. Assim sendo, a modificação na estrutura dos flavonoides, natural ou sintética, é um caminho promissor para melhorar a biodisponibilidade desses compostos. Além disso, uma vez que os flavonoides metilados são responsáveis pela defesa química e proteção ao stress das plantas, derivados O-metilados podem apresentar potencial anticâncer mais pronunciado do que os flavonoides hidroxilados (CAO *et al.*, 2015).

A metilação, então, é a principal reação de proteção das hidroxilas livres, produzindo derivados menos sensíveis a glucuronidações e sulfatações, por exemplo, e, por tabela, aumentando drasticamente a estabilidade metabólica – o que ajuda a avaliar o potencial quimioprotetor destes compostos no tratamento de várias doenças humanas (MA *et al.*, 2013; CAO *et al.*, 2015; KARABÍN *et al.*, 2015; KOIRALA *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2017; CHALET *et al.*, 2018; KUSHWAHA *et al.*, 2018).

A conjugação com metil-grupamentos pode, ainda, aprimorar a atividade biológica dos flavonóides, potencializando seus efeitos antialérgicos, antimicrobianos, anticancerígenos e cardioprotetores, dependendo da posição de metilação, e diminuindo a possibilidade de efeitos colaterais tóxicos (WALLE, 2009; MA *et al.*, 2013; KARABÍN *et al.*, 2015). 3-*O*-metilquercetina apresenta propriedade antiviral, ao passo que 7-*O*-metilquercetina inibe a formação de  $\beta$ -amilóides – o principal componente proteico das placas amiloides envolvidas na doença de Alzheimer (KARABÍN *et al.*, 2015).

Walle e colaboradores (2007) mostraram que os derivados metilados de 7-hidroxi-flavona, 7,4'-dihidroxi-flavona e 5,7- dihidroxi-flavona passaram a atingir altos níveis teciduais depois da modificação molecular, enquanto os compostos de partida foram indetectáveis nos níveis teciduais após administração em ratos.

Flavonas mono e dimetiladas mostraram atividades antiproliferativas potentes, e flavonoides polimetilados inibiram a proliferação de linhagens celulares tumorais por ação citostática (não-apoptótica) – um mecanismo muito vantajoso para o tratamento de tumores humanos, já que restringiria a proliferação de uma maneira menos provável de indução de citotoxicidade e morte em tecidos normais (MURAKAMI *et al.*, 2002; MORLEY *et al.*, 2007; KOIRALA, 2016).

Wen e Walle (2006) determinaram a estabilidade metabólica de 4 flavonas metiladas e seus respectivos substratos de estruturas químicas variadas. Todos os compostos testados mostraram estabilidade metabólica muito maior frente aos análogos demetilados correspondentes.

Metabólitos metilados da naringenina (7-*O*-naringenina e 4'-*O*-naringenina), por exemplo, apresentam atividades antifúngica contra *Pyricularia oryzae* e *Magnaporthe grisea* (patógenos do arroz) e antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (CHO *et al.*, 2012; KARABÍN *et al.*, 2015).

A metilação é reconhecidamente uma estratégia de modificação molecular atrativa para o desenvolvimento de fármacos, por exemplo. Frente à presença de flavonoides metilados a níveis limitados em espécies vegetais, é imprescindível o aprimoramento de técnicas eficientes para a síntese desses derivados (WEN *et al.*, 2017).

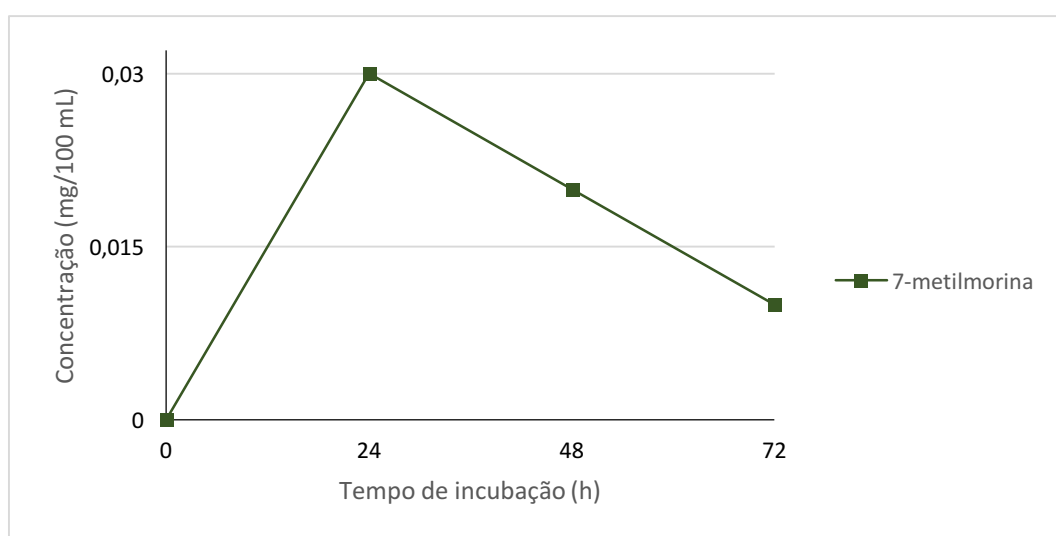
Iodeto de metila, dimetilsulfato e diazometano – reagentes tóxicos e perigosos – são comumente empregados para a síntese orgânica clássica dos derivados metilados de flavonoides. Uma alternativa não-tóxica é o reagente dimetilcarbonato, que apresenta rendimento > 98 % para esses casos (WEN *et al.*, 2017).

A síntese química de derivados metilados completos é, portanto, exequível. Contudo é laboriosa a obtenção de flavonoides parcialmente metilados em uma porção hidroxila específica. A síntese biológica é uma boa alternativa para tal exigência, devido à sua especificidade e por ser ambientalmente amigável (WEN *et al.*, 2017).

#### 4.3.1.1.2 Estudo da cinética de formação do derivado metilado

A análise dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras dos tempos de incubação T24, T48 e T72 (Anexo B) permitiu o estudo da cinética de obtenção de 7-metilmorina (Figura 33). É possível observar que a concentração máxima do derivado externalizado para o meio de cultura se dá em 24 horas, sendo possível interromper a biotransformação neste tempo para os estudos em que se objetiva a biossíntese deste composto.

Figura 33 - Cinética de formação do derivado 7-metilmorina catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244

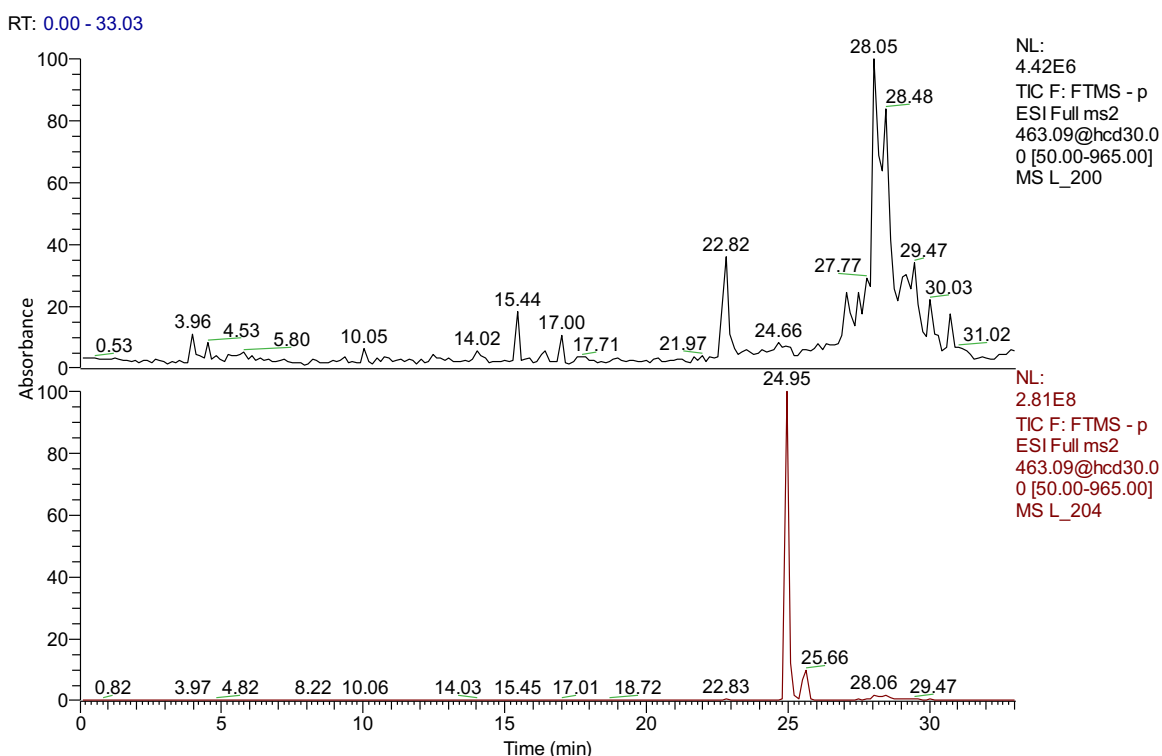


Fonte: autor

#### 4.3.1.2 Caracterização dos derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo

Das análises de CLAE-EMAR, também foi possível observar a formação de glicosídeos a partir da biotransformação com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244 (ANEXO C). O cromatograma (CLAE-EMAR) – com o íon  $[M - H^+]$  463,08766 monitorado – mostra dois picos com tempos de retenção 24,95 e 25,66 minutos (não presentes nas amostras controle (Figura 34) com acréscimos de massa referentes a derivados glicosilados.

Figura 34 - Cromatogramas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M - H^+]$  463,08766 monitorado

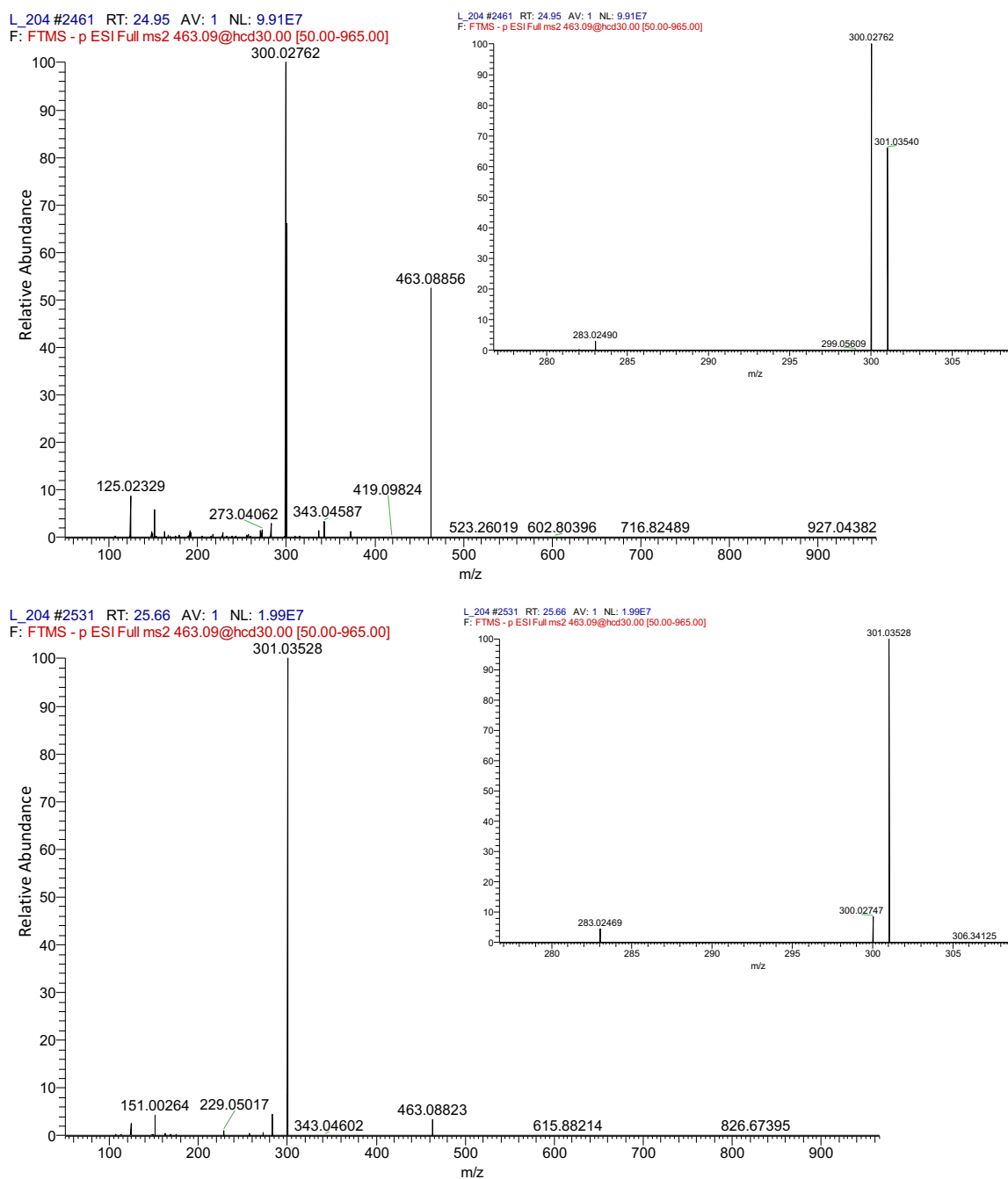


Fonte: autor

O pico com tempo de retenção 24,95 minutos apresentou íon  $[M - H^+]$  463,08856, com erro de 1,458 ppm, e íon fragmento  $m/z = 300,02762$  mais abundante. Já o pico com tempo de retenção 25,66 minutos apresentou íon  $[M - H^+]$

463,08823, com erro de 1,128 ppm, e íon fragmento  $m/z = 301,03528$  mais abundante (Figura 35).

Figura 35 - Espectros de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação, dos tempos de retenção 24,95 minutos (a) e 25,66 minutos (b), com íon molecular  $[M - H]^-$  463,08766 monitorado, e expansões



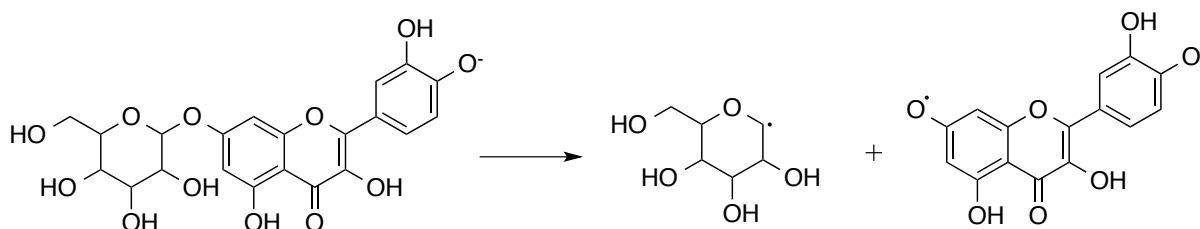
Fonte: autor

As perdas  $[M - H^+ - 162]^-$  são características de derivados glicosídeos de flavonoides (CUYCKENS E CLAEYS, 2004; SUN *et al.*, 2007; SOBEH *et al.*, 2016; KERA *et al.*, 2018). Frequentemente, derivados glicosilados são identificados por um íon molecular  $m/z$  463, acompanhado pelo íon fragmento característico  $[M - H^+]^-$  301, indicativo da aglicona (LI *et al.*, 2016; SOBEH *et al.*, 2016).

Os padrões de fragmentação no espectro de massa podem determinar uma boa quantidade de informação estrutural sobre uma substância. Os fragmentos moleculares tem origem na câmara de ionização, em que podem ser formados, também, uma série de compostos derivados da quebra de algumas ligações da molécula em análise. Esses íons fragmento aparecem em valores  $m/z$  correspondentes às suas massas individuais e, com muita frequência, é o mais abundante no espectro de massa (PAVIA *et al.*, 2010).

Em alguns casos, os fragmentos de agliconas podem ser observados em faixa  $m/z$  mais baixa, em que um radical aglicona abundante  $[M - H^+ - 162]^*$  também é formado. Tal radical advém da quebra homolítica da ligação glicosídica entre a aglicona e a porção do açúcar, esquematizada na Figura 36 (CUYCKENS E CLAEYS, 2004; QIN *et al.*, 2017). Nos espectros de massa atribuídos aos glicosídeos da morina, esses íons radical são observados em  $m/z$  300,02762 e  $m/z = 300,02747$ , para os tempos de retenção 24,61 e 25,66 minutos, respectivamente.

Figura 36 - Esquema da quebra homolítica da ligação glicosídica entre a aglicona e a porção do açúcar



Fonte: autor

Da análise do cromatograma e dos espectros de massa (CLAE-EMAR) (Figuras 34 e 35) infere-se a formação de dois isômeros, frente a observação da predominância de dois íons fragmento de alta intensidade para cada espectro referente aos dois picos

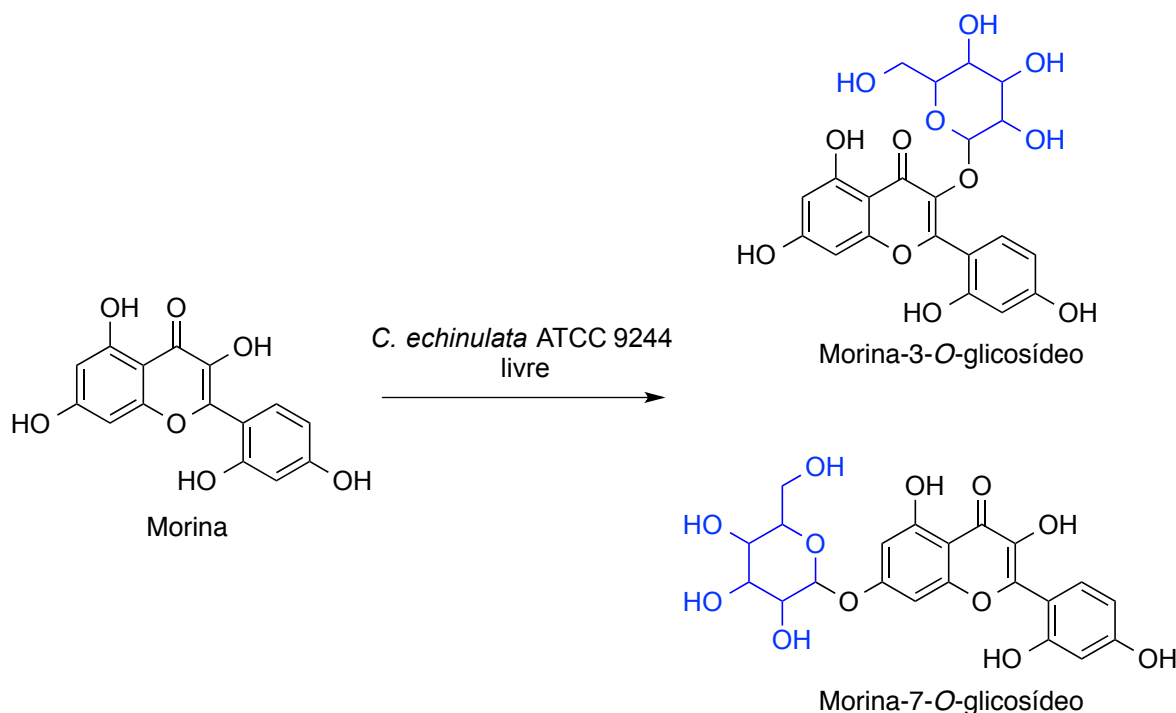
formados, atribuídos a  $[M - H^+ - 162]^-$  e  $[M - H^+ - 162]^{\bullet}$ , comprovando a mesma perda de uma unidade de hexose e a formação do radical aglicona (QIN *et al.*, 2017).

Alguns estudos mostraram que, geralmente, o radical desprotonado aglicona  $[M - H^+ - 162]^{\bullet}$  está mais abundantemente presente nos casos de derivados 3-*O*-glicosídeos, ao passo que 7-*O*-glicosídeos apresentam o íon fragmento  $[M - H^+ - 162]^-$  mais abundante. O radical aglicona também pode ser formado nestes casos, mas em quantidades muito mais baixas (HVATTUM E EKEBERG, 2003; CUYCKENS E CLAEYS, 2004; ABDEL-HAMEED *et al.*, 2013; GONZALES *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2016; SOBEH *et al.*, 2016; SOUZA, 2017).

Cuyckens e Claeys (2004) e Hvattum e Ekeberg (2003) afirmam, ainda, que a relação de abundância entre o radical aglicona e o íon fragmento aglicona “regular”, proveniente da clivagem da ligação 3-*O*-glicosídica, aumenta com o número de substituições -OH no anel B do núcleo fundamental dos flavonoides, enquanto o oposto vale para os 7-*O*-glicosídeos.

Dessa forma, a proposta deste estudo é a obtenção de dois derivados glicosilados da morina, morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo (Figura 37), sendo o 3-*O*-glicosídeo produzido em maior quantidade quando da biotransformação do flavonoide pelas células livres de *C. echinulata* ATCC 9244.

Figura 37 - Proposição da biotransformação de morina a morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

#### 4.3.1.2.1 Reações de glicosilação

As glicosilações são consideradas uma ferramenta eficiente para aumentar a solubilidade em água e a estabilidade dos flavonoides, o que pode permitir, também, a melhoria das suas propriedades farmacológicas, aumentando sua biodisponibilidade e, por vezes, diminuindo a toxicidade aguda e os efeitos adversos (HUYNH *et al.*, 2014; PLAZA *et al.*, 2014; SORDON *et al.*, 2016; HUERTA-OCHOA *et al.*, 2018; SLÁMOVÁ *et al.*, 2018; TELES *et al.*, 2018).

Em geral, quando focados em melhoria da solubilidade, os estudos mostram, de fato, que os análogos glicosilados podem aumentar muito a solubilidade do composto de partida (em mais de duas vezes) e aumentar sua captação *in vitro*. Por exemplo, o glicosídeo de genisteína apresentou uma vantagem adicional por ser mais solúvel que a sua aglicona, embora sua atividade biológica não tivesse demonstrado melhoria (KOIRALA, 2016).

Um substituinte glicosil, independentemente da posição e estrutura, todavia, raramente confere uma vantagem antioxidante frente à aglicona e, geralmente, a atividade diminui com o aumento do número de porções glicosídicas. Como a metilação, a *O*-glicosilação interfere na coplanaridade do anel B com os demais anéis dos flavonoides e na capacidade de deslocar elétrons. Apesar de os glicosídeos serem geralmente agentes antioxidantes mais fracos que as agliconas, a biodisponibilidade é por vezes aumentada por uma porção glicosídica (HEIM *et al.*, 2002; LÓPEZ-LÁZARO, 2002; SLÁMOVÁ *et al.*, 2018).

A despeito de as glicosilações atenuarem, em alguns casos, algumas propriedades biológicas – como, por exemplo, as atividades antidiabética, anti-inflamatória, e antibacteriana –, por outro lado, podem apresentar certos benefícios biológicos, incluindo as propriedades anti-HIV, anti-rotavírus, anti-stress, anti-obesidade, anti-adipogênica e anti-alérgica (SLÁMOVÁ *et al.*, 2018).

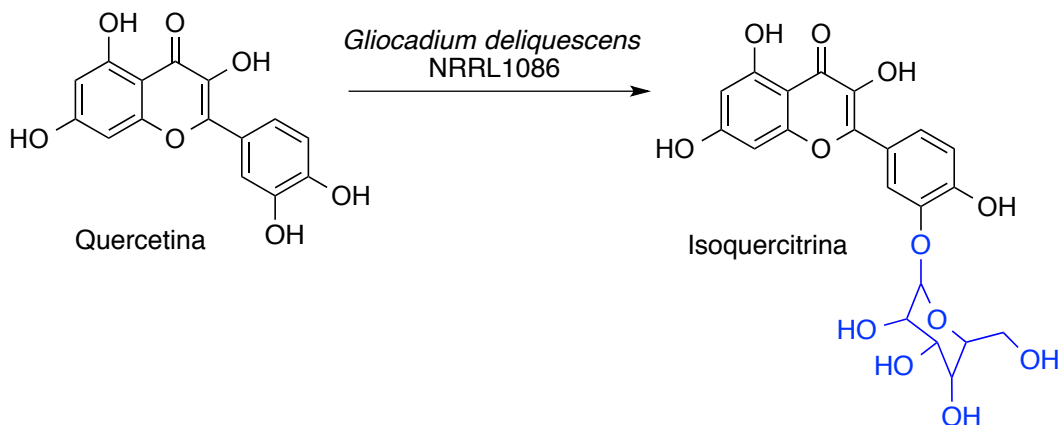
Células inteiras como biocatalisadores microbianos podem ser empregadas na catálise de glicosilações, sob condições brandas de reação, e geração de glicosídeos de flavonoides específicos, em processos simples e baratos. A maioria dos relatos de literatura sobre estas reações referem-se ao uso de fungos filamentosos (SORDON *et al.*, 2019).

Miyakoshi e colaboradores (2010) descreveram a obtenção de morina 3-*O*- $\beta$ -glicopiranosídeo por *C. echinulata* CBS 596.68, com rendimento de 20 %. O derivado apresenta atividades antifúngicas e anticâncer melhoradas (SORDON *et al.*, 2016)

*C. blakesleeana* foi satisfatoriamente empregada como biocatalisador na biotransformação altamente seletiva de flavonoides do tipo icariina, epimedina C, epimedosida, epimidina A e epimedina B. Foram obtidos, neste estudo, glicosídeos raros com rendimento em torno de 95% e que apresentaram atividade anti-osteoporose mais proeminente (XIN *et al.*, 2015)

Xu e colaboradores (2017) obtiveram isoquercitrina – um glicopiranosídeo de alto valor, frente a suas inúmeras atividades biológicas e solubilidade em água melhorada – a partir da biotransformação de quercetina por *Gliocadium deliquescens* NRRL 1086 (Figura 38). A taxa de conversão do substrato foi de aproximadamente 25%, sendo o tempo ótimo para isolamento do meio de cultura entre 8 e 12 horas.

Figura 38 - Esquema de biotransformação de quercetina a isoquercitrina por *Gliocadium deliquescens*



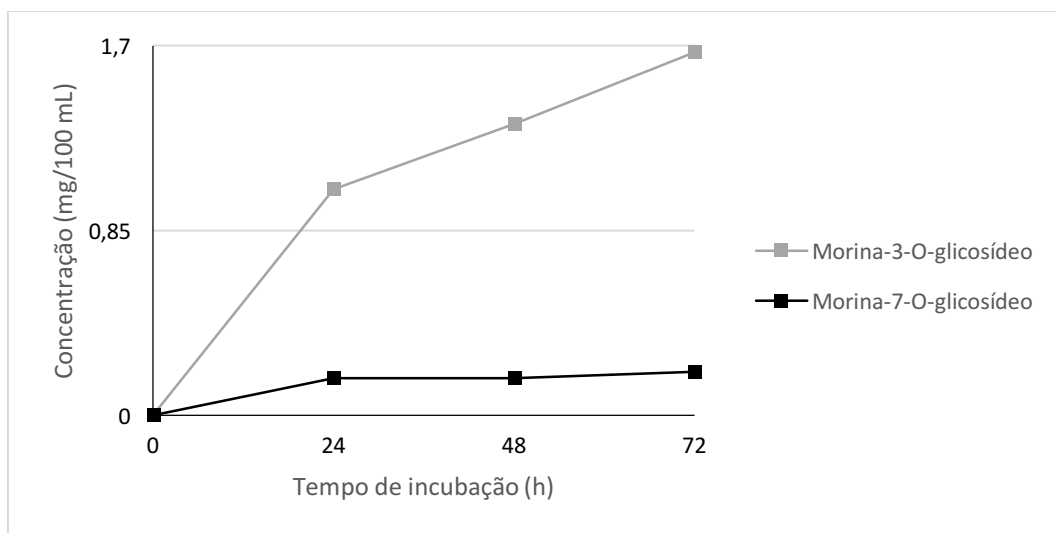
Fonte: autor

Sordon e colaboradores (2019) conduziram o estudo de geração de glicosídeos, catalisada por fungos filamentosos, usando crisina, apigenina, luteolina, pinocembrina, naringenina e eriodictiol como substratos. *Beauveria bassiana* mostrou estrita regiosseletividade (posição C7), fornecendo derivados 4''-*O*-metilglicosídeos.

#### 4.3.1.2.2 Estudo da cinética de formação dos derivados glicosilados por células livres

A cinética de formação dos glicosídeos foi estudada a partir da análise dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras dos tempos de incubação T0, T24, T48 e T72 (Anexo C). É possível observar, na Figura 39, que a concentração máxima dos dois derivados glicosilados – externalizados para o meio de cultura – se dá em 72 horas, sendo já observados nas primeiras 24 horas de incubação. O aumento gradativo da concentração ao longo do período de incubação é mais pronunciado para o 3-*O*-glicosídeo.

Figura 39 - Cinética de formação dos derivados glicosilados da morina (morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo) catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244



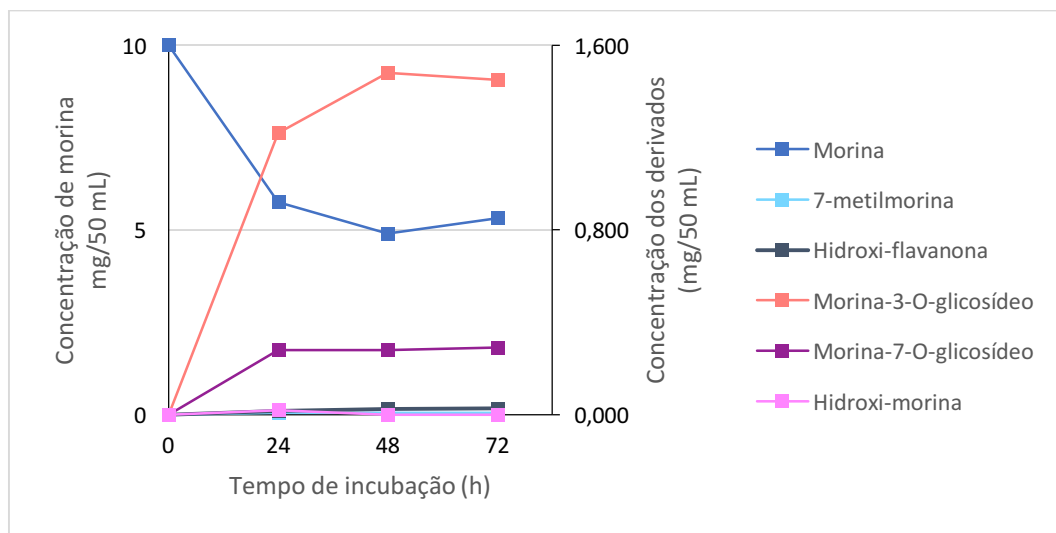
Fonte: autor

#### 4.3.2 Biotransformação de morina catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244

No estudo da biotransformação de morina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, as análises, por CLAE-EMAR, das amostras dos sobrenadantes de incubação T0, T24, T48 e T72 (Anexo D) possibilitaram verificar a formação de dois outros derivados, além dos observados no experimento com células livres, hidroxilado e hidroxi-flavanona. Nas primeiras 24 h, observou-se a presença de cinco derivados do metabolismo fúngico da morina: 7-metilmorina, morina-3-*O*-glicosídeo, morina-7-*O*-glicosídeo, hidroxi-morina e hidroxi-flavanona.

O gráfico da Figura 40 mostra a cinética de formação destes derivados. Os derivados hidroxi-morina e hidroxi-flavanona só estão presentes nas amostras T24, desaparecendo do sobrenadante de incubação depois deste tempo.

Figura 40 - Cinética de biotransformação da morina e formação dos derivados 7-metilmorina, morina-3-*O*-glicosídeo, morina-7-*O*-glicosídeo, hidroximorina e hidroxiflavanona catalisadas por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



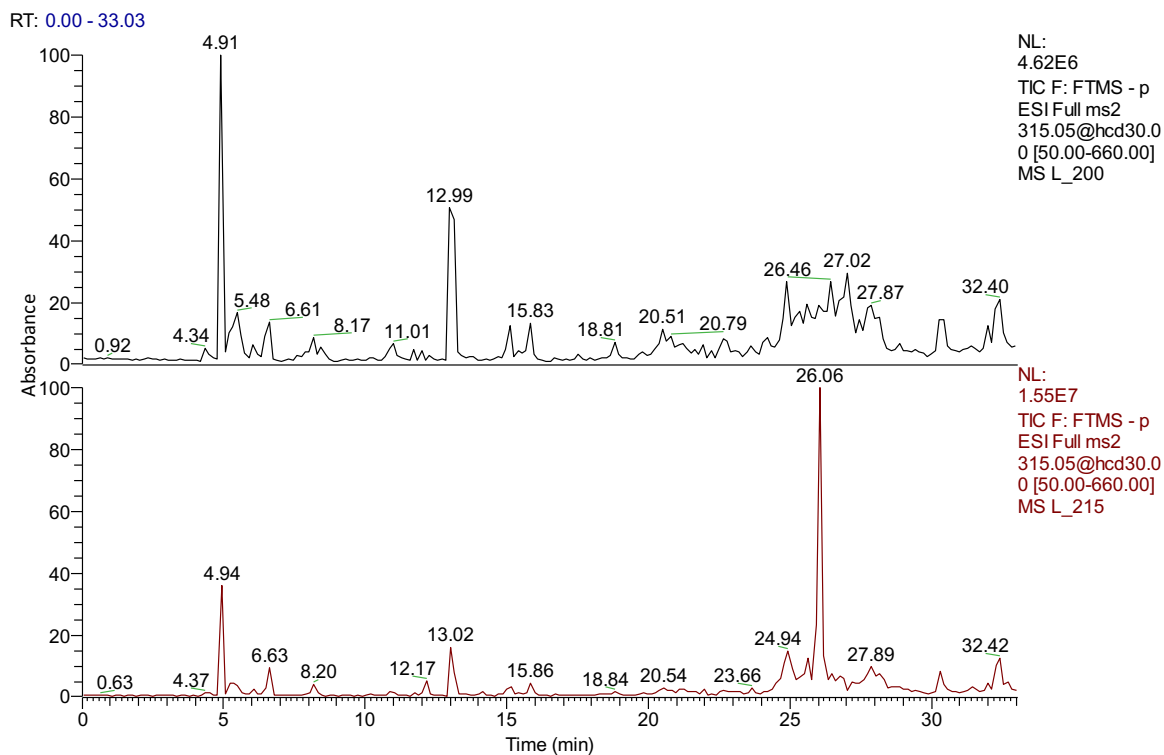
Fonte: autor

\*dados referentes aos derivados plotados em eixo secundário

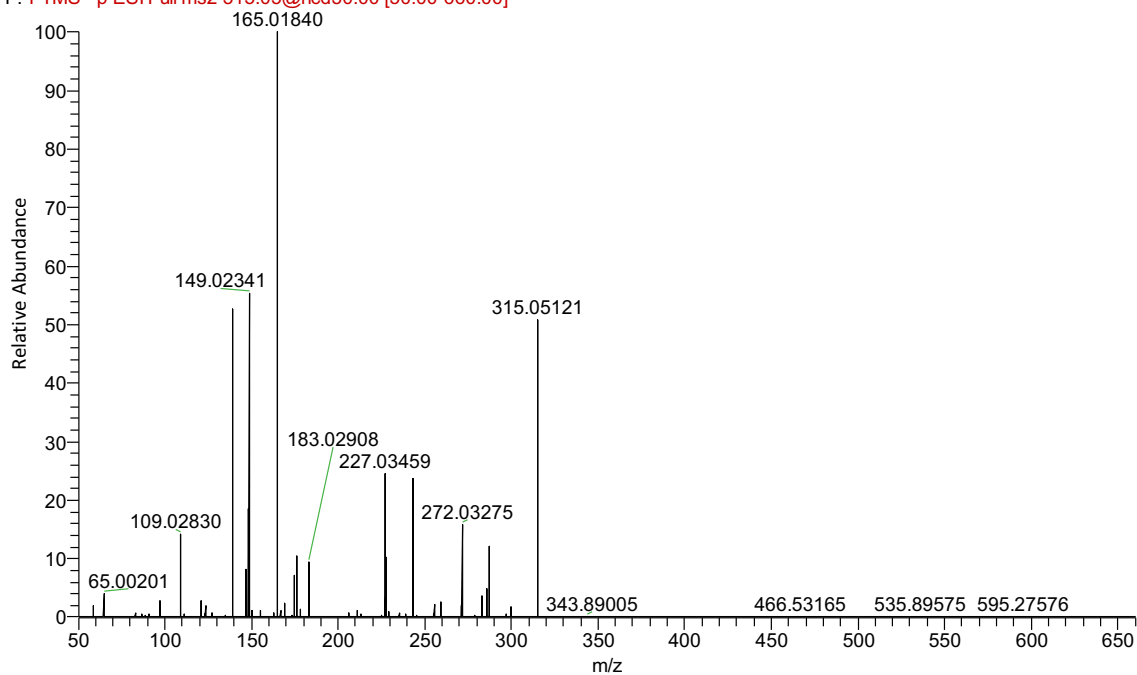
#### 4.3.2.1 Caracterização do derivado 7-metilmorina obtido a partir da biotransformação de morina catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244

Semelhantemente à biotransformação com células livres, os biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 também foram capazes de catalisar a formação de 7-metilmorina. A Figura 41 traz o cromatograma e o espectro de massa atribuído ao derivado metilado obtido da incubação com biofilmes, em que é possível observar o pico com tempo de retenção 26,06 minutos e o íon  $[M - H^+]^-$  315,05121, com erro de 1,281 ppm.

Figura 41 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M - H^+]^-$  315,05048 monitorado



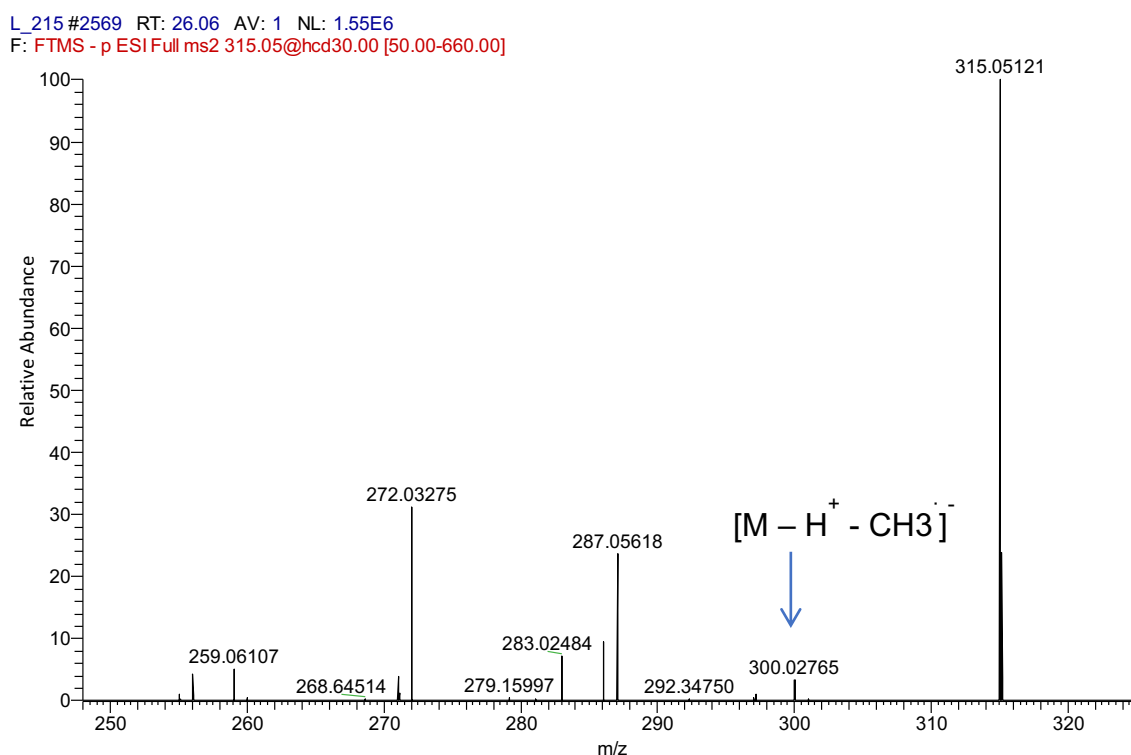
L\_215 #2569 RT: 26.06 AV: 1 NL: 3.06E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 315.05@hcd30.00 [50.00-660.00]



Fonte: autor

A análise do espectro de massa CLAE-EMAR mostra padrão de fragmentação semelhante ao derivado obtido da incubação com células livres, tratando-se, portanto, do mesmo derivado, sendo observados, também, a presença do íon molecular  $m/z$  300,02740 (erro 1,196 ppm) (Figura 42) – referente à perda metil-radicalar durante a fragmentação – e íon  $m/z$  165 em maior abundância indicando, para este estudo, a mesma posição de substituição em C7.

Figura 42 - Expansão do espectro de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M - H^+]^-$  315,05048 monitorado



Fonte: autor

#### 4.3.2.1.1 Reações de metilação

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a aplicação de biofilmes de fungos como biocatalisadores na geração de derivados metilados.

Apesar de a maioria das pesquisas sobre biofilmes fúngicos concentrarem-se em leveduras, como *Candida* e *Saccharomyces*, há um crescente reconhecimento de

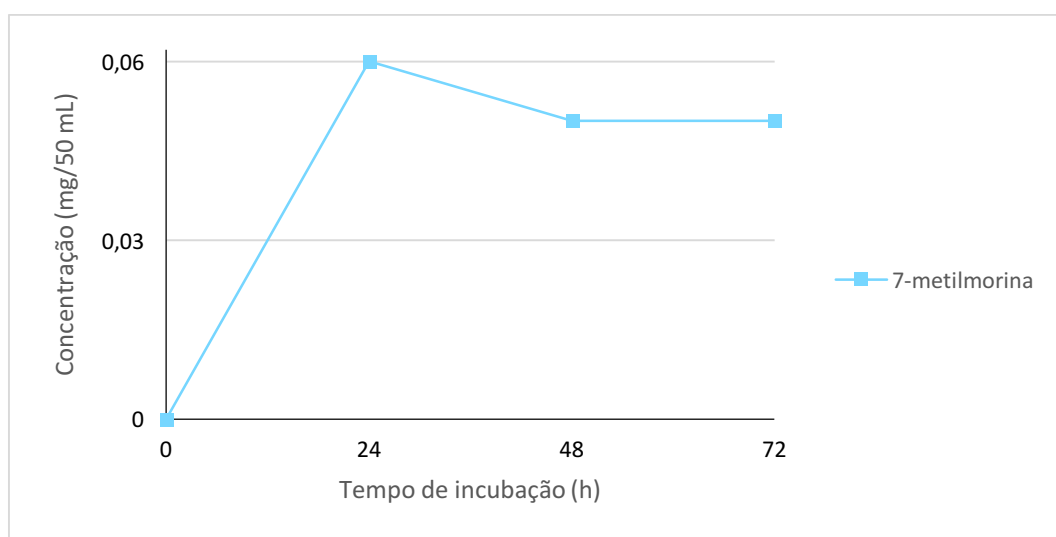
que fungos filamentosos podem formar biofilmes e possuem características em comum com as bactérias, a exemplo das células fixas em matrizes extracelulares, que fazem deles também passíveis de imobilização (CASEY E MURPHY, 2013; MUNCK *et al.*, 2018).

O primeiro relato de biofilmes de fungos filamentosos sendo aplicados como biocatalisadores para a produção de derivados e metabólitos foi feito por Amadio e colaboradores (2013).

#### 4.3.2.1.2 Estudo da cinética de formação de derivado 7-metilmorina

O estudo da cinética do derivado 7-metilmorina obtido a partir da biotransformação de morina por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 (Anexo E) permitiu observar que a concentração máxima do derivado externalizado para o meio de cultura se dá em 24 horas, sendo possível interromper a biotransformação neste tempo para os estudos em que se objetiva a biossíntese deste composto (Figura 43).

Figura 43 - Cinética de formação do derivado 7-metilmorina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244



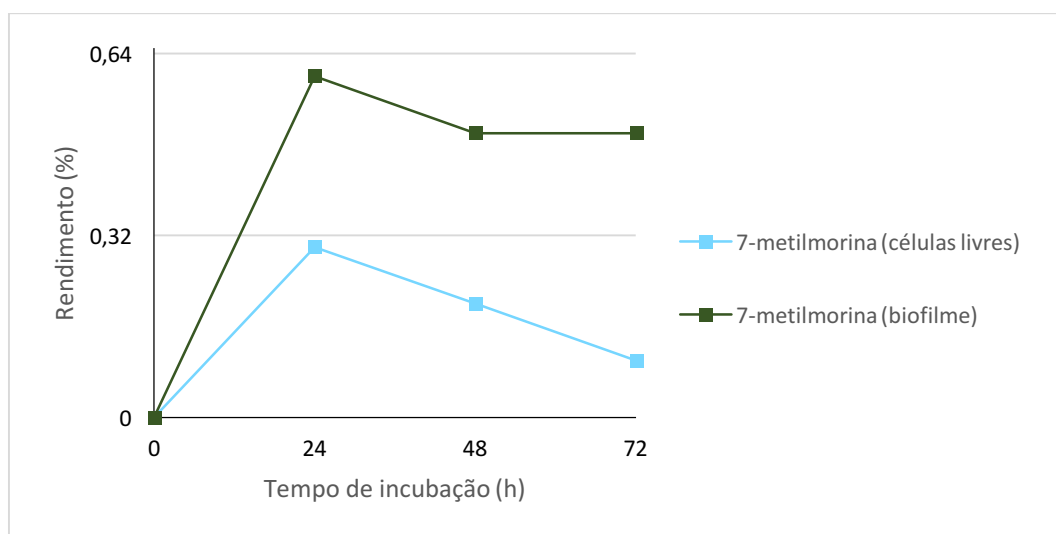
Fonte: autor

O gráfico da Figura 43 também nos permite notar um decaimento do derivado metilado advindo da incubação com biofilmes nas alíquotas de 48 horas, que pode ser

atribuído à dinâmica do produto formado pelos compartimentos intra e extracelulares do microrganismo (ARAÚJO *et al.*, 2013). A adsorção física do substrato à massa fúngica, por sua vez, pode justificar o decaimento contínuo do derivado nas amostras da incubação com células livres, a partir do tempo T24 (RUSSO *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2018).

Quando comparadas as áreas dos picos, das amostras de 24 horas, dos dois experimentos (Figura 44), temos que os biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 são capazes de produzir o derivado 7-metilmorina em uma quantidade maior ou com uma eficiência de externalização maior que as células livres, sendo, dessa feita, uma estratégia vantajosa quando do interesse por esse tipo de reação.

Figura 44 - Comparativo do rendimento durante a cinética de biotransformação da morina a 7-metilmorina catalisada por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

O estudo de geração de derivados tetrazólicos catalisada por células do fungo filamentosos *C. echinulata* ATCC 9244 também mostrou rendimento de biotransformação um pouco maior quando utilizados biofilmes fúngicos (SOUZA, 2015).

Células fúngicas imobilizadas em matrizes, como é o caso dos biofilmes produzidos neste trabalho, tem apresentado maior capacidade de biotransformar fármacos do que células livres, sugerindo um aumento de atividade ou produção

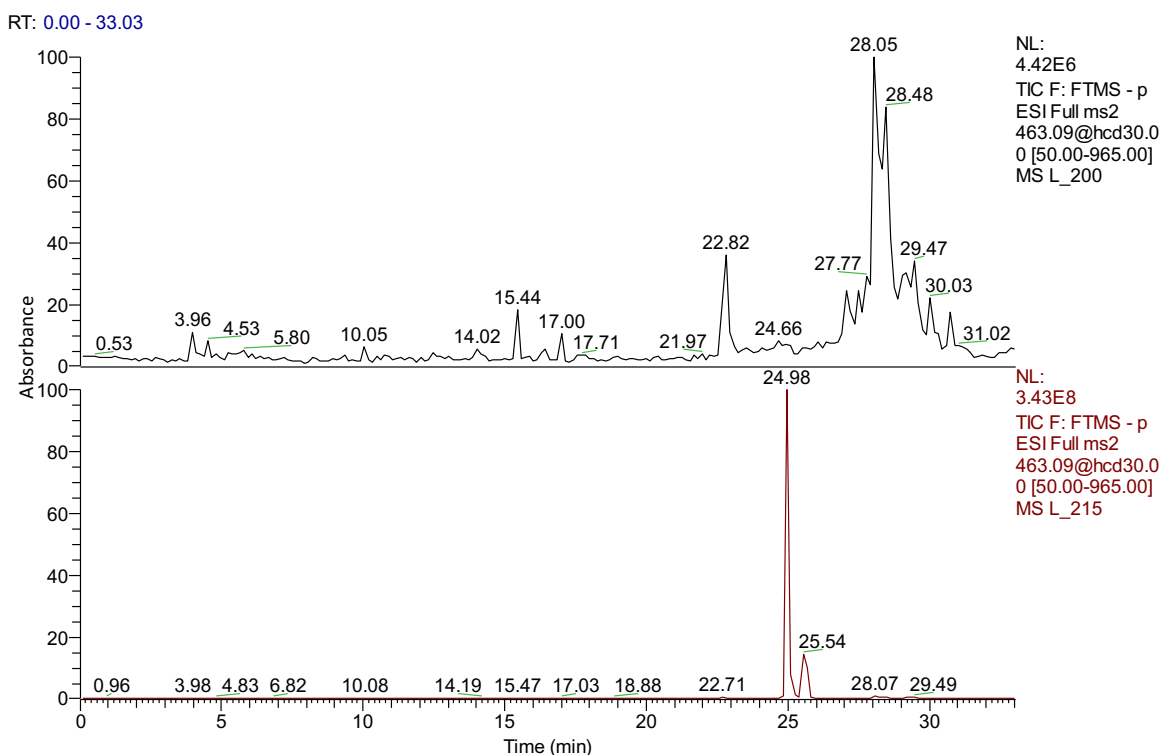
enzimática. Tais resultados, ainda, reportam sua utilização como ferramentas eficazes para a produção de derivados em escala industrial (AMADIO *et al.*, 2013).

#### 4.3.2.2 Caracterização dos derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo por biofilme

Nas Figuras 45 e 46, observam-se o cromatograma e os espectros CLAE-EMAR referentes aos derivados glicosilados obtidos da incubação com biofilmes. Infere-se, igualmente ao experimento com células livres, a formação de dois derivados com posições diferentes para a unidade de açúcar.

O pico com tempo de retenção 24,98 minutos apresentou íon  $[M - H^+]$  463,08841, com erro de 1,308 ppm, e dois fragmentos de alta intensidade  $m/z$  300,02753  $[M - H^+ - 162]^+$  e  $m/z$  301,03534  $[M - H^+ - 162]^+$ . A posição da glicosilação em 3-OH foi determinada pela maior intensidade relativa de  $[M - H - 162]^+$  (Figura 46) (CUYCKENS E CLAEYS, 2004; GONZALES *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016).

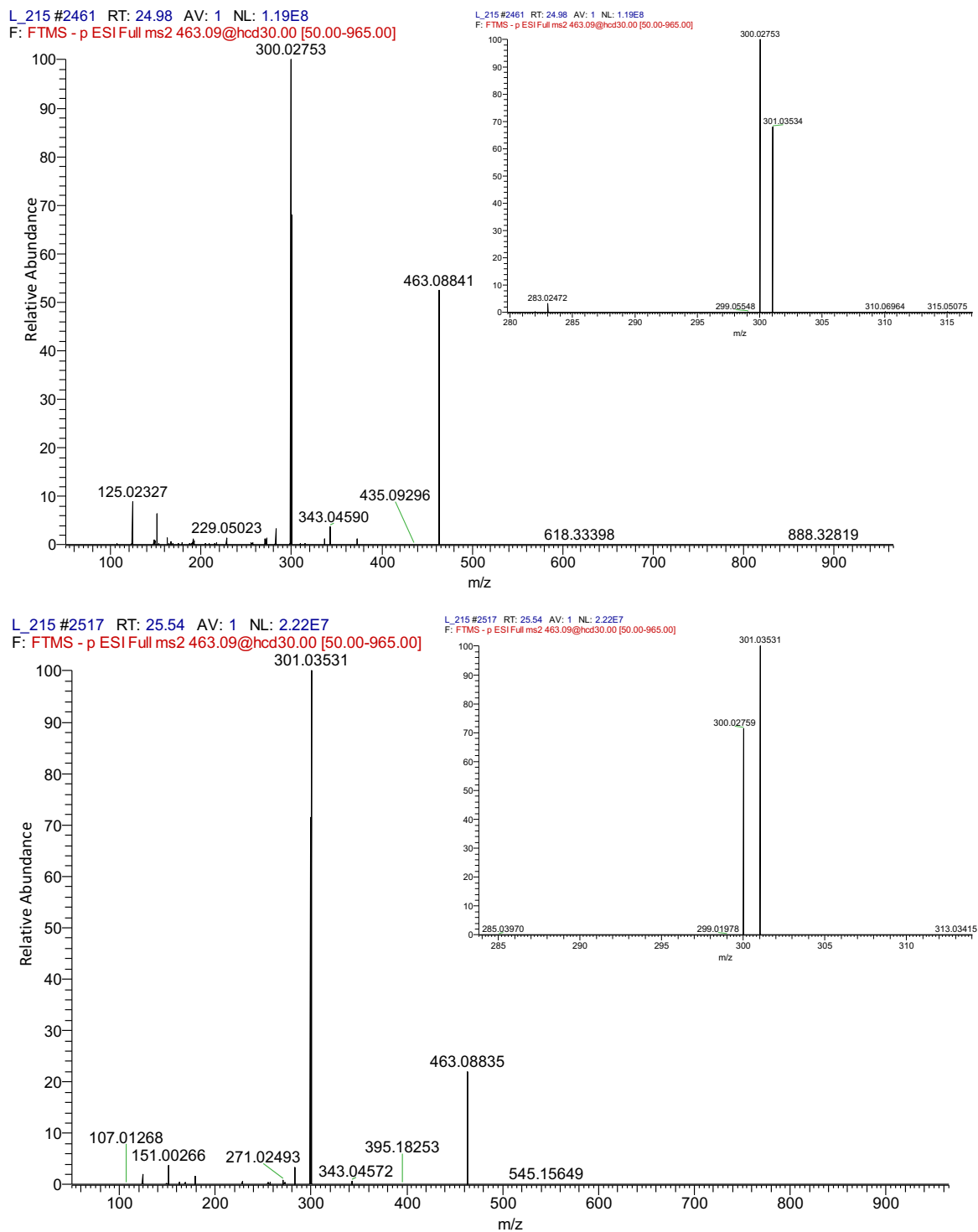
Figura 45 - Cromatogramas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M - H^+]^-$  463,08766 monitorado



Fonte: autor

Já o pico com tempo de retenção 25,54 apresentou íon molecular  $[M - H^+]^-$  463,08835, com erro de 1,248 ppm, e íons fragmento  $m/z$  301,03531 e  $m/z$  300,02759, sugerindo a perda da unidade de hexose e a formação do íon radical aglicona (Figura 46).

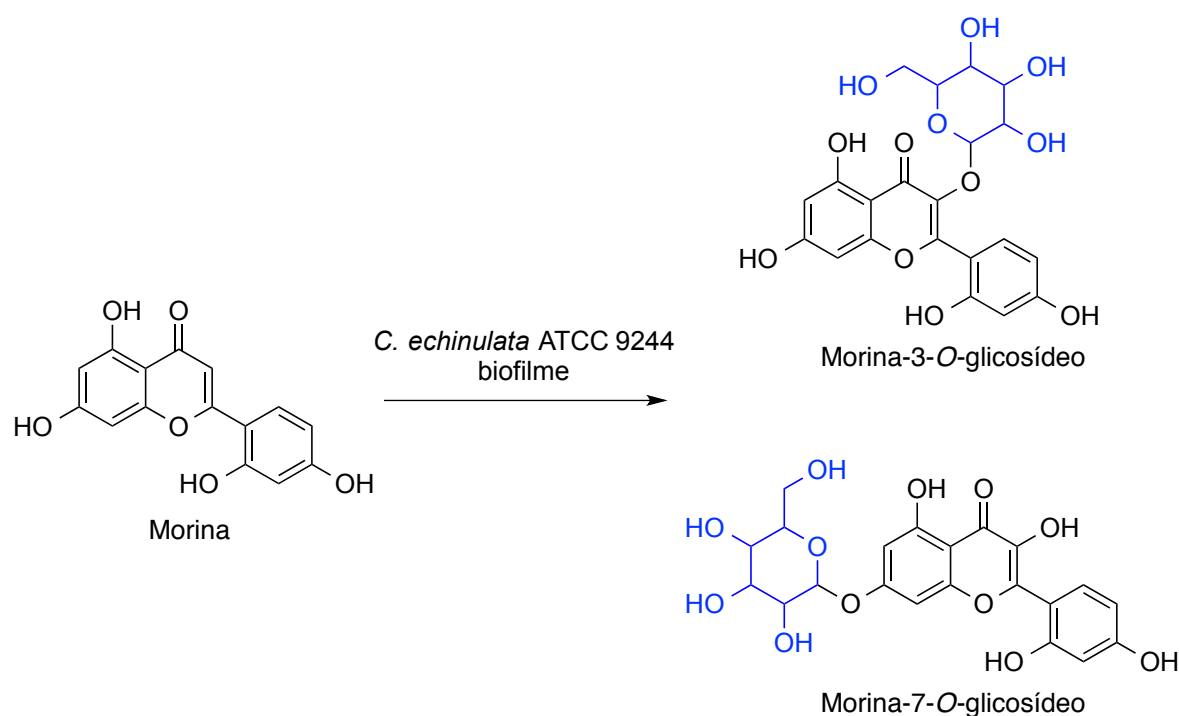
Figura 46 - Espectros de massas CLAE-EMAR da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, dos tempos de retenção 24,98 minutos (a) e 25,54 minutos (b), com íon molecular  $[M - H^+]^-$  463,08766 monitorado, e expansões



Fonte: autor

Neste estudo, propõe-se a obtenção de dois derivados glicosilados da morina, morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo (Figura 47), semelhantes aos derivados obtidos da biotransformação do flavonoide pelas células livres de *C. echinulata* ATCC 9244. O 3-*O*-glicosídeo também apresentou maior rendimento de formação por biofilmes fúngicos, nos tempos de 24 e 48 horas.

Figura 47 - Proposição da biotransformação de morina a morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

#### 4.3.2.2.1 Reações de glicosilação

Poucos relatos na literatura descrevem o desenvolvimento de biofilmes de fungos filamentosos e sua aplicação na glicosilação de compostos orgânicos.

As reações de glicosilação são umas das mais promissoras estratégias de modificação molecular, uma vez que confere aos derivados alterações físicas, otimização das características ADME, bem como bioatividade. Entre os inúmeros derivados flavonoides, os glicosídeos são mais atrativos para a aplicação industrial, uma vez que apresentam melhor solubilidade, estabilidade e funcionalidade (THUAN *et al.*, 2017).

A síntese química tradicional de produtos naturais baseia-se em conversões altamente energéticas a partir de matérias-primas derivadas do petróleo, por exemplo. Ademais, os açúcares ativados devem ser utilizados em relações estequiométricas, tornando o processo proibitivamente caro (THUAN *et al.*, 2017).

Em contrapartida, os processos biotecnológicos permitem a obtenção de uma variedade enorme de compostos químicos derivados de fontes de carbono renováveis, a temperatura e pressão comparativamente baixas (THUAN *et al.*, 2017).

Biofilmes fúngicos foram satisfatoriamente empregados como biocatalisador na geração, em uma única etapa, de *N*-glicosídeos por *C. echinulata* ATCC 9244 a partir de um híbrido tetrazol-pirazol. Geralmente, as *N*-glicosilações são conduzidas em quatro passos, por métodos sintéticos clássicos, em ambiente ácido e com etapas de proteção e desproteção. Neste estudo, este tipo de reação e imobilização foram pioneiramente descritas em biotransformações em biorreator (DE MELO SOUZA *et al.*, 2016).

*C. elegans* imobilizados em espumas de poliuretano catalisaram a formação de 3-fluorantenoglucopiranosídeo, com intermediário hidroxilado também obtido por produção microbiana. A taxa de biotransformação de fluoranteno foi 22 vezes maior quando o fungo foi cultivado sob a forma de biofilme e a expressão gênica do CYP450 mostrou-se 2,1 vezes mais acentuada (MITRA *et al.*, 2013).

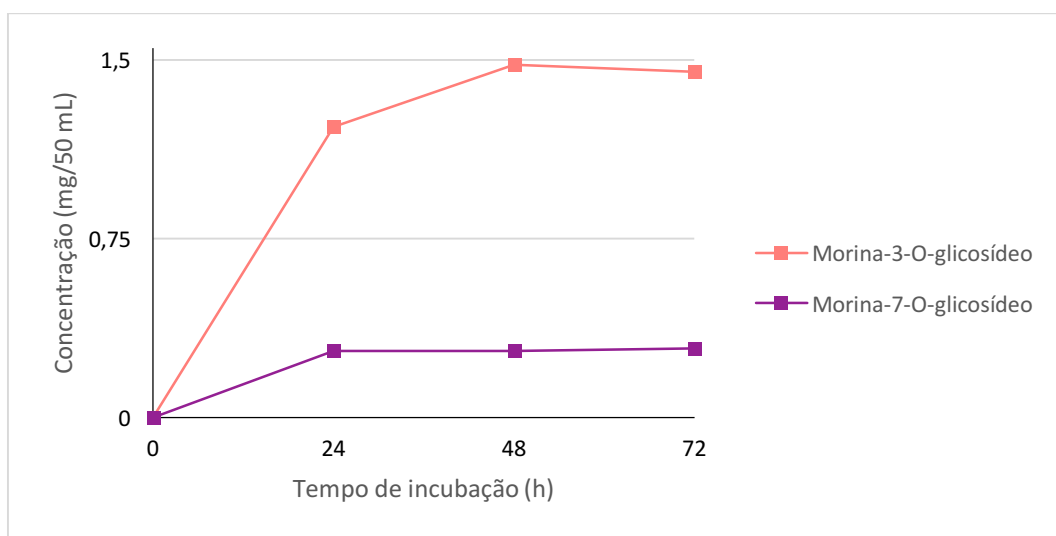
Células de *Claviceps purpúrea*, imobilizadas em alginato de cálcio, foram empregadas na glicosilação de alcaloides de ergot. Elimoclavina foi propriamente biotransformada a seu glicosídeo correspondente, com rendimento total de obtenção deste tipo de derivado maior frente às células livres (KREN *et al.*, 1990).

#### 4.3.2.2.2 Estudo da cinética de formação dos derivados glicosilados por biofilme

O estudo da cinética de formação dos glicosídeos catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 (Figura 48) a partir das análises dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras dos tempos de incubação T0, T24, T48 e T72 (Anexo F) possibilitou observar que a concentração máxima dos dois derivados glicosilados se dá em 48 horas, sendo já observados nas primeiras 24 horas de incubação. Neste experimento,

a produção do derivado morina-3-*O*-glicosídeo também é mais pronunciada, como acontece na biotransformação catalisada com células livres.

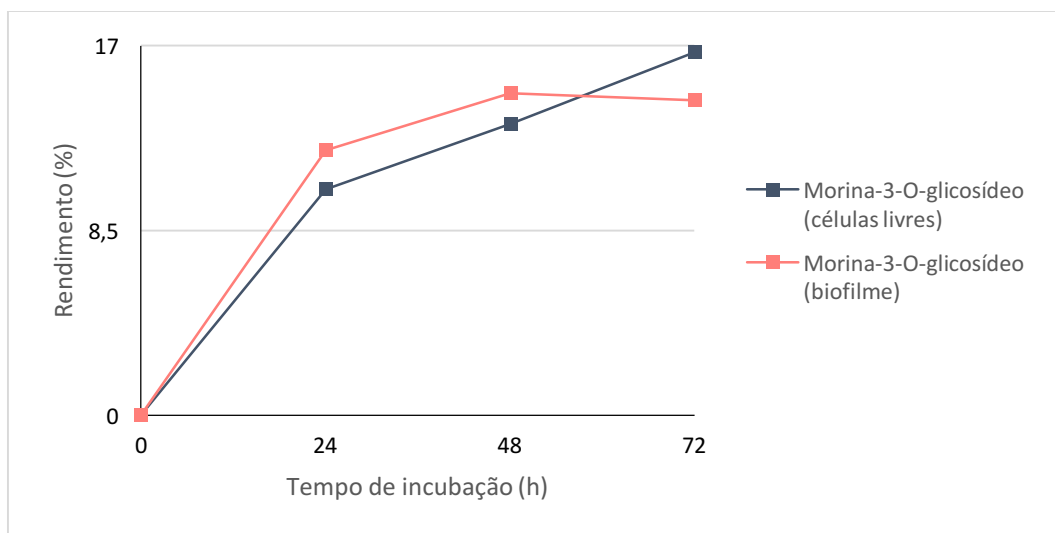
Figura 48 - Cinética de formação dos derivados glicosilados de morina (morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo) catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

Vale ressaltar, aqui, uma das vantagens associada aos biofilmes quanto à externalização dos produtos para o meio de cultura. Quando comparadas as cinéticas de formação do derivado morina-3-*O*-glicosídeo, nos dois estudos (Figura 49), a biossíntese catalisada por biofilmes fúngicos mostrou uma discreta eficiência nos tempos de 24 e 48 horas frente às células livres, podendo ser um indicativo da maior produção e secreção enzimática (HARDING *et al.*, 2009; MURPHY, 2015; MURPHY *et al.*, 2019).

Figura 49 - Comparativo do rendimento durante a cinética de biotransformação da morina a morina-3-*O*-glicosídeo catalisada por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

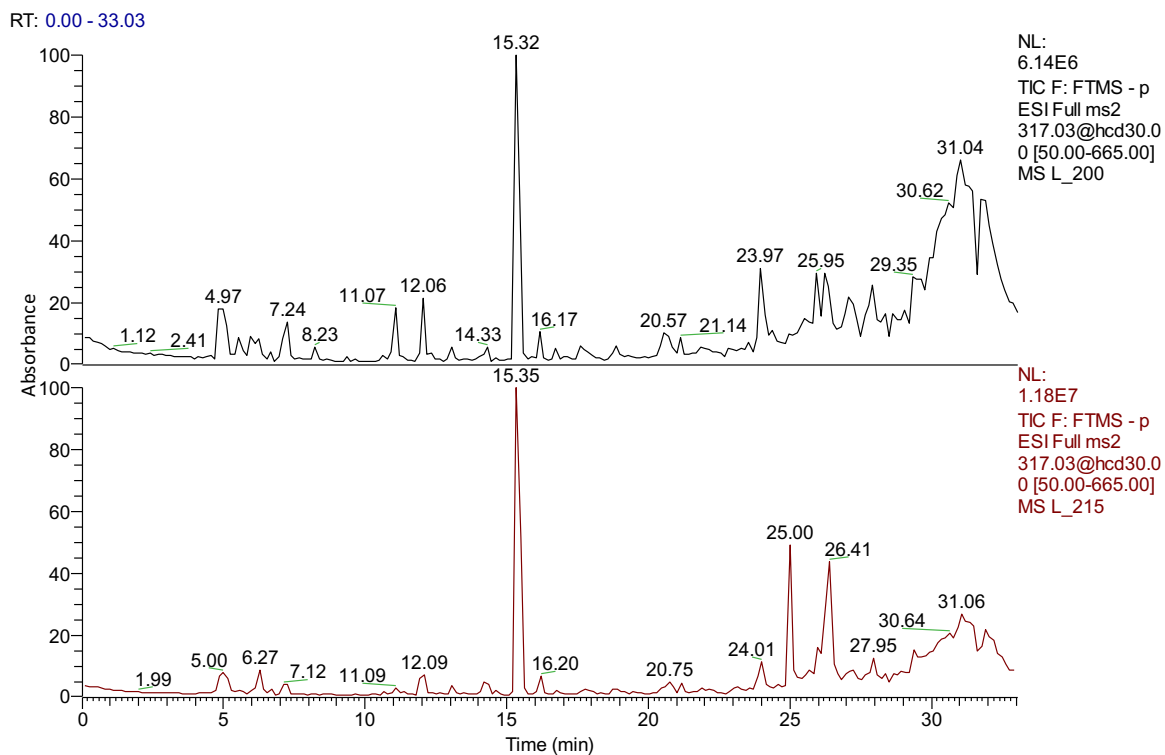
Além das vantagens associadas as biotransformações microbianas frente aos métodos clássicos de glicosilação, De Melo Souza *et al.* (2016) destacaram a maior capacidade catalítica das células imobilizadas quando comparadas com as células livres no período estudado neste trabalho.

#### 4.3.2.3 Caracterização de derivado hidroxí-morina por biofilme

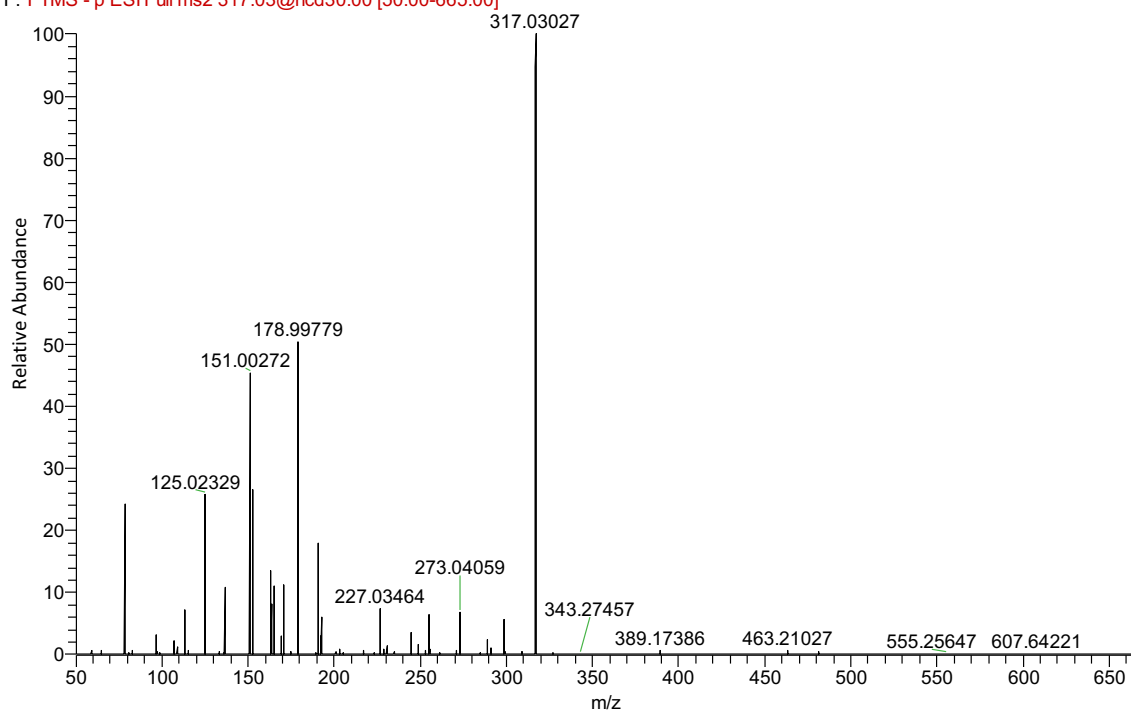
Os dois derivados formados, neste estudo, exclusivamente pela biotransformação catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, foram identificados nos tempos de retenção 25,00 e 26,41 minutos com o íon  $[M - H^+]^-$  317,02975 monitorado.

O espectro de massa CLAE-EMAR para o pico com tempo de retenção 26,41 minutos contém o íon precursor  $[M - H^+]^-$  317,03027, com erro 1,076 ppm, que foi atribuído ao derivado hidroxilado da morina (Figura 50).

Figura 50 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M - H^+]^-$  317,02975 monitorado



L\_215 #2603 RT: 26.41 AV: 1 NL: 1.12E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 317.03@hcd30.00 [50.00-665.00]

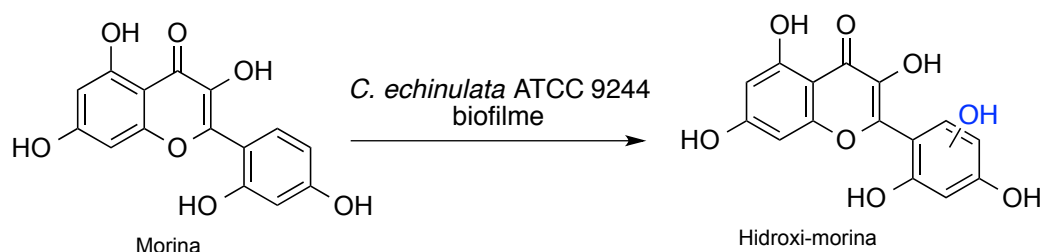


Fonte: autor

Os valores de  $m/z$  menores que  $m/z$  317, tais quais  $m/z$  179,  $m/z$  151 e  $m/z$  137 são típicos de reações RDA de flavon-3-ols que possuem o anel A dihidroxilado e  $m/z$  137 é um fragmento típico de anéis B trihidroxilados, como a miricetina (MCNAB *et al.*, 2009; SALDANHA *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2019).

Karabín e colaboradores (2015) afirmaram que frequentemente a hidroxilação ocorre na posição orto ao grupamento hidroxila presente na posição 4'. A proposta, então, para este estudo, é de hidroxilação no anel B da morina, possivelmente caracterizando os derivados 5'-hidroxi-morina ou 3'-hidroxi-morina (Figura 51).

Figura 51 - Proposição da biotransformação de morina a hidroxi-morina por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

#### 4.3.2.3.1 Reações de hidroxilação

As reações de hidroxilação catalisadas por microrganismos estão entre as estratégias inovadoras para a obtenção de produtos mais raros. A geração de diversidade química-estrutural e a produção de novos compostos terapeuticamente importantes, a partir da biotransformação de flavonoides, e o notável emprego da engenharia metabólica de enzimas biossintéticas em microrganismos, por exemplo, ampliam em possibilidades o campo destas biotransformações (DAS E ROSAZZA, 2006; HEGAZY *et al.*, 2015; PANDEY *et al.*, 2016).

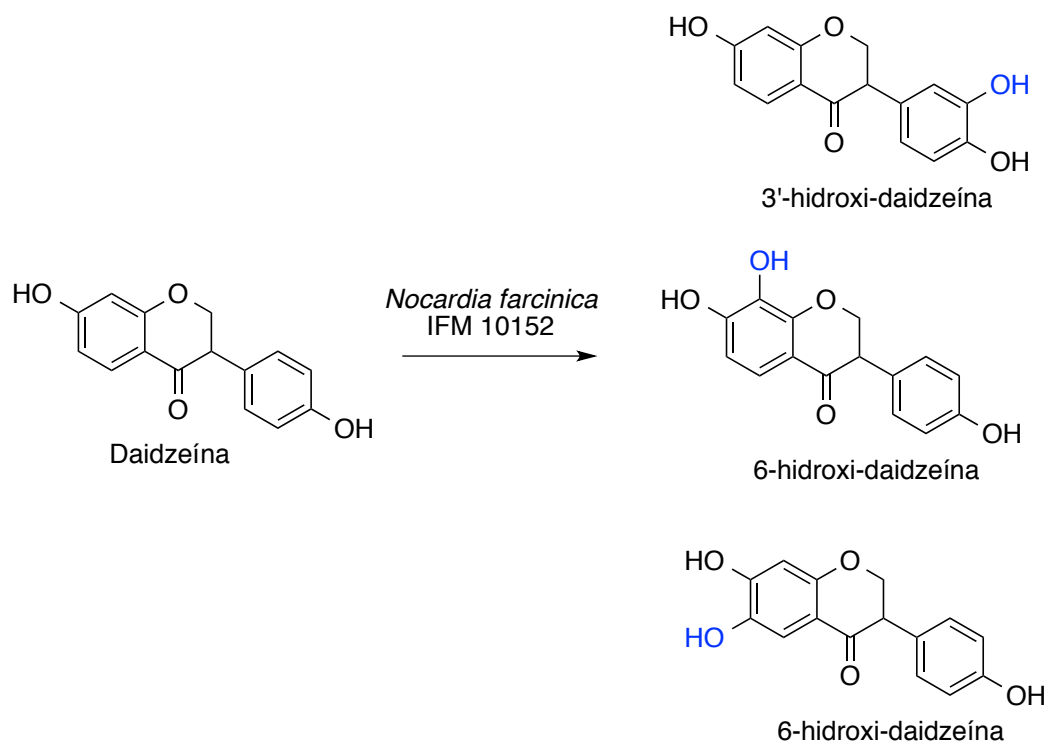
A síntese química apresentou muitas desvantagens como um método tradicional para a preparação de derivados hidroxilados, tais quais toxicidade de catalisadores químicos, etapas complicadas de reação, tempo exagerado de produção e baixo rendimento. Visto que os mecanismos mediados pelo CYP450 introduzem um oxigênio molecular em substratos, apresentando alta regio- e estereosseletividades, a

alternativa microbiana mostrou-se consideravelmente vantajosa para reações deste tipo (CHOI *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 2016).

Os vários grupamentos hidroxila dos flavonoides, além de identificarem-nos entre si, determinam suas cores e estabilidade e a maioria dos glicosídeos naturais encontrados derivam das agliconas flavonoides multi-hidroxiladas. Quando estas modificações acontecem especialmente no anel B podem aumentar significativamente sua atividade antioxidante, além de resultar em uma menor hidrofobicidade – o que dificulta a permeabilidade destes compostos em membranas biológicas (KUMAR E PANDEY, 2013; CAO *et al.*, 2015; KARABÍN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018).

Três derivados monohidroxilados da daidzeína, 3'-hidroxidaidzeína, 6-hidroxidaidzeína e 8-hidroxidaidzeína foram obtidos da biotransformação catalisada por células inteiras de *Nocardia farcinica* IFM10152 (Figura 52) e o envolvimento do CYP450 na modificação molecular foi confirmado por clonagem de todos os genes das 27 CYP450s microbianas e introdução em hospedeiro *E. coli* BL21 (CHOI *et al.*, 2009).

Figura 52 - Esquema de biotransformação de daidzeína por *Nocardia farcinica* IFM10152

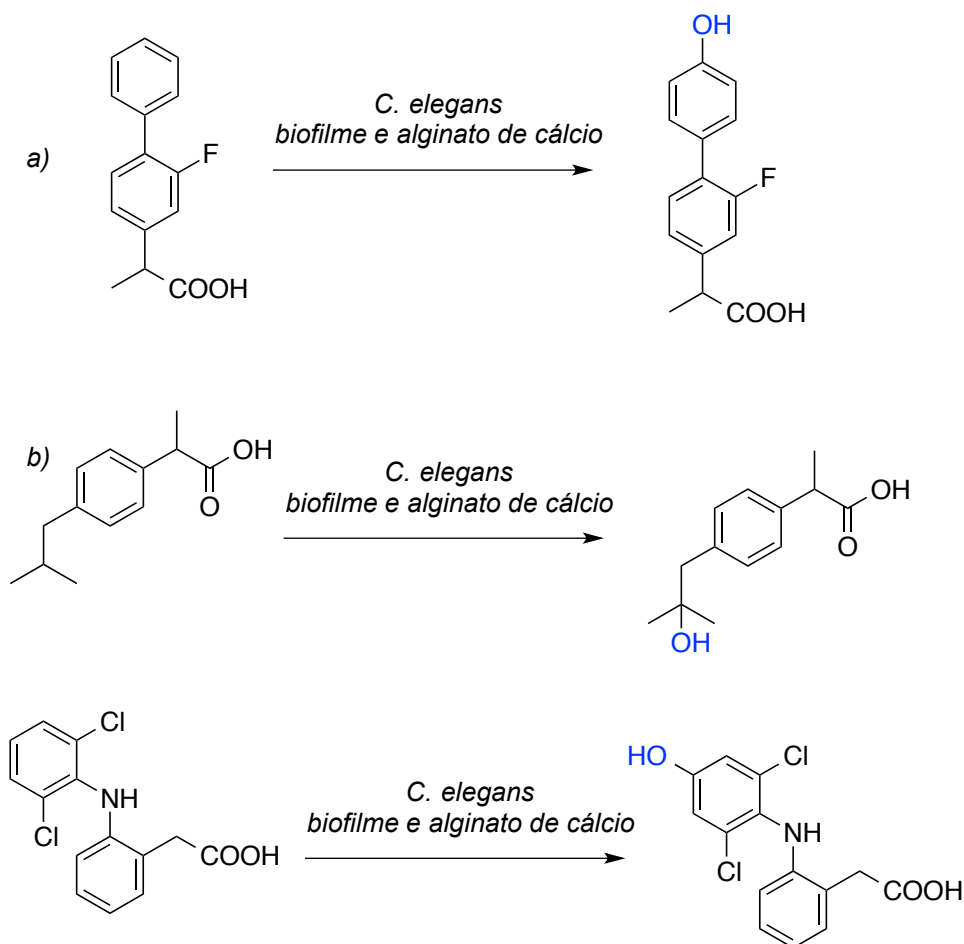


Fonte: autor

Amadio *et al.* (2013) descreveram a obtenção de derivados hidroxilados do flurbiprofeno por biofilmes de *C. elegans*, com taxa de conversão de 86 %, em 24 horas, frente aos 76 % apresentados pelas culturas livres. Neste estudo, os biofilmes também apresentaram vida mais longa (AMADIO *et al.*, 2013).

4'-hidroxiflurbiprofeno, 4'-hidroxiclofenaco e 2-hidroxiplutamida também foram obtidos por biofilmes de *C. elegans* (imobilizado em alginato de cálcio e molas de aço inoxidável) no estudo de escalonamento da produção de derivados de fármacos catalisada por fungos filamentosos (Figura 53) (QUINN *et al.*, 2015).

Figura 53 - Esquema de obtenção de derivados hidroxilados de fármacos catalisada por *C. elegans* sob forma de biofilme e imobilizada em alginato de cálcio



Fonte: autor

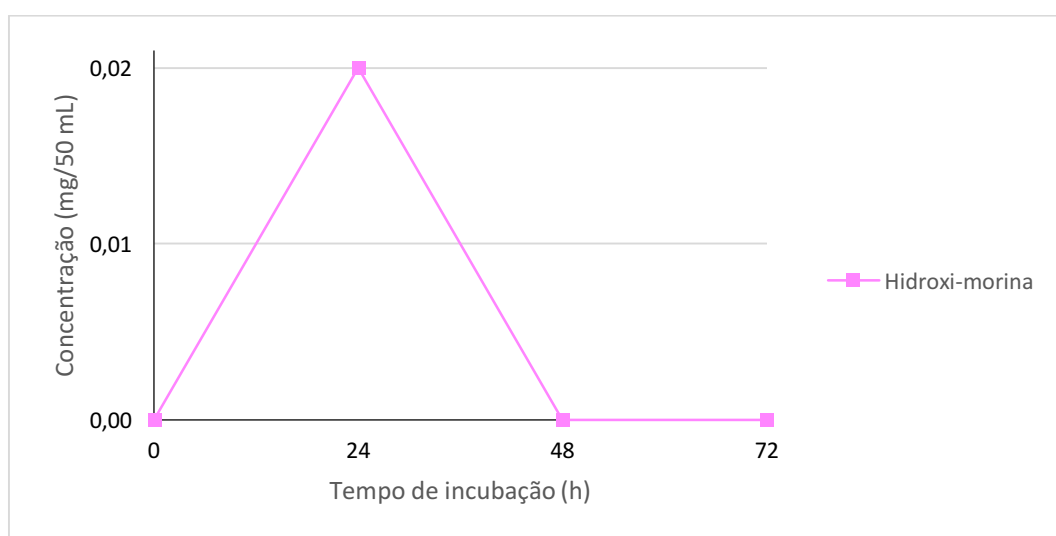
Neste estudo, ademais, Quinn *et al.* (2015) destacam a possibilidade de reuso do biocatalisador imobilizado como vantagem, bem como sua aplicação por um período maior, o que é inviável para as células livres.

#### 4.3.2.3.2 Estudo da cinética de formação do derivado hidroxi-morina

O estudo da cinética de formação do derivado hidroxi-morina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 (Figura 54) a partir das análises dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras dos tempos de incubação T0, T24, T48 e T72 (Anexo G) possibilitou observar que apenas a amostra obtida no tempo de 24 horas contém este composto, dado que pode ser considerado para o planejamento de experimentos que objetivem a catálise deste tipo de reação.

Uma das desvantagens associadas ao uso de biofilmes pode estar na limitação na transferência de massa dos produtos formados entre os compartimentos intracelulares e o meio de cultura, o que não foi observado neste estudo, já que, mesmo em quantidades muito baixas, foi possível identificar e caracterizar o derivado (WANG *et al.*, 2005).

Figura 54 - Cinética de formação do hidroxi-morina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244

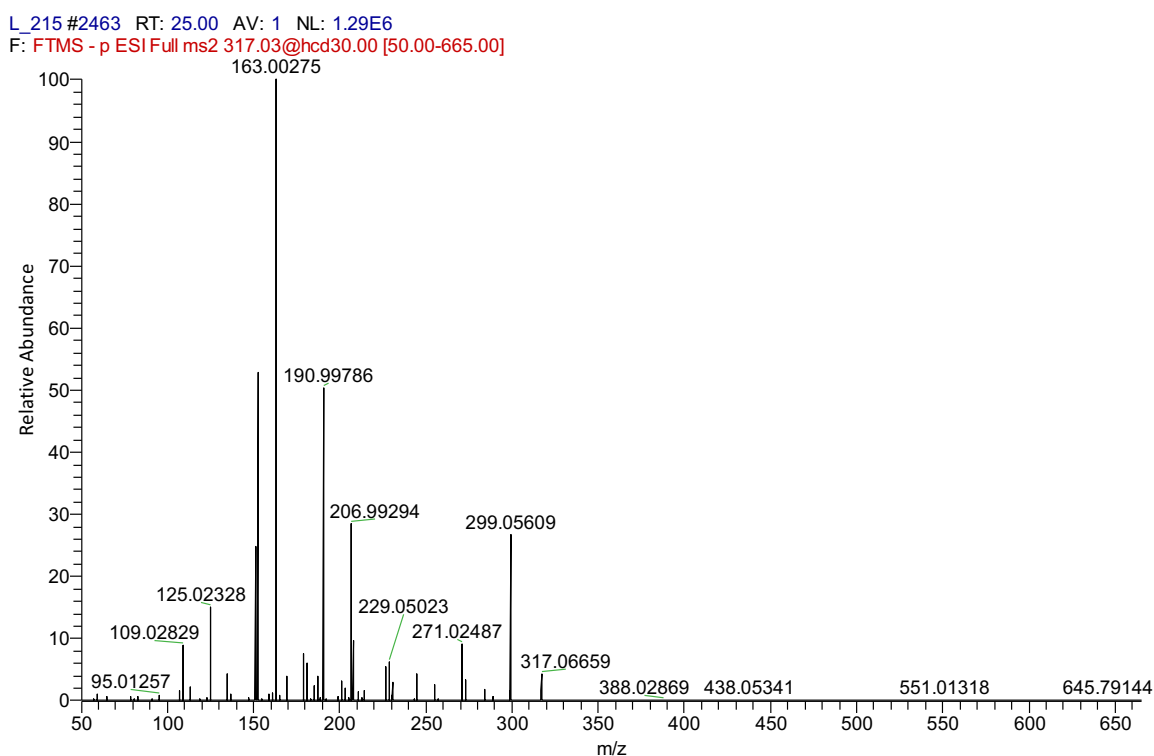


Fonte: autor

#### 4.3.2.4 Caracterização de derivado hidroxiflavanona ou flavanonol por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244

O espectro de massa CLAE-EMAR para o pico com tempo de retenção 25,00 minutos contém o íon molecular  $[M - H^+]^-$  317,06659, com erro 1,011 ppm. As informações de *Ring Double Bond Equivalents* (RDBE) 10,5 para a fórmula molecular  $C_{16}H_{13}O_7$  contribuíram para a proposição do derivado hidroxiflavanona ou flavanonol (Figura 55).

Figura 55 - Espectro de massas CLAE-EMAR do pico com tempo de retenção 25 minutos da amostra de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M - H^+]^-$  317,02975 monitorado



Fonte: autor

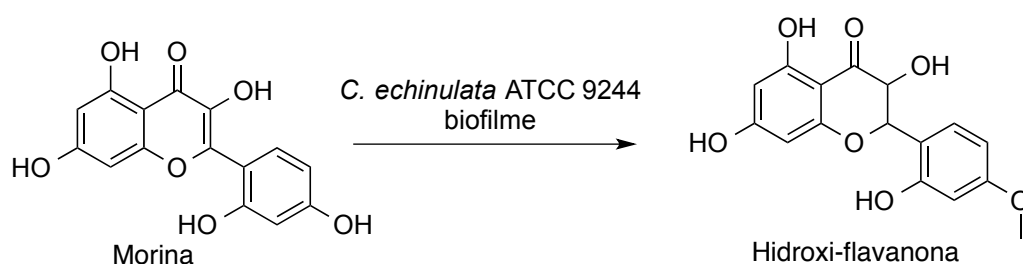
As flavanonas são uma classe de intermediários flavonoides, que dá origem aos isoflavonóides por intermédio da subfamília 93C do CYP450 (AKASHI *et al.*, 2005). Possuem o anel C saturado e, ao contrário das flavonas, a dupla ligação entre as posições 2 e 3 também é saturada (PANCHE *et al.*, 2016).

As hidroxiflavanonas são produtos naturais extremamente raros e sua síntese química, separação e purificação são extremamente difíceis. Além disso, são frequentemente relatados como novos compostos, não descritos na literatura (STEVENS *et al.*, 1999; KULESH *et al.*, 2001; KOSTRZEWA-SUSŁOW E JANECKO, 2012). Ainda, várias enzimas específicas de leguminosas são essenciais para a biossíntese desses compostos (AKASHI *et al.*, 2005).

DuBois e Sneden (1996) obtiveram o 3-hidroxiflavanona ferreirinol – uma classe relativamente rara de flavonoides – a partir do extrato etanólico do cerne seco e moído de *Swartzia polyphylla*. Neste estudo, a espectrometria de massas do composto obtido apresentou fragmentos característicos  $[M]^+$   $m/z$  166 e  $m/z$  152.

A proposta para o derivado hidroxiflavanona obtido a partir da biotransformação da morina por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 é de um isômero estrutural do ferreirinol (Figura 56). Não foram encontrados relatos na literatura de produção microbiana deste composto, sendo, possivelmente, este o primeiro a descrever a sua biossíntese.

Figura 56 - Proposição da biotransformação de morina a hidroxiflavanona por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

A aplicação prática de flavonoides como medicamentos é frequentemente considerada limitada, frente a sua baixa solubilidade, transporte ineficiente através das membranas biológicas e baixa estabilidade. A biotransformação deste tipo de composto pode ser um método natural de modificação molecular, objetivando aumentar a diversidade estrutural e melhorar sua bioacessibilidade, e também possibilita rastrear e estudar as suas transformações metabólicas (KOSTRZEWA-SUSŁOW, EDYTA E JANECKO, TOMASZ, 2012).

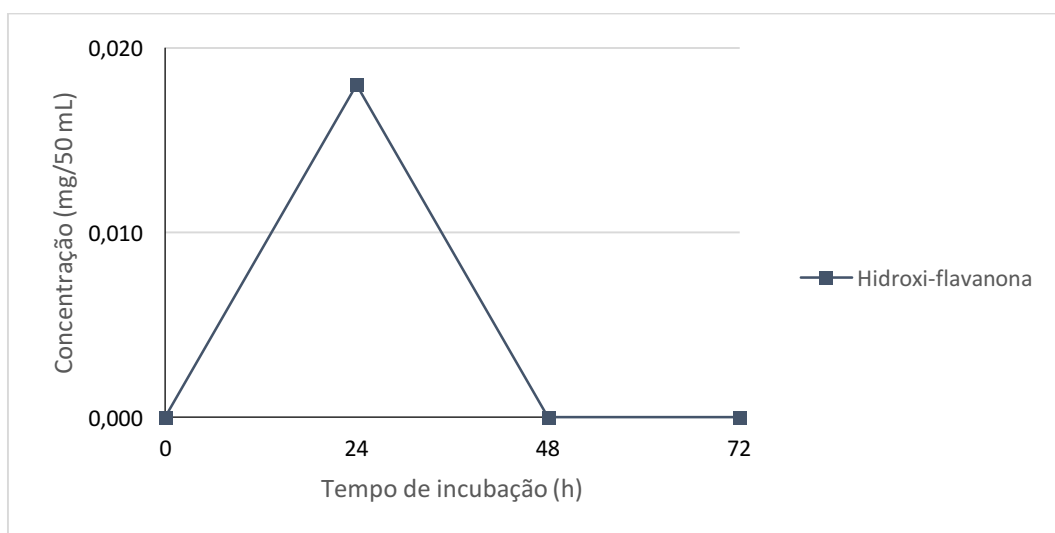
#### 4.3.2.4.1 Estudo da cinética de formação do derivado hidroxi-flavanona

O estudo da cinética de formação do derivado hidroxi-flavanona catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 foi possível a partir das análises dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras dos tempos de incubação T0, T24, T48 e T72 (Anexo G).

A análise do gráfico da Figura 57 possibilitou identificar a presença deste derivado apenas nas primeiras 24 horas de incubação, sendo, portanto, para os estudos que objetivem a produção deste derivado, o monitoramento considerando este tempo de estudo.

Como no estudo da cinética de formação do derivado hidroxi-morina, não foram observadas, neste estudo, limitações na transferência de massa, que pode ser considerada uma desvantagem ao uso de biofilmes já que, mesmo em quantidades muito baixas, também foi possível identificar e caracterizar o derivado em questão (WANG *et al.*, 2005).

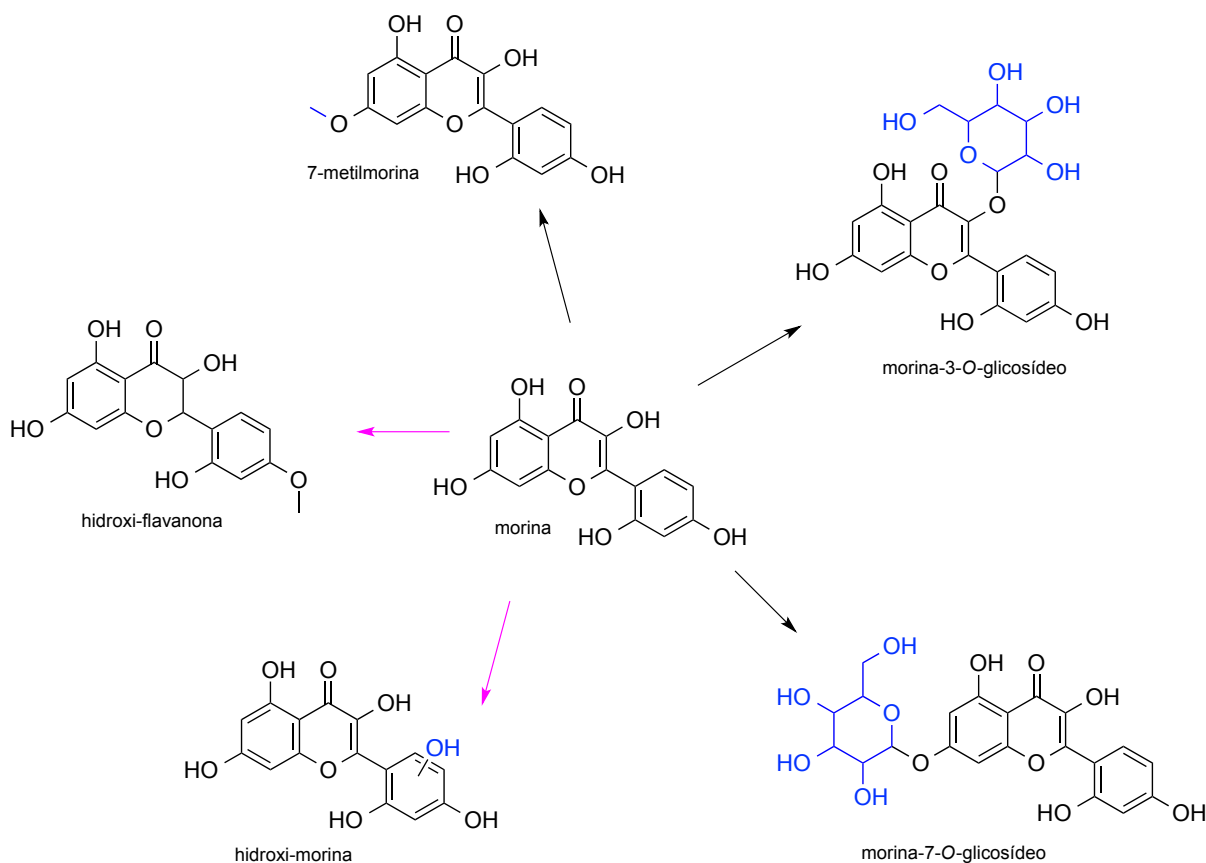
Figura 57 - Cinética de formação do hidroxi-flavanona catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

Do estudo de biotransformação de morina por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244 e após a caracterização dos derivados, temos, então, que foram produzidos cinco derivados, descritos na Figura 58.

Figura 58 - Proposição dos derivados formados a partir da biotransformação de morina por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor. Legenda: setas em preto: derivados produzidos por células livres e biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244; setas em rosa: derivados produzidos exclusivamente por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244

### 4.3.3 Técnicas de monitoramento, isolamento e caracterização

#### 4.3.3.1 Espectrometria de Massas

A geração de derivados e produtos de metabolismo advindos dos estudos de biotransformação microbiana requer cuidadoso monitoramento e exige o emprego e execução de técnicas analíticas capazes de fornecer informações estruturais que são

cruciais para a sua caracterização. Inúmeras técnicas analíticas têm sido empregadas na análise destes compostos (RYDEVIK, 2014; SPONCHIADO *et al.*, 2019).

A Espectrometria de Massas é uma destas técnicas analíticas e baseia-se na determinação da massa molecular de compostos químicos pela separação de íons moleculares conforme a sua razão massa-carga ( $m/z$ ). Os íons são gerados tanto pela perda ou ganho induzidos de carga, como são os casos das protonações e desprotonações, e, uma vez gerados, podem ser separados de acordo com sua  $m/z$  e finalmente detectados. Assim, até mesmo informações estruturais podem ser obtidas como resultado da ionização, separação de íon e detecção e fornecidas pelos espectros de massa (CARR *et al.*, 1991).

A Espectrometria de Massas apresenta muitas limitações no que se refere à diferenciação de isômeros constitucionais, especialmente aqueles com estruturas muito parecidas, a exemplo dos isômeros cis-trans ou orto/meta/para. Como a técnica fundamenta-se na medida da massa ( $m/z$ ) de moléculas isoladas, muitas atribuições seguras de configuração não são possíveis, já que os espectros e as fragmentações podem ser muito semelhantes (EBERLIN, 2012).

Todavia, tais métodos podem ser usados para obter informações sobre as sequências de carboidratos e as porções agliconas dos compostos em estudo. Em muitos casos, podem ser definidos, também, a posição de glicosilação e a identidade estereoquímica do resíduo de açúcar terminal (CUYCKENS E CLAEYS, 2004).

#### 4.4 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450)

A inibição enzimática caracteriza-se pela redução da atividade catalítica de enzimas metabolizadoras e, no caso de estudos farmacocinéticos, apresenta como consequência um aumento da meia-vida e da concentração plasmática do fármaco. Constantemente, o aumento da ocorrência de efeitos adversos e/ou tóxicos decorrem dessa inibição (BARREIRO E FRAGA, 2015).

A capacidade de substâncias tais como fármacos, alimentos, produtos fitoterápicos e outros agentes de induzir ou inibir as enzimas do CYP450 pode resultar em mudanças na sua habilidade metabólica. A inibição enzimática é de sumo interesse, já que ocorre com a primeira dose do agente inibidor (NDUKA *et al.*, 2017).

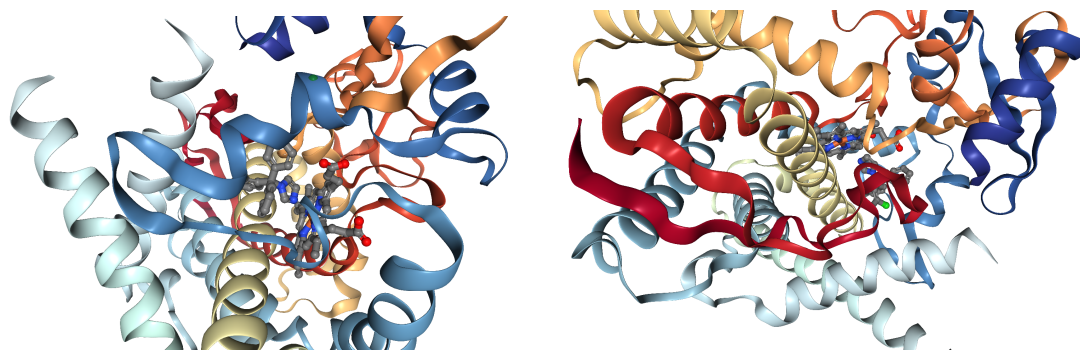
Em estudos farmacológicos, essas alterações nas taxas de metabolismo causam variações significativas na resposta terapêutica dos fármacos ou medicamentos em teste. A inibição enzimática pode, ainda, ser consideravelmente importante para o estudo de associações e interações medicamentosas, podendo ser observado, ademais, um aumento na biodisponibilidade ou acúmulo de substâncias tóxicas (AUDI E PUSSI, 2000; ZANGER E SCHWAB, 2013; NDUKA *et al.*, 2017).

Em geral, cada isoenzima apresenta maior especificidade por um substrato, mas sendo observado, também, xenobióticos sendo metabolizados por mais de uma isoforma (ZANGER E SCHWAB, 2013).

A subfamília CYP3A é a mais importante das famílias do CYP450 envolvidas no metabolismo e biotransformações, frente à sua abundante expressão nos principais órgãos de eliminação, sua habilidade em metabolizar uma ampla gama de substratos estruturalmente diversos e seu papel dominante no metabolismo, e é altamente passível de experimentos de indução e inibição (MICHAELS E WANG, 2014; BARREIRO E FRAGA, 2015).

Clotrimazol, um agente antifúngico azólico, é um potente inibidor das isoformas CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 e inespecificamente da subfamília 3A (Figura 59) (MERINO *et al.*, 2003; KEBAMO *et al.*, 2015). Alguns estudos mostram a inibição das enzimas CYP como efeito adverso do clotrimazol e, estruturalmente, deve-se à subunidade imidazólica (SANTOS E CHIN, 2012).

Figura 59 - Complexo de clotrimazol do Citocromo P450 46A1 humano (PDB 46A1)



Fonte: <http://www.rcsb.org/3MDV>

Geralmente, os compostos imidazólicos estão entre os potentes inibidores reversíveis da atividade das enzimas CYP, uma vez que eles não só blindam o grupo

prostético heme, como também se ligam à sua porção lipofílica. Inibidores que são capazes de formar ligações simultaneamente a estas duas regiões da enzima são inibidores inerentemente mais potentes (LIN E LU, 1998).

Thummel e Wilkinson (1998) observaram que, apesar de as interações clínicas descritas para os agentes como o clotrimazol serem de natureza inibitória, um efeito bifásico pode acontecer, mediado por uma interação de difícil compreensão entre indutor/inibidor, seu receptor e outros produtos do metabolismo endógeno, em que, são formados complexos com as proteínas CYP3A, aumentando os seus níveis por estabilização.

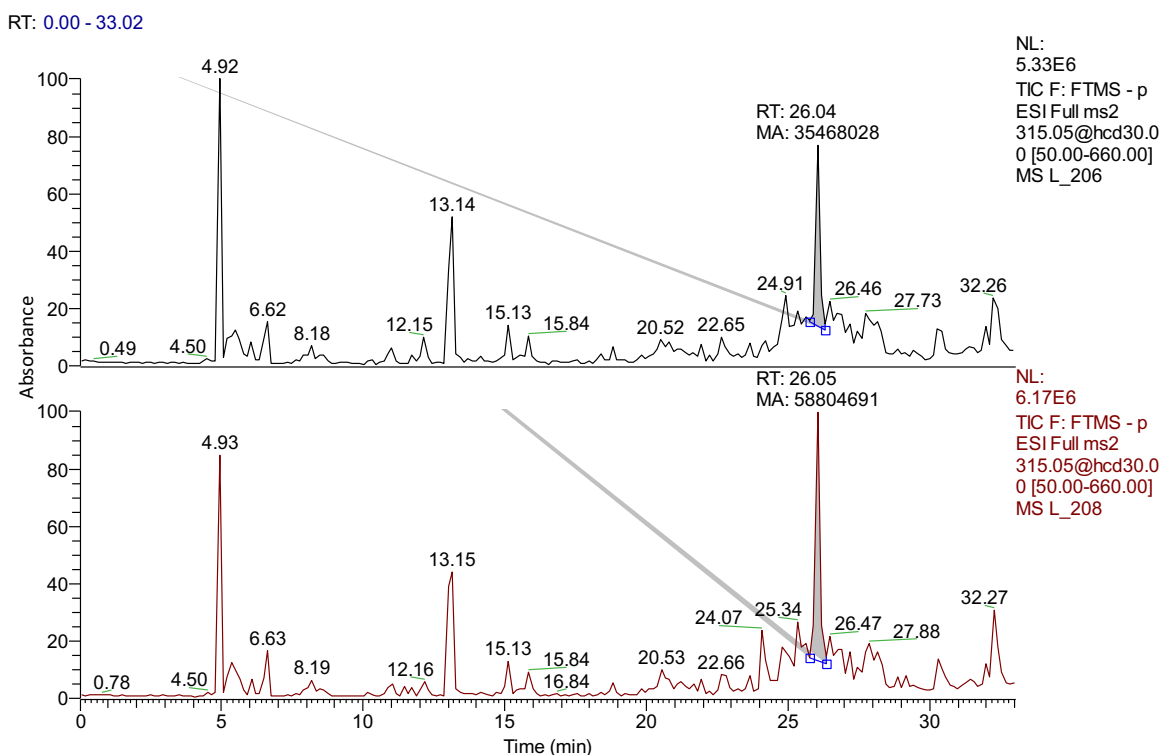
#### **4.4.1 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em células livres de *C. echinulata* ATCC 9244**

##### 4.4.1.1 Influências na geração do derivado 7-metilmorina

No experimento de inibição da subfamília CYP3A, verificou-se, igualmente, a formação dos derivados metilado e glicosilados a partir da biotransformação catalisada com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244. Como as reações de *O*-metilação e glicosilação são mediadas por enzimas de conjugação do metabolismo de Fase II, não se esperava, portanto, diminuição na formação destes derivados.

Quando comparados os espectros das amostras dos sobrenadantes de incubação obtidos nos tempos de 72 horas (Figura 60), com o íon referente ao derivado metilado monitorado, é possível verificar a sua formação nos dois experimentos.

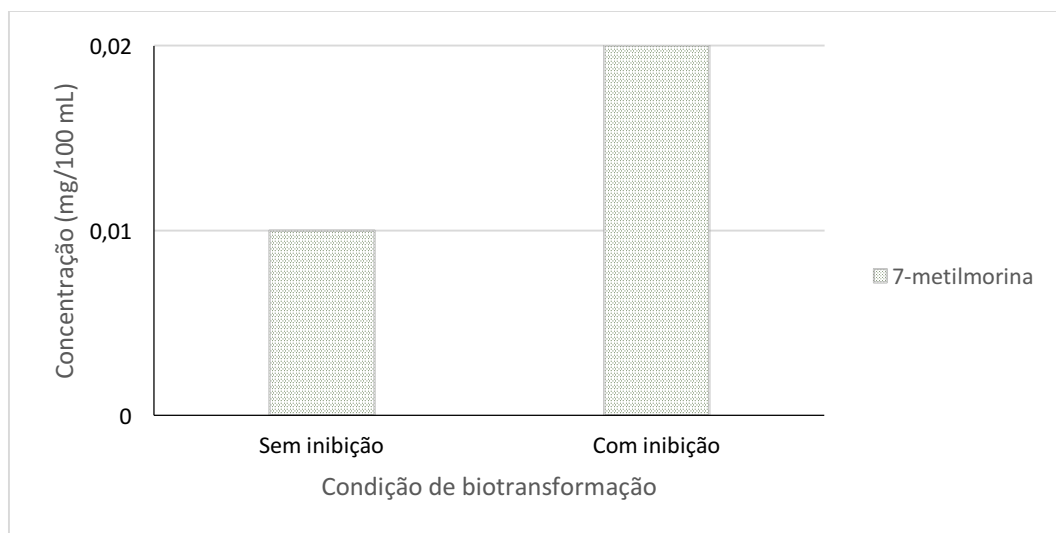
Figura 60 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol (a) e sem inibidor clotrimazol (b), e íon molecular  $[M - H^+]^-$  315,05048 monitorado



Fonte: autor

Na comparação das áreas dos picos (Figura 61), observa-se um rendimento maior para a obtenção de 7-metilmorina quando da adição do CYP-inibidor clotrimazol, o que confirma a ação de outras enzimas de Fase II na biotransformação, tais como metiltransferases.

Figura 61 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do derivado 7-metilmorina (72 horas), catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol



Fonte: autor

No estudo da capacidade de indução e inibição de CYP450 por benzodiazepinas, verificou-se que, além de induzir a subfamília CYP2B, o clonazepam foi capaz, também, de induzir o RNA codificador de outras enzimas metabolizadoras, a exemplo da glutationa-*S*-transferase, que não é tipicamente induzida por este tipo de composto (NIMS *et al.*, 1997).

Neste estudo, o clotrimazol, como inibidor inespecífico da subfamília CYP3A, pode, também, ter influenciado a codificação de outras enzimas envolvidas no metabolismo na morina, justificando o aumento de rendimento na obtenção do derivado 7-metilmorina. No entanto, análises de proteômica são requeridas, nestes casos, para se investigar as enzimas presentes no metabolismo em questão (ARRUDA, 2018).

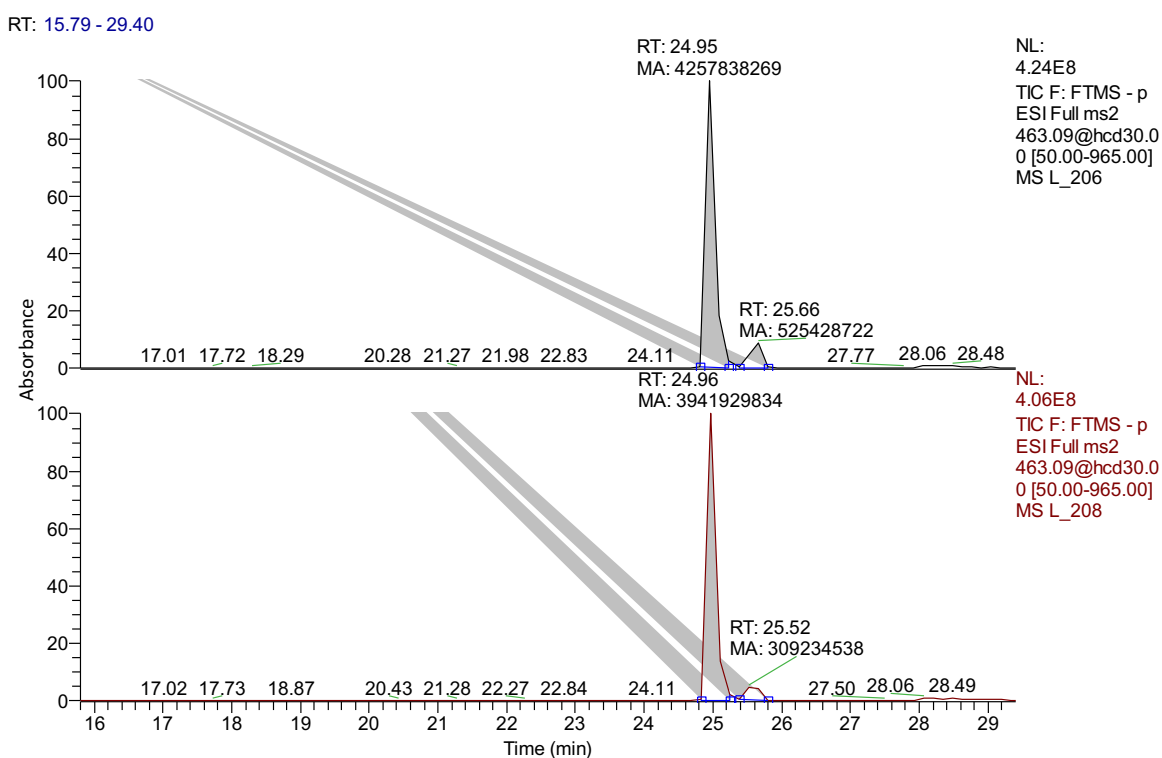
#### 4.4.1.2 Influência na geração dos derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo

Em relação aos derivados glicosilados, obtiveram-se também os derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo no experimento de inibição da

subfamília CYP3A, sugerindo que o metabolismo da morina não é mediado exclusivamente pelas enzimas da subfamília CYP3A e que há outras enzimas de Fase II atuando na biotransformação, como as glicosiltransferases.

Os cromatogramas contidos na Figura 62 mostram os picos referentes aos derivados glicosilados nas amostras dos sobrenadantes dos experimentos sem adição de clotrimazol e com a presença do inibidor, quando do monitoramento do íon referente aos derivados glicosilados.

Figura 62 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol (a) e sem inibidor clotrimazol (b), e íon molecular  $[M - H^+]^-$  463,08766 monitorado

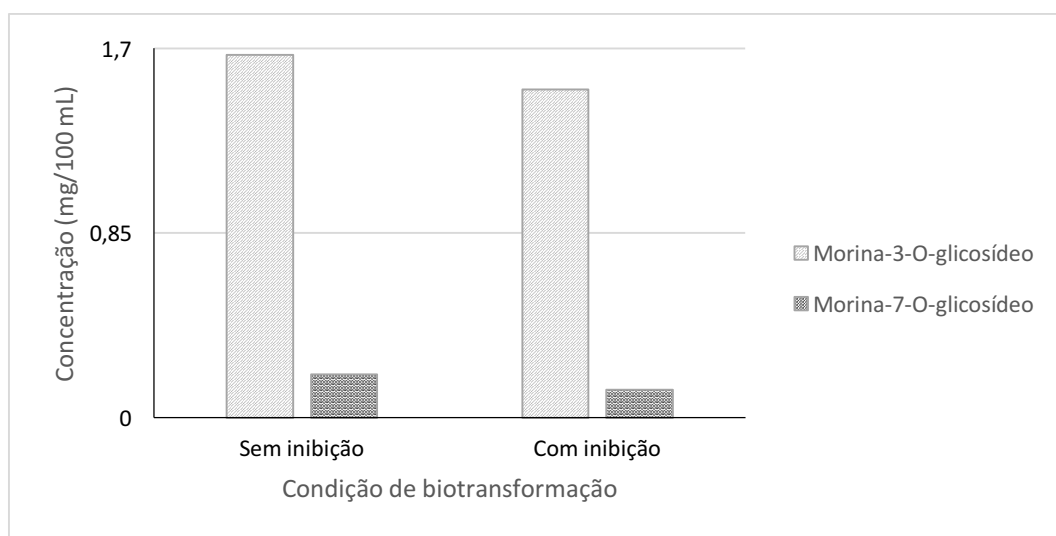


Fonte: autor

É possível observar, pela comparação das áreas dos picos dos dois experimentos (Figura 63), pouca influência no rendimento da biotransformação de morina a morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo. Destes resultados, comprova-se, então, que a formação de derivados glicosilados a partir do substrato

morina deve-se às enzimas de conjugação, estando a subfamília CYP3A envolvida em seu metabolismo de Fase I.

Figura 63 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação dos derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo (72 horas), catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol



Fonte: autor

Relatos na literatura afirmam que as reações de sulfatação, glucuronidação e *O*-metilação dos flavonoides sejam mediadas pela superfamília das sulfotransferases, glucuroniltransferases (UGTs), e catecol-*O*-metiltransferases, respectivamente, já que o processo é mais rápido e mais eficiente do que a oxidação mediada pelo CYP450, corroborando com os resultados obtidos neste estudo (VISKUPIČOVÁ *et al.*, 2008; CHALET *et al.*, 2018; PARAJULI *et al.*, 2018).

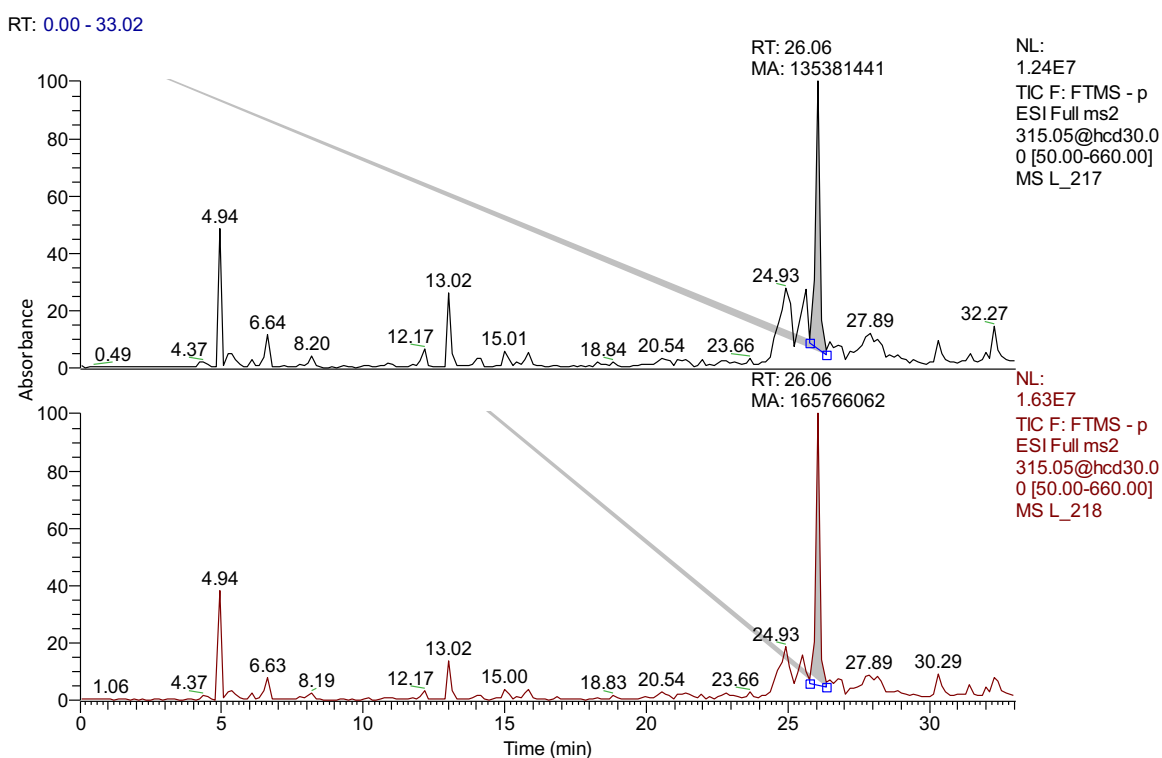
#### 4.4.2 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244

##### 4.4.2.1 Influência na geração do derivado 7-metilmorina

Quando inibida a subfamília CYP3A, por clotrimazol, nas biotransformação de morina por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, da mesma maneira o derivado 7-

metilmorina foi obtido. O espectro da Figura 64 traz os cromatogramas gerados das análises CLAE-EMAR, sendo possível observar os mesmos picos referentes ao derivado, quando o íon  $[M - H]^+$  315,05048 foi monitorado.

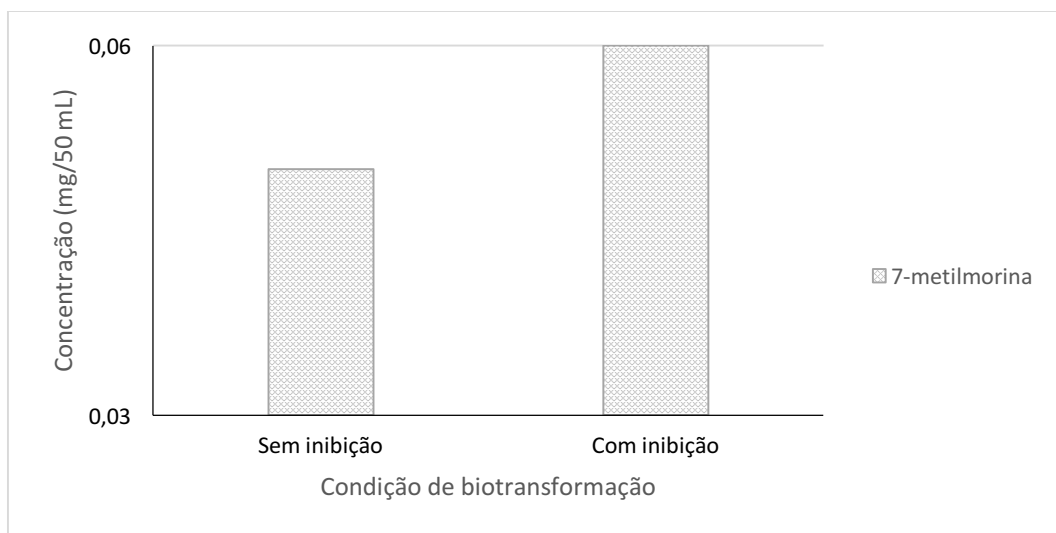
Figura 64 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular  $[M - H]^+$  315,05048 monitorado



Fonte: autor

Como observado no experimento com células livres, houve um leve aumento no rendimento da biotransformação de morina, quando da adição do inibidor clotrimazol, reforçando, novamente, o envolvimento de enzimas de Fase II na reação de *O*-metilação de morina (Figura 65).

Figura 65 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do derivado 7-metilmorina (72 horas), catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol



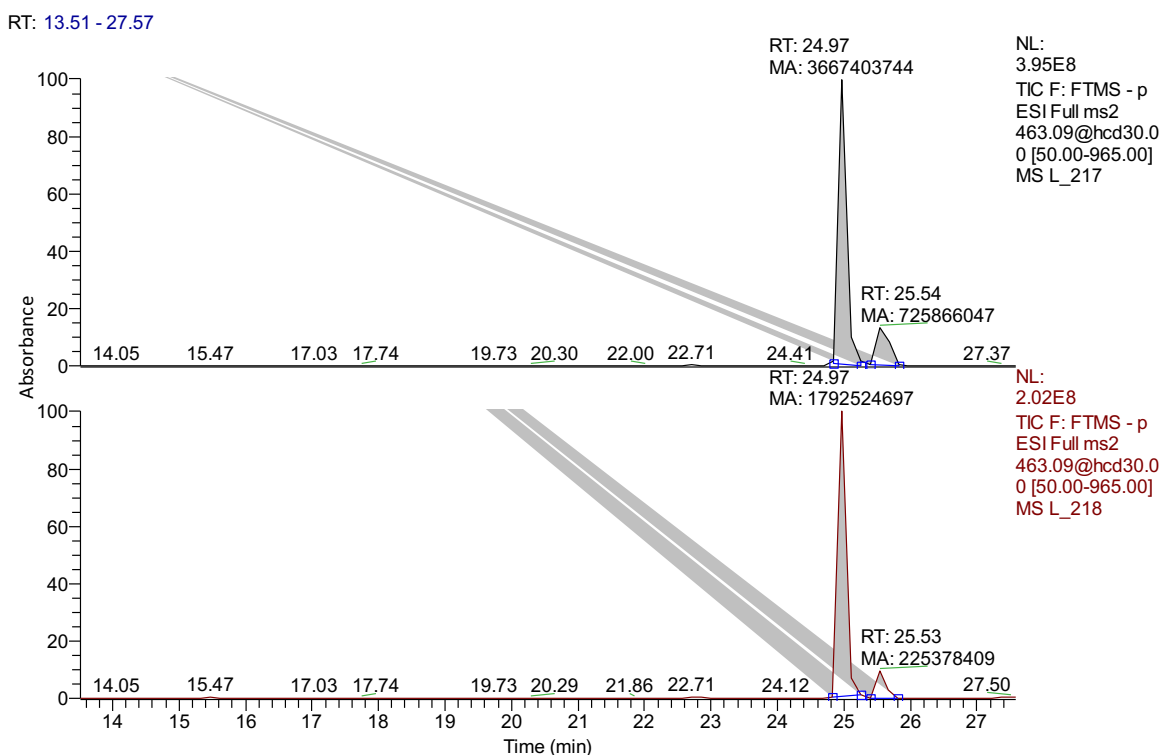
Fonte: autor

Neste caso, o aumento do rendimento no experimento de inibição pode ser justificado pela maior disponibilidade do substrato para a ação das metiltransferases, já que as enzimas do CYP450 não estavam desempenhando atividade catalítica, aumentando os níveis de morina disponível para metabolismo mediado por enzimas de conjugação.

#### 4.4.2.2 Influência na geração dos derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo

Os derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo também foram obtidos pela biotransformação de morina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, quando do experimento de inibição com clotrimazol. Os cromatogramas da Figura 66 mostram os picos atribuídos aos derivados glicosilados nas duas condições de biotransformação.

Figura 66 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de biotransformação de morina catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol (a) e sem inibidor clotrimazol (b), e íon molecular  $[M - H^+]^-$  463,08766 monitorado



Fonte: autor

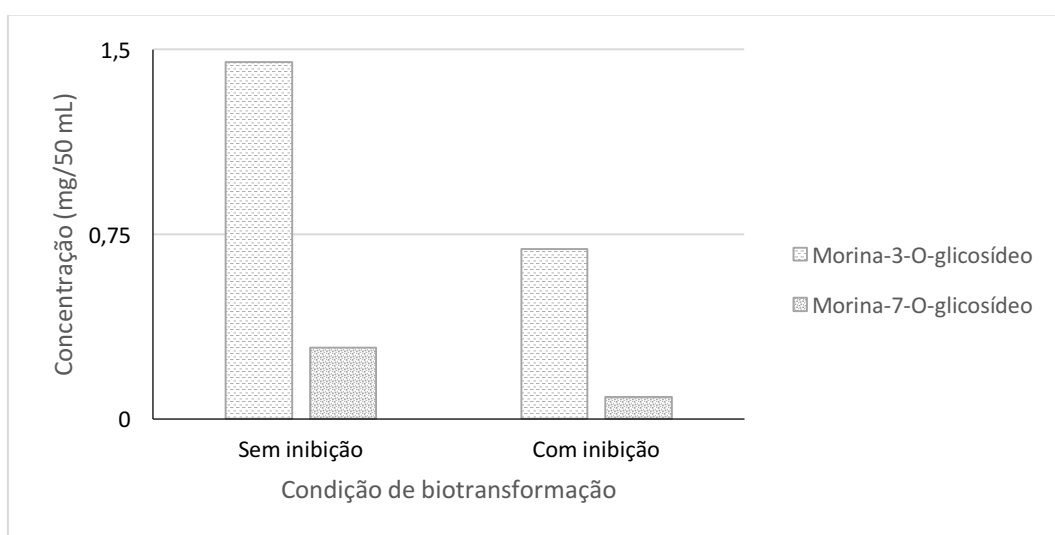
Pelo tipo de derivado obtido, esperava-se nenhuma influência no metabolismo e nas taxas de biotransformação da morina, frente à mediação das enzimas de conjugação. Contudo, pela análise do gráfico da Figura 67, verifica-se uma queda brusca no rendimento de formação destes derivados.

A estabilidade enzimática é uma das propriedades das quais geralmente se espera melhoria quando a imobilização celular é proposta. No entanto, em alguns casos, ela pode diminuir, se, por exemplo, o suporte imobilizador estabelecer interações indesejáveis com a enzima (MATEO *et al.*, 2007).

Neste estudo, o suporte imobilizador mostrou-se adequado à imobilização de células fúngicas de *C. echinulata* ATCC 9244, apresentando, inclusive, melhores rendimentos quando comparados os rendimentos de biotransformação catalisada por células fúngicas e biofilmes.

Interessantemente, Mateo e colaboradores (2007) afirmam que inibidores e protetores de outras enzimas podem reduzir a atividade enzimática de enzimas imobilizadas em suportes. Assim, a presença destes compostos induz a perda da atividade catalítica, o que pode justificar os menores rendimentos de geração dos derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo, apenas nos experimentos catalisados por biofilmes e com a adição do inibidor clotrimazol.

Figura 67 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação dos derivados morina-3-*O*-glicosídeo e morina-7-*O*-glicosídeo (72 horas), catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol



Fonte: autor

#### 4.4.2.3 Influência na geração dos derivados hidroximorina e hidroxiflavanona

No experimento de inibição da subfamília CYP3A, utilizando biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 como biocatalisadores, não foi possível verificar a formação dos derivados hidroximorina e hidroxiflavanona, comprovando o envolvimento de isoformas CYP450 na conversão destes intermediários (AKASHI *et al.*, 2005; LAMB E WATERMAN, 2013).

As reações mais comuns do complexo enzimático do CYP450 incluem as C-hidroxilações, oxigenações de heteroátomos, desalquilações, epoxidação e migração

de grupos funcionais. Mais recentemente, reações enzimáticas mais complexas e incomuns foram também atribuídas à catálise CYP450-dependente, tais como oxigenação do cloro; formação de dímeros; acoplamentos, contrações e formações de anel; e desalogenação aromática (LAMB E WATERMAN, 2013).

Estes estudos são de extrema importância já que a inibição ocorre com a primeira dose do agente inibidor e podem propor possíveis efeitos adversos provenientes de associações e interações medicamentosas (BARREIRO E FRAGA, 2015; NDUKA *et al.*, 2017).

As interações de qualquer substância cogitadas para uso terapêutico devem, primeiro, ser avaliadas com os principais CYP450s, a fim de se compreender sua eficácia e as possíveis reações adversas (ZHANG *et al.*, 2002).

## 5. CONCLUSÃO

*C. echinulata* ATCC 9244 mostrou-se um biocatalisador efetivo na produção de derivados de morina independentes do metabolismo, nas formas de cultivo livre e imobilizada. A biotransformação catalisada por células livres forneceu os derivados 7-metilmorina, morina-3-*O*-glicosídeo, morina-7-*O*-glicosídeo, sendo morina-3-*O*-glicosídeo produzido em maior quantidade.

Já da biotransformação com biofilmes, foram obtidos, além dos compostos acima descritos, os derivados hidroximorina e hidroxiflavanona – este pela primeira vez relatado na literatura.

O estudo das cinéticas de formação dos derivados mostrou uma maior eficiência catalítica, quanto ao rendimento de biotransformação, dos biofilmes aqui produzidos. Além disso, apresentaram-se como uma ferramenta importante para a geração exclusiva dos derivados hidroxilado e flavanona.

No experimento de inibição, foi possível verificar o envolvimento das enzimas oxidativas CYP450 e de conjugação na biotransformação da morina.

A técnica CLAE-EMAR foi importante na detecção e caracterização dos compostos obtidos e viabilizou enormemente o estudo, dispensando etapas de extração e purificação dos derivados.

CAPÍTULO 2  
ESTUDO DO METABOLISMO

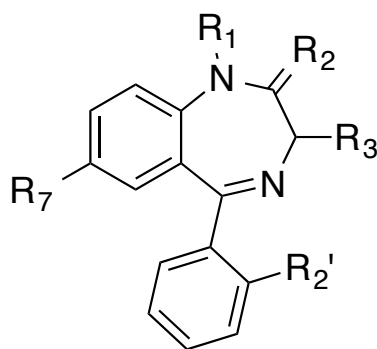
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 BENZODIAZEPÍNICOS

Os benzodiazepínicos, substâncias psicoativas dentre as mais prescritas no mundo para o tratamento de distúrbios do sono e de ansiedade, epilepsia, convulsões e outras condições psiquiátricas, são uma classe de compostos que compartilham entre si um anel comum de 7 átomos em sua estrutura química (Figura 68).

As benzodiazepinas individualizam-se, então, pelas variações funcionais no anel, que afetam suas propriedades biológicas e seus perfis farmacocinéticos (CARTER *et al.*, 2018; MANCHESTER *et al.*, 2018; MORTELÉ *et al.*, 2018). Esta classe de compostos é assim denominada, em virtude de seu anel benzênico fundido a um anel 1,4 diazepina de sete membros, sendo que a grande maioria também possui um anel substituinte 5-aril, e as diferentes substâncias são dadas por grupos substituintes diferentes nas posições 1, 2, 3 e 4 do anel diazepina, na posição 7 do anel benzênico ou na posição 2' do anel substituinte 5-aril (FRANÇA, 2013).

Figura 68 - Estrutura química básica das benzodiazepinas



Fonte: autor

A via de metabolismo das benzodiazepinas, geralmente oxidação e glucuronidação, foi extensivamente caracterizada, podendo envolver também a formação de metabólitos ativos, como o temazepam e o oxapam – produtos farmacêuticos também de prescrição (DE PAULA *et al.*, 2015; CARTER *et al.*, 2018; MORTELÉ *et al.*, 2018).

Em geral, os compostos benzodiazepínicos são primeiramente oxidados, em especial pelas enzimas do CYP450, fornecendo metabólitos que serão posteriormente glucuronidados para, então, serem excretados. Dessa maneira, seu tempo de ação pode ser muito longo. No caso da glucuronidação direta, são produzidos metabólitos inativos e que são rapidamente excretados, apresentando uma curta duração de ação (MANDRIOLI *et al.*, 2008; DE PAULA *et al.*, 2015).

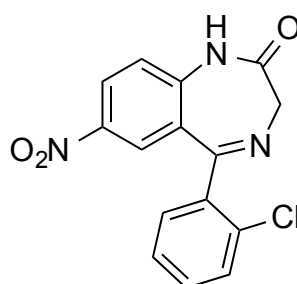
O uso generalizado das benzodiazepinas levou, recentemente, à sua detecção em águas residuais e, apesar de estarem relativamente em baixas concentrações, elas são tóxicas para organismos aquáticos. Há relatos, ainda, que tais compostos são resistentes à remoção do meio ambiente (CARTER *et al.*, 2018).

O estudo do metabolismo das benzodiazepinas catalisado por fungos filamentosos pode, além de mimetizar o metabolismo de mamíferos, gerar outros metabólitos e/ou derivados, que devem ser conhecidos e avaliados quanto a potenciais efeitos tóxicos para outros sistemas. A biotransformação fúngica, então, é uma estratégia viável, uma vez que fungos e os contaminantes benzodiazepínicos estão presentes no meio ambiente (DE PAULA *et al.*, 2015; CARTER *et al.*, 2018; PALMER-BROWN *et al.*, 2018).

### 1.1.1 Clonazepam

Clonazepam (5-(2-clorofenil)-7-nitro-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona) (Figura 69), um benzodiazepínico com propriedades anticonvulsivantes e ansiolíticas, está entre as 200 principais prescrições dispensadas nos EUA, juntamente com diazepam, lorazepam, alprazolam e temazepam de acordo com o IMS 2012 (NARDI E PERNA, 2006; DE PAULA *et al.*, 2015; CARTER *et al.*, 2018).

Figura 69 - Estrutura química de clonazepam



Fonte: autor

Este composto é extensivamente metabolizado a 7-amino-clonazepam por redução no grupo 7-nitro catalisada por enzimas CYP450. A seguir, este metabólito é, então, *N*-acetilado a 7-acetamido-clonazepam. A hidroxilação destes metabólitos e do composto de partida a 3-hidroxi-clonazepam, apesar de ser uma via metabólica menor, também já foi relatada (DE PAULA *et al.*, 2015; TÓTH *et al.*, 2016; MORTELÉ *et al.*, 2018).

A principal rota do metabolismo do clonazepam é a nitro-redução, catalisada majoritariamente pela isoforma CYP3A4, ao passo que a *N*-acetiltransferase é responsável pela acetilação de 7-amino clonazepam, que é, então, excretado nas urinas e nas fezes (SEREE *et al.*, 1993; MUNAKATA E TSUCHIYA, 2008; STORHAUG *et al.*, 2012; TÓTH *et al.*, 2016; WOLFF, 2016).

O metabolismo do clonazepam já foi reportado em humanos, cachorros, ratos (ELMER E REMMEL, 1984; SEREE *et al.*, 1993; STORHAUG *et al.*, 2012), macacos (LAI *et al.*, 1979), fungos (DE PAULA *et al.*, 2015) e células vegetais (CARTER *et al.*, 2018)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Aplicar células livres e biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 como modelo microbiano do metabolismo animal de clonazepam.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar células de *C. echinulata* ATCC 9244 em meio de cultura líquido PDSM, livremente e imobilizadas em molas de aço inoxidável, sob forma de biofilmes;
- Proceder ao estudo do metabolismo microbiano de clonazepam em escala semi-preparativa;
- Comparar os rendimentos de metabolismo com células livres e biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 através do estudo das cinéticas de obtenção dos metabólitos;
- Estudar o envolvimento das enzimas do Citocromo P450 através de estudos de inibição com o composto clotrimazol;
- Identificar e caracterizar os metabólitos de clonazepam por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 SUBSTRATO

##### 3.1.1 Clonazepam

O substrato clonazepam (5-(2-clorofenil)-7-nitro-1,3-dihidro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona) foi adquirido de Sigma Aldrich (Brasil), com pureza de 95%.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL, CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO, ANÁLISE DOS PRODUTOS E EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450)

A preparação do meio reacional, as condições de biotransformação, as análises dos produtos e o experimento de inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) foram as mesmas do estudo de biotransformação e geração de derivados de flavonoides, descritas nos subitens 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5 do capítulo anterior.

Os equipamentos utilizados foram Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, com coluna Zorbax Eclipse Plus fenil hexil – Agilent (4,6 x 100 mm; 3,5  $\mu$ m), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte *H-ESI*, operando em modo positivo, utilizando voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 20, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 320 °C, temperatura de gás auxiliar 300 °C, *tube lens* 70 e faixa de massas *m/z* 150-750. A análise por CLAE foi realizada com água deionizada acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (Fase móvel A, v/v) e acetonitrila acidificada com 0,1% ácido fórmico (Fase móvel B, v/v). A programação gradiente realizada iniciou-se com 80:20 (A:B %), 100 (B %) em 20 minutos, permaneceu por 3 minutos, 80:20 (A:B %) em 1 minuto, permanecendo por 5 minutos. O tempo de corrida foi 29 minutos, com fluxo de 0,3 mL/min, volume injeção 10  $\mu$ L 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 70 (CE).

Os íons  $[M + H]^+$  monitorados foram 252,11369; 271,06382; 277,03800; 282,08787; 286,07471; 287,05873; 301,07438; 328,08528; 332,04381; 345,11585 e 448,12752.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

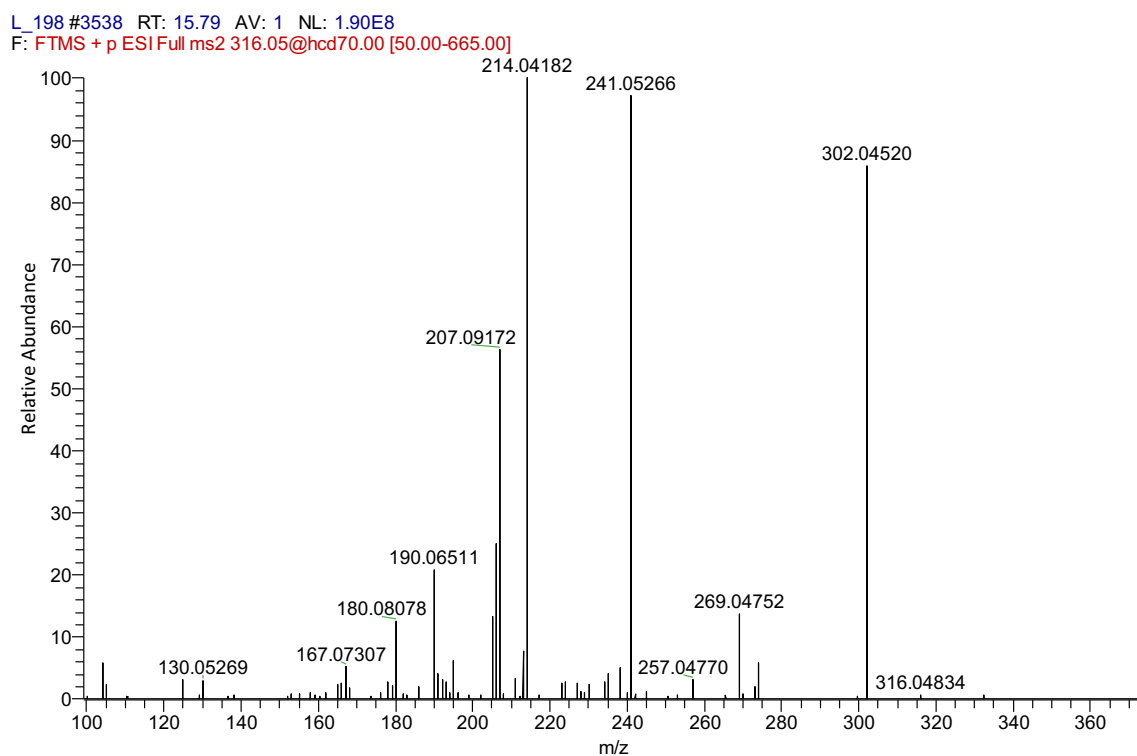
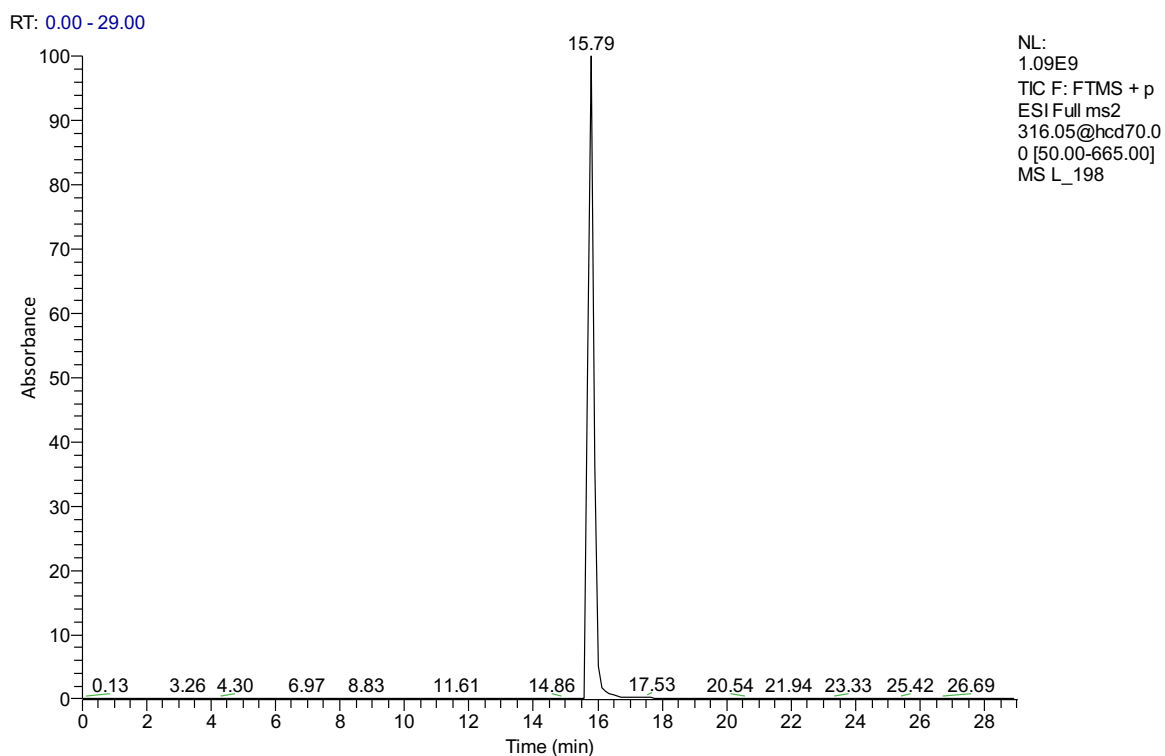
### 4.1 SUBSTRATO

#### 4.1.1 Caracterização do substrato clonazepam

As análises, por CLAE-EMAR, do padrão clonazepam permitiram a identificação da transição do íon precursor para os íons referentes aos fragmentos. O espectro de massas (CLAE-EMAR) mostra um íon molecular  $[M + H^+]^+$  316,04834, com erro 0,005 ppm, referente ao composto protonado, e os íons fragmento, no tempo de retenção 15,79 minutos (Figura 70).

Os íons fragmento  $m/z$  270 (resultante da perda  $NO_2$ ) e  $m/z$  241 (resultante da perda CO) e  $m/z$  214 foram os íons característicos da fragmentação do clonazepam com fonte de ionização por eletropulverização, em modo positivo (KIM *et al.*, 2011; CAVEDAL, 2014; DING *et al.*, 2014).

Figura 70 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra clonazepam, com íon molecular  $[M + H]^+$  316,04891 monitorado



Fonte: autor

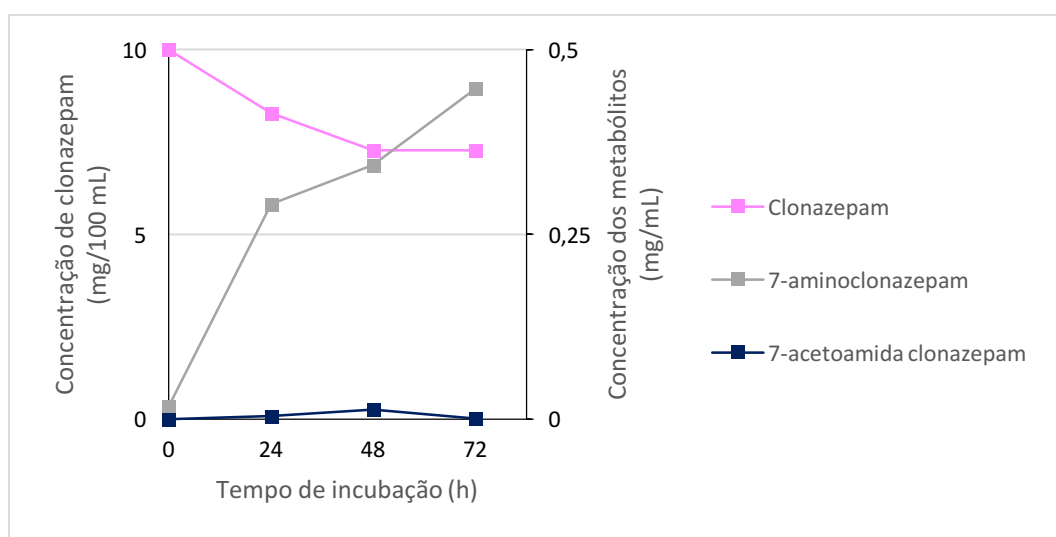
## 4.2 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE METABOLISMO

### 4.2.1 Metabolismo de clonazepam catalisado por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244

As análises por CLAE-EMAR possibilitaram o estudo da cinética do metabolismo de clonazepam, durante o período de incubação com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244 (Anexo H). O gráfico da Figura 71 foi obtido a partir destes dados.

É possível notar, então, que já nas primeiras 24 horas de exposição às células fúngicas, houve a produção microbiana de dois metabólitos humanos, 7-aminoclonazepam e 7-acetoamida clonazepam. Verifica-se, também, que a maior parte do substrato não foi metabolizada. Contudo, a técnica de identificação e caracterização empregada foi eficiente na detecção dos metabólitos mesmo em pequenas quantidades.

Figura 71 - Cinética de metabolismo de clonazepam e geração dos metabólitos 7-amino clonazepam e 7-acetoamida clonazepam catalisadas por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

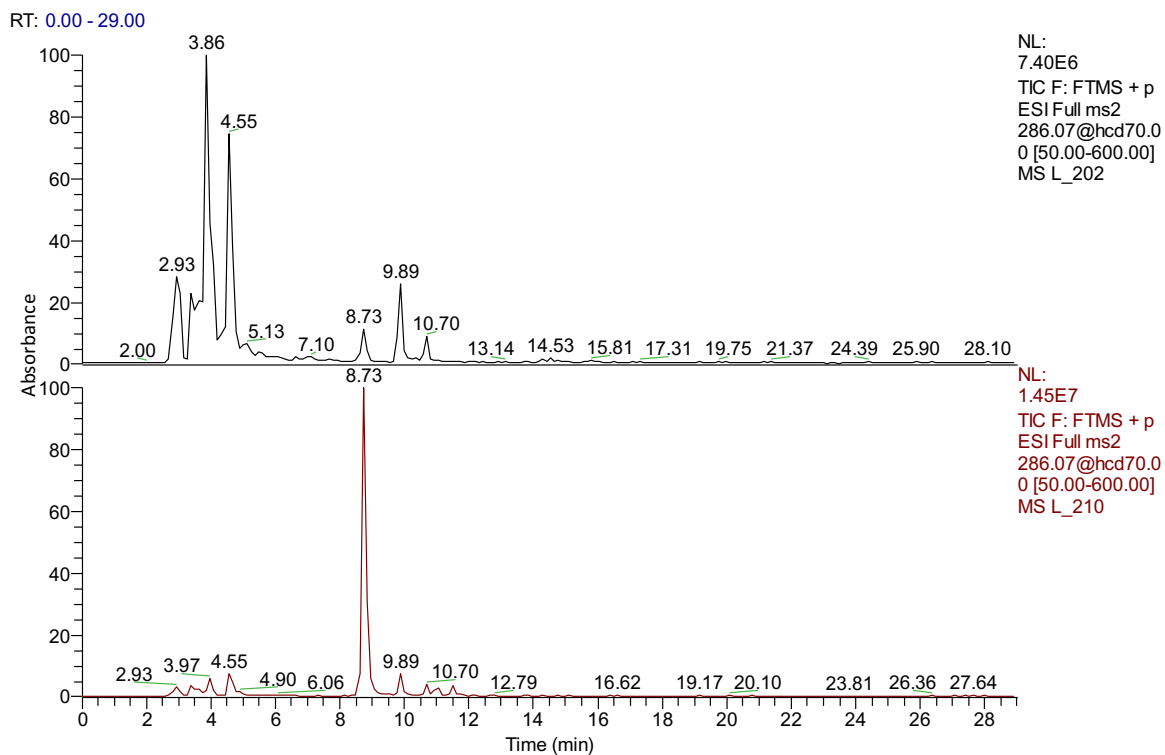
\*dados referentes aos derivados plotados em eixo secundário

#### 4.2.1.1 Caracterização do derivado 7-amino-clonazepam

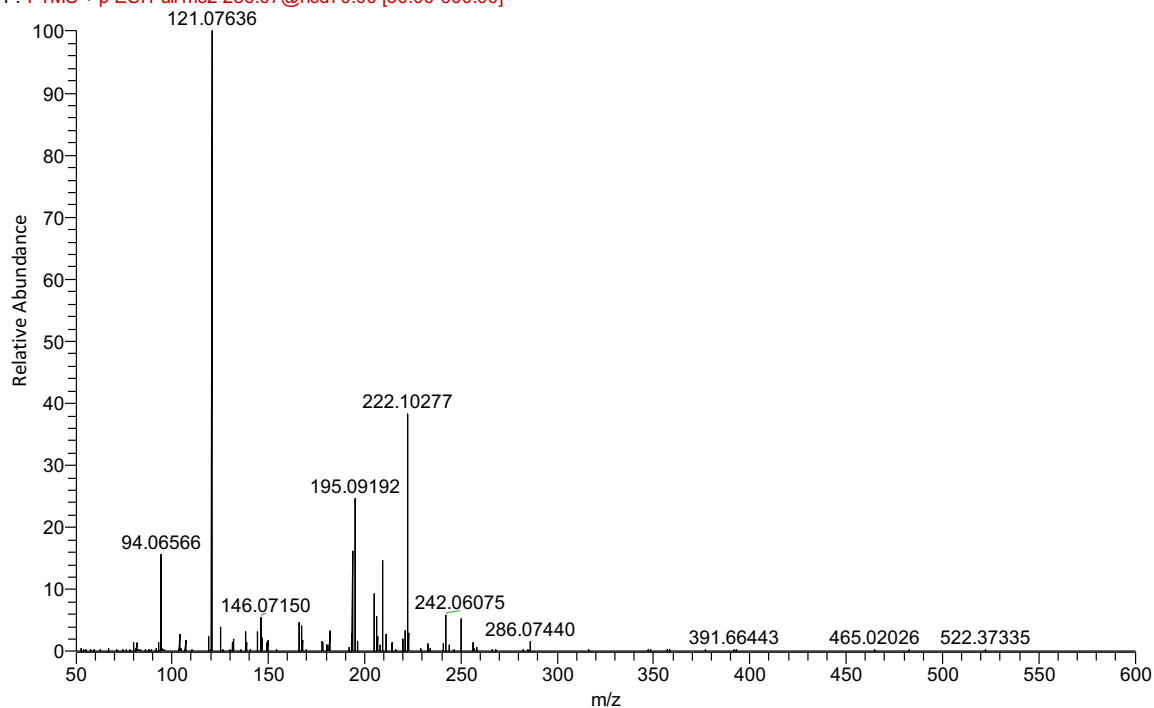
As análises, por CLAE-EMAR, das amostras dos sobrenadantes de incubação (T0, T24, T48 e T72) da biotransformação catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244 possibilitaram verificar a formação do metabólito amino-clonazepam, análogo ao metabolismo de mamíferos.

O espectro de massa CLAE-EMAR, no tempo de retenção 8,73 minutos, apresentou íon precursor  $[M + H^+]^+$  286,07440 com erro de 0,234 ppm (Figura 72), referente à perda de dois átomos de oxigênio, caracterizando o metabólito 7-amino-clonazepam, já descrito na literatura (RUST *et al.*, 2012; DE PAULA *et al.*, 2015; MELANSON *et al.*, 2016; NIESSEN E CORREA, 2017; KRONSTRAND *et al.*, 2018).

Figura 72 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de *C. echinulata*, com íon molecular  $[M + H]^+$  286,07471 monitorado



L\_210 #1956 RT: 8.73 AV: 1 NL: 4.10E6  
F: FTMS + p ESI Full ms2 286.07@hcd70.00 [50.00-600.00]



Fonte: autor

Os principais íons fragmentos observados estavam em  $m/z$  222 e  $m/z$  121, dados também verificados por Chèze *et al.* (2004), Kim *et al.* (2011), Almeida (2012), Rust *et al.* (2012) e Ding *et al.* (2014). O íon fragmento  $m/z$  222  $[M + H^+]^+$ , que dá origem ao fragmento  $m/z$  121, é proveniente da perda dos grupamentos  $-CO$  e  $-HCl$  (ALMEIDA, 2012; MELANSON *et al.*, 2016; NIESSEN E CORREA, 2017)

É possível verificar no cromatograma da amostra controle (Figura 72) um pico referente ao composto 7-aminoclonazepam, com mesmo padrão de fragmentação observado para as alíquotas de incubação. Infere-se que, neste experimento, houve a formação deste metabólito também de maneira abiótica e o composto de partida clonazepam apresenta instabilidade em meio de cultura líquido PDSM.

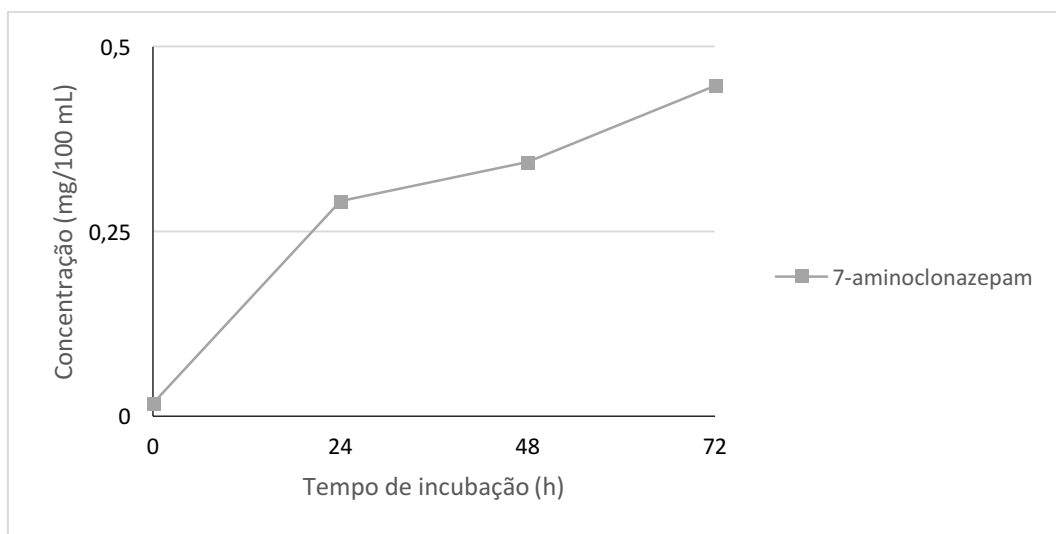
Estudos de estabilidade relatados na literatura mostraram a degradação de clonazepam em plasma ou em tampão fosfato (pH 7,4) (HAVER *et al.*, 1986; HAMMAD E MÜLLER, 1998; BARES *et al.*, 2004). Bares e colaboradores (2004) estudaram a estabilidade do clonazepam em água bidestilada, em termos de precisão e acurácia. Foi observada uma meia-vida curta do fármaco em água, o que pode justificar a presença do metabólito 7-aminoclonazepam nas amostras controle (clonazepam + meio de cultura PDSM).

O composto 7-aminoclonazepam é um produto ativo do metabolismo do clonazepam, com discreta atividade anticonvulsivante (MELANSON *et al.*, 2016; HO *et al.*, 2018). A obtenção de metabólitos é extremamente vantajosa, tanto para sua utilização como padrões analíticos de referência e a triagem clínica dos medicamentos, quanto nos estudos de eficácia terapêutica de fármacos e de bioequivalência (DE PAULA *et al.*, 2015).

#### 4.2.1.1.1 Cinética de formação de 7-aminoclonazepam por células livres

A análise dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras dos tempos de incubação T24, T48 e T72 (Anexo I) permitiu o estudo da cinética de formação do metabólito de 7-aminoclonazepam (Figura 73).

Figura 73 - Cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244



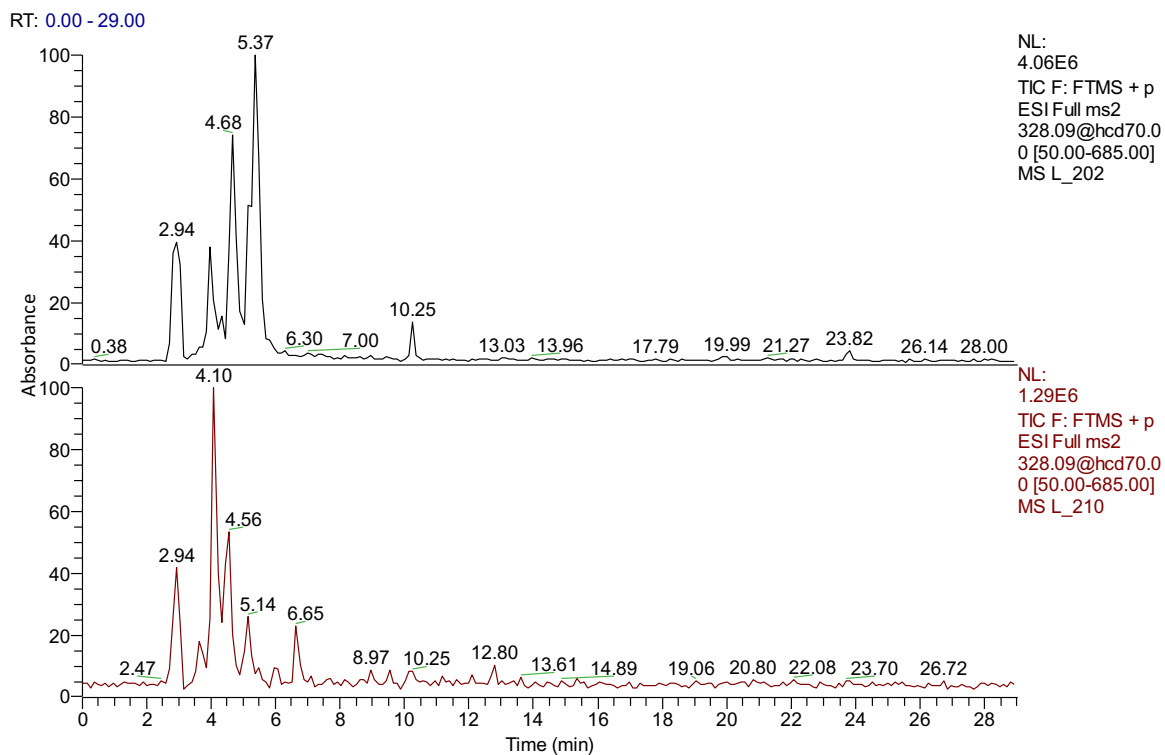
Fonte: autor

É possível observar a formação do metabólito nas primeiras horas de incubação do substrato com células livres *C. echinulata* ATCC 9244, sendo sua concentração máxima observada em 72 horas.

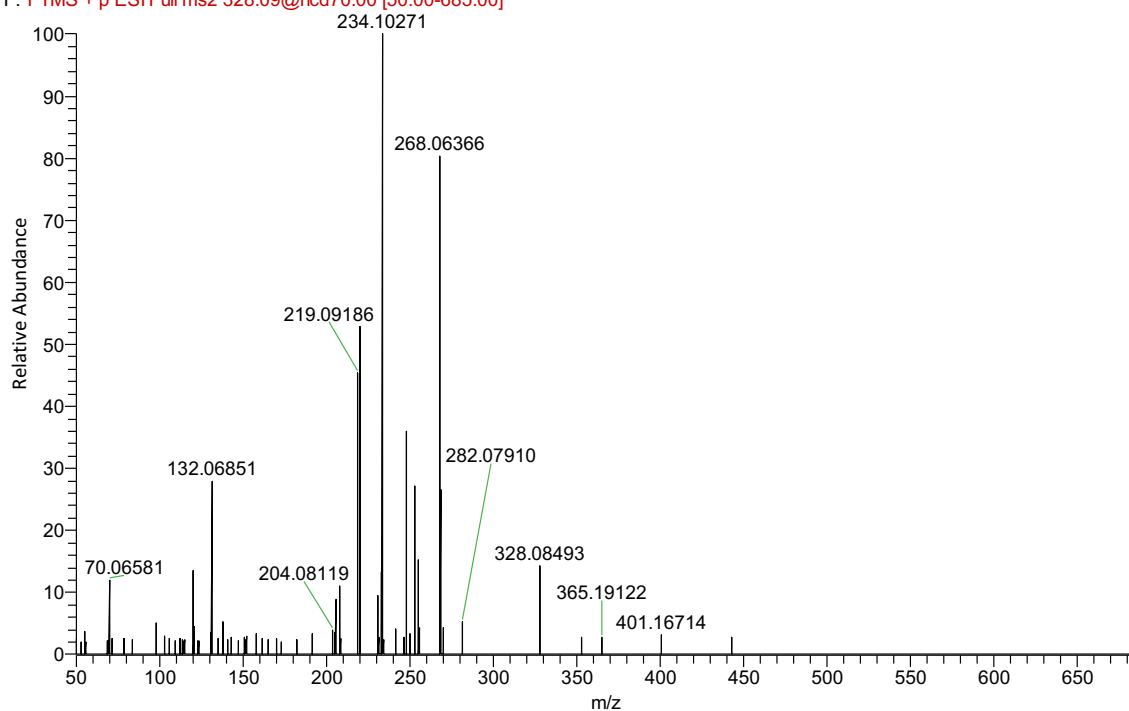
#### 4.2.1.2 Caracterização do metabólito 7-acetamido clonazepam

Outro metabólito obtido neste estudo foi observado em espectro de massa CLAE-EMAR, no tempo de retenção 6,65 minutos (pico cromatográfico ausente nas amostras controle), apresentando íon precursor  $[M + H^+]^+$  328,08493 com erro de 0,199 ppm, caracterizando o metabólito 7-acetamido clonazepam, também já descrito na literatura (Figura 74).

Figura 74 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de *C. echinulata*, com íon molecular  $[M + H]^+$  328,08528 monitorado



L\_210 #1490 RT: 6.65 AV: 1 NL: 4.42E4  
F: FTMS + p ESI Full ms2 328.09@hcd70.00 [50.00-685.00]



Fonte: autor

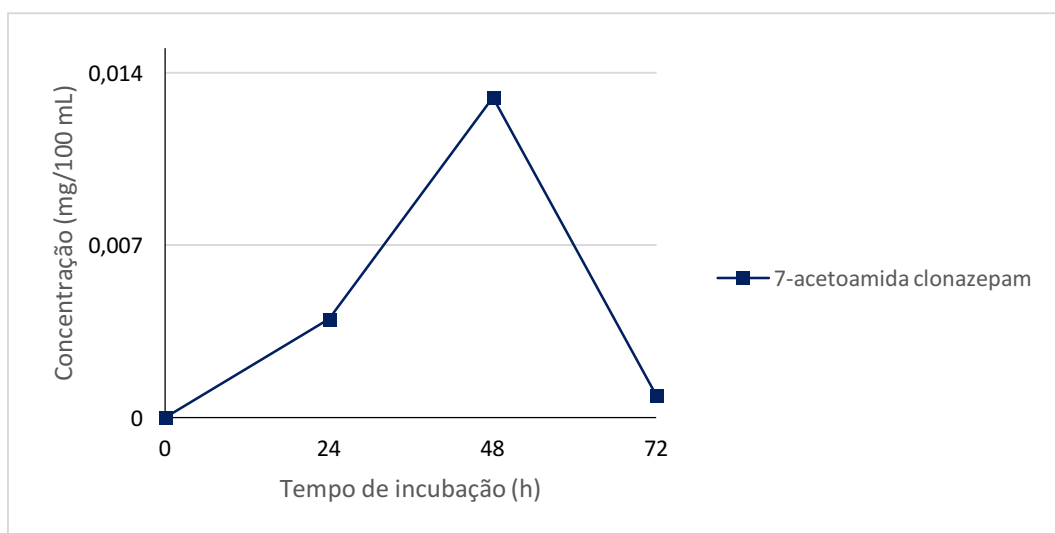
O metabólito 7-acetamido clonazepam está presente em proporções muito pequenas depois das reações de Fase II do metabolismo (CHÈZE *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2012). O uso de fungos filamentosos para reações de catálise é, portanto, uma ferramenta promissora para a produção de quantidades mais pronunciadas destes metabólitos, além de mais barata, rápida e econômica do que o uso de animais, cultura de células ou sistemas enzimáticos (DE PAULA *et al.*, 2015).

Todavia, mesmo que a possibilidade de obtenção de metabólitos de mamíferos com microrganismos seja atraente, existem limitações, particularmente, no que se refere à cultivos em larga escala, já que são requeridos biorreatores especializados e biocatalisadores reutilizáveis (MURPHY, 2015).

#### 4.2.1.2.1 Cinética de formação de 7-acetamido clonazepam por células livres

A cinética de formação do metabólito 7-acetamido clonazepam (Figura 75) foi estudada a partir da análise dos cromatogramas CLAE-EMAR das alíquotas de incubação obtidas nos tempos T0, T24, T48 e T72 (Anexo J).

Figura 75 - Cinética de formação do metabólito 7-acetamido clonazepam catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

O gráfico da Figura 75 mostra que a concentração máxima no metabólito 7-acetoamida clonazepam se deu em 48 horas, estando praticamente ausente no sobrenadante de incubação no tempo de 72 horas.

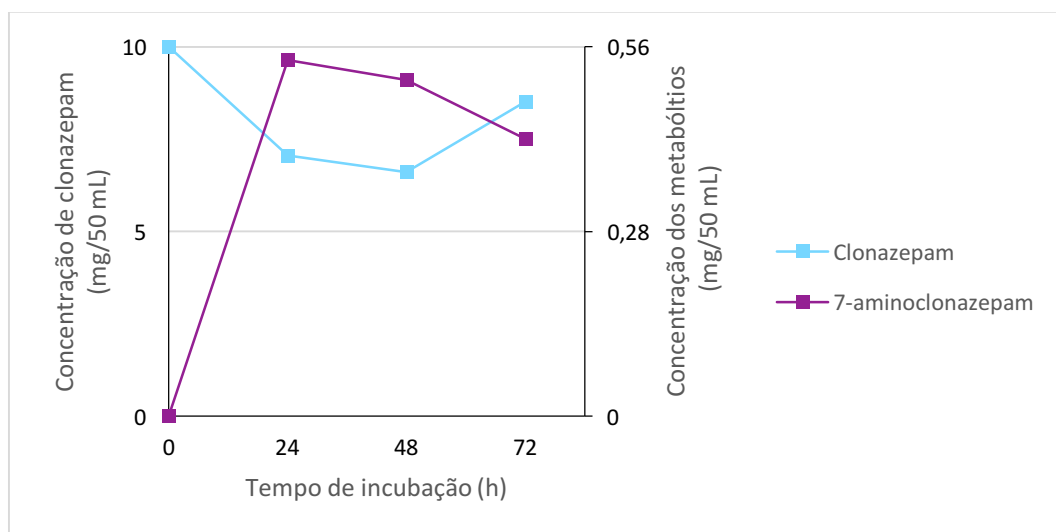
#### 4.2.2 Metabolismo de clonazepam catalisado por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244

O estudo da cinética do metabolismo do clonazepam por biofilmes (Figura 76), obtida a partir das análises dos cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de incubação T0, T24, T48 e T72, possibilitou verificar a produção exclusiva do metabólito 7-aminoclonazepam, já nas primeiras 24 horas de exposição às células imobilizadas de *C. echinulata* ATCC 9244.

Observa-se, também, que a maior parte do substrato não foi metabolizada, como observado no experimento com células livres, contrariando os resultados obtidos *in vivo*, em que esse tipo de composto é altamente metabolizado e menos de 2% é eliminado na urina de forma inalterada (CAVEDAL, 2014).

A Espectrometria de Massas de Alta Resolução evidenciou, mais uma vez, sua alta sensibilidade, quando da detecção de metabólitos presentes em quantidades muito pequenas em matrizes relativamente complexas.

Figura 76 - Cinética de metabolismo de clonazepam e formação do metabólito 7-aminoclonazepam catalisadas por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

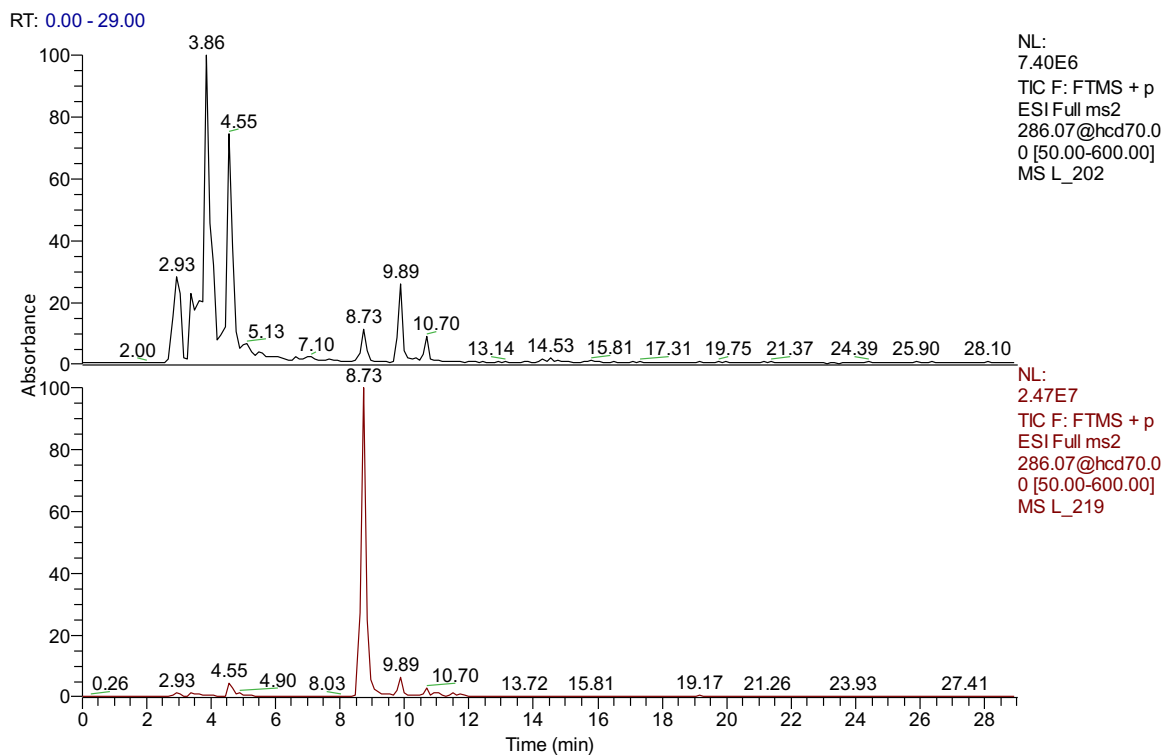
#### 4.2.2.1 Caracterização do metabólito 7-amino clonazepam por biofilme

As análises, por CLAE-EMAR, das amostras dos sobrenadantes de incubação (T0, T24, T48 e T72) da biotransformação catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 possibilitaram verificar a formação exclusiva do metabólito 7-aminoclonazepam.

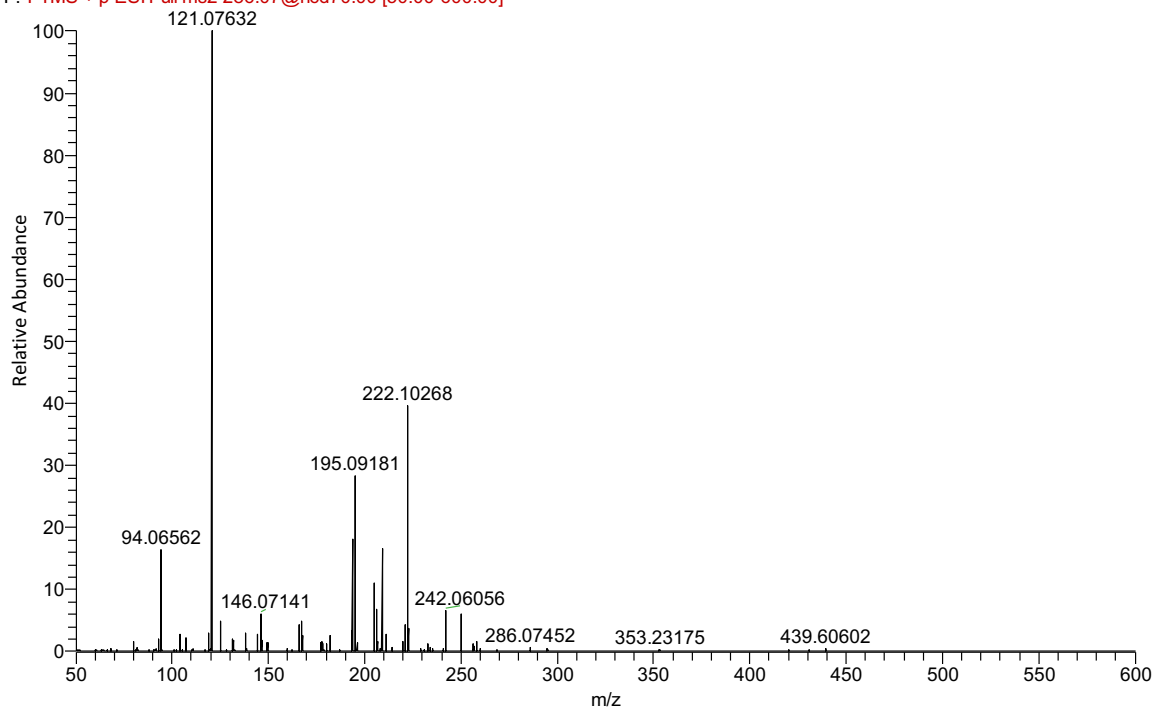
O fato das *N*-acetiltransferases, que mediam a formação de 7-acetoamida clonazepam a partir de 7-aminoclonazepam, serem enzimas citosólicas podem justificar sua ação catalítica ausente nos experimentos procedidos com imobilização celular (MORTELE *et al.*, 2018).

O espectro de massas (Figura 77) mostra o íon precursor  $[M + H^+]^+$  286,07452, com erro 0,354, e padrão de fragmentação semelhante ao verificado para o metabólito obtido na biotransformação catalisada por células livres, tratando-se, portanto, do mesmo composto.

Figura 77 - Cromatograma e espectro de massas CLAE-EMAR da amostra controle contendo meio de cultura PDSM e de sobrenadante de incubação obtida depois de 24 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, com íon molecular  $[M + H]^+$  286,07471 monitorado



L\_219 #1956 RT: 8.73 AV: 1 NL: 6.64E6  
 F: FTMS + p ESI Full ms2 286.07@hcd70.00 [50.00-600.00]



Fonte: autor

O uso de biofilmes de fungos filamentosos seria interessante, neste caso, para estudos que objetivem a obtenção de metabólitos exclusivos, já que uma das vantagens associadas ao uso de biofilmes frente ao de células livres é a não-exigência de múltiplas etapas de extração e purificação, por exemplo (DE MELO SOUZA *et al.*, 2016).

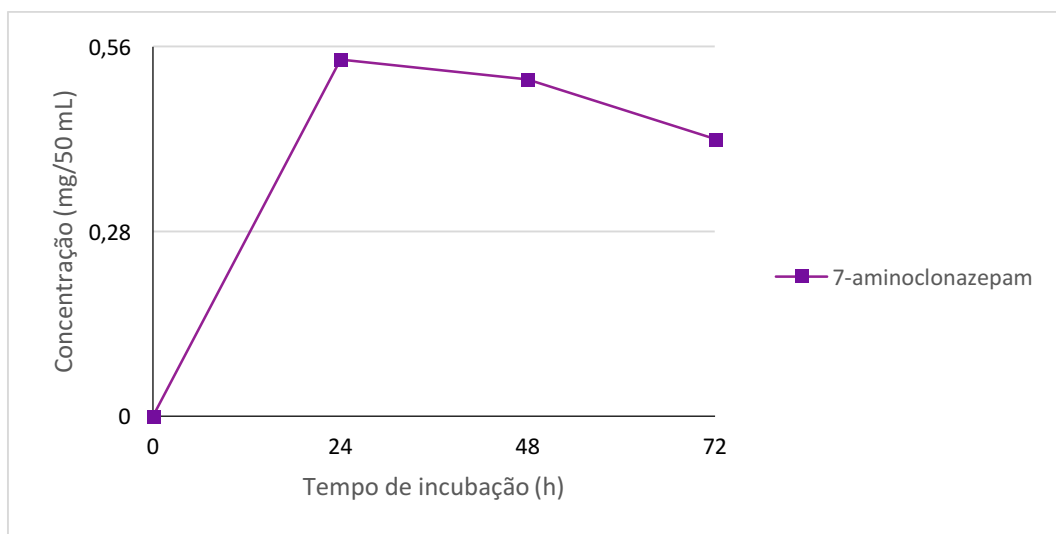
O desenvolvimento de biofilmes de fungos filamentosos e seu emprego na produção de metabólitos humanos foi pioneiramente relatado por Amadio e colaboradores (2013), em que foi comprovado que as células incorporadas no biofilme desempenham um papel predominante no metabolismo de fármacos.

Neste estudo, a comparação de eficiência catalítica entre os biofilmes e as células livres de *C. elegans* mostrou que a biotransformação utilizando células imobilizadas é pelo menos tão eficiente quanto as culturas livres, para o metabólito 7-amino clonazepam. A grande vantagem estaria, então, na aplicação dos biofilmes em processos contínuos para produtividade melhorada e sua resistência a estresses mecânicos, robustez, facilidade de manuseio e reusabilidade (AMADIO *et al.*, 2013).

#### *4.2.2.1.1 Estudo da cinética de formação do metabólito 7-amino clonazepam*

A cinética de formação do metabólito aminado obtida a partir da biotransformação do clonazepam por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 (Anexo K) possibilitou observar que a concentração máxima do 7-aminoclonazepam dá-se em 24 horas de incubação, mostrando uma eficiência de externalização maior ou uma maior produção enzimática dos biofilmes em comparação com as células livres (Figura 78). Dessa feita, a imobilização fúngica mostra-se, novamente, como observado no estudo da biotransformação da morina, uma estratégica vantajosa.

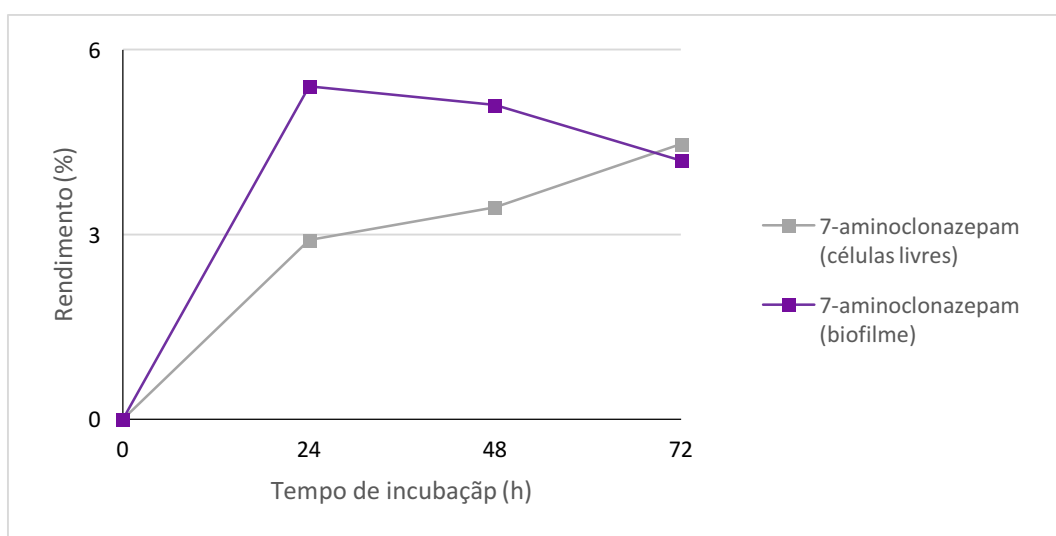
Figura 78 - Cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam catalisada por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

Ademais, quando comparadas as cinéticas de formação do derivado 7-aminoclonazepam usando células livres e biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244 (Figura 79), a imobilização mostra-se mais eficiente durante todo o processo de biotransformação do clonazepam.

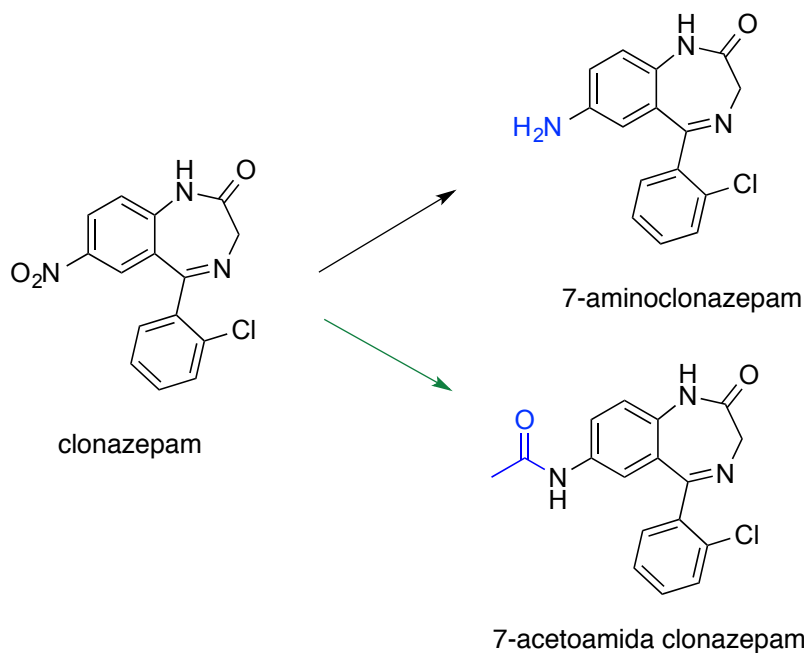
Figura 79 - Comparativo do rendimento durante a cinética de metabolismo de clonazepam a 7-aminoclonazepam catalisada por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor

Do estudo do metabolismo de clonazepam por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244 e após a caracterização dos metabólitos, tem-se, então, que foram produzidos dois metabólitos de mamíferos, descritos na Figura 80.

Figura 80 - Proposição dos metabólitos formados a partir do metabolismo de clonazepam por células livres e biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244



Fonte: autor. Legenda: setas em preto: metabólito produzido por células livres e biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244; seta em verde: metabólito produzido exclusivamente por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244

### 4.3 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CITOCROMO P450 (CYP450)

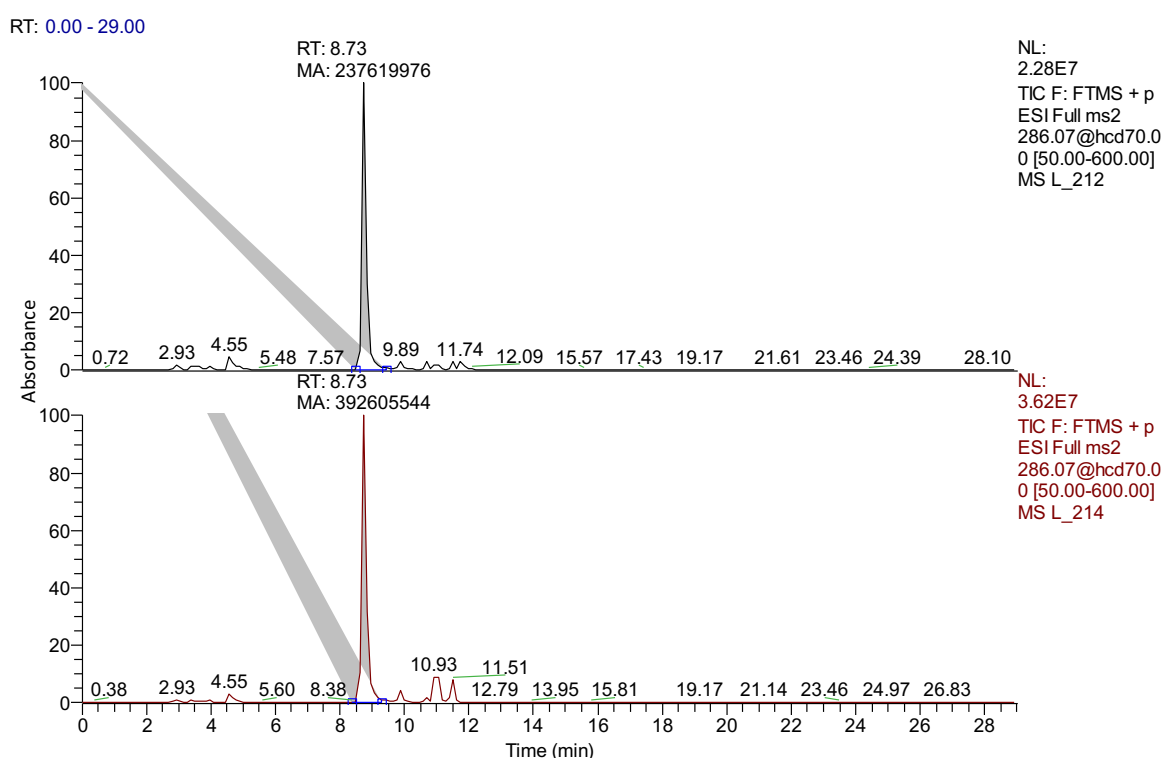
#### 4.3.1 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em células livres de *C. echinulata* ATCC 9244

##### 4.3.1.1 Influência na geração do metabólito 7-amino clonazepam

Do experimento de inibição da subfamília CYP3A, verificou-se, qualitativamente, a formação dos metabólitos 7-aminoclonazepam e 7-acetamido clonazepam para a biotransformação catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244.

Quando comparados os espectros das amostras dos sobrenadantes de incubação obtidos nos tempos de 72 horas (Figura 81), com o íon referente ao metabólito aminado monitorado, é possível verificar a sua formação nos dois experimentos.

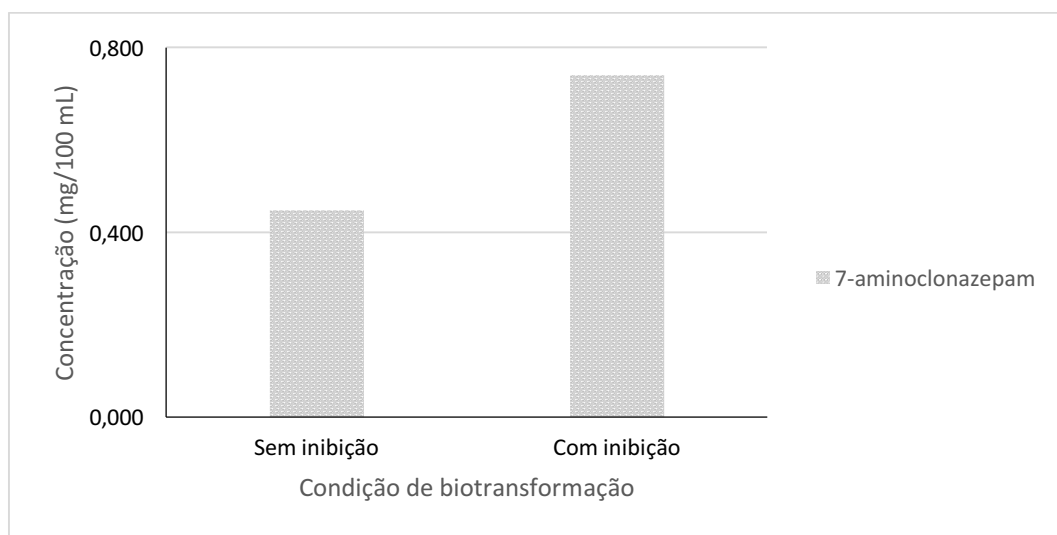
Figura 81 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular  $[M + H^+]^+$  286,07471 monitorado



Fonte: autor

Na comparação das cinéticas de formação (Figura 82), observa-se um rendimento maior – não esperado em experimentos de inibição – para a formação de 7-amino clonazepam quando da adição do inibidor clotrimazol. A subfamília 3A do Citocromo P450, especialmente a isoforma CYP3A4, desempenha importante papel no metabolismo de clonazepam, particularmente na nitro-redução (ALMEIDA, 2012; DING *et al.*, 2014; ALVES, 2017; HO *et al.*, 2018; MORTELÉ *et al.*, 2018)

Figura 82 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam (72 horas), catalisada por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol



Fonte: autor

A inibição enzimática, como já pontuada neste trabalho, é caracterizada pela diminuição da atividade catalítica de enzimas metabolizadoras, e, quando de experimentos *in vivo* deste tipo, espera-se o aumento da concentração plasmática do fármaco (BARREIRO E FRAGA, 2015).

Neste experimento, o composto clotrimazol foi aplicado como um inibidor reversível inespecífico da subfamília CYP3A. No entanto, o clonazepam foi reconhecidamente relatado como um indutor fraco da isoforma CYP3A4, sendo capaz de aumentar o rendimento das reações de biotransformação de benzodiazepínicos e sua eliminação (BRAZ *et al.*, 2018).

Além disso, estudos revelaram que o clonazepam é indutor relativamente eficaz da subfamília CYP2B, tanto *in vivo*, quanto em experimentos *in vitro*. Observaram-se microsomas hepáticos de ratos altamente induzidos em relação as atividades catalíticas mediadas por CYP2B, sendo outras enzimas CYP fracamente induzidas (NIMS *et al.*, 1997).

Tais observações podem justificar o aumento observado na produção do metabólito 7-amino clonazepam nos estudos de inibição do CYP450, já que, ademais, outras enzimas CYP, a exemplo das CYP2B e CYP1A, podem estar envolvidas

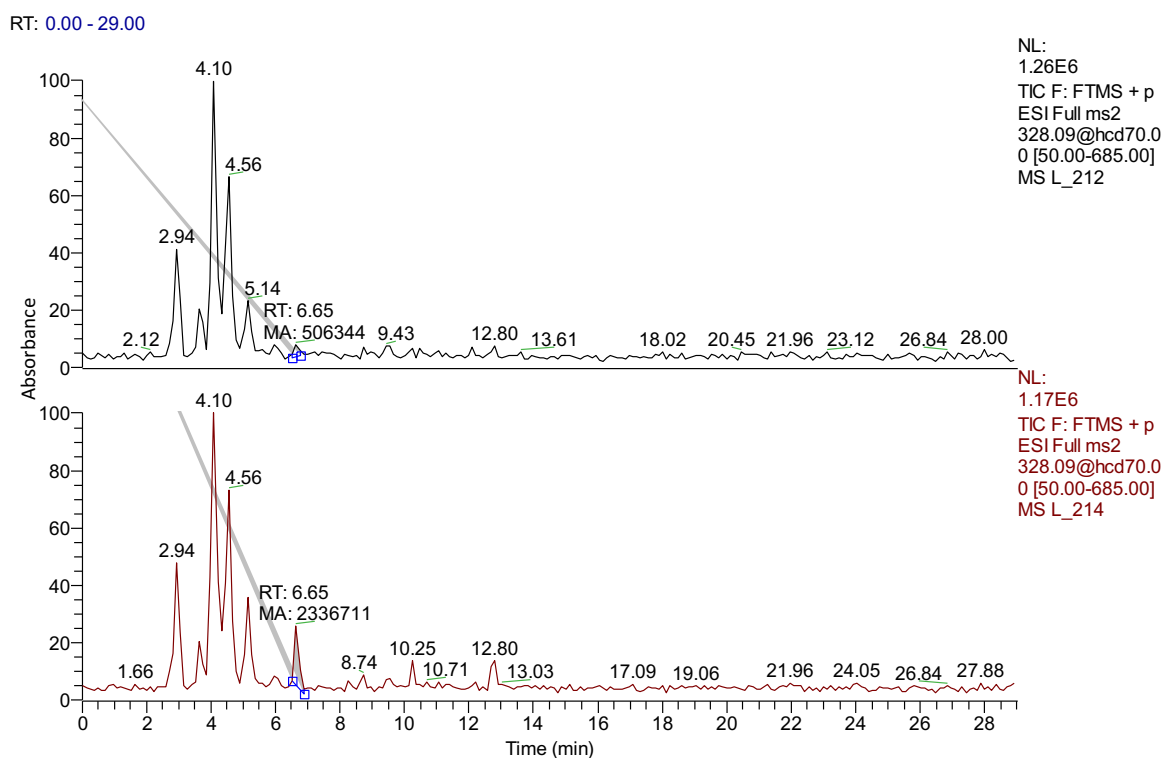
minoritariamente no metabolismo do clonazepam (COLUCCI *et al.*, 1996; DE PAULA *et al.*, 2015).

#### 4.3.1.2 Influência na geração do metabólito 7-acetoamida clonazepam

Nos experimentos de inibição da subfamília CYP3A, também foi obtido o metabólito 7-acetoamida clonazepam da biotransformação de clonazepam por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244.

Na comparação dos cromatogramas referentes às amostras dos sobrenadantes de incubação obtidos nos tempos de 72 horas, com o íon referente ao metabólito acetoamida monitorado, observa-se a formação do metabólito nas duas condições de biotransformação (sem inibição e com inibição) (Figura 83).

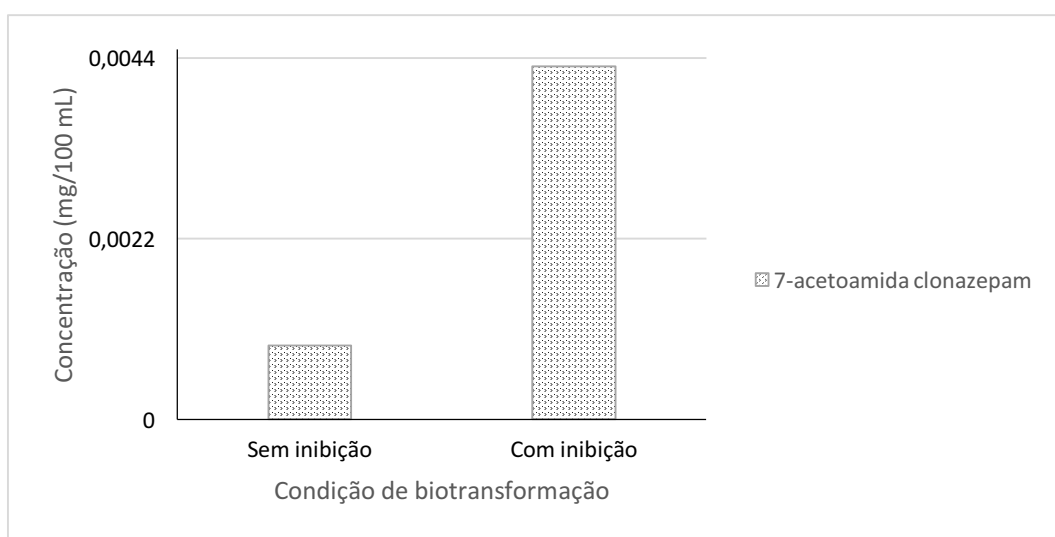
Figura 83 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por células livres de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular  $[M + H]^+$  328,08528 monitorado



Fonte: autor

*A priori*, a formação dos metabólitos não era, portanto, esperada para este experimento, mesmo a do 7-acetamido clonazepam, já que seu precursor é o metabólito 7-aminoclonazepam (HO *et al.*, 2018; MORTELÉ *et al.*, 2018). Contudo, como observado para a geração de 7-amino clonazepam, nos estudos de inibição, observa-se, também, o aumento do rendimento para o metabólito em questão (Figura 84).

Figura 84 - Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do metabólito 7-acetoamida clonazepam (72 horas), catalisada por células livres, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol



Fonte: autor

O aumento de rendimento, neste caso, justifica-se, também, pela capacidade indutora de CYP do substrato clonazepam, que, uma vez aumentando as taxas de biotransformação a 7-amino clonazepam, aumenta-se, por conseguinte, o rendimento de 7-acetoamida clonazepam.

A formação do metabólito 7-acetamido clonazepam é mediada por enzimas *N*-acetiltransferases, que utilizam o 7-amino clonazepam como substrato para sua ação catalítica (ALMEIDA, 2012; DING *et al.*, 2014; ALVES, 2017; HO *et al.*, 2018; MORTELÉ *et al.*, 2018). Dessa maneira, aumentando a disponibilidade de substrato para ação enzimática, tem-se o aumento do rendimento das reações de biotransformação.

Além disso, a atividade de *N*-acetiltransferases já foi detectada em cepas de fungos e leveduras (NASUNO *et al.*, 2013), confirmando a proposição acima.

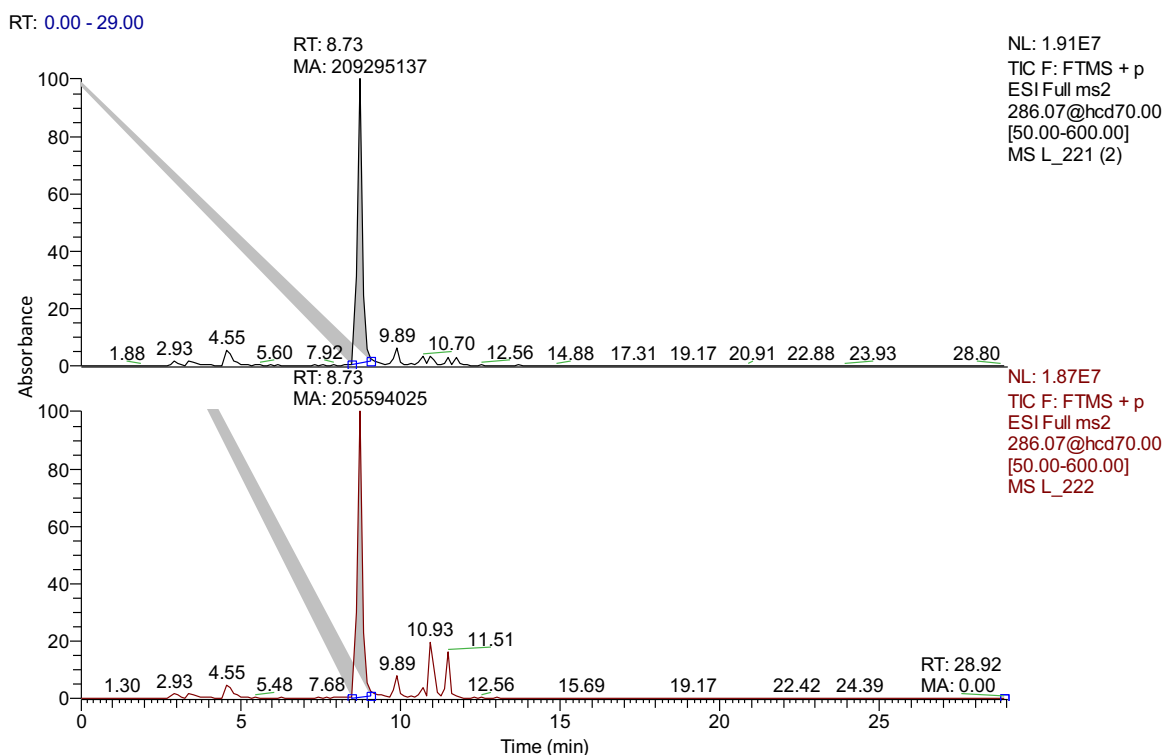
### **4.3.2 Inibição da subfamília 3A do Citocromo P450 (CYP450) em biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244**

#### 4.3.2.1 Influências na geração do metabólito 7-amino clonazepam

Nos experimentos de inibição da subfamília CYP3A, também foi obtido o metabólito 7-amino clonazepam da biotransformação de clonazepam por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244. Todavia, foi observado, aqui, uma diminuição na concentração do metabólito ao fim da biotransformação

A Figura 85 mostra a comparação dos cromatogramas das amostras T72 dos sobrenadantes de incubação dos experimentos nas duas condições reacionais – sem inibição e com inibição –, com o íon referente ao metabólito aminado monitorado, sendo sua formação observada nos dois casos.

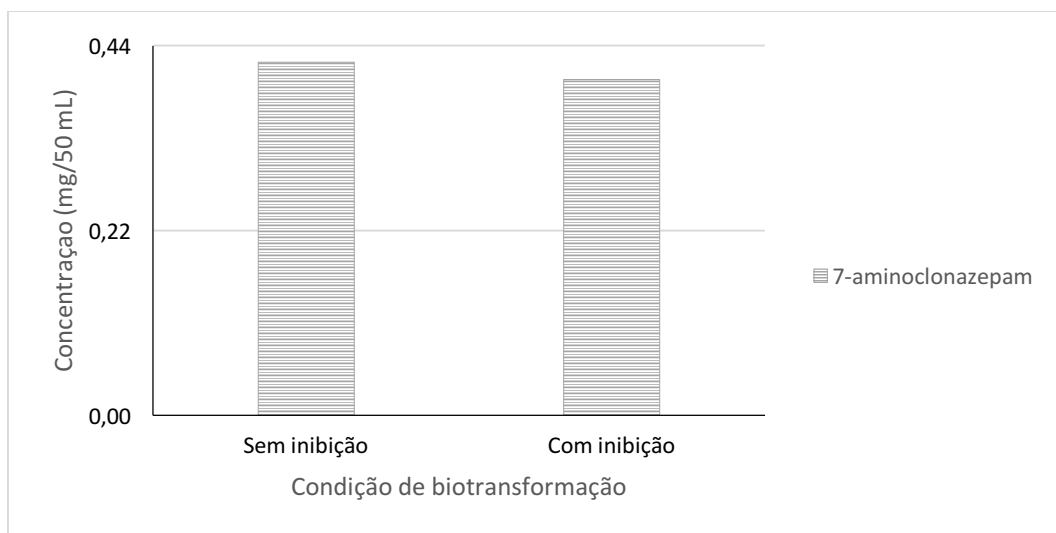
Figura 85 - Cromatogramas CLAE-EMAR das amostras de sobrenadante de incubação obtida depois de 72 horas de metabolismo de clonazepam, catalisado por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244, com inibidor clotrimazol e sem inibidor clotrimazol, e íon molecular  $[M + H^+]^+$  286,07471 monitorado



Fonte: autor

Na comparação das áreas dos picos do gráfico da Figura 86, observa-se uma diminuição da concentração de 7-amino clonazepam frente à adição do CYP-inibidor clotrimazol, esperado para os experimentos de inibição.

Figura 86 – Comparativo do rendimento durante a cinética de formação do metabólito 7-aminoclonazepam (72 horas), catalisada por biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244, nos experimentos sem inibição e com inibição da subfamília CYP3A por clotrimazol



Fonte: autor

Inúmeros relatos literários descrevem as técnicas LC-MS/MS na identificação de metabólitos benzodiazepínicos em diferentes matrizes, especialmente urina. Isso deve-se ao fato de os analisadores, principalmente os mais recentes, apresentarem uma sensibilidade muito maior, usando técnicas de ionização por eletropulverização (DRUMMER *et al.*, 2019).

Geralmente, quando do uso do "Modo de Reação Múltipla", a técnica limita-se ao monitoramento de transições pré-selecionadas. Dessa feita, o método será capaz de identificar apenas substâncias conhecidas, não sendo possível rastrear as não-conhecidas (DRUMMER *et al.*, 2019).

## 5. CONCLUSÃO

*C. echinulata* ATCC 9244 mostrou-se um modelo microbiano eficaz na geração de metabólitos idênticos aos humanos de clonazepam, nas formas de cultivo livre e imobilizada. O metabolismo catalisado por células livres forneceu os derivados 7-amino clonazepam e 7-acetamido clonazepam.

Já do metabolismo procedido com biofilmes, foi obtido exclusivamente o metabólito 7-aminoclonazepam, provavelmente devido à localização das enzimas N-acetiltransferases no citosol das células.

O estudo das cinéticas de formação do metabólito 7-aminoclonazepam mostrou uma maior eficiência catalítica, quanto ao rendimento de biotransformação, dos biofilmes aqui produzidos, como observado também no estudo de biotransformação da morina. Além disso, apresentaram-se como uma ferramenta importante para a geração exclusiva deste metabólito.

No experimento de inibição, foi possível verificar o envolvimento das enzimas oxidativas CYP450 e de conjugação no metabolismo de clonazepam, além de uma característica de indução do próprio substrato.

A técnica CLAE-EMAR foi de imprescindível importância na detecção e caracterização dos metabólitos obtidos, mesmo em concentrações muito baixas, e viabilizou enormemente o estudo, dispensando etapas de extração e purificação.

CAPÍTULO 3  
BIORREMEDIAÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 COMPOSTOS ORGANOFLUORADOS

A introdução de flúor em compostos orgânicos pode alterar favoravelmente suas propriedades físico-químicas e no que se refere a lipofilicidade, acidez, potência e eficácia, por exemplo (MURPHY, 2010; REDDY, 2015). As ligações carbono-flúor apresentam maior resistência quando comparadas com as ligações carbono-hidrogênio, o que confere a esse tipo de composto maior estabilidade química e metabólica (REDDY, 2015; MURPHY, 2016).

Apesar de seu reduzido tamanho e sua elevada eletronegatividade, o comportamento químico do átomo de flúor assemelha-se ao do átomo de hidrogênio, causando pouco impacto estérico quando da sua introdução em moléculas orgânicas (FERREIRA, 2013; CASTELO BRANCO *et al.*, 2015).

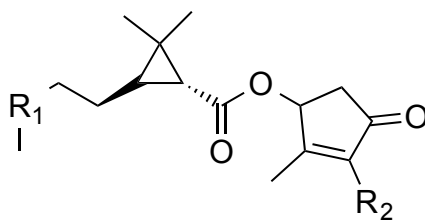
Os compostos organofluorados podem apresentar, ainda, propriedades farmacocinéticas mais interessantes e biodisponibilidade melhorada em comparação aos hidrocarbonetos, visto a sua melhor permeabilidade de membrana (MURPHY, 2010; REDDY, 2015). Dessa maneira, são frequentemente usados em produtos agroquímicos e farmacêuticos (MURPHY, 2010; CASTELO BRANCO *et al.*, 2015; REDDY, 2015).

Esse tipo de composto, então, advém majoritariamente das atividades humanas, já que, biosintetizados de novo são naturalmente raros (COBB E MURPHY, 2009). No entanto, a despeito da sua estabilidade, não são inertes, são biologicamente ativos e podem fornecer fluorometabólitos nocivos (MURPHY, 2010).

#### 1.1.1 Piretróides

Os piretróides são uma classe de inseticidas orgânicos, obtidos sinteticamente e derivados das piretrinas. As piretrinas (Figura 87) são inseticidas oriundos das flores secas de *Chrysanthemum cinerariifolium* e *Chrysanthemum coccineum*, popularmente conhecidas como crisântemo-de-jardim e, originalmente, utilizadas para o combate doméstico de mosquitos (DALLEGRAVE, 2017)

Figura 87 - Estrutura química básica das piretrinas naturais



Fonte: autor

As piretrinas e os piretróides são os principais inseticidas utilizados mundialmente, sendo mais de 3500 produtos registrados devido à substituição ao uso dos inseticidas mais nocivos para o meio ambiente, como os organofosforados e carbamatos (MARETTOVA *et al.*, 2017). Frente aos pesticidas tradicionais, os piretróides apresentam baixo potencial poluente, mas podem bioacumular através da cadeia alimentar e via resíduos na água, frutas e vegetais, uma vez que apresentam alta lipofilicidade (DALLEGRAVE, 2017; TANG *et al.*, 2018).

Apesar da origem natural, para a obtenção de piretróides sintéticos, são requeridas inúmeras modificações moleculares a fim de melhorar suas propriedades químicas em termos de estabilidade no meio ambiente (ar, luz e calor), bem como sua atividade biológica (maior toxicidade seletiva), que, muitas vezes, resultam em compostos mais tóxicos e menos passíveis de degradação no ambiente (KANEKO, 2010; MARETTOVA *et al.*, 2017).

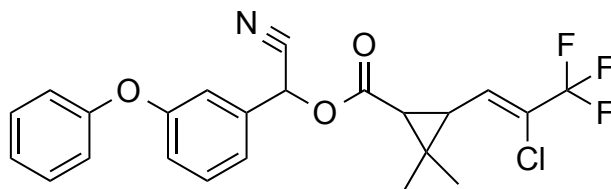
São altamente tóxicos para organismos aquáticos, podendo causar efeitos adversos a esses ecossistemas, e, mesmo em baixas doses, a exposição a longo prazo a esse tipo de composto pode causar doenças crônicas e efeitos tóxicos aos sistemas nervoso, imune, cardiovascular e genéticos dos organismos, induzindo teratogenicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade (TANG *et al.*, 2018).

Os piretróides podem ser classificados em piretróides de primeira geração (Tipo I) e piretróides de segunda geração (Tipo II). Os piretróides Tipo I são ésteres derivados do ácido crisântemo e álcoois que possuem o anel furano, sendo altamente voláteis, termolábeis e fotossensíveis. Os piretróides Tipo II, geralmente, possuem derivados do álcool 3-fenoxibenzílico na porção álcool, apresentam excelente atividade inseticida e estabilidade em condições externas (KANEKO, 2010).

### 1.1.1.1 $\lambda$ -Cialotrina

O composto  $\lambda$ -cialotrina ((RS)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil(Z)-(1R)-cis-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato) (Figura 88) é um dos principais pesticidas utilizados na agricultura, silvicultura, horticultura, saúde pública e animal e em controle doméstico de pragas (CHEN *et al.*, 2015). Sabem-se que piretróides do tipo II que contém um grupamento  $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil e um halogênio na porção ácida são rapidamente absorvidos quando inalados ou administrados oralmente (MARTÍNEZ *et al.*, 2018).

Figura 88 - Estrutura química de  $\lambda$ -cialotrina



Fonte: autor

No Brasil, a Diretoria de Autorização e Registro Sanitários Resolução – RE nº 1.714, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, aprovou o emprego domissanitário da  $\lambda$ -cialotrina a partir de junho de 2018 e a incluiu na monografia C63 – Lambda-Cialotrina (GARCIA NETO, 2018). Contudo, foi o piretroide mais utilizado de maneira irregular no ano de 2011 (VENTURINI, 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Aplicar biofilmes de *C. elegans* DSM1908 como biorremediador do pesticida  $\lambda$ -cialotrina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar células de *C. elegans* DSM1908 em meio de cultura líquido Sabouraud livremente e imobilizadas em molas de aço inoxidável, sob forma de biofilmes;
- Proceder à biorremediação  $\lambda$ -cialotrina em escala semi-preparativa;
- Estudar o envolvimento das enzimas do Citocromo P450 através de estudos de inibição em microssomas hepáticos de ratos com o composto 1-aminobenzotriazol e a formação de conjugados por ensaios de desconjugação;
- Identificar e caracterizar os produtos de degradação de  $\lambda$ -cialotrina obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) e Ressonância Magnética Nuclear  $^{19}\text{F}$  (RMN  $^{19}\text{F}$ ).

### **3. METODOLOGIA**

O estudo aqui descrito foi realizado na *UCD School of Biomolecular and Biomedical Science, da University College Dublin* (Dublin, Irlanda), sob orientação do Dr. Cormac Declan Murphy, durante o estágio de doutoramento do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE 19/2016 (Fundação CAPES/PDSE/Processo 88881.131595/2016-01), financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

#### **3.1 SUBSTRATO**

##### **3.1.1 $\lambda$ -Cialotrina**

O substrato  $\lambda$ -cialotrina foi adquirido da PESTANAL® (Irlanda) e caracterizado por Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear  $^{19}\text{F}$ .

#### **3.2 PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO FÚNGICO**

Esporos de *C. elegans* DSM1908 foram cultivados em placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose, a 28 °C. Após 5 dias, os micélios foram assepticamente homogeneizados em 100 mL de solução salina de cloreto de sódio (NaCl) 0,8 %.

#### **3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL**

##### **3.3.1 Cultivo de biofilmes**

Para a obtenção dos biofilmes, 1 mL do homogenato foi utilizado para inocular 49 mL de meio de cultura líquido Sabouraud Dextrose em Erlenmeyers de capacidade de 250 mL contendo molas de aço inoxidável (fio 1.2 mm T316; *Shannon Coiled Springs*, Irlanda) acomodadas sem folgas no fundo dos frascos de cultivo e em contato com as paredes de vidro. Os frascos foram incubados por 72 horas, a 28 °C, sob

agitação de 150 rpm. Os experimentos controle foram conduzidos na ausência do substrato e na ausência do inóculo. Durante esse período, foram observados a formação do biofilme pela extensão da matriz imobilizadora, seu aspecto morfológico, agitação e temperatura de incubação.

### **3.3.2 Cultivo de células livres**

As células livres foram cultivadas conforme descrito no subitem 3.2.2, à exceção da fixação das molas de aço inoxidável nos frascos de cultivo. Nesse caso, 5 mL do homogenato foram inoculados em Erlenmeyers de capacidade de 250 mL contendo 45 mL de meio de cultura líquido Sabouraud Dextrose.

## **3.4 CONDIÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO**

### **3.4.1 Incubação em meio de cultura líquido Sabourad Dextrose**

Transcorridas 72 horas de crescimento fúngico, 10 mg de  $\lambda$ -cicalotrina, em DMF, foram adicionados às culturas (livres e biofilme) e os fracos de cultivo foram reincubados, nas mesmas condições por mais 120 horas. Os sobrenadantes de incubação dos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h (T0, T24, T48, T72, T96 e T120) foram, então, ajustados a pH igual a 2, extraídos com acetato de etila. O solvente foi removido sob pressão reduzida e os extratos redissolvidos em 5 mL de acetato de etila. As biomassas, de cada *timepoint*, foram separadas por centrifugação e extraídas com 50 mL de acetato de etila, sob agitação, por 1 hora, e os extratos foram obtidos como descrito.

## **3.5 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO**

### **3.5.1 CG-MS**

As análises por Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) foram realizadas com os extratos previamente per-trimetilsililados. A

derivatização deu-se pela adição de 50  $\mu$ L de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA, Sigma) e aquecimento a 100 °C por 1 hora. As amostras derivatizadas foram injetadas em modo *splitless* em coluna HP-1 (12 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,33  $\mu$ m), com temperatura do forno mantida a 120 °C por 2 min e, então, aumentada para 300 °C a 10 °C/min.

### 3.5.2 <sup>19</sup>F RMN

As análises espectroscópicas por <sup>19</sup>F RMN foram realizadas em espectrômetro Varian 400 MHz. Os extratos foram dissolvidos em 800  $\mu$ L de metanol-d<sub>4</sub> e óxido de deutério, respectivamente. Os dados foram processados em MestreNova, sendo as linhas de base dos espectros corrigidas.

## 3.6 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DO DA SUBFAMÍLIA 3A DO CYP450

O composto 1-aminobenzotriazol (2 mM) foi adicionado aos frascos de cultivo contendo células livres de *C. elegans* DSM1908 cultivadas em meio de cultura líquido SDB, antes da adição do substrato. Os sobrenadantes de incubação e a biomassa foram extraídos como descrito previamente. Os extratos foram derivatizados e analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (*GC-MS*) e <sup>19</sup>F RMN.

## 3.7 INCUBAÇÃO COM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS (*RLM*)

A biotransformação por microssomas hepáticos de ratos (Sigma, Irlanda) foi procedida como descrita por Obach (1999). Os microssomas (10 mg/mL) foram incubados, por 2 horas, a 37 °C e 100 rpm com  $\lambda$ -cialotrina (0,5 mM), em DMF, cloreto de magnésio (3,3 mM) e NADPH (1 mM), em um volume final de 0,5 mL de tampão fosfato de sódio (25 mM, pH = 7). Os metabólitos foram extraídos com acetato de etila, derivatizados e analisados por *GC-MS*. Os experimentos controle foram conduzidos com flurbiprofeno (0,5 mM) e na ausência de *RLM*.

### 3.8 TRATAMENTO COM $\beta$ -GLUCOSIDASE E SULFATASE

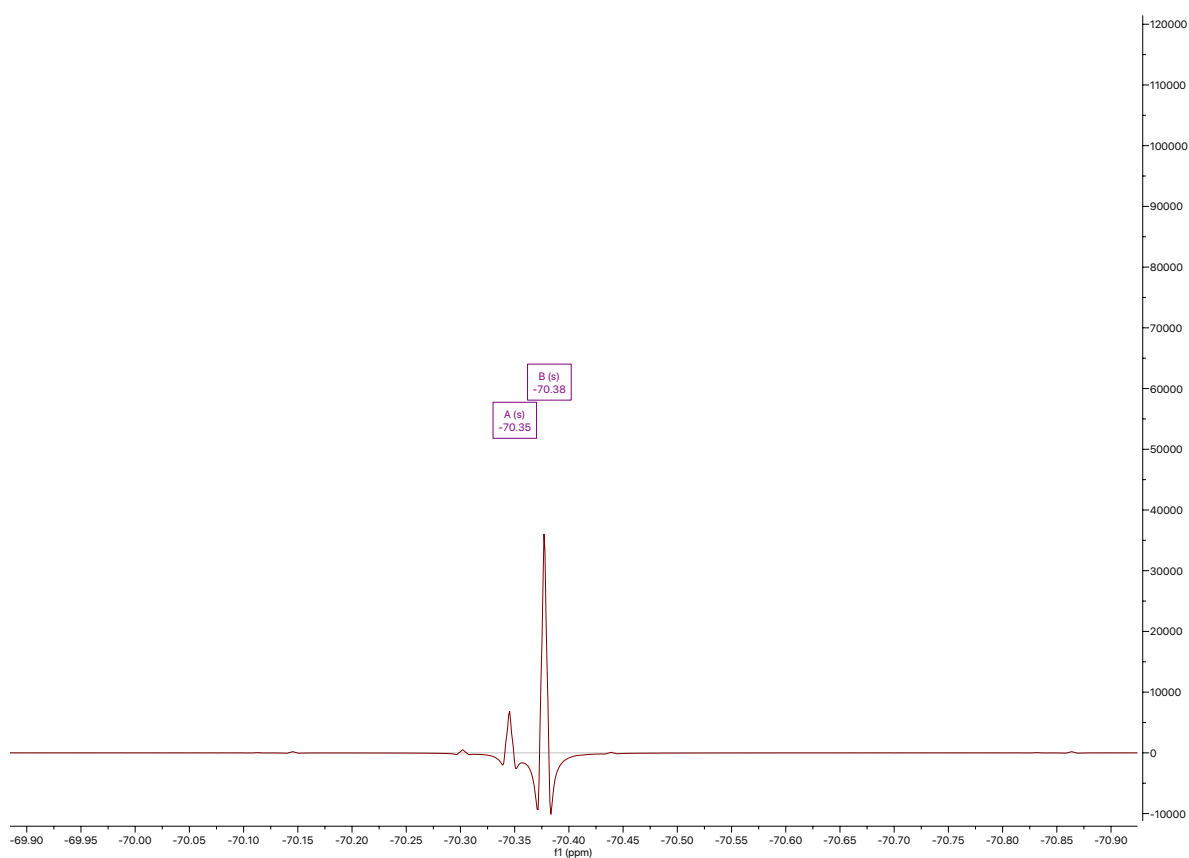
As enzimas  $\beta$ -glucosidase e sulfatase foram utilizadas nos ensaios de desconjugação enzimática. Os extratos T120 foram incubados, a 37 °C e 2.000 rpm, com 200  $\mu$ g de enzima em tampão fosfato de potássio (10 mM, pH = 7,7) e MgCl<sub>2</sub> (10 mM), em um volume final de 1 mL. Após 2 horas de incubação, as amostras foram extraídas com acetato de etila e reanalisadas por <sup>19</sup>F RMN. Os experimentos controle foram realizados nas mesmas condições com as enzimas previamente desativadas por aquecimento a 90 °C, durante 20 minutos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

Os espectros de  $^{19}\text{F}$  RMN do substrato  $\lambda$ -cicalotrina apresentaram dois singletos com deslocamentos químicos de  $\delta$  -70,38 ppm e  $\delta$  -70,35 ppm, o que representa o conteúdo isomérico do composto (Figura 89).

Figura 89 - Espectro de RMN  $^{19}\text{F}$  do substrato  $\lambda$ -cicalotrina

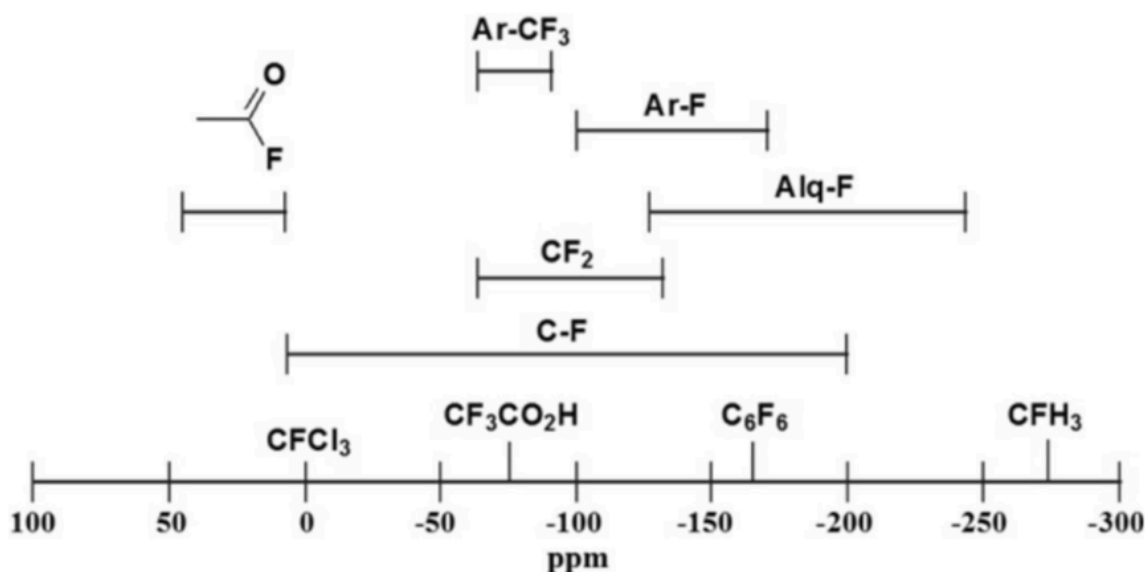


Fonte: autor

Em RMN  $^{19}\text{F}$ , fluorotriclorometano ( $\text{CFCl}_3$ ) é o padrão interno utilizado para sinalizar o deslocamento zero. A maior parte dos compostos organofluorados apresentam o núcleo de flúor mais blindado que o observado neste padrão interno e, portanto, mostram deslocamentos químicos negativos (ANTUNES, 2016).

A Figura 90 apresenta, resumidamente, as faixas (em ppm) para os deslocamentos químicos dos compostos organofluorados.

Figura 90 - Faixas de deslocamentos químicos esperados para os compostos organofluorados



Fonte: CASTELO BRANCO *et al.* (2015)

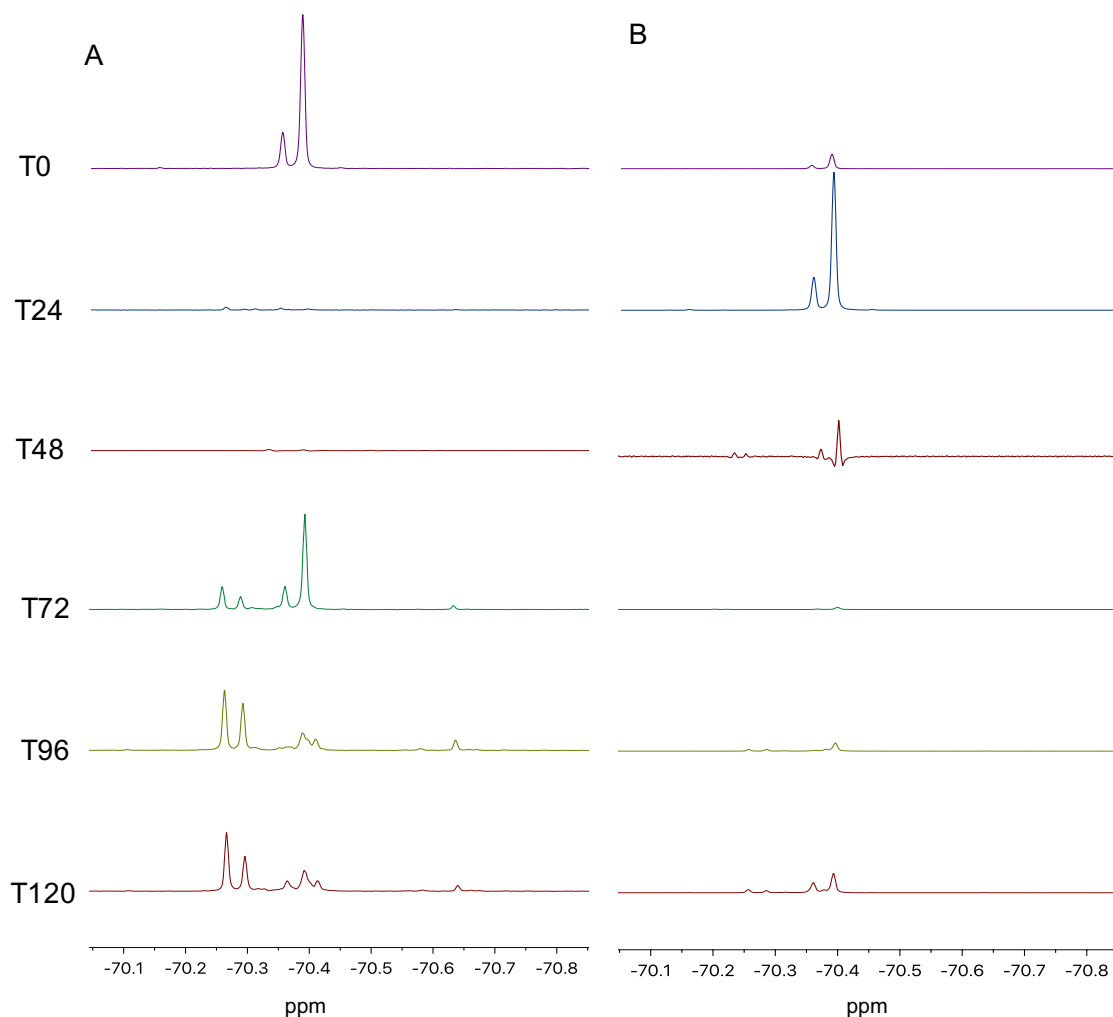
Como não há diferenças significativas nos ambientes químicos dos núcleos de flúor nos isômeros, bem como raios hidrodinâmicos e coeficientes de difusão muito parecidos, não é possível uma separação eficiente destes sinais e os deslocamentos químicos apresentam-se bem próximos (ANTUNES, 2016).

## 4.2 BIODEGRADAÇÃO DE $\lambda$ -CIALOTRINA

### 4.2.1 <sup>19</sup>F RMN

Os espectros de <sup>19</sup>F RMN dos extratos retirados nos diferentes *timepoints* - T0, T24, T48, T72, T96 e T120 -, durante a incubação com *C. elegans* DSM1908, estão contidos na Figura 91.

Figura 91 - Espectros de RMN  $^{19}\text{F}$  das amostras dos sobrenadantes de incubação (A) e biomassa (B) obtidos nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de degradação de  $\lambda$ -cialotrina por biofilmes de *C. elegans* DSM1908



Fonte: autor

As análises, por  $^{19}\text{F}$  RMN, dos extratos advindos dos sobrenadantes e da biomassa permitiram verificar a formação de produtos fluorados durante a biotransformação da  $\lambda$ -cialotrina. Em 120 horas de incubação, maior parte do pesticida já havia sido degradada.

Nas primeiras 24 horas de incubação, o pesticida é detectável apenas na biomassa, sugerindo que o composto foi primeiramente absorvido pelo biofilme, antes de ser metabolizado. No tempo de 48 horas, é possível observar o decaimento da  $\lambda$ -cialotrina aderida à massa fúngica e a sua externalização para o meio de cultura, o que pode ser atribuído à dinâmica dos compostos pelos compartimentos intra e

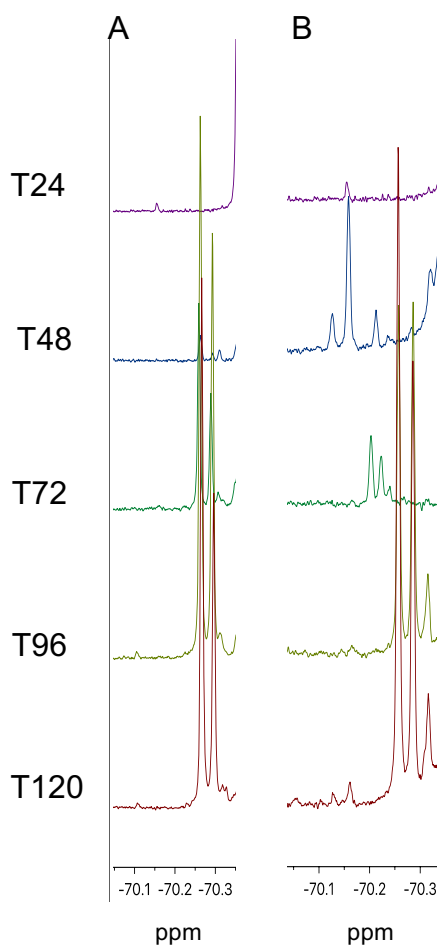
extracelulares do microrganismo (ARAÚJO *et al.*, 2013). Tal dinâmica pode ser confirmada, ademais, pelo reaparecimento do pesticida nos extratos da biomassa retiradas nos tempos de 96 e 120 horas.

Após 72 horas, novos sinais com o mesmo padrão de multiplicidade foram detectados nos espectros ( $\delta$  -70,3 e -70,25 ppm), juntamente com os sinais referentes à  $\lambda$ -cialotrina, indicando que não houve modificações no ambiente químico próximo aos átomos de flúor e que o grupamento trifluorometil permanece intacto. A ausência de sinais em  $\delta$  -120,00, referente ao deslocamento químico do íon fluoreto, também corroboram esta observação.

Amadio e colaboradores (2010), quando do estudo da biotransformação do flurbiprofeno por espécies de *Cunninghamella*, monitoraram a cinética de formação dos metabólitos por  $^{19}\text{F}$  RMN. Os deslocamentos químicos e os padrões de multiplicidade mantiveram-se idênticos ao produto de partida, indicando que não houve alterações nas proximidades do átomo de flúor.

Metabólitos “transitórios” puderam ser detectados apenas nas amostras advindas da biomassa, após 24 horas de incubação (Figura 92). Provavelmente, tais compostos foram confinados à biomassa devido à barreira difusional criada pela matriz polimérica extracelular presente nas culturas de biofilmes (AMADIO *et al.*, 2013).

Figura 92 - Expansão do espectro RMN  $^{19}\text{F}$  das amostras dos sobrenadantes de incubação (A) e biomassa (B) obtidos nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de degradação de  $\lambda$ -cicalotrina por biofilmes de *C. elegans* DSM1908, mostrando fluorometabólitos transitórios



Fonte: autor

A espectroscopia de ressonância nuclear de flúor ( $^{19}\text{F}$ ) tem sido extremamente útil como ferramenta para o monitoramento da degradação de compostos fluorados, bem como para a elucidação de rotas catabólicas envolvidas na obtenção de fluorometabólitos (COBB E MURPHY, 2009; MURPHY, 2010; CASTELO BRANCO *et al.*, 2015).

Uma das grandes vantagens associadas à técnica é a não necessidade de purificação dos produtos formados, uma vez que o intervalo de deslocamentos químicos para o núcleo  $^{19}\text{F}$  é muito maior que o referente aos núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (MURPHY, 2010; CASTELO BRANCO *et al.*, 2015; MURPHY, 2016).

Neste trabalho, não foi desenvolvida nenhuma técnica de purificação para a identificação e caracterização dos produtos obtidos da biotransformação da  $\lambda$ -cialotrina. Palmer-Brown e colaboradores (2017), do mesmo modo, caracterizaram os derivados obtidos da biotransformação de ácidos carboxílicos de piridina substituídos com fluorofenil a partir da análise das misturas reacionais brutas (não purificadas) por  $^{19}\text{F}$  RMN.

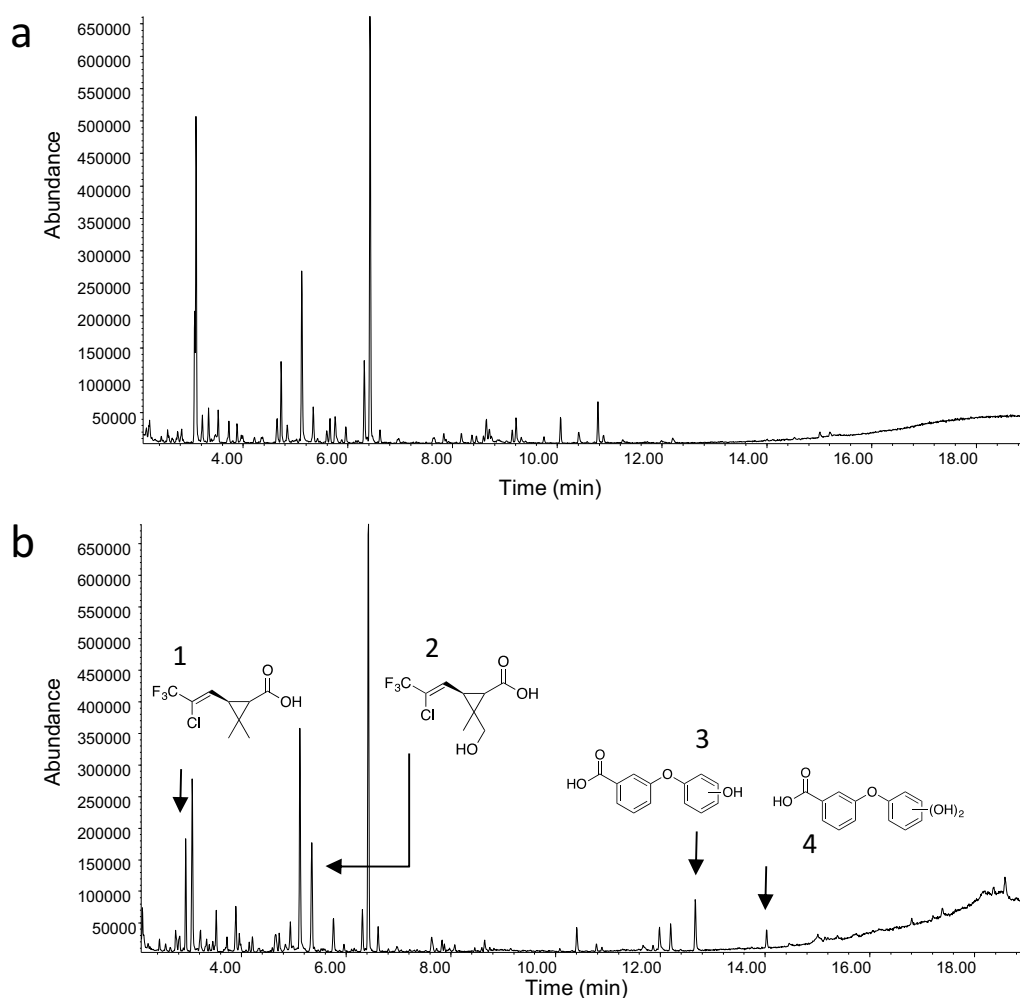
Além disso, para análises *in vivo* e estudos de metabolismo de fármacos, por exemplo, a técnica mostra-se ainda mais vantajosa, já que compostos fluorados são essencialmente ausentes do meio biológico. Assim, não há interferências de sinais de substâncias endógenas, como é observado na ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (CASTELO BRANCO *et al.*, 2015).

#### **4.2.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)**

Estudos anteriores sobre o metabolismo da  $\lambda$ -cialotrina em animais propuseram que a primeira etapa consiste na hidrólise da ligação éster, dando origem às porções ácida e álcool (KANEKO, 2010). Dessa maneira, certamente, os metabólitos advindos da porção álcool não seriam observados nos espectros de  $^{19}\text{F}$  RMN.

Para tanto, amostras das frações orgânicas dos sobrenadantes de incubação foram sililadas e analisadas por GC-MS. Os cromatogramas de íons totais destas análises mostram quatro novos picos (**1 – 4**), referentes a quatro novos produtos, que não foram identificados nos cromatogramas das amostras controles (Figura 93).

Figura 93 - Cromatogramas de íons totais *GC-MS* da amostra controle (a) contendo meio de cultura SDB e do sobrenadante de incubação (b) obtidas no tempo de 120 h de degradação de  $\lambda$ -cialotrina por biofilmes de *C. elegans* DSM1908



Fonte: autor

Os espectros de massa dos produtos **1** e **2** apresentaram padrões isotópicos característicos de compostos clorados e os íons moleculares ( $M^+$ ) foram idênticos aos esperados para o ácido ciclopropilcarboxílico siliado ( $m/z$  299) e para o ácido ciclopropilcarboxílico monohidroxilado siliado ( $m/z$  387), produtos já conhecidos oriundos do metabolismo da  $\lambda$ -cialotrina em mamíferos (KANEKO, 2010). O padrão de fragmentação do produto **1**, com tempo de retenção igual a 2,94 minutos, era composto pelos íons  $m/z$  178,  $m/z$  142,  $m/z$  73 e  $m/z$  61 (Tabela 1).

Tabela 1 - Tempos de retenção e dados espectrais de massa dos quatro novos picos observados após análise por *CG-MS* dos extratos de culturas de *C. elegans* incubadas com  $\lambda$ -cialotrina por 120 h

Produto	$t_R$ (min)	$m/z$ (intensidade relativa)	
		$M^+$	Íons fragmento
1	2,94	299 (4)	178 (10), 142 (10), 73 (100), 61 (15)
2	5,35	387 (1)	147 (45), 130 (100), 115 (59), 73 (100)
3	12,67	374 (100)	359 (44), 285 (24), 172 (17), 73 (100)
4	14,03	462 (31)	285 (24), 257 (9), 207 (11), 73 (100)

Fonte: autor

Os produtos **3** e **4** apresentaram os espectros de massa esperados para ácidos bifenil éter carboxílicos mono e dihidroxilados. Tais compostos provavelmente são formados a partir da hidroxilação, catalisada pelo citocromo P450, da porção álcool, que surge após a hidrólise da ligação éster do produto de partida. Essa mesma via metabólica foi verificada, também, no estudo do metabolismo dos inseticidas piretróides fenvalerato, cipermetrina e deltametrina. Espera-se, ainda, que o grupo ciano sofra conversões em íons tiocianato ( $^-\text{SCN}$ ) (KANEKO, 2010).

Chen e colaboradores (2015), igualmente, propuseram a hidrólise da ligação éster e a formação das porções álcool e ácido como primeira etapa da degradação da  $\lambda$ -cialotrina catalisada por *Bacillus thuringiensis* ZS-19. No entanto, neste estudo, a porção ácida não apresenta o grupamento trifluorometil e não há relatos do destino dos íons fluoreto que deveriam ser formados.

#### 4.2.3 Reações de hidrólise de éster

As reações de hidrólise compreendem a quebra de uma ligação pela adição de água e, quando catalisadas por microrganismos em biorremediação, tem como objetivo a inativação de poluentes (ALEXANDER, 1999).

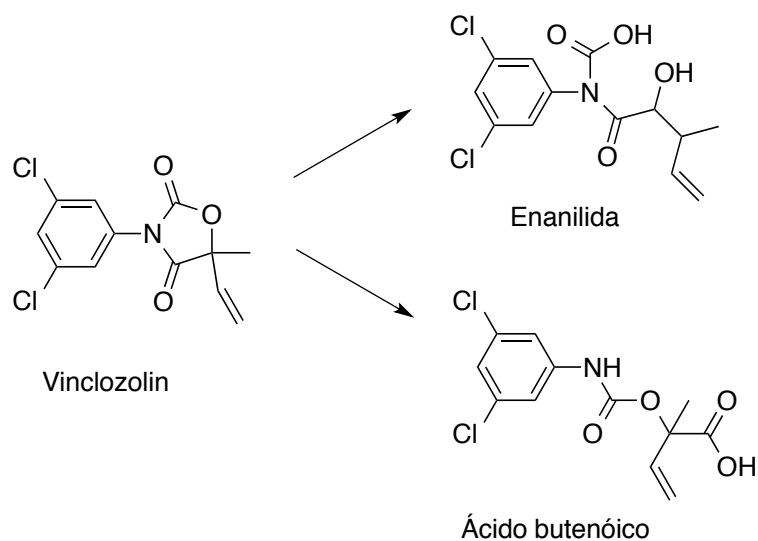
Os grupamentos éster são prontamente hidrolisados por microrganismos a seus ácido carboxílico e álcool correspondentes. Uma grande variedade de substratos sofre este tipo de reação e aqueles que são degradados inicialmente por essa via, em geral,

apresentam um tempo de vida mais curto no meio ambiente (RISER-ROBERTS, 1992; ALEXANDER, 1999; WISE, 1999)

Pothuluri e colaboradores (2000) relataram a degradação do fungicida vinclozolin, extensamente utilizado para o combate de pragas agrícolas nos Estados Unidos e Europa, catalisada por *C. elegans*.

A proposta de degradação apresentada no estudo acima mencionado é via éster-hidrólise (Figura 94), sendo observada a formação das porções ácido butenóico e enanilida. *C. elegans* foi o biocatalisador escolhido frente a maior tendência dos modelos microbianos do metabolismo de mamíferos à bioativação (POTHULURI *et al.*, 2000; PRASAD, 2018).

Figura 94 - Esquema proposto para a degradação de vinclozolin catalisada por *C. elegans* via hidrólise



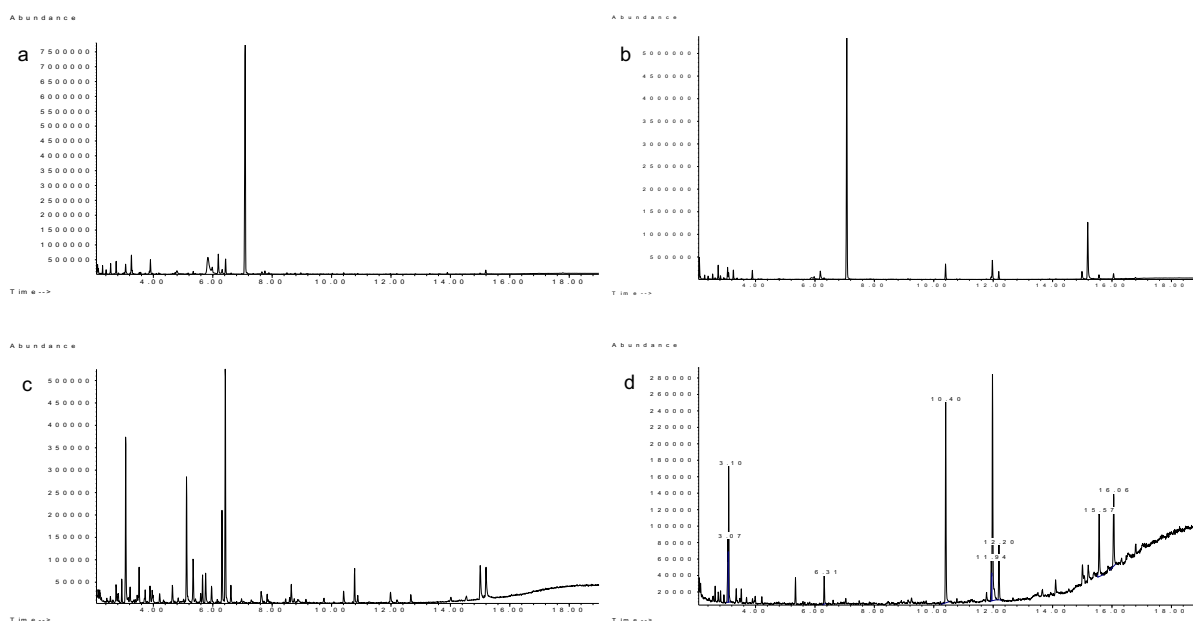
Fonte: autor

### 4.3 EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DO CYP450

Nenhum produto de biotransformação foi observado nas frações orgânicas dos sobrenadantes e biomassa, obtidas a partir do experimento de inibição do CYP 450 com o composto 1-aminobenzotriazol. Na Figura 95, estão contidos os cromatogramas das amostras coletadas após 72 horas de incubação. A partir da análise dos cromatogramas, é possível verificar novos picos possivelmente atribuídos a produtos de degradação da  $\lambda$ -cialotrina, o que sugere que o metabolismo do pesticida,

catalisado pelo fungo filamentoso *C. elegans* DSM1908, é mediado pelas enzimas do CYP450.

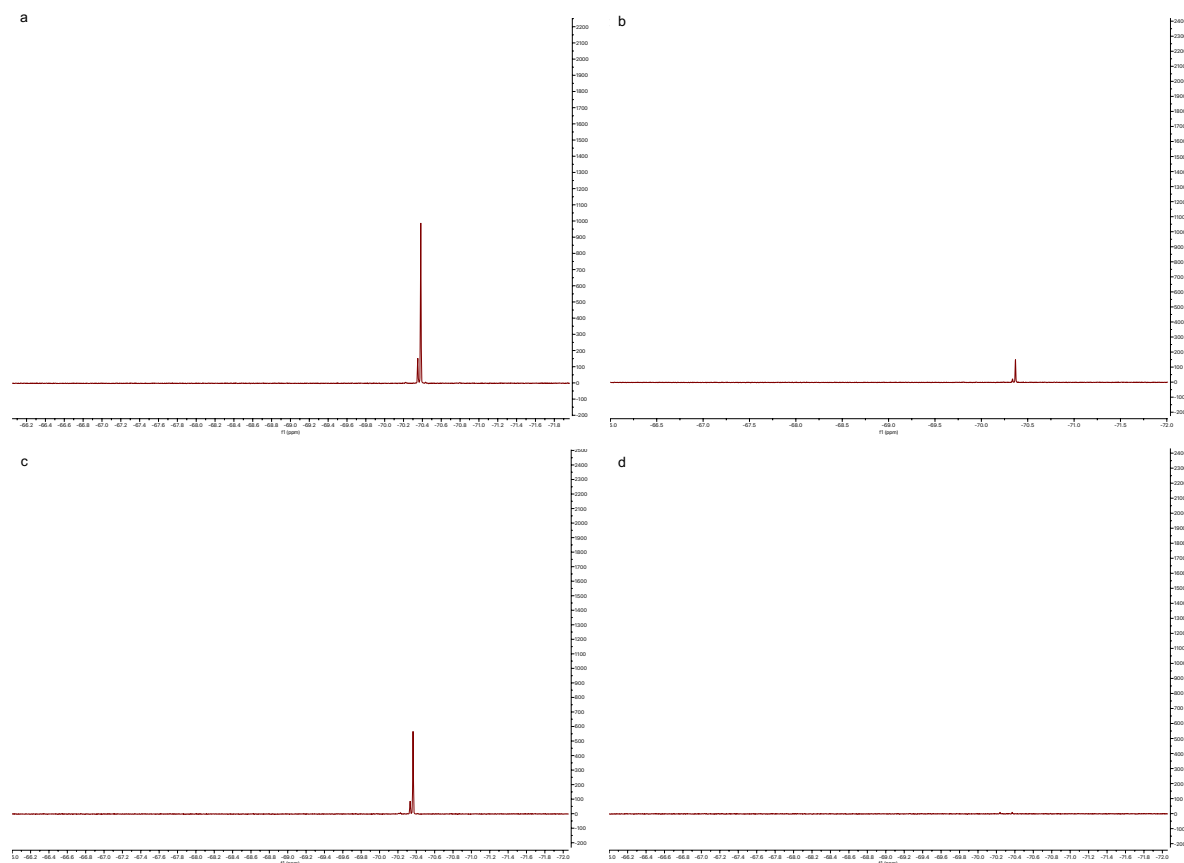
Figura 95 - Cromatogramas de íons totais *GC-MS* das amostras do sobrenadante de incubação e biomassa, na ausência e presença de inibidor, obtidas no tempo de 120 h de degradação de  $\lambda$ -cicalotrina por biofilmes de *C. elegans* DSM1908



Fonte: autor; a: sobrenadante + inibidor; b: biomassa + inibidor; c: sobrenadante sem inibidor; d: biomassa sem inibidor

Os espectros de  $^{19}\text{F}$  RMN (Figura 96) das frações orgânicas dos sobrenadantes e das biomassas, obtidas nos tempos de 72 e 120 horas de incubação com *C. elegans* DSM1908 e o inibidor 1-aminobenzotriazol, também indicam a não formação de produtos fluorados oriundo da biotransformação da  $\lambda$ -cicalotrina. Assim, a inibição do citocromo P450 sugere que suas enzimas estão diretamente envolvidas na hidrólise do éster central.

Figura 96 - Espectros  $^{19}\text{F}$  RMN das frações orgânicas dos sobrenadantes e das biomassas, obtidas nos tempos de 72 e 120 horas de incubação com *C. elegans* DSM1908 e o inibidor 1-aminobenzotriazol

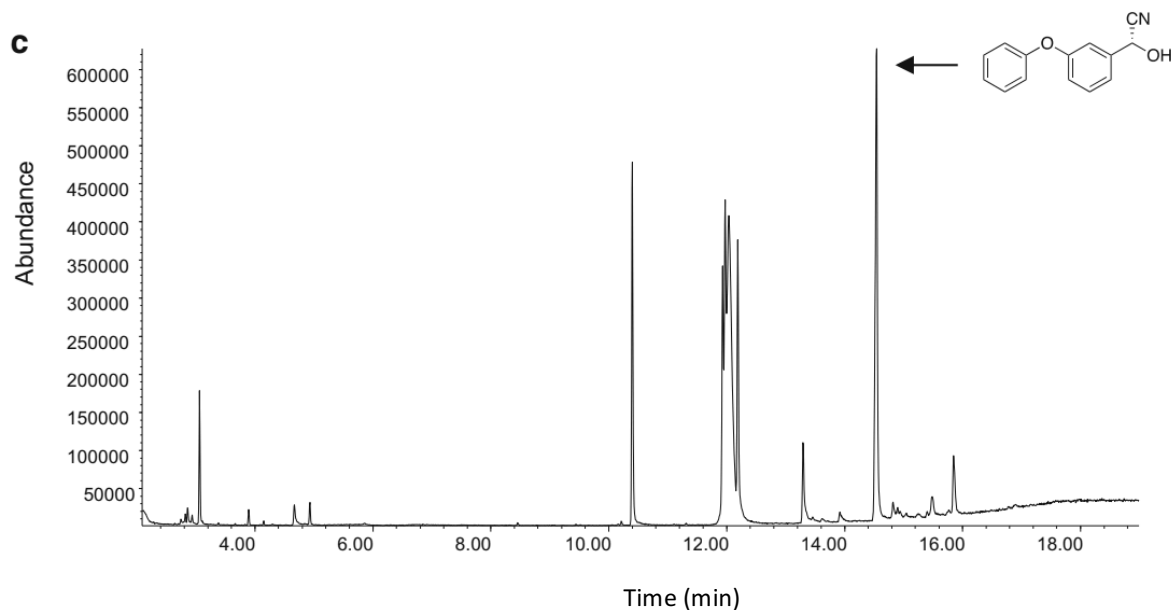


Fonte: autor. a: sobrenadante com inibidor (T72); b: células com inibidor (T72); c: sobrenadante com inibidor (T120); d: células com inibidor (T120);

#### 4.4 INCUBAÇÃO COM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS (*RLM*)

$\lambda$ -cialotrina também foi incubada com microssomas hepáticos de ratos, a fim de comparar o metabolismo fúngico com o de mamíferos. O composto com espectro de massa esperado para o álcool-ciano-3-fenoxibenzílico foi facilmente detectável, o que é consistente com a hidrólise do éster do composto de partida (Figura 97). Todavia, não foi detectado nenhum outro produto ácido ciclopropilcarboxílico, nem quaisquer outros intermediários, como o ácido fenoxibenzóico.

Figura 97 - Cromatograma *CG-MS* de íon total das amostras controle contendo meio de cultura SDB e dos extratos dos sobrenadantes de incubação obtidos no tempo de 120 h do experimento de incubação com *RLM*

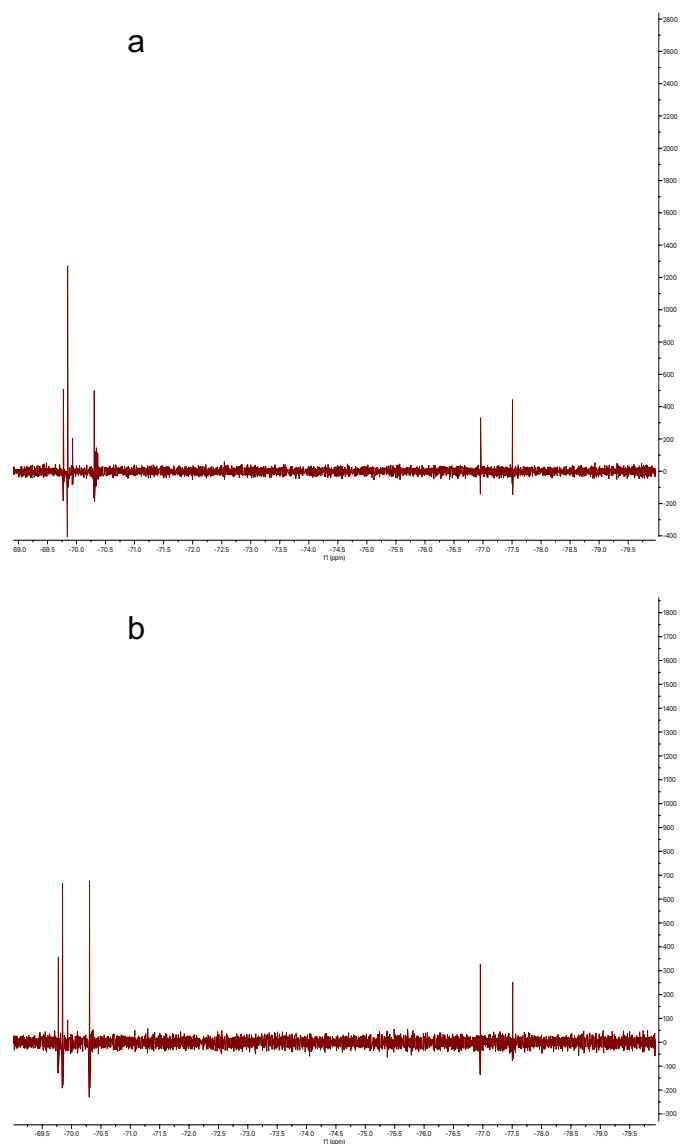


Fonte: autor

#### 4.5 TRATAMENTO COM $\beta$ -GLUCOSIDASE E SULFATASE

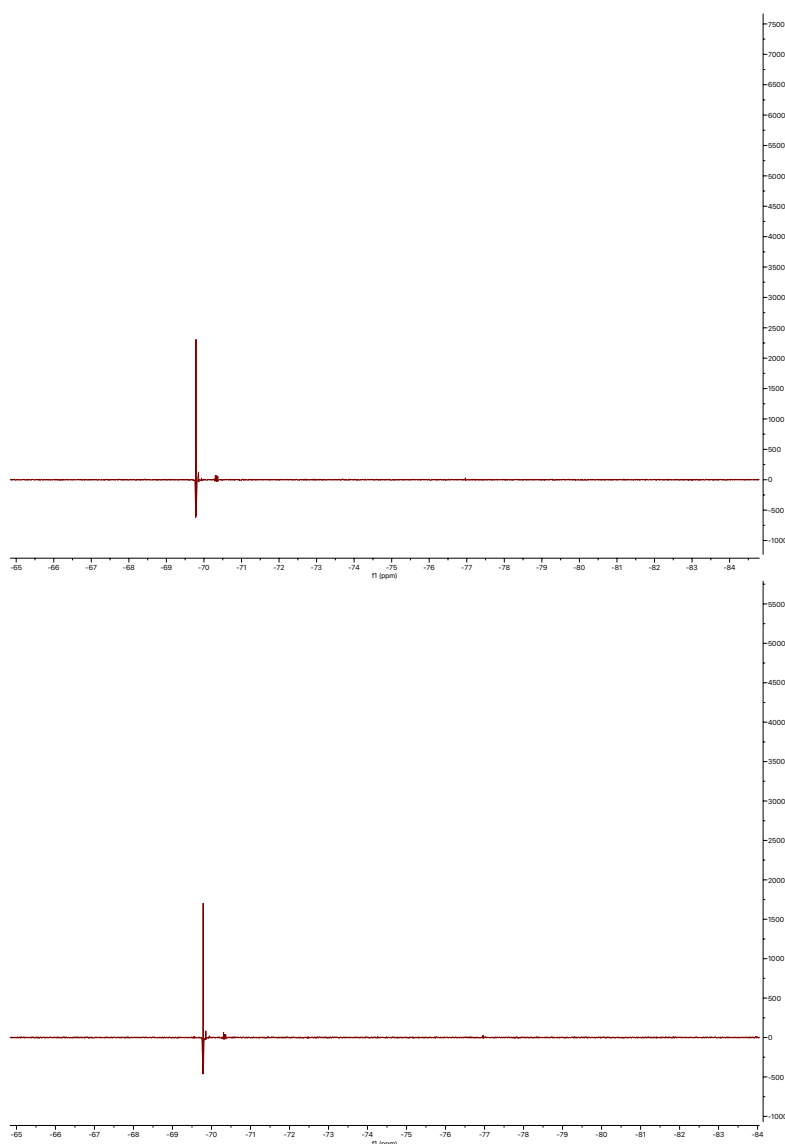
As enzimas  $\beta$ -glucosidase e sulfatase foram usadas no experimento de desconjugação enzimática. Os produtos da reação foram extraídos com acetato de etila e analisados por  $^{19}\text{F}$  RMN. Não houveram diferenças entre os espectros das amostras tratadas com enzimas ativas e desnaturadas, apesar de observados novos sinais. Nenhuma desconjugação foi observada e não há indícios de agliconas (Figuras 98 e 99).

Figura 98 - Espectros RMN  $^{19}\text{F}$  dos extratos orgânicos dos produtos da reação de tratamento com  $\beta$ -Glucosidase ativa (a) e desnaturada (b)



Fonte: autor

Figura 99 - Espectros RMN  $^{19}\text{F}$  dos extratos orgânicos dos produtos da reação de tratamento com sulfatase ativa (a) e desnaturada (b)



Fonte: autor

Esperam-se, deste experimento, o desaparecimento de sinais referentes a metabólitos nas amostras antes do tratamento enzimático (ou com enzima desnaturada) e o concomitante aumento de sinais referentes às agliconas correspondentes. Não se pode afirmar, desta feita, que os novos sinais são referentes a compostos conjugados, advindos da degradação da  $\lambda$ -cialotrina.

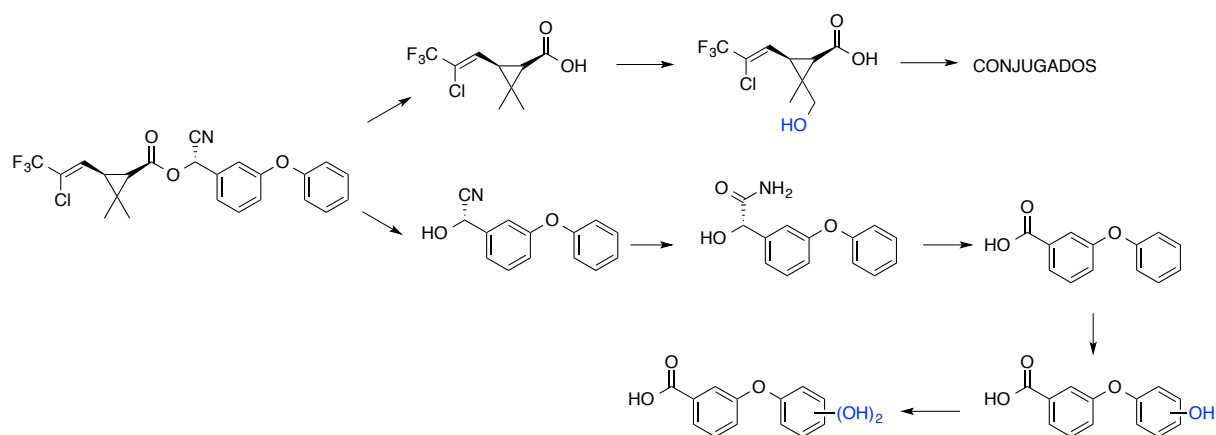
No entanto, estudos tem demonstrado que o metabolismo de piretróides do tipo II é mediado pelo complexo enzimático do citocromo P450 e há a formação de metabólitos conjugados (MARTÍNEZ *et al.*, 2018). Kaneko e colaboradores (2010)

descreveram o ácido ciclopropilcarboxílico e seu glucuronídeo como os metabólitos majoritários da detoxificação da porção ácida da  $\lambda$ -cialotrina em animais.

Uma justificativa para os resultados obtidos neste estudo é de as amostras retiradas nos tempos de 120 horas não apresentarem mais os compostos glicosilados ou sulfatados, já que, frente ao desequilíbrio químico, as enzimas hidrolases podem catalisar a clivagem das ligações de conjugação por uma reação hidrolítica reversa (WEIJERS *et al.*, 2008; FABER, 2011).

Baseado nos dados aqui apresentados, uma proposta para o caminho de biodegradação de  $\lambda$ -cialotrina por *C. elegans* está contido na Figura 100.

Figura 100 - Proposição para a biodegradação  $\lambda$ -cialotrina por *C. elegans*



Fonte: autor

## 5. CONCLUSÃO

Biofilme de *C. elegans* DSM 1908 mostrou-se um biorremediador eficiente na degradação do pesticida  $\lambda$ -cialotrina a suas porções ácido carboxílico e álcool.

Os experimentos com microsomas hepáticos de ratos permitiram verificar o envolvimento das enzimas oxidativas CYP450. O ensaio de desconjugação não evidenciou a formação de conjugados a partir da degradação do pesticida por *C. elegans* DSM 1908, apesar de este tipo de composto estar associado ao metabolismo de piretróides em animais.

Os produtos de degradação foram identificados e caracterizados pelas técnicas Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (*CG-MS*) e Ressonância Magnética Nuclear  $^{19}\text{F}$  (RMN  $^{19}\text{F}$ ).

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E.-S.; BAZAID, S. A.; SALMAN, M. S. **Characterization of the phytochemical constituents of Taif rose and its antioxidant and anticancer activities.** BioMed Researc International, v. 2013, 2013.
- AGHAKHANI, F.; KHARAZIAN, N.; LORI GOOINI, Z. **Flavonoid Constituents of *Phlomis* (Lamiaceae) Species Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry.** Phytochemical Analysis, v. 29, n. 2, p. 180-195, 2018.
- AKASHI, T.; AOKI, T.; AYABE, S.-I. **Molecular and Biochemical Characterization of 2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase. Involvement of Carboxylesterase-Like Proteins in Leguminous Isoflavone Biosynthesis.** Plant Physiology, v. 37, p. 882–891, 2005.
- AKSHAYA, K. B. *et al.* **Electrocatalytic oxidation of morin on electrodeposited Ir-PEDOT nanograins.** Food Chemistry, v. 270, p. 78-85, 2019.
- AKUTSU, T. *et al.* **Identification of human cytochrome p450 isozymes involved in diphenhydramine N-demethylation.** Drug Metabolim & Disposition, v. 35, n. 1, p. 72-78, 2007.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremedation.** 2nd Edition. New York: Academic Press, 1999.
- ALMEIDA, C. A. A. **Identificação e determinação de fármacos ansiolíticos e antiepilépticos e seus metabólitos em ambiente hospitalar.** 2012. (Doutorado). Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.
- ALVES, F. A. **Estudo de interação de Clonazepam e excipientes em formulações farmacêuticas sólidas e validação de método indicativo de estabilidade.** 2017. (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.
- 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.; GORDON, K.; MURPHY, C. D. **Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella* species.** Applied Environmental Microbiology, v. 76, n. 18, p. 6299-6303, 2010.
- AMADIO, J.; MURPHY, C. D. **Production of human metabolites of the anti-cancer drug flutamide via biotransformation in *Cunninghamella* species.** Biotechnology Letters, v. 33, n. 2, p. 321-326, 2011.

ANOUAR, E. H. *et al.* **Relationship between antioxidant acidity of several flavonols and their molecular properties.** *Journal of Physical Chemistry*, v. 45, p. 107-113, 2009.

ANTUNES, V. U. **Diferenciação de Isômeros Organofluorados Por Rmn Aplicando a Metodologia <sup>19</sup>F Mad (Matrix-Assisted Dosy).** 2016. (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

ARAÚJO, K. C. *et al.* **Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 93-96, 2013.

ARRUDA, E. L. **Aplicação de fungos filamentosos como biocatalisadores em bioprocessos para produção de derivados potencialmente bioativos.** 2018. (Doutorado). Faculdade de Farmacia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. ***Cunninghamella* - A Microbial Model For Drug Metabolism Studies - A Review.** *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 16-29, 2009.

ATTIA, G. A.; ABOU-EL-SEOUD, K. A.; IBRAHIM, A.-R. S. **Biotransformation of coumarins by *Cunninghamella elegans*.** *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 10, n. 18, p. 411-418, 2016.

AUDI, E. A.; PUSSI, F. D. **Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas.** *Acta Scientiarum*, v. 22, n. 2, p. 599-604, 2000.

B, S. *et al.* **Microbial synthesis of mammalian metabolites of spironolactone by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*.** *Steroids*, v. 136, p. 1-7, 2018.

BAIJAL, U.; MEHEOTBA, B. S. **The genus *Cunninghamella* - a reassessment.** *Sydowia*, v. 33, p. 1-13, 1980.

BANDU, R.; KIM, K. P. **Editorial: Drug Metabolism and Toxicology.** *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, v. 7, n. 2, 2016.

BARES, I. F.; PEHOURCQ, F.; JARRYA, C. **Development of a rapid RP-HPLC method for the determination of clonazepam in human plasma.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 36, p. 865-869, 2004.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal - As bases moleculares da ação dos fármacos.** 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BASSO, A. V. *et al.* **Biotransformation of Salpichrolides A, C, and G by Three Filamentous Fungi.** *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 6, p. 1658-1667, 2016.

BAYDOUN, E. *et al.* **Microbial transformation of contraceptive drug etonogestrel into new metabolites with *Cunninghamella blakesleeana* and *Cunninghamella echinulata*.** *Steroids*, v. 115, p. 56-61, 2016.

BAYDOUN, E. *et al.* **Biotransformation of drospirenone, a contraceptive drug, with *Cunninghamella elegans*.** *Steroids*, v. 126, p. 30-34, 2017.

BÉRDY, J. **Bioactive microbial metabolites.** *The Journal of Antibiotics*, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BHATTACHARYA, S. S.; YADAV, J. S. **Microbial P450 Enzymes in Bioremediation and Drug Discovery: Emerging Potentials and Challenges.** *Current Protein & Peptide Science*, v. 19, n. 1, p. 75-86, 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.

BORGES, K. B. *et al.* **Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts.** *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20, p. 385–397, 2009.

BRAR, S. K. *et al.* **Bioremediation of Hazardous Wastes - A Review.** *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, v. 10, p. 59-72, 2006.

BRAZ, C. D. L. *et al.* **Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450 utilizados por idosos em domicílio.** *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 28, 2018.

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

CARR, S. A. *et al.* **Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology.** *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 24, p. 2802-2824, 1991.

CARTER, L. J. *et al.* **Sorption, plant uptake and metabolism of benzodiazepines.** *Science of the Total Environment*, v. 628-629, p. 18-25, 2018.

CARULLO, G.; BADOLATO, M.; AIELLO, F. **Bioavailability and Biochemistry of Quercetin and Applications to Health and Diseases. In: (Ed.). Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease.** Elsevier, 2018. cap. 26, p.361-371.

CASELLI, A. *et al.* **Morin: A Promising Natural Drug.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 774-791, 2016.

CASEY, E.; MURPHY, C. D. **Biofilm-catalysed transformation of organofluorine compounds.** *Chimica Oggi - Chemistry Today*, v. 31, n. 3, 2013.

CASTELO BRANCO, F. S. C. *et al.* **Nuclear Magnetic Resonance of organofluorine compounds: a challenge in the teaching of spectroscopy.** Química Nova, v. 38, n. 9, p. 1237-1246, 2015.

CAVEDAL, L. E. **Quantificação do Clonazepam em Plasma Humano por Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplada ao Espectrômetro de Massas em um Estudo de Bioequivalencia.** 2014. (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

CHA, C. J.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. **Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*.** Applied and Environmental Microbiology, v. 67, n. 9, p. 4358-60, 2001.

CHALET, C. *et al.* **Identification of phase-II metabolites of flavonoids by liquid chromatography-ion-mobility spectrometry-mass spectrometry.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 410, n. 2, p. 471-482, 2018.

CHEN, G. *et al.* **Analysis of Flavonoids in Rhamnus davurica and Its Antiproliferative Activities.** Molecules, v. 21, n. 10, 2016.

CHEN, H.-Y.; GUAN, Y.-X.; YAO, S.-J. **A novel two-species whole-cell immobilization system composed of marine-derived fungi and its application in wastewater treatment.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 89, n. 11, 2014.

CHEN, S. *et al.* **Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19.** Scientific Reports, v. 5, 2015.

CHEN, W. *et al.* **Fungal cytochrome p450 monooxygenases: their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin.** Genome Biology and Evolution, v. 6, n. 7, p. 1620-1634, 2014

CHEN, Y. *et al.* **Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration.** Molecules, v. 20, n. 10, p. 18352-18366, 2015.

CHIANG, C.-M. *et al.* **Production and Anti-Melanoma Activity of Methoxyisoflavones from the Biotransformation of Genistein by Two Recombinant *Escherichia coli* Strains.** Molecules, v. 22, n. 87, p. 1-9, 2017.

CHO, M.-H. *et al.* **Characterization of Regiospecific Flavonoid 3'/5'-OMethyltransferase from Tomato and Its Application in Flavonoid Biotransformation.** Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry, v. 55, p. 749-755, 2012.

CHOI, K. Y. *et al.* **A-ring ortho-specific monohydroxylation of daidzein by cytochrome P450s of *Nocardia farcinica* IFM10152.** *Biotechnology Journal*, v. 4, n. 11, p. 1586-1595, 2009.

CHÈZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. **Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS Application to forensic cases of drug facilitated crimes.** *Forensic Science International*, v. 145, p. 123-130, 2004.

COBB, S. L.; MURPHY, C. D.  **$^{19}\text{F}$  NMR applications in chemical biology.** *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 130, p. 132-143, 2009.

COLUCCI, R. *et al.* **Effect of Felbamate on The Pharmacokinetics of Clonazepam.** *American Journal of Therapeutics*, v. 3, n. 4, p. 294-297, 1996.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. D.; ANDRADE, G. S. S. **Potential catalytic of mycelium-bound lipase of filamentous fungi in biotransformation processes.** *Química Nova*, v. 40, p. 85-96, 2017.

COUTTS, R. T.; FOSTER, B. C.; PASUTTO, F. M. **Fungal metabolism of (-)-deprenyl and pargyline.** *Life Science*, v. 29, n. 19, p. 1951-1958, 1981.

CRUZ, J. C. D.; SÉRVULO, E. F. C.; CASTRO, A. M. D. **Microbial Production of Itaconic Acid. In: (Ed.). Microbial Production of Food Ingredients and Additives: Elsevier, 2017. cap. 10.**

CUSACK, K. P. *et al.* **Emerging technologies for metabolite generation and structural diversification.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, n. 20, p. 5471-5483, 2013.

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

DAI, J. *et al.* **Structural diversification of taxanes by whole-cell biotransformation.** *Tetrahedron*, v. 64, p. 8102-8116, 2008.

DAI, L. *et al.* **Use of a Promiscuous Glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* 168 for the Enzymatic Synthesis of Novel Protopanaxatriol-Type Ginsenosides.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 4, p. 943-949, 2018.

DALLEGRAVE, A. **Inseticidas piretróides: do desenvolvimento analítico ao nível de resíduos em alimentos de origem animal.** 2017. (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DAS, S.; ROSAZZA, J. P. **Microbial and enzymatic transformations of flavonoids.** *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 3, p. 499-508, 2006.

DE MELO SOUZA, P. L. *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.

DE PAULA, N. C. *et al.* **Biosynthesis of human diazepam and clonazepam metabolites.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 5, p. 1026-1029, 2015.

DE VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H. **Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids.** *Journal of Chromatography A*, v. 1430, p. 16-78, 2016.

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. **Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation.** *Indian Journal of Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 247-264, 2016.

DING, J.; SHI, Y.; WANG, J. **Qualitative and Quantitative Analysis of Clonazepam and its Metabolite 7-aminoclonazepam in Blood by LC-tandem QTOF/MS and LC-MS/MS.** *Scanning Electron Microscopy in Forensic Science*, v. 4, n. 1, 2014.

DRUMMER, O. H.; RAGO, M. D.; GEROSTAMOULOS, D. **Analysis of Benzodiazepines for Drug-Facilitated Assaults and Abuse Settings (Urine).** In: NATURE, S. (Ed.). **LC-MS in Drug Analysis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v.1872, 2019.

DUARTE, J. M.; BARBIER, I.; SCHAERLI, Y. **Bacterial Microcolonies in Gel Beads for High-Throughput Screening of Libraries in Synthetic Biology.** *ACS Synthetic Biology*, v. 6, n. 11, p. 1988-1995, 2017.

DUBE, A. K.; KUMAR, M. S. **Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleeana*.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 2, p. 259-267, 2017.

DUBOIS, J. L.; SNEDEN, A. T. **Ferreirinol, a New 3-Hydroxyisoflavanone from *Swartzia polyphylla*.** *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 902-903, 1996.

DURAIRAJ, P.; HUR, J. S.; YUN, H. **Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases.** *Microbial Cell Fact*, v. 15, n. 1, p. 125, 2016.

EBERLIN, M. N. B., MARIO. **Absolute and general assignment of constitutional isomers by mass spectrometry: the case of methylpiperidines.** *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 17-21, 2012.

ELMER, G. W.; REMMEL, R. P. **Role of the intestinal microflora in clonazepam metabolism in the rat.** *Xenobiotica*, v. 14, n. 11, p. 829-840, 1984.

ES, I.; VIEIRA, J. D.; AMARAL, A. C. **Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, 2015.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. New York: Springer, 2011.

FAN, H.-X. *et al.* **A microbial model of mammalian metabolism: biotransformation of 4,5-dimethoxyl-canthin-6-one using *Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3.970**. Xenobiotica, v. 47, n. 4, p. 284-289, 2017.

FELCZAK, A. *et al.* **Quinoline biodegradation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans* and adaptive modifications of the fungal membrane composition**. Environmental Science and Pollution Research International, v. 23, n. 9, p. 8872-8880, 2016.

FERREIRA, Á. L. G. **Novos processos de fluoração em Química Farmacêutica Industrial**. 2013. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra.

FOGAÇA, R. F. H. L. *et al.* **Biotransformation of Ephedrine by Whole Cells of *Cunninghamella elegans***. Biomedical & Life Sciences v. 4, n. 4, 2017.

FRANÇA, J. D. A. **Desenvolvimento de método para determinação de xenobióticos em imaturos de insetos necrófagos por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)**. 2013. (Mestrado). Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.

FREITAS, L. M. C. *et al.* **Emprego de *Aspergillus niger* AN400 em reatores de bancada para remover pesticida de matriz aquosa**. Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 22, p. 1-10, 2017.

FRIDÉN, M. E.; SJÖBERG, P. J. **Strategies for differentiation of isobaric flavonoids using liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry**. Journal of Mass Spectrometry, v. 49, n. 7, p. 646-63, Jul 2014.

FU, S.; FENG, X.; SUN, D. A. **Microbe-mediate transformation of echinocystic acid by whole cells of filamentous fungus *Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3.910**. Molecular Biology Reports, v. 45, n. 6, p. 2795-2800, 2018.

FURA, A. *et al.* **Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery**. Journal of Medicinal Chemistry, v. 47, n. 18, p. 4339-4351, 2004.

GAO, N. *et al.* **Simultaneous removal of ciprofloxacin, norfloxacin, sulfamethoxazole by co-producing oxidative enzymes system of *Phanerochaete chrysosporium* and *Pycnoporus sanguineus***. Chemosphere, v. 195, p. 146-155, 2018.

GARCIA NETO, F. M. **RESOLUÇÃO-RE Nº 1.714, DE 29 DE JUNHO DE 2018.** SANITÁRIOS, Brasil 2018.

GATES, P. J.; LOPES, N. P. **Characterisation of flavonoid aglycones by negative ion chip-based nanospray tandem mass spectrometry.** International Journal of Analytical Chemistry, v. 2012, 2012.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. **Screening and production of lipase from fungal organisms.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 14, p. 241-253, 2018.

GHAFFAR, I. *et al.* **Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview.** International Microbiology, p. 1–12, 2018.

GHOSAL, D. *et al.* **Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review.** Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1369, 2016.

GÓMEZ, J. D. *et al.* **Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).** PLoS ONE, v. 13, n. 10, 2018.

GONZALES, G. B. *et al.* **Ultra(high)-pressure liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight-ion mobility-high definition mass spectrometry for the rapid identification and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste.** Journal of Chromatography A, v. 1323, p. 39-48, 2014.

GRAFINGER, K. E. *et al.* **Investigating the ability of the microbial model *Cunninghamella elegans* for the metabolism of synthetic tryptamines.** Drug Testing and Analysis, v.11, n. 5, p. 721-729, 2019.

GRANT, D. M. *et al.* **Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver.** Biochemical Pharmacology, v. 36, n. 8, p. 1251-1260, 1987.

GUENGERICH, F. P. **Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity.** Chemical Research in Toxicology, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001.

GUTIÉRREZ-CORREA, M. *et al.* **Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 167, n. 5, p. 1235-53, 2012.

HALDAR, S. *et al.* **Whole-Cell Mediated 11 $\beta$ -Hydroxylation on the Basic Limonoid Skeleton by *Cunninghamella echinulata*.** The Journal of Organic Chemistry, v. 19, n. 80, p. 6490- 649 5, 2015.

HAMMAD, M. A.; MÜLLER, B. W. **Solubility and stability of clonazepam in mixed micelles.** International Journal of Pharmaceuticals, v. 169, n. 1, p. 55-64, 1998.

HAN, F.; LEE, I.-S. **Microbial transformation of bavachin by *Absidia coerulea***. *Phytochemistry Letters*, v. 18, p. 136–139, 2016.

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

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. **Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 177-192, 2011.

HAYER, V. M. *et al.* **Simplified high performance liquid chromatographic method for the determination of clonazepam and other benzodiazepines in serum**. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 8, n. 3, p. 352-357, 1986.

HAYAT, K. *et al.* **Microbial biotechnology as an emerging industrial wastewater treatment process for arsenic mitigation: A critical review**. *Journal of Cleaner Production*, v. 151, p. 427-438, 2017.

HEGAZY, M. E. *et al.* **Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review**. *Journal of Advanced Research*, v. 6, n. 1, p. 17-33, 2015.

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

HO, T. T.; GUPTA, S. V.; SANCHEZ-VALLE, A. **Prolonged clonazepam-induced withdrawal symptoms in an NAT2 ultraslow acetylator**. *Pharmacogenomics*, 2018.

HOLLAND, H. L. **Microbial hydroxylation of pregnenolone derivatives**. *Chemical Society Reviews*, v. 11, n. 14, 1982.

HOU, Y. C. *et al.* **Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 55, n. 2, p. 199-203, 2003.

HUERTA-OCHOA, S. *et al.* **Whole-Cell Bioconversion of Citrus Flavonoids to Enhance Their Biological Properties**. In: (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v.61, 2018. cap. 9.

HUSSAIN, S. *et al.* **Simultaneous removal of malachite green and hexavalent chromium by *Cunninghamella elegans* biofilm in a semi-continuous system**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 125, p. 142-149, 2017.

HUYNH, N. T. *et al.* **Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review.** International Journal of Molecular Sciences, v. 15, n. 11, p. 19369-19388, 2014.

HVATTUM, E.; EKEBERG, D. **Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry.** Journal of Mass Spectrometry, v. 38, n. 1, p. 43-9, 2003.

IBRAHIM, A.-R. S.; RAGAB, A. E. **Fusidic acid ring B hydroxylation by *Cunninghamella elegans*.** Phytochemistry Letters, v. 25, p. 86-89, 2018.

IBRAHIM, A. R. *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.

JAPIASSU, K. B. **Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico.** 2018. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

JI, Y. *et al.* **Antitumor activity of the plant extract morin in tongue squamous cell carcinoma cells.** Oncology Reports, v. 40, n. 5, p. 3024-3032, 2018.

KACHLICKI, P. *et al.* **Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques.** Molecules, v. 21, n. 11, 2016.

KALIEVA, A. *et al.* **Cell immobilization of *Aspergillus niger*/7 for enhanced production of phytase.** European Journal of Biotechnology and Bioscience, v. 5, n. 3, p. 48-50, 2017.

KANEKO, H. **Pyrethroid Chemistry and Metabolism.** In: PRESS, A. (Ed.). Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Third Edition. New York, 2010. cap. 76, p.1635-1663.

KARABÍN, M. *et al.* **Biotransformations and biological activities of hop flavonoid.** Biotechnology Advances, v. 33, n. 6, p. 1063-1090, 2015.

KEBAMO, S.; TESEMA, S.; GELETA, B. **The Role of Biotransformation in Drug Discovery and Development.** Drug Metabolism & Toxicology, v. 6, n. 5, 2015.

KEERTHANA, M.; VIDYAVATHI, M. **Screening and evaluation of fungal resources for loratadine metabolites.** Journal of Biosciences, v. 43, n. 5, p. 823–833, 2018.

KELLY, S. L.; KELLY, D. E. **Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do**

**and what can they do for us?** Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 6, n. 368, p. 1612, 2013.

KERA, K. *et al.* **Pathway-specific metabolome analysis with.** Metabolomics, v. 14, n. 5, p. 71, 2018.

KIM, J. *et al.* **Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC–MS/MS and its application to human and rat hair.** Journal of Chromatography B, v. 879, p. 878–886, 2011.

KIM, K. *et al.* **Crystal structure of GSK3 $\beta$  in complex with the flavonoid, morin.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 504, n. 2, p. 519-524, 2018.

KIM, K.-M. *et al.* **Biosynthesis of novel daidzein derivatives using *Bacillus amyloliquefaciens* whole cells.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 36, n. 6, p. 469-475, 2018.

KOIRALA, N. **Enhancing the Pharmaceutical Properties of Flavonoids via Methylation and Glycosylation.** SOJ Biochemistry - Symbiosis, v. 2, n. 2, p. 1-2, 2016.

KOIRALA, N. *et al.* **Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production.** Enzyme and Microbial Technology, v. 86, p. 103-16, 2016.

KOLLER, M. **A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters.** Fermentation, v. 4, p. 1-30, 2018.

KOSTRZEWA-SUSŁOW, E.; JANECKO, T. **Microbial Transformations of 7-Hydroxyflavanone.** The Scientific World Journal, v. 2012, p. 1-8, 2012.

KREN, V.; FLIEGER, M.; SAJDL, P. **Glycosylation of ergot alkaloids by free and immobilized cells of *Claviceps purpurea*.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 32, p. 645-650, 1990.

KRONSTRAND, R.; FORSMAN, M.; ROMAN, M. **Quantitative analysis of drugs in hair by UHPLC high resolution mass spectrometry.** Forensic Science International, v. 283, p. 9-15, 2018.

KRULL, R. *et al.* **Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology.** Journal of Biotechnology, v. 163, n. 2, p. 112-123, 2013.

KULESH, N. I. *et al.* **Isoflavonoids from heartwood of *Maackia amurensis* RUPR. ET MAXIM.** Chemistry of Natural Compounds, v. 37, n. 1, p. 29-31, 2001.

KUMAR, A.; DEVI, S.; SINGH, D. **Significance and Approaches of Microbial Bioremediation in Sustainable Development.** Microbial Bioprospecting for Sustainable Development, p. 93-114, 2018.

KUMAR, S. **Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation.** Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, v. 6, n. 2, p. 115-131, 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. **Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview.** Scientific World Journal, v. 2013, p. 162750, 2013.

KUSHWAHA, P. P.; SINGH, P.; KUMAR, S. **Methylated Flavonoids as a Novel Inhibitor of Metastasis in the Cancer Cell.** Apple Academic Press, 2018. cap. 16.

LAH, L. *et al.* **The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification.** Molecular Microbiology, v. 81, n. 5, p. 1374-1389, 2011.

LAI, A. A. *et al.* **Kinetics of biotransformation of clonazepam to its 7-amino metabolite in the monkey.** Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, v. 7, n. 1, p. 87-95, 1979.

LAMB, D. C.; WATERMAN, M. R. **Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science, v. 368, n. 1612, 2013.

LAMB, S. B. *et al.* **Cytochrome P450 immobilisation as a route to bioremediation/biocatalysis.** FEBS Letters, v. 431, n. 3, p. 343-346, 1998.

LEE, H. *et al.* **Identification and formation pattern of metabolites of cyazofamid by soil fungus *Cunninghamella elegans*.** Applied Biological Chemistry, v. 59, n. 1, p. 9-14, 2016.

LI, C. *et al.* **Identification of methylated flavonoid regioisomeric metabolites using enzymatic semisynthesis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Metabolomics, v. 9, p. 92-101, 2013.

LI, G.; LOU, H. X. **Strategies to diversify natural products for drug discovery.** Medicinal Research Reviews, v. 38, n. 4, p. 1255-1294, 2018.

LI, H. W. *et al.* **Anticancer effects of morin-7-sulphate sodium, a flavonoid derivative, in mouse melanoma cells.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 84, p. 909-916, 2016.

LI, K. *et al.* **Enzymatic Synthesis of Bufadienolide O-Glycosides as Potent Antitumor Agents Using a Microbial Glycosyltransferase.** *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 359, n. 21, p. 3765-3772, 2017.

LI, X. Z.; HAUER, B.; ROSCHE, B. **Single-species microbial biofilm screening for industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, n. 6, p. 1255-1262, 2007.

LI, Z. H. *et al.* **Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS.** *Journal of Chromatography Science*, v. 54, n. 5, p. 805-10, 2016.

LIANG, W.-F. *et al.* **Microbial glycosylation of tanshinone IIA by *Cunninghamella elegans* AS 3.2028.** *RSC Advances*, v. 5, p. 63753-63756, 2015.

LIN, J. H.; LU, A. Y. **Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications.** *Clinical Pharmacokinetics*, v. 35, n. 5, p. 361-90, 1998.

LIU, X.; JIA, L. **The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and *in vivo* studies.** *Current Drug Metabolism*, v. 8, n. 8, p. 815-821, 2007.

LÓPEZ-LÁZARO, M. **Flavonoids as Anticancer Agents: Structure-Activity Relationship Study.** *Current Medicinal Chemistry - Anti-cancer Agents*, v. 2, p. 691-714, 2002.

MA, C. *et al.* **Identification of regioisomers of methylated kaempferol and quercetin by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight (UHPLC-QTOF) tandem mass spectrometry combined with diagnostic fragmentation pattern analysis.** *Analytica Chimica Acta*, v. 795, p. 15-24, 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.

MA, S.-H.; ZHANG, L.-L.; JIANG, Q.-Q. **Protective effect of bioflavonoid morin on Cadmium induced oxidative neuropathy.** *Biomedical Research*, v. 28, p. 1148-1154, 2017.

MACKENZIE, P. I.; SOMOGYI, A. A.; MINERS, J. O. **Advances in drug metabolism and pharmacogenetics research in Australia.** *Pharmacological Research*, v. 116, p. 7-19, 2017.

MALANDAIN, C.; FAYOLLE-GUICHARD, F.; VOGEL, T. M. **Cytochromes P450-mediated degradation of fuel oxygenates by environmental isolates.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 72, n. 2, p. 289-296, 2010.

MANCHESTER, K. R. *et al.* **The emergence of new psychoactive substance (NPS) benzodiazepines: A review.** *Drug Testing and Analysis*, v. 10, n. 2, p. 392-393, 2018.

MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; RAGGI, M. **A. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective.** *Current Drug Metabolism*, v. 9, n. 8, p. 827-844, 2008.

MARETTOVA, E.; MARETTA, M.; LEGÁTH, J. **Effect of pyrethroids on female genital system. Review.** *Animal Reproduction Science*, v. 184, p. 132–138, 2017.

MARTÍNEZ, M. A. *et al.* **Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin induces hepatic cytochrome P450 enzymes, oxidative stress and apoptosis in rats.** *Science of the Total Environment*, v. 631-632, p. 1371-1382, 2018.

MARY, S. J.; MERINA, A. J. **Antibacterial activity of kaempferol-3-O-Glucoside.** *International Journal of Scientific Research*, v. 3, p. 46-47, 2014.

MARĆ, M. A. *et al.* **In Vitro Biotransformation, Safety, and Chemopreventive Action of Novel 8-Methoxy-Purine-2,6-Dione Derivatives.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 184, n. 1, p. 124-139, 2018.

MATEO, C. *et al.* **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MCNAB, H. *et al.* **Negative ion ESI–MS analysis of natural yellow dye flavonoids — An isotopic labelling study.** *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 284, p. 57–65, 2009.

MELANSON, S. E. F. *et al.* **7-Aminoclonazepam is superior to clonazepam for detection of clonazepam use in oral fluid by LC–MS/MS.** *Clinica Chimica Acta*, v. 455, p. 128–133, 2016.

MEMON, A. F. *et al.* **Quantitative separation of hesperidin, chrysin, epicatechin, epigallocatechin gallate, and morin using ionic liquid as a buffer additive in capillary electrophoresis.** *Electrophoresis*, v. 39, n. 13, p. 1606-1612, 2018.

MERINO, G. *et al.* **Effect of clotrimazole on microsomal metabolism and pharmacokinetics of albendazole.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 55, n. 6, p. 757-64, 2003.

MICHAELS, S.; WANG, M. Z. **The revised human liver cytochrome P450 "Pie": absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics.** *Drug Metabolism & Disposition*, v. 42, n. 8, p. 1241-1251, 2014.

MIKUŠOVÁ, N. *et al.* **The effect of composition of a polymeric coating on the biofilm formation of bacteria and filamentous fungi.** *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2018.

MIQUEL GUENNOG, C. *et al.* **A New Method for Qualitative Multi-scale Analysis of Bacterial Biofilms on Filamentous Fungal Colonies Using Confocal and Electron Microscopy.** *Journal of Visualized Experiments*, n. 119, 2017.

MIRON, A. *et al.* **Flavonoids as modulators of metabolic enzymes and drug transporters.** *Annals of the New York Academy Sciences*, v. 1398, n. 1, p. 152-167, 2017.

MITRA, S. *et al.* **Enhanced biotransformation of fluoranthene by intertidally derived *Cunninghamella elegans* under biofilm-based and niche-mimicking conditions.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 24, p. 7922-7930, 2013.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S.; KUZUYAMA, T. **Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, n. 3, p. 320–321, 2010.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. **Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*.** *Drug Metabolism & Disposition*, v. 27, n. 10, p. 1157-64, 1999.

MOODY, J. D. *et al.* **Metabolism of the ethanolamine-type antihistamine diphenhydramine (Benadryl) by the fungus *Cunninghamella elegans*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 3, p. 310-315, 2000.

MORENO-GARCÍA, J. *et al.* **Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives.** *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

MORLEY, K. L.; FERGUSON, P. J.; KOROPATNICK, J. **Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells.** *Cancer Letters*, v. 251, p. 168–178, 2007.

MORTELÉ, O. *et al.* ***In vitro* Phase I and Phase II metabolism of the new designer benzodiazepine cloniprazepam using liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 153, p. 158-167, 2018.

MUNAKATA, M.; TSUCHIYA, S. **Residual effect of a 7-amino metabolite of clonazepam on GABAA receptor function in the nucleus reticularis thalami of the rat.** *Epilepsia*, v. 49, n. 10, p. 1803–1808, 2008.

MUNCK, C. *et al.* **Biofilm formation of filamentous fungi *Coriopsis sp.* on simple muslin cloth to enhance removal of triphenylmethane dyes.** *Journal of Environmental Manage*, v. 214, p. 261-266, 2018.

MURAKAMI, A. *et al.* **Characteristic rat tissue accumulation of nobiletin, a chemopreventive polymethoxyflavonoid, in comparison with luteolin.** *Biofactors*, v. 16, n. 3-4, p. 73-82, 2002.

MURPHY, C. D. **Biodegradation and biotransformation of organofluorine compounds.** *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 3, p. 351-359, 2010.

MURPHY, C. D. **Drug metabolism in microorganisms.** *Biotechnology Letters*, v. 31, n. 1, p. 19-28, 2015.

MURPHY, C. D. **Microbial degradation of fluorinated drugs: biochemical pathways, impacts on the environment and potential applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 6, p. 2617-2627, 2016.

MURPHY, C. D. *et al.* **Microbial metabolism of fluorinated drugs. In: SCIENCE, P. I. F. (Ed.). Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals**, 2019. cap. 7, p.281-299. (Progress in Fluorine Science Series).

MUSONI, M. *et al.* **Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems.** *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, v. 19, n. 4, 2015.

NARDI, A. E.; PERNA, G. **Clonazepam in the treatment of psychiatric disorders: an update.** *International Clinical Psychopharmacology*, v. 21, n. 3, p. 131-142, 2006.

NASCIMENTO, J. S. D.; CONCEIÇÃO, J. C. S.; SILVA, E. D. O. **Biotransformation of Coumarins by Filamentous Fungi: An Alternative Way for Achievement of Bioactive Analogs.** *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 16, p. 1-10, 2019.

NASUNO, R. *et al.* **Structural and functional analysis of the yeast N-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance via proline metabolism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 29, p. 11821-11826, 2013.

NDUKA, S. O. *et al.* **In vitro and in vivo cytochrome P450 3A enzyme inhibition by *Aframomum melegueta* and *Denniettia tripetala* extracts.** *Asian Pacific Journal of Tropic Medicine*, v. 10, n. 6, p. 576-581, 2017.

NEVALAINEN, H.; PETERSON, R.; CURACH, N. **Overview of Gene Expression Using Filamentous Fungi.** *Current Protocols in Protein Science*, v. 92, n. 1, 2018.

NICHOLLS, A. W. *et al.* **Identification of phenacetin metabolites in human urine after administration of phenacetin-C2H3: measurement of futile**

**metabolic deacetylation via HPLC/MS-SPE-NMR and HPLC-ToF MS.** *Xenobiotica*, v. 36, n. 7, p. 615-629, 2006.

NICKAVAR, B.; VAHIDI, H.; ESLAMI, M. **An efficient biotransformation of progesterone into 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone by *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*.** *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2018.

NIESSEN, W. M. A.; CORREA, R. A. **Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides**, 2017.

NIMS, R. W. *et al.* ***In vivo* induction and *in vitro* inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by the benzodiazepine anticonvulsants clonazepam and diazepam.** *Drug Metabolism & Disposition*, v. 25, n. 6, p. 750-756, 1997.

NODA, S.; KONDO, A. **Recent Advances in Microbial Production of Aromatic Chemicals and Derivatives.** *Trends in Biotechnology*, v. 35, n. 8, p. 785-796, 2017.

OBACH, R. S. **Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes.** *Drug Metabolism & Disposition*, v. 27, n. 11, p. 1350-1359, 1999.

OMURA, T.; SATO, R. **A new cytochrome in liver microsomes.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 237, p. 1375-1376, 1962.

ONG, C. E. *et al.* **The xenobiotic inhibitor profile of cytochrome P4502C8.** *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 50, n. 6, p. 573-580, 2000.

ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. **Cytochrome P450 -Structure, Mechanism, and Biochemistry.** 4. Springer International Publishing, 2015.

ÖZÇINAR, Ö. *et al.* **Biotransformation of ruscogenins by *Cunninghamella blakesleeana* NRRL 1369 and neoruscogenin by endophytic fungus *Neosartorya hiratsukae*.** *Phytochemistry*, v. 152, p. 1-9, 2018.

PALCIC, M. M. **Glycosyltransferases as biocatalysts.** *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, n. 2, p. 226-233, 2011.

PALMER-BROWN, W. *et al.* **Biotransformation of fluorophenyl pyridine carboxylic acids by the model fungus *Cunninghamella elegans*.** *Xenobiotica*, v. 47, n. 9, p. 763-770, 2017.

PALMER-BROWN, W.; DE MELO SOUZA, P. L.; MURPHY, C. D. **Cyhalothrin biodegradation in *Cunninghamella elegans*.** *Environmental Science and Pollutant Research International*, 2018.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. **Flavonoids: an overview**. Journal of Nutritional Science, v. 5, 2016.

PANDEY, R. P. *et al.* **Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology**. Biotechnology Advances, v. 34, n. 5, p. 634-662, 2016.

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

PARAJULI, P. *et al.* **Substrate Scope of O-Methyltransferase from *Streptomyces peucetius* for Biosynthesis of Diverse Natural Products Methoxides**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 184, n. 4, 2018.

PATEL, R. N. **Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries**. 2006.

PATIL, T. *et al.* **Fungi: an ideal biotransformation model for mimicking mammalian drug metabolism**. International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences, v. 4, n. 3, p. 15-24, 2014.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to Spectroscopy**. 4<sup>a</sup> editon. Bellingham: Brooks/Cole Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, W. L. *et al.* **Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea L.*) contra a linhagem de célula H460**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 17, n. 1, p. 798-806, 2015.

PERVAIZ, I. *et al.* **Microbial biotransformation: a tool for drug designing (Review)**. Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya, v. 49, n. 5, p. 435-449, 2013

PETERSON, D. H. *et al.* **Microbiological Transformations of Steroids. 1 I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone**. Journal of the American Chemical Society, v. 74, n. 23, p. 5933–5936, 1952.

PISKA, K. *et al.* ***Cunninghamella* Biotransformation - Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process**. v. 17, n. 2, p. 107-117, 2016.

PLAZA, M. *et al.* **Substituent effects on *in vitro* antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 62, n. 15, p. 3321-3333, 2014.

POTHULURI, J. V. *et al.* **Biotransformation of vinclozolin by the fungus *Cunninghamella elegans***. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 12, p. 6138-6148, 2000.

PRASAD, R. **Mycoremediation and Environmental Sustainability.** Springer International Publishing, 2018.

PREETI, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. **Microbial production of ketoreductases: Development of a novel high-throughput screening method.** Bioresource Technology, v. 242, p. 319-323, 2017.

QIN, Y. *et al.* **Characterization of flavonol mono-, di-, tri- and tetra-O-glycosides by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and its application for identification of flavonol glycosides in *Viola tianschanica*.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 142, p. 113-124, 2017.

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.

REDDY, C. S.; ACOSTA, D.; DAVIS, P. J. **Microbial models of mammalian metabolism: biotransformations of phenacetin and its O-alkyl homologues with *Cunninghamella* species.** Xenobiotica, v. 20, n. 12, p. 1281-1297, 1990. I

REDDY, V. P. **Organofluorine Compounds in Biology and Medicine.** Elsevier, 2015.

RISER-ROBERTS, E. **Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites.** 1st Edition. CRC Press, 1992.

RUIZ-CRUZ, S. *et al.* **Flavonoids: important biocompounds in food. In: (Ed.). Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health: InTech, 2017. cap. 16,**

RUSSO, M. E. *et al.* **Adsorption of acid dyes on fungal biomass: Equilibrium and kinetics characterization.** Chemical Engineering Journal, v. 162, p. 537-545, 2010.

RUST, K. Y. *et al.* **Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 "z-drugs" in human hair by LC-MS/MS.** Forensic Science International, v. 215, p. 64-72, 2012.

RUYONG, Z.; GUIQING, C. **A monograph of *Cunninghamella*.** Mycotaxon, v. 80, p. 1-75, 2001.

RYDEVIK, A. **Drug Metabolites Formed by *Cunninghamella* Fungi.** 2014. Faculty of Pharmacy, Uppsala University, Uppsala.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. **Progress in Microbial Carotenoids Production.** Indian Journal of Microbiology, v. 57, n. 1, p. 129-130, 2017.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. **Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS(n) and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR.** *Molecules*, v. 18, n. 7, p. 8402-8416, 2013.

SANTOS, J. L.; CHIN, C. M. **Anemia Falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos.** *Química Nova*, v. 35, n. 4, p. 783-790, 2012.

SCHAERLI, Y. **Bacterial Microcolonies in Gel Beads for High-throughput Screening.** *Bio-Protocol*, v. 8, n. 13, 2018.

SEREE, E. J. *et al.* **Identification of the human and animal hepatic cytochromes P450 involved in clonazepam metabolism.** *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 69-75, 1993.

SERRANO-FUJARTE, I. *et al.* **Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress.** *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

SEVIOR, D. K.; PELKONEN, O.; AHOKAS, J. T. **Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 44, n. 2, p. 257-261, 2012.

SHARMA, C.; CHOWDHARY, A. **Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 50, n. 5, p. 607-616, 2017.

SHAUGHNESSY, M. J. *et al.* **Targeted fluorination of a nonsteroidal anti-inflammatory drug to prolong metabolic half-life.** *ChemMedChem*, v. 9, n. 4, p. 733-736, 2014.

SHIN, H. S. **Metabolism of selegiline in humans. Identification, excretion, and stereochemistry of urine metabolites.** *Drug Metabolism & Disposition*, v. 25, n. 6, p. 657-662, 1997.

SHIOSAKI, R. K. *et al.* **Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*.** *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 18, n. 3, p. 123-127, 2001.

SILVA, D. B.; LOPES, N. P. **MALDI-MS of flavonoids: a systematic investigation of ionization and in-source dissociation mechanisms.** *Journal of Mass Spectrometry*, v. 50, n. 1, p. 182-190, 2015.

SILVA, F. C. D. **Desenvolvimento de modelos de QSAR para identificação de substratos e inibidores de CYP3A4.** 2015. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia – GO.

SIMIRGIOTIS, M. J. *et al.* **Phenolic Compounds in Chilean Mistletoe (*Quintral, Tristerix tetrandus*) Analyzed by UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS and Its Antioxidant Properties.** *Molecules*, v. 21, n. 3, 2016.

SLÁMOVÁ, K.; KAPEŠOVÁ, J.; VALENTOVÁ, K. **"Sweet Flavonoids": Glycosidase-Catalyzed Modifications.** *International Journal of Molecular Science*, v. 19, n. 7, 2018.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. **Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 161, n. 2, p. 551-558, 1974.

SOBEH, M. *et al.* **Identification of phenolic secondary metabolites from.** *PeerJ*, v. 4, 2016.

SORDON, S.; POPŁOŃSKI, J.; HUSZCZA, E. **Microbial Glycosylation of Flavonoids.** *Polish Journal of Microbiology*, v. 65, n. 2, 2016.

SORDON, S. *et al.* **Regioselective O-glycosylation of flavonoids by fungi *Beauveria bassiana*, *Absidia coerulea* and *Absidia glauca*.** *Bioorganic Chemistry*, 2019.

SOUZA, C. C. P. D. **IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOÍDES POR LC-MS/MS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Caesalpinia ferrea* Mart. E AVALIAÇÃO DA REVERSÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS.** 2017. (Mestrado). Instituto de Ciências Naturais Humanas e Sociais, Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop - MT.

SOUZA, P. L. D. M. **N-GLICOSILAÇÃO DE 5-(1-(3-FLUOROFENIL)-1H-PIRAZOL-4-IL)-1H-TETRAZOL CATALISADA POR CÉLULAS FÚNGICAS LIVRES E IMOBILIZADAS DE *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.** 2015. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO.

SPENNATI, F. *et al.* **Removal of Quebracho and Tara tannins in fungal bioreactors: Performance and biofilm stability analysis.** *Journal of Environmental Manage*, v. 231, p. 137-145, 2018.

SPONCHIADO, R. *et al.* **Microbial transformation of ambrisentan to its glycosides by *Cunninghamella elegans*.** *Biomedical Chromatography*, 2019.

STEVENS, J. F. *et al.* **A novel 2-hydroxyflavanone from *collinsonia canadensis*.** *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 2, p. 392-394, 1999.

STORHAUG, L. W. *et al.* **Prolonged excretion of 7-aminoclonazepam in urine after repeated ingestion of clonazepam: a case report.** *Forensic Science International*, v. 222, n. 1-3, 2012.

SUN, J. *et al.* **Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries.** *Molecules*, v. 12, n. 3, p. 679-693, 2007.

SUN, X.-H. *et al.* **Fungal biotransformation of mosapride by *Cunninghamella elegans*.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, n. 1-3, p. 82-89 2009.

SUTHERLAND, J. B. *et al.* **N-oxidation of quinoline and isoquinoline by *Cunninghamella elegans*.** *Experimental Microbiology*, v. 18, p. 271-274, 1994.

TAN, C. Y. *et al.* **Immobilization of a Bacterial Cytochrome P450 Monooxygenase System on a Solid Support.** *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 55, n. 48, p. 15002-15006, 2016.

TANG, W. *et al.* **Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview.** *Chemosphere*, v. 191, p. 990-1007, 2018.

TELES, Y. C. F.; SOUZA, M. S. R.; SOUZA, M. F. V. **Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities.** *Molecules*, v. 23, n. 2, 2018.

TESTA, B.; JENNER, P. **Inhibitors of Cytochrome P-450s and Their Mechanism of Action.** *Drug Metabolism Reviews*, v. 12, n. 1, p. 1-117, 1981.

THUAN, N. H. *et al.* **Microbial production of astilbin, a bioactive rhamnosylated flavanonol, from taxifolin.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 2, 2017.

THUMMEL, K. E.; WILKINSON, G. R. **In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A.** *Annual Review of Pharmacology Toxicology*, v. 38, p. 389-430, 1998.

TÓTH, K. *et al.* **Optimization of Clonazepam Therapy Adjusted to Patient's CYP3A Status and NAT2 Genotype.** *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 19, n. 12, 2016.

UNDERHILL, G. H.; KHETANI, S. R. **Advances in Engineered Human Liver Platforms for Drug Metabolism Studies.** *Drug Metabolism & Disposition*, v. 46, n. 11, p. 1626-1637, 2018.

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

VELÍK, J. *et al.* **Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes.** *Research in Veterinary Science*, v. 76, p. 95-108, 2004.

VENTURINI, F. P. **Efeitos da exposição à lambda-cialotrina no teleósteo *Brycon amazonicus*: metabolismo antioxidante, parâmetros histológicos e**

**hematológicos.** 2014. (Doutorado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP.

VILLENA, G. K. *et al.* **Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 6, p. 1920-1026, 2010.

VISKUPIČOVÁ, J.; ONDREJOVIČ, M.; ŠTURDÍK, E. **Bioavailability and metabolism of flavonoids.** *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 47, n. 48, p. 151-162, 2008.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N. **Gas Chromatography: Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods.** *Polyphenols in Plants*, 2019. cap. 17.

VON MOLTKE, L. L. *et al.* **Escitalopram (*S*-citalopram) and its metabolites in vitro: cytochromes mediation biotransformation, inhibitory effects and comparison to *R*-citalopram.** *Drug Metabolism Disposition*, v. 29, n. 8, p. 1102-1109, 2001.

WALLE, T. **Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects.** *Internation Journal of Molecular Science*, v. 10, n. 11, p. 5002-5019, 2009.

WALLE, T. *et al.* **Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids--methylated versus unmethylated flavones.** *Biochemical Pharmacology*, v. 73, n. 9, p. 1288-1296, 2007.

WANG, J. *et al.* **Recent advances in microbial production of aromatic natural products and their derivatives.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 1, p. 47-61, 2018.

WANG, L. *et al.* **Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations.** *Biotechnology Advances*, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

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

WEIJERS, C. A.; FRANSSSEN, M. C.; VISSER, G. M. **Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides.** *Biotechnol Advances*, v. 26, n. 5, p. 436-546, 2008

WEN, L. *et al.* **Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1398, n. 1, p. 120-129, 2017.

WEN, X.; WALLE, T. **Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability.** *Drug Metabolism and Disposition*, v. 34, n. 10, p. 1786-1792, 2006.

WINN, M. *et al.* **Biofilms and their engineered counterparts: A new generation of immobilised biocatalysts.** *Catalysis Science & Technology*, v. 2, 2012.

WISE, D. **Bioremediation of Contaminated Soils.** American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1999.

WOLFF, K. W., JASON KARCH, STEVEN. **The SAGE Handbook of Drug & Alcohol Studies - Biological Approaches** SAGE Publications Ltd, 2016.

WOODLEY, J. M. **New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener.** *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 321-327, 2008.

WOODLEY, J. M. **Integrating protein engineering with process design for biocatalysis.** *Philosophical Transactions of The Royal Society A Mathematical Physical and Engineering Sciences*, v. 13, n. 376, 2018.

WRÓBLEWSKI, T.; USHAKOU, D. V. **Photophysical properties of 7-hydroxyflavanone: Quantum chemical calculations and experimental studies.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 215, p. 81-87, 2019.

XIAO, Y.; LEE, I. S. **Microbial transformation of naringenin derivatives.** *Archives of Pharmacal Research*, v. 40, n. 6, p. 720-726, 2017.

XIN, X. *et al.* **Biotransformation of major flavonoid glycosides in herb epimedii by the fungus *Cunninghamella blakesleana*.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 122, p. 141-146, 2015.

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.

XU, L. *et al.* Recent progress in the enzymatic glycosylation of phenolic compounds. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 35, n. 1, 2016.

YAN, G. *et al.* **Recent Advances in Transition Metal-Catalyzed Methylation Reactions.** *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 357, n. 7, p. 1333-1350, 2015.

YAN, M. *et al.* **Separation and analysis of flavonoid chemical constituents in flowers of *Juglans regia* L. by ultra-high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 164, p. 734-741, 2019.

YANG, S. *et al.* **Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review.** *Bioresource Technology*, v. 141, p. 97-108, 2013.

YANG, X. *et al.* **Biotransformation of isoimperatorin by *Cunninghamella blakesleana* AS 3.970.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 88, p. 1-6, 2013.

ZAFAR, S.; AHMED, R.; KHAN, R. **Biotransformation: A Green and Efficient Way of Antioxidant Synthesis.** *Free Radical Research*, v. 50, n. 9, p. 939-948, 2016.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. **Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation.** *Pharmacology Therapy*, v. 138, n. 1, p. 103-141, 2013.

ZARNOWSKI, R. *et al.* **Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia.** *American Society for Microbiology*, v. 5, n. 4, 2014.

ZAWADZKA, K. *et al.* **Microbial detoxification of carvedilol, a  $\beta$ -adrenergic antagonist, by the filamentous fungus *Cunninghamella echinulata*.** *Chemosphere*, v. 183, p. 18-26, 2017.

ZHANG, D. *et al.* **Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, n. 2-3, p. 221-226, 1996.

ZHANG, M.; SUN, J.; CHEN, P. **Development of a Comprehensive Flavonoid Analysis Computational Tool for Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-High Resolution Accurate Mass-Mass Spectrometry Data.** *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 14, p. 7388-7397, 2017.

ZHANG, P. *et al.* **N-acetyltransferases from three different organisms displaying distinct selectivity toward hexosamines and N-terminal amine of peptides.** *Carbohydrate Research*, v. 472, p. 72-75, 2019.

ZHANG, W. *et al.* **Inhibition of Cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives.** *Drug Metabolism and Disposition*, v. 30, n. 3, p. 314-318, 2002.

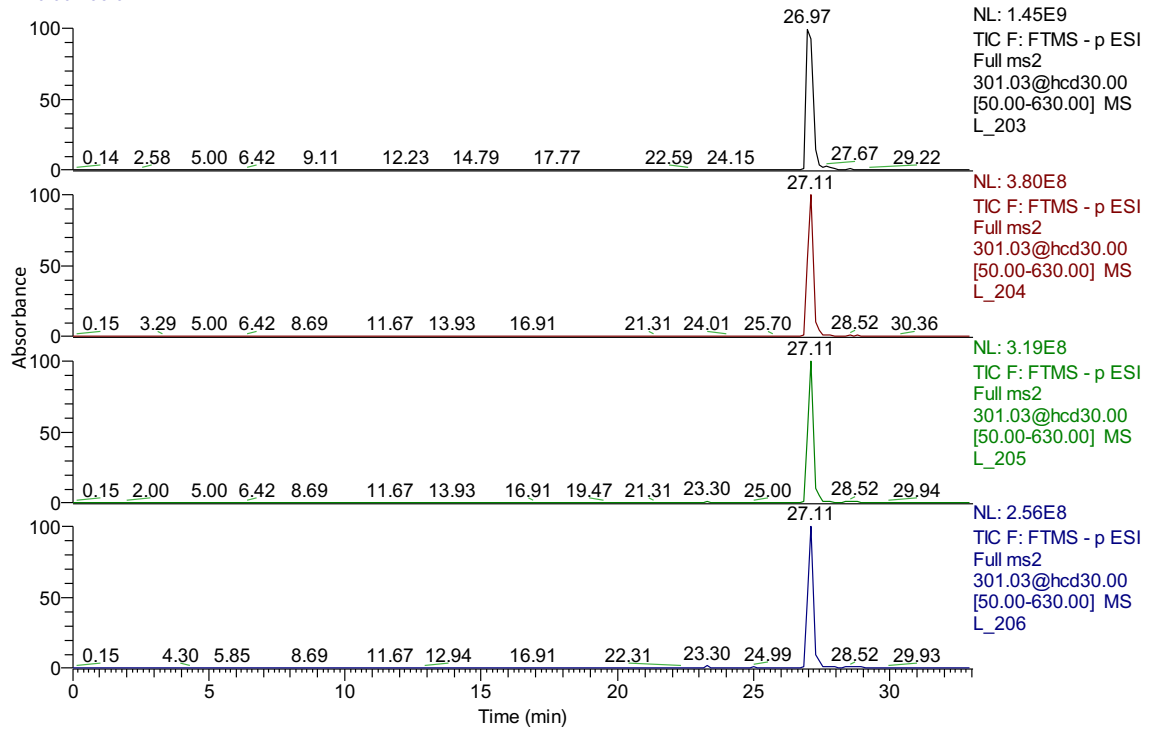
ZHU, Y. Z. *et al.* **Metabolism of an Insecticide Fenitrothion by *Cunninghamella elegans* ATCC36112.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 49, p. 10711-10718, 2017.

ZI, J. *et al.* **Metabolism of quercetin by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 112, n. 4, p. 360-362, 2011.

## ANEXOS

Anexo A - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  301,03 481

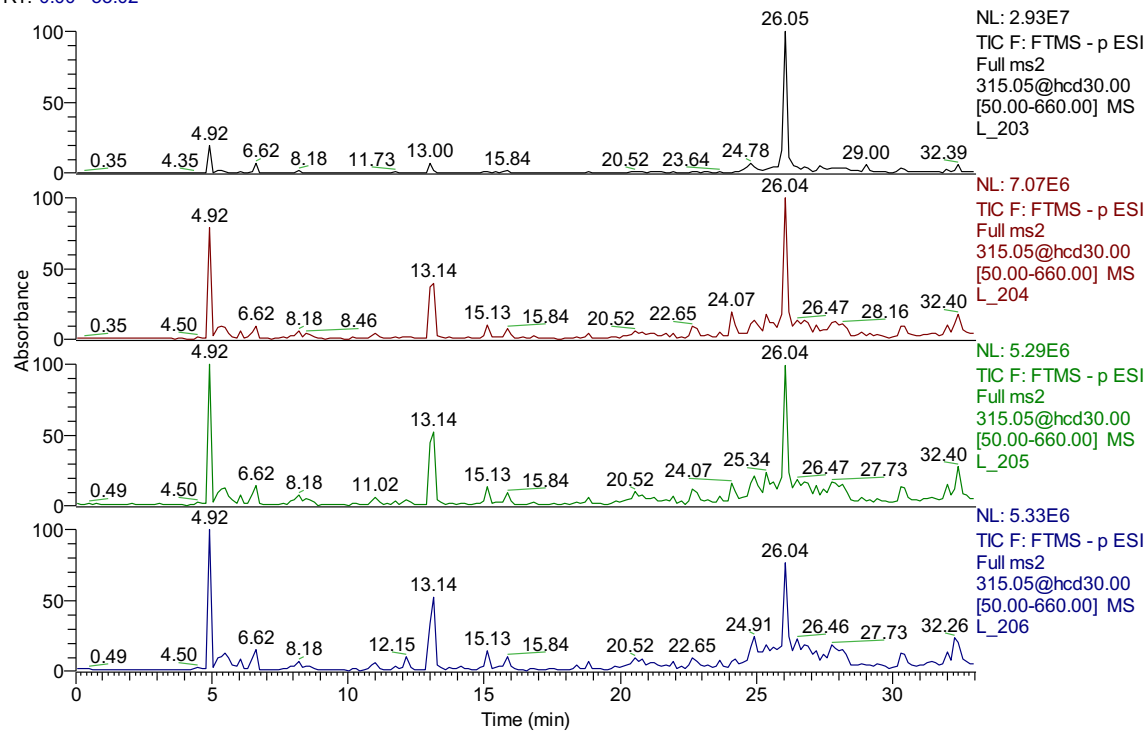
RT: 0.00 - 33.02



Fonte: autor

Anexo B - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  315,05048

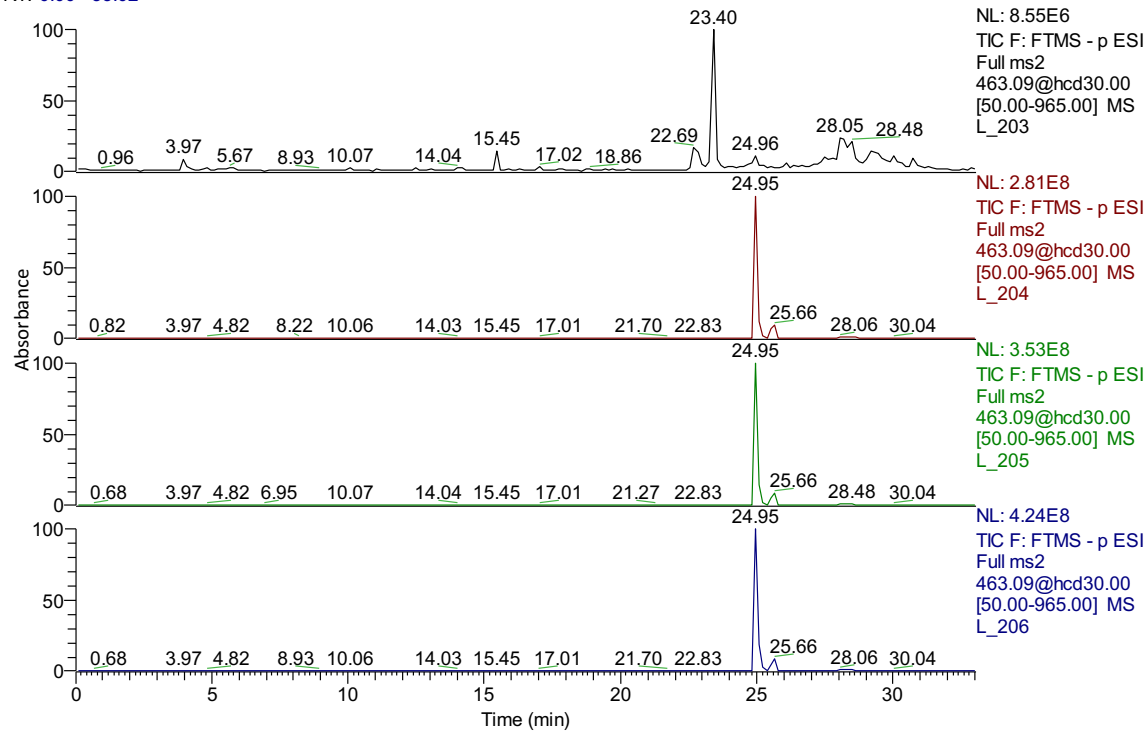
RT: 0.00 - 33.02



Fonte: autor

Anexo C - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  463,08766

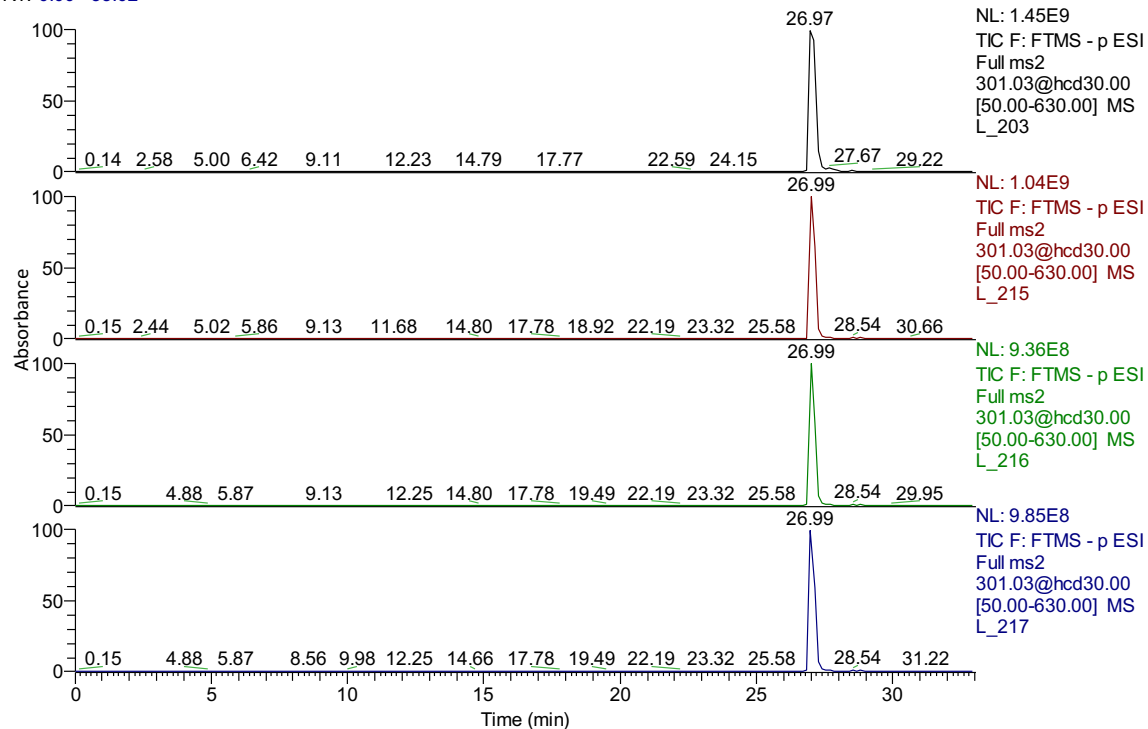
RT: 0.00 - 33.02



Fonte: autor

Anexo D - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  301,03 481

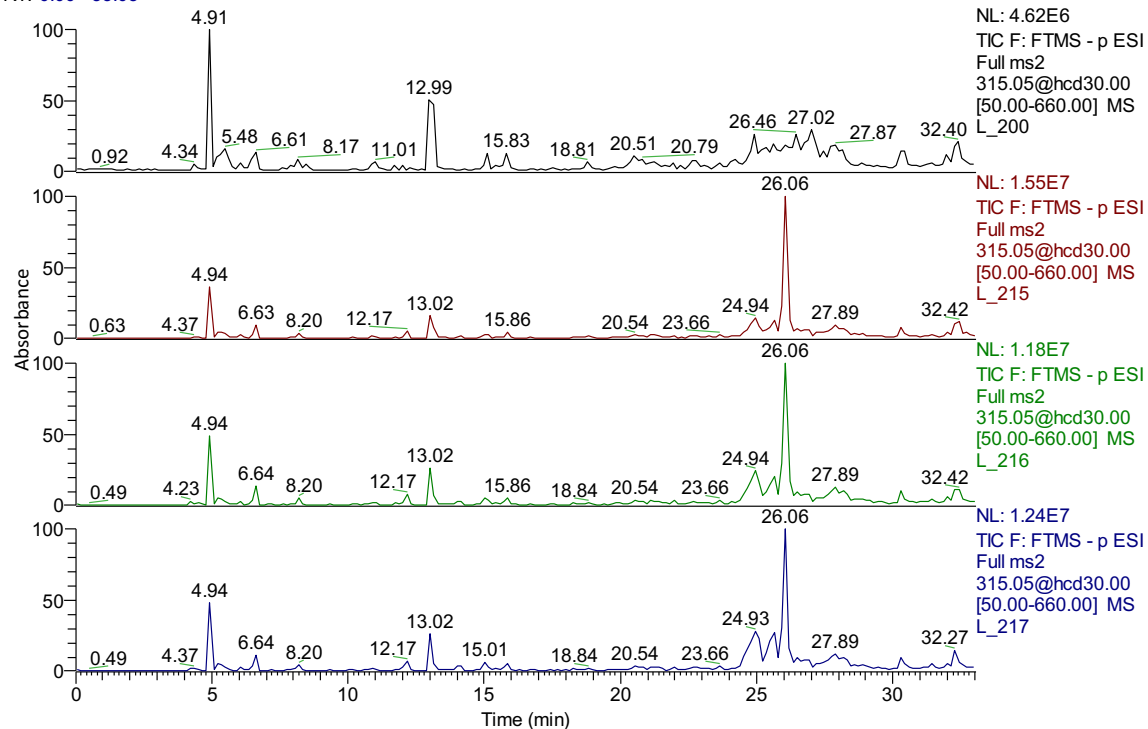
RT: 0.00 - 33.02



Fonte: autor

Anexo E - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  315,05048

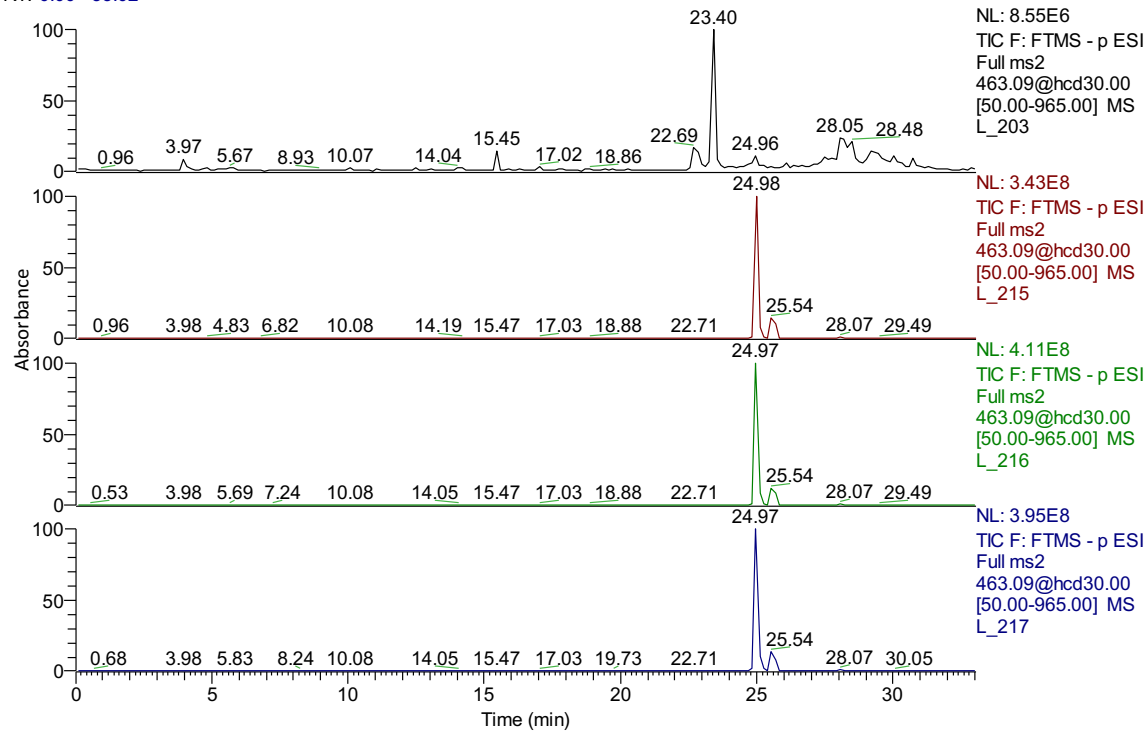
RT: 0.00 - 33.03



Fonte: autor

Anexo F - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  463,08766

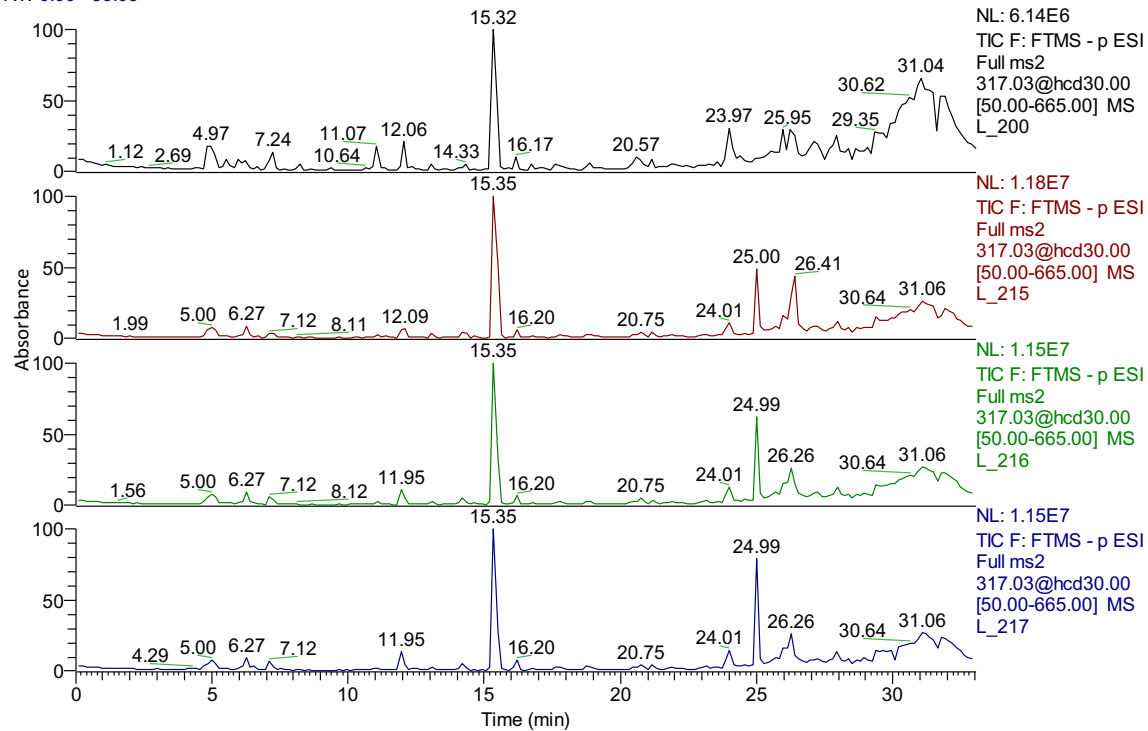
RT: 0.00 - 33.02



Fonte: autor

Anexo G - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação da biotransformação de morina com biofilme de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  317,02975

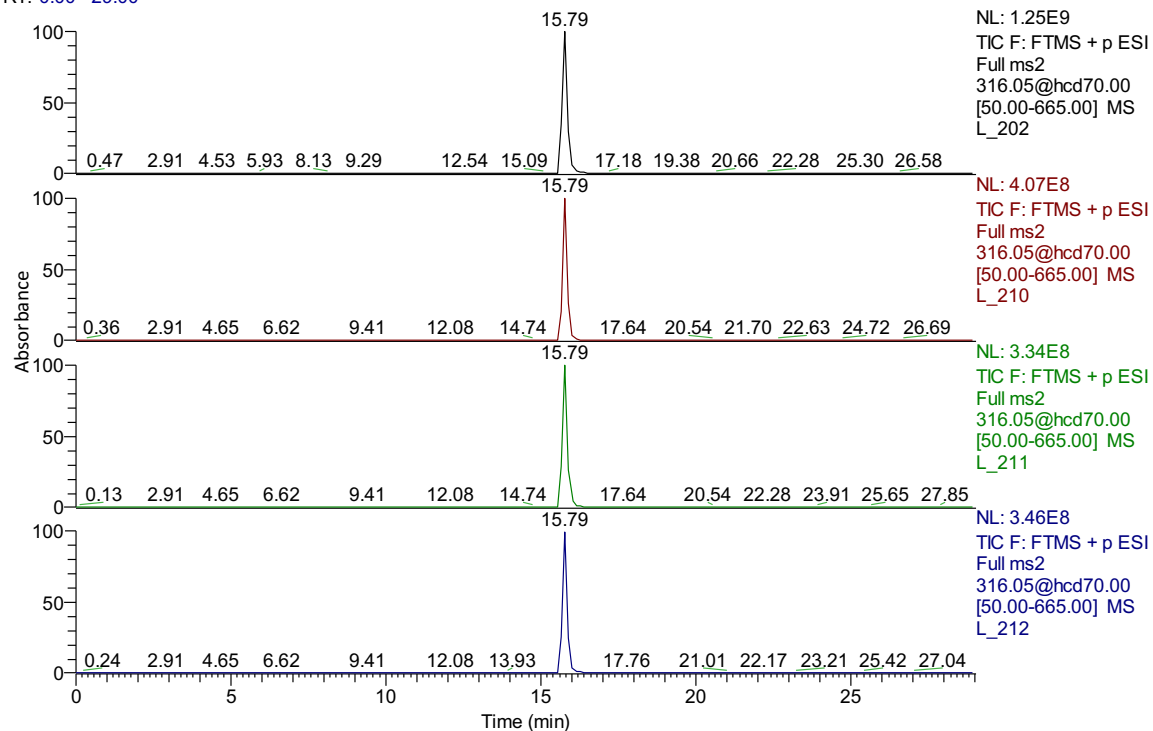
RT: 0.00 - 33.03



Fonte: autor

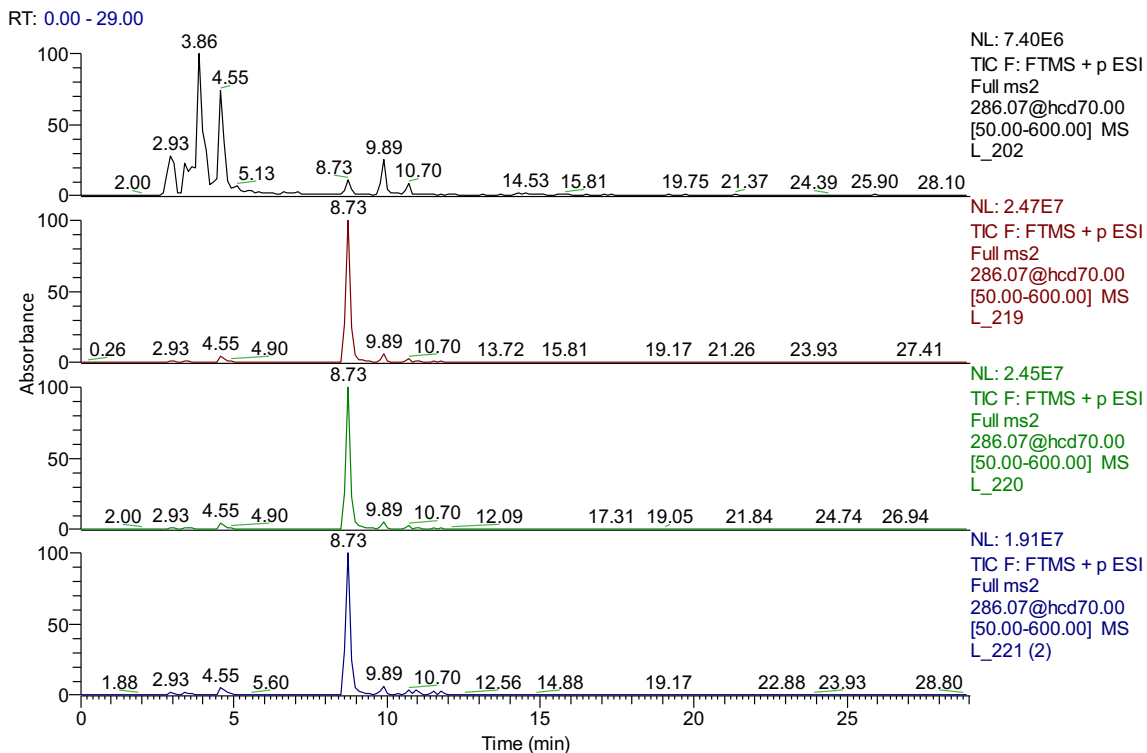
Anexo H - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M - H^+]^-$  316,04891

RT: 0.00 - 29.00



Fonte: autor

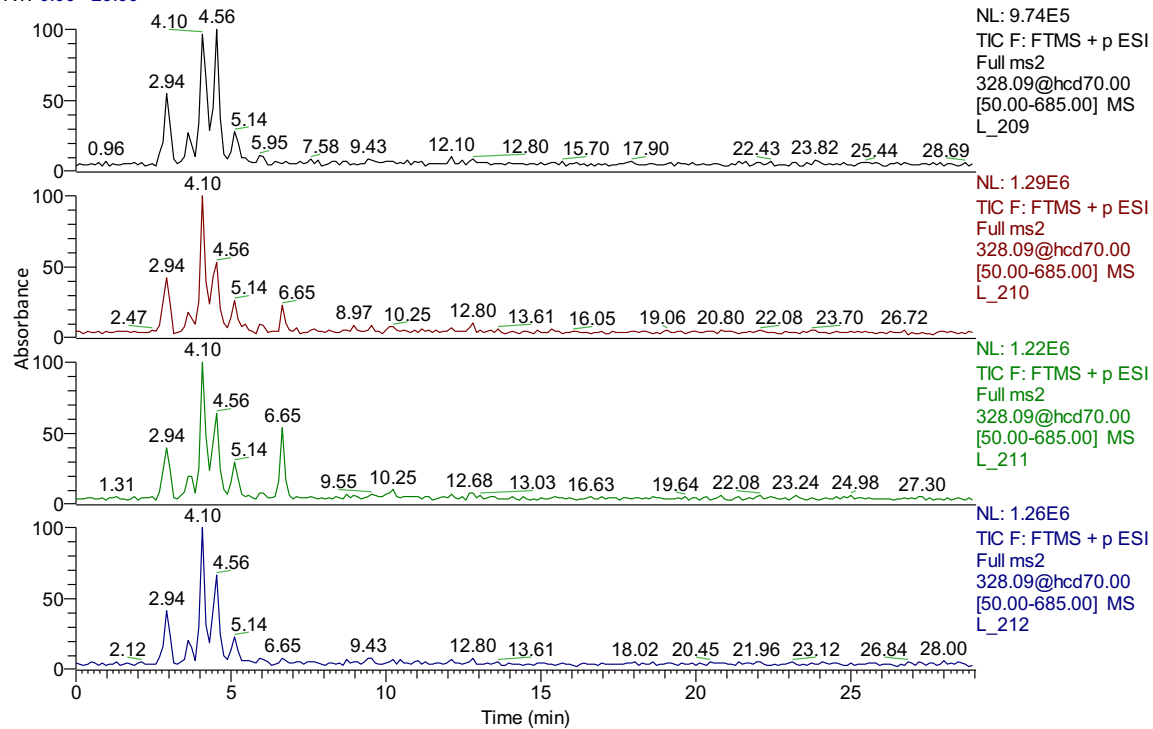
Anexo I - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M + H]^+$  286,07471



Fonte: autor

Anexo J - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam com células livres de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M + H]^+$  328,08528

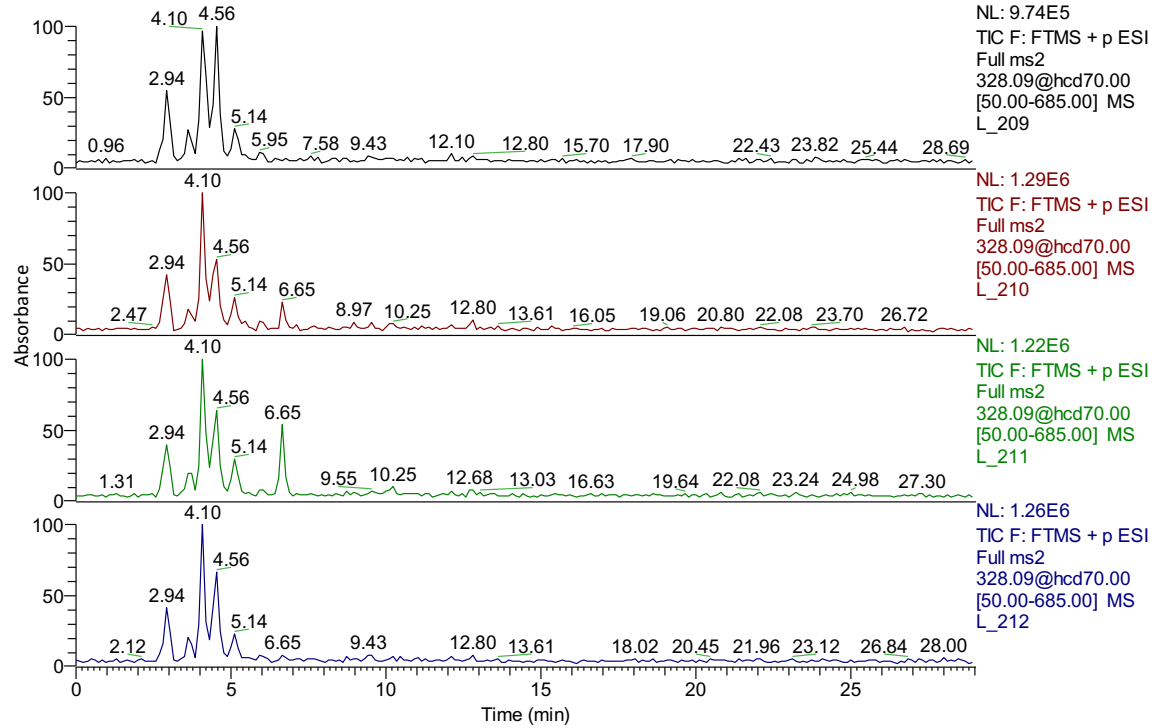
RT: 0.00 - 29.00



Fonte: autor

Anexo K - Cromatogramas dos tempos 0, 24, 48 e 72 horas das amostras dos sobrenadantes de incubação do metabolismo de clonazepam catalisado por biofilmes de *C. echinulata* ATCC 9244; íon monitorado  $[M + H]^+$  286,07471

RT: 0.00 - 29.00



Fonte: autor