



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



APLICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA β -GLICOSILAÇÃO DA ENTACAPONA

Keyla Rejane Magno Dias Lustosa
Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira

Goiânia
2011

Keyla Rejane Magno Dias Lustosa

**APLICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA β -GLICOSILAÇÃO DA
ENTACAPONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos


Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira

Goiânia
2011

Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 25 de fevereiro de 2011, pela mestranda Keyla Rejane Magno Dias Lustosa.

Banca Examinadora:



Profª. Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFG)
Presidente



Profª. Dra. Telma Alves Garcia (FF/UFG)



Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)

**Aos meus pais que sempre me apoiaram e
depositaram confiança em todos os momentos de minha vida.**

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Nossa Senhora pela proteção e por guiarem meus passos.

Aos meus pais, Mauro e Célia, por representarem pilares em minha vida, transmitindo sempre muito amor, carinho e força.

As minhas irmãs, Fabrícia e Aline, minhas companheiras e amigas inseparáveis.

Ao meu esposo Júnior pelo apoio e carinho nas horas difíceis.

Aos meus queridos filhos Laura e Arthur, minhas vidas, obrigada de coração pela compreensão e pelo amor que recebi de vocês.

A todos meus familiares que direta ou indiretamente me apoiaram nesta jornada.

A Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira pela orientação, disponibilidade, compreensão e pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti pelos ensinamentos na análise dos espectros de RMN e por todas as sugestões para o engrandecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Morais Lião pela realização das análises de RMN e IV.

Ao Rodolpho de Campos Braga pela realização das análises de CLAE-EM/EM.

A Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Freitas Bara e ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti pela participação da banca de qualificação e por suas valorosas correções e sugestões.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula e a Prof^a. Dr^a Telma Alves Garcia pelo aceite para a participação da banca de defesa.

Aos amigos do LaBioCon pela amizade, companheirismo e pela força nos momentos difíceis.

A minha amiga Patrícia Caixeta de Oliveira pelo incentivo e pelo apoio.

Aos colegas de trabalho do LACEN-GO e da VISA-Goiânia por todo apoio recebido e compreensão para conquista deste trabalho.

A firmeza

**Um encaixamento de madeira adaptado
aos alicerces de um edifício não se desconjunta.
Assim é o coração firmado por uma decisão bem amadurecida.**

Eclesiástico 22:19

RESUMO

O estudo da bioconversão de compostos biologicamente ativos por microrganismos, principalmente fungos filamentosos, e seus possíveis derivados glicosilados têm sido bastante explorado e têm trazido resultados promissores. Os modelos microbianos do metabolismo animal, baseados na similaridade do metabolismo hepático e enzimático microbiano, tornaram-se uma alternativa para a elucidação da rota metabólica tanto de fármacos bem como de candidatos a novos fármacos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi explorar a capacidade dos fungos filamentosos em promover a bioconversão da entacapona e realizar a identificação, purificação e caracterização dos derivados formados. Foram selecionados oito fungos filamentosos *Absidia blakesleeana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Beauveria* sp, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 e *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145, seis deles demonstraram ser eficazes na metabolização da entacapona, sendo a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 a mais promissora. Foram detectados 5 diferentes derivados funcionalizados, dos quais um, o majoritário, foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) e Hidrogênio (RMN ^1H), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM) e Espectroscopia no Infravermelho (IV) como derivado β -glicosilado da entacapona (*E, Z*): 4 hidroxi-5-nitrofenil-3-O-(β)-D-glicopiranosose-(*E*)-2-ciano-N,N-dietil-3-acrilamida.

PALAVRAS-CHAVE: Entacapona, fungos filamentosos, bioconversão, glicosilação, derivados funcionalizados.

ABSTRACT

The study of bioconversion of biologically active compounds by microorganisms, mainly filamentous fungi and their possible glycosylated derivatives have been extensively explored and have brought promising results. Microbial models of animal metabolism, based on the similarity of the hepatic metabolism and microbial enzyme, became an alternative for the elucidation of metabolic routes of both drugs as well as new drug candidates. In this context, the objective of this study was to explore the ability of filamentous fungi to promote the bioconversion of entacapone and perform the identification, purification and characterization of derivatives formed. We selected eight filamentous fungi *Absidia blakesleana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Beauveria* sp, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 and *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145, six of them proved to be effective in the metabolism of entacapone, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 being the most promising. Were detected 5 different functionalized derivatives, one of which the majority was characterized by Nuclear Magnetic Resonance of Carbon (^{13}C NMR) and Hydrogen (^1H NMR), High-Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometer (HPLC-MS/MS) and Infrared Spectroscopy (IR) as a β -glycosylated derivative of entacapone (*E, Z*): 4 hydroxy-5-nitrophenyl-3-*O*-(β)-*D*-glucopyranose-(*E*)-2-cyano-*N, N*-diethyl-3-acrylamide.

KEYWORDS: Entacapone, filamentous fungi, bioconversion, glycosylation, functionalized derivatives.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Bioconversão por <i>Cunninghamella elegans</i> NRRL 1392 do Psiadiarabin (1) e o análogo 6-desmetoxi 5,3'-dihidroxi-7,2', 4',5'-tetrametoxiflavona (2) em dois derivados glicosilados (3 e 4). Fonte: IBRAHIM et al., 1997..... | 18 |
| Figura 2. Metabólitos de fase 2 da Etofesalamida. Fonte: HUANG et al., 2005..... | 19 |
| Figura 3. Hemiacetais: grupo –OH e um grupo –OR ligados ao mesmo átomo de carbono da carbonila do aldeído ou cetona. Acetais: que possuem dois grupos –OR ligados ao mesmo átomo de carbono..... | 20 |
| Figura 4. Forma cíclica da Glicose mostrando o anômero α : –OH trans em relação ao grupo –CH ₂ OH e o anômero β : –OH cis em relação ao grupo –CH ₂ OH..... | 21 |
| Figura 5. Representação esquemática da nova estratégia para liberar dopamina no SNC. Fonte: FERNANDEZ et al., 2000..... | 22 |
| Figura 6. Derivados glicosilados da dopamina. Fonte: FERNANDEZ et al., 2000.... | 23 |
| Figura 7. Derivados glicosilados da dopamina. Fonte: FERNANDEZ et al., 2000.... | 24 |
| Figura 8. Proposta do perfil metabólico de mosaprida em ratos. Fonte: SUN, et al., 2009 _b | 26 |
| Figura 9. Transformação metabólica de fármacos. Fonte: AZERAD, 1999; FURA, 2006..... | 34 |
| Figura 10. Bioconversão da Procaína. Fonte: THOMAS, 2003..... | 35 |
| Figura 11. Via glicuronidação catalisada por UDP-glicuronosil transferases (UDPG transferases). Fonte: WILLIAMS, 2001..... | 37 |
| Figura 12. Exemplos de reações de biotransformações que levam a metabólitos farmacologicamente ativos ou inativos. Fonte: FURA et al., 2004..... | 39 |
| Figura 13- Representação esquemática da estrutura tridimensional da COMT. A S-adenosil-L-metionina-co-substrato (SAM), o inibidor 3,5-dinitrocatecol (3,5-DNC), os íons de magnésio, e as moléculas de água coordenadas são representados. Fonte: CHEM4513, 2010..... | 44 |
| Figura 14. Fórmula estrutural da entacapona (C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₅) (E)-2-ciano-N,N-dietil-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil) acrilamida..... | 46 |
| Figura 15. Estrutura catecol de fármacos: Entacapona, Carbidopa, Levodopa e Dopamina..... | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Síntese de monofosfato de entacapona. Fonte: LEPPANEN et al., 2000..... | 48 |
| Figura 17. Estrutura do glicuronídeo da entacapona (1) e de seu (<i>Z</i>) Isômero (2). Fonte: LEHTONEN et al., 1999 _a | 49 |
| Figura 18. Fórmula estrutural do (<i>E</i>)-isômero e do (<i>Z</i>)-isômero da entacapona. Fonte: SANMARTI et al., 2008..... | 50 |
| Figura 19. Metodologia aplicada para o desenvolvimento da bioconversão da entacapona, LABIOCON-FF-UFG..... | 55 |
| Figura 20. CCD do derivado I formado a partir da cepa <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245 e dos tubos 17 a 26..... | 62 |
| Figura 21. Entacapona (C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₅) (<i>E</i>)-2-ciano-N,N-dietil-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil) acrilamida..... | 63 |
| Figura 22. Expansão do espectro de RMN ¹ H da entacapona, de 8,0 a 0,5 ppm..... | 65 |
| Figura 23. Expansão do espectro de RMN ¹ H da entacapona, de 3,8 a 0,9 ppm (porção alifática -CH ₂ e -CH ₃)..... | 66 |
| Figura 24. Expansão do espectro de RMN ¹ H da entacapona, de 3,8 a 0,9 ppm (porção aromática H ₂ ' e H ₃ ', porção alifática H ₃)..... | 66 |
| Figura 25. Expansão do espectro de RMN ¹³ C da entacapona, de 180 a 95 ppm..... | 68 |
| Figura 26. Expansão do espectro HMBC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (8,5-0,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (180-40 ppm)..... | 69 |
| Figura 27. Expansão do espectro HMBC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (8,4-7,2 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (170-110 ppm)..... | 69 |
| Figura 28. Expansão do espectro HSQC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (8,5-0,5 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (160-0 ppm)..... | 70 |
| Figura 29. Expansão do espectro HSQC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (3,8-1,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (55-5 ppm)..... | 70 |
| Figura 30. Expansão do espectro HSQC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (8,7-7,1 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (155-110 ppm)..... | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 31. Fórmula estrutural do derivado I da entacapona: 4 hidroxi-5-nitrofenil-3-O-(β)-D-glicopirranose-(E)-2-ciano-N, N-dietil-3- acrilamida..... | 72 |
| Figura 32. Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado I da entacapona, de 8,0 a 0,5 ppm..... | 74 |
| Figura 33. Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado I da entacapona, de 1,75 a 1,0 ppm..... | 74 |
| Figura 34. Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado I da entacapona, de 5,1 a 3,3 ppm..... | 75 |
| Figura 35. Expansão do espectro de RMN ¹ H do derivado I da entacapona, de 8,2 a 7,4 ppm..... | 75 |
| Figura 36. Expansão do espectro de RMN ¹³ C do derivado I entacapona, de 165 a 0 ppm..... | 78 |
| Figura 37. Expansão do espectro de RMN ¹³ C do derivado I entacapona, de 168 a 102 ppm..... | 78 |
| Figura 38. Expansão do espectro de RMN ¹³ C do derivado I entacapona, de 78 a 12 ppm..... | 79 |
| Figura 39. Expansão do espectro HMBC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (8,5-0,7 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (140-0 ppm)..... | 79 |
| Figura 40. Expansão do espectro HMBC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (5,0-1,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (140-0 ppm)..... | 80 |
| Figura 41. Expansão do espectro HMBC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (8,5-7,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (140-80 ppm)..... | 80 |
| Figura 42. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (8,5-1,5 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (160-20 ppm)..... | 81 |
| Figura 43. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (5,5-2,5 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (110-30 ppm)..... | 81 |
| Figura 44. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (2,3-0,6 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (35-5 ppm)..... | 82 |
| Figura 45. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ _H (9,2-6,4 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ _C (170-110 ppm)..... | 82 |

| | |
|--|----|
| Figura 46. Bioconversão da entacapona formando o (<i>E</i>)-entacapona glicosídeo e o (<i>Z</i>)-entacapona glicosídeo, determinado por CLAE-EM/EM..... | 83 |
| Figura 47. Separação cromatográfica de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) da entacapona glicosilada (<i>E</i>) / (<i>Z</i>), eixo horizontal corresponde ao tempo em minutos e o eixo vertical corresponde à intensidade..... | 84 |
| Figura 48. Espectro de massa do derivado glicosilado da entacapona: pico íon molecular $m/z=468,1$ e pico base $m/z=306,0$, varredura de 100 a 500 u.m.a..... | 85 |
| Figura 49. Proposta de fragmentação do derivado glicosilado da entacapona por EM..... | 86 |
| Figura 50. Espectro de massa do produto íon (A) - (<i>E</i>)-entacapona (m/z 306,1 – 233,0, varredura 100-400 u.m.a) e (B) – (<i>Z</i>)-entacapona (m/z 306,1 – 233,0, varredura 100-400 u.m.a.) em modo de ionização positiva. Fonte: YADAV et al., 2009..... | 88 |
| Figura 51. Espectros de absorção na região do infravermelho da entacapona e do derivado I - entacapona glicosídeo em pastilhas de KBr..... | 89 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Gênero <i>Cunninghamella</i> - Exemplos de metabolismo microbiano x metabolismo mamífero de fármacos farmacologicamente ativos. Fonte: ASHA & VIDYAVATHI, 2009..... | 32 |
| Tabela 1. Bioconversão da entacapona por cepas de fungos filamentosos..... | 60 |
| Tabela 2. Bioconversão da entacapona resultante do “pool” das misturas reacionais dos microrganismos..... | 61 |
| Tabela 3. Dados espectrais de RMN ^1H (500 MHz) da entacapona em metanol deuterado..... | 64 |
| Tabela 4. Dados espectrais de RMN ^{13}C da entacapona em metanol deuterado..... | 67 |
| Tabela 5. Dados espectrais de RMN ^1H do derivado I da entacapona em metanol deuterado..... | 73 |
| Tabela 6. Dados espectrais de RMN ^{13}C do derivado I da entacapona em metanol deuterado..... | 77 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------|---|
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CLAE-EM/EM | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa |
| COMT | Catecol-O-metiltransferase |
| CYP450 | Citocromo P-450 |
| D | Dimensões |
| DP | Doença de Parkinson |
| EM | Espectrometria de Massa |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Coherence |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| IC | Metade da Concentração Inibitória Máxima |
| IQ/UFG | Instituto de Química/Universidade Federal de Goiás |
| IV | Espectroscopia no Infravermelho |
| M0 | Mosaprida |
| PDSM | “Potato Dextrose Soy Medium” |
| ppm | Partes por milhão |
| Rf | Fator de Retenção ou Fator de Retardamento |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMN ¹³ C | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |

| | |
|--------------------|---|
| RMN ¹ H | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| UV | Ultravioleta |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|--------------------------|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| C | Carbono |
| J | Constante de acoplamento |
| d | Dubleto |
| dd | Duplo dubleto |
| δ | Deslocamento químico |
| H | Hidrogênio |
| Hz | Hertz |
| MHz | Mega Hertz |
| m | Multiplete |
| rpm | Rotação por minuto |
| s | Singleto |
| u.m.a | Unidade de massa atômica |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | GLICOSILAÇÃO DE FÁRMACOS..... | 20 |
| 1.2 | MÉTODOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO..... | 25 |
| 1.3 | <i>CUNNINGHAMELLA</i> | 30 |
| 1.4 | METABOLISMO..... | 33 |
| 1.5 | METABÓLITOS..... | 38 |
| 1.6 | PARKINSONISMO..... | 40 |
| 1.7 | DOENÇA DE PARKINSON..... | 43 |
| 1.8 | INIBIDORES DA COMT: TOLCAPONA E ENTACAPONA..... | 45 |
| 1.9 | ENTACAPONA..... | 46 |
| 1.9.1 | Fórmula estrutural e Mecanismo de ação | 46 |
| 1.9.2 | Farmacocinética | 48 |
| 2 | OBJETIVOS | 51 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 3.1 | SUBSTRATO..... | 52 |
| 3.2 | MICROORGANISMO..... | 52 |
| 3.3 | MEIOS DE CULTURA..... | 53 |
| 3.3.1 | Meio Sólido Ágar Batata Modificado | 53 |
| 3.3.2 | Meio Líquido PDSM | 53 |
| 3.4 | MANUTENÇÃO E REPIQUE DAS CEPAS..... | 54 |
| 3.5 | TRIAGEM..... | 54 |
| 3.6 | FILTRAÇÃO E EXTRAÇÃO..... | 55 |
| 3.7 | MONITORAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS DA ENTACAPONA..... | 56 |
| 3.7.1 | Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 56 |
| 3.7.2 | Cromatografia em Coluna | 57 |
| 3.8 | CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DA ENTACAPONA..... | 57 |
| 3.8.1 | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C) e Hidrogênio (RMN ¹H) | 57 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.8.2 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM)..... | 58 |
| 3.8.3 | Espectroscopia no Infravermelho (IV)..... | 58 |
| 3.9 | PONTO DE FUSÃO..... | 59 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 60 |
| 4.1 | BIOCONVERSÃO DA ENTACAPONA..... | 60 |
| 4.2 | CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS..... | 62 |
| 4.2.1 | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C) e Hidrogênio (RMN ¹H)..... | 63 |
| 4.2.2 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM)..... | 83 |
| 4.2.3 | Espectroscopia no Infravermelho (IV)..... | 89 |
| 4.3 | DERIVADO I DA ENTACAPONA..... | 90 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 93 |
| 6 | PERSPECTIVAS..... | 94 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 95 |

1. INTRODUÇÃO

O estudo da bioconversão de compostos biologicamente ativos por microrganismos, principalmente fungos filamentosos, e seus possíveis derivados glicosilados tem sido amplamente investigado. Como exemplo as flavonas de *Psiadia arabica*, *Psiadiarabin* (1, Figura 1) e seu análogo 6-desmetoxi 5,3'dihidroxi-7,2', 4',5'-tetrametoxiflavona (2, Figura 1) foram metabolizados por *Cunninghamella elegans* NRRL 1392 resultando em dois glicose-conjugados altamente polares (3 e 4, Figura 1), caracterizados por RMN (IBRAHIM et al., 1997).

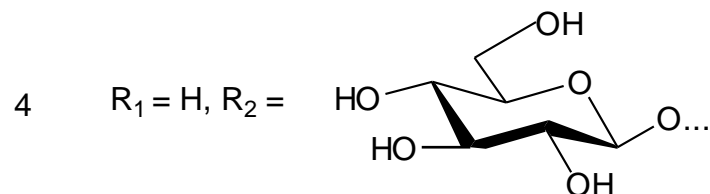
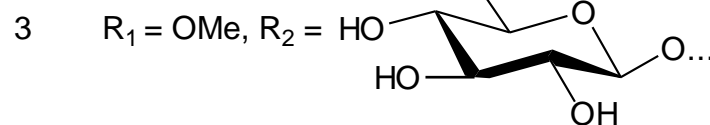
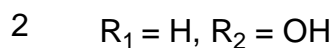
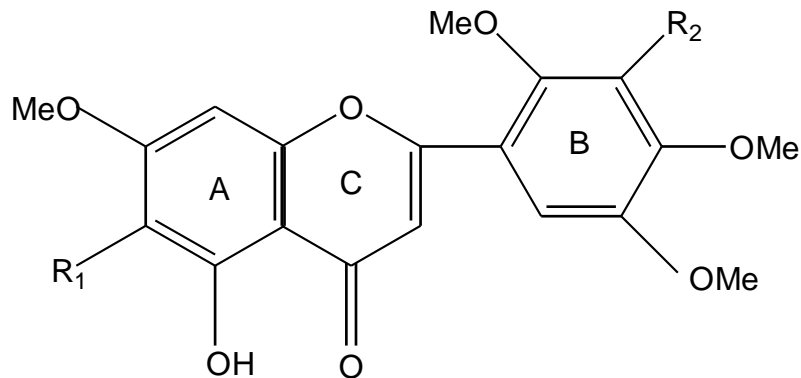


Figura 1. Bioconversão por *Cunninghamella elegans* NRRL 1392 do Psiadiarabin (1) e o análogo 6-desmetoxi 5,3'dihidroxi-7,2', 4',5'-tetrametoxiflavona (2) em dois derivados glicosilados (3 e 4). Fonte: IBRAHIM et al., 1997.

HUANG et al. utilizaram a etofesalamida, aplicada a acne, psoríase, dermatite de sensibilização, eczema crônico, e neurodermite no uso clínico, como substrato para explorar a capacidade dos fungos filamentosos em convertê-la em metabólitos de fase 2, comparando os resultados encontrados com os resultados do metabolismo em mamíferos, visto que a etofesalamida em coelhos tem sido bem estudada e o etofesalamida-2-glicuronídeo é o principal metabólito. Para estudar os metabólitos de fase 2, sete fungos foram selecionados para transformar a etofesalamida: *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Mucor circinelloides*, *Cunninghamella elegans* AS 3.156, *Cunninghamella elegans* AS 3.2028, *Cunninghamella echinulata* AS 3.2004 e *Cunninghamella blacksleeana* AS 3.153 (HUANG et al., 2005).

Os metabólitos da etofesalamida foram analisadas por CLAE-EM. A etofesalamida foi convertida em dois metabólitos de fase 2: glicosídeo e ribosídeo conjugados. O glicosídeo conjugado foi o principal produto com um rendimento superior a 90%, não foram detectados metabólitos de fase 1 (Figura 2). Eles concluíram que as conjugações glicosídicas e ribosídicas da etofesalamida obtidas por fungos filamentosos diferiram da glicuronidação do metabolismo de fase 2 em mamíferos (HUANG et al., 2005).

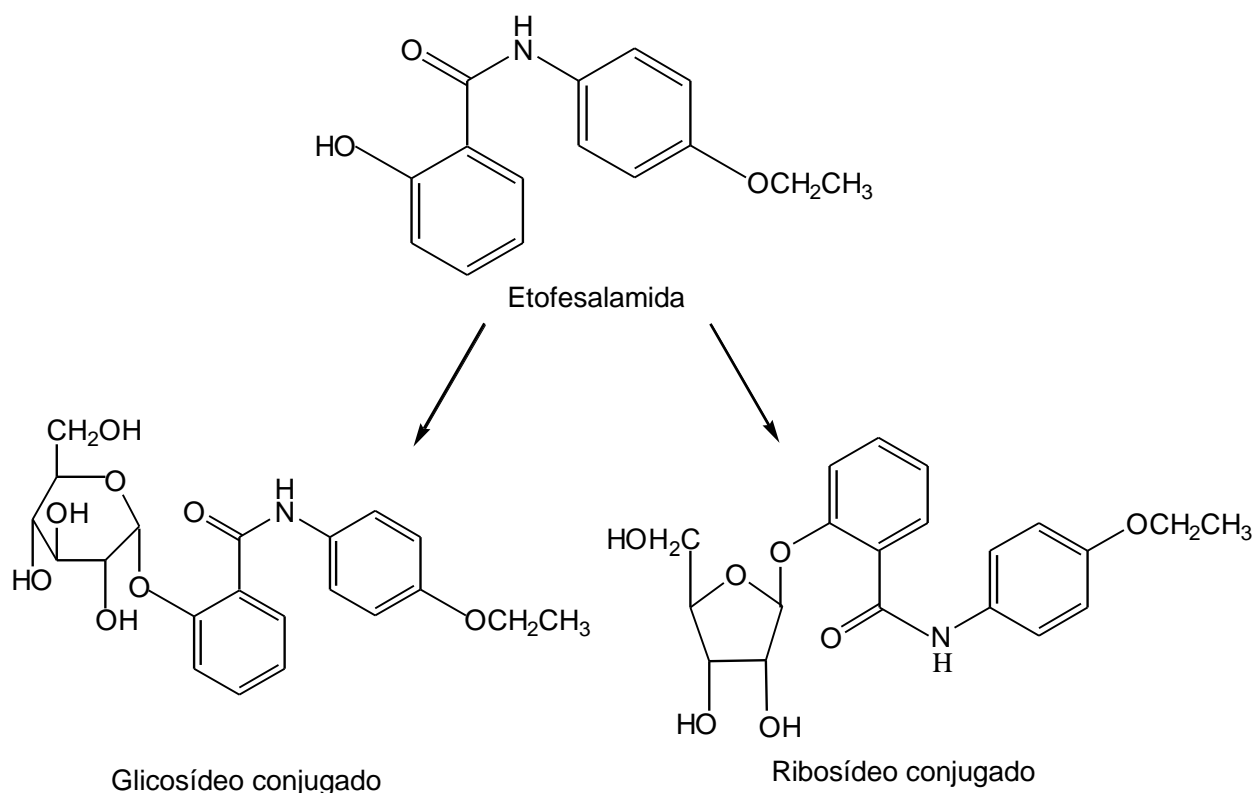
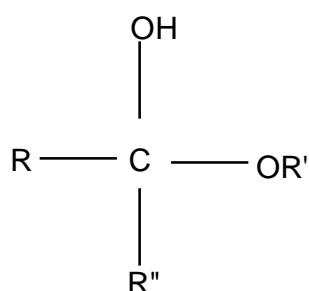


Figura 2. Metabólitos de fase 2 da Etopesalamida. Fonte: HUANG et al., 2005.

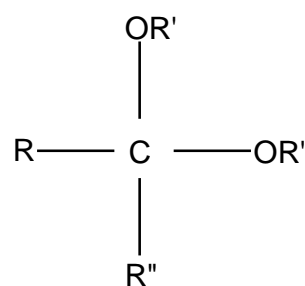
Por via química as reações de glicosilação podem ser bastante difíceis, envolvendo várias etapas de proteção e desproteção, reduzindo consideravelmente os rendimentos. Geralmente as reações de glicosilação necessitam de per-O-acetilação da glicose com anidrido acético e iodeto (MUKHOPADHYAY et al., 2004) sobre halogenação da posição anomérica usando HBr 30% em ácido acético (RUTTENS et al., 2007). Como resultado a molécula glicosilada reage com metóxido de sódio para desproteger as hidroxilas (CAMPO & CARVALHO, 2008).

1.1 GLICOSILAÇÃO DE FÁRMACOS

Os carboidratos são normalmente definidos como aldeídos e cetonas poli-hidroxiladas ou substâncias que hidrolisam para produzir aldeídos e cetonas poli-hidroxiladas. Faz-se importante ressaltar que devido aos carboidratos conterem grupos C=O e grupos -OH, eles existem principalmente como hemiacetais, ou seja, grupo -OH e um grupo -OR ligados ao mesmo átomo de carbono da carbonila do aldeído ou cetona, ou acetais que possuem dois grupos -OR ligados ao mesmo átomo de carbono (Figura 3) (SOLOMONS & FRYHLE, 2002).



Hemiacetal (R'' pode ser H)



Acetal (R'' pode ser H)

Figura 3. Hemiacetais: grupo -OH e um grupo -OR ligados ao mesmo átomo de carbono da carbonila do aldeído ou cetona. Acetais: que possuem dois grupos -OR ligados ao mesmo átomo de carbono.

O sistema *D-L* das designações estereoquímicas está totalmente embutido na literatura da química dos carboidratos. As formas cíclicas da *D-(+)*-glicose são hemiacetais formados por uma reação intramolecular do grupo -OH em C5 com o grupo de aldeído. A ciclização cria um novo estereocentro em C1 e este estereocentro explica como duas formas cíclicas são possíveis. Estas duas formas cíclicas são diastereoisômeros que diferem entre si apenas na configuração do C1 . Os diastereoisômeros deste tipo são chamados de anômeros, e o átomo de carbono hemiacetal é chamado de átomo de carbono anomérico (SOLOMONS & FRYHLE, 2002).

Cada anômero de glicose é designado como um anômero α ou β , dependendo do grupo -OH do C1 . Quando desenhamos as formas cíclicas de um açúcar *D* na orientação mostrada na figura 4, o anômero α possui o -OH trans em relação ao grupo $\text{-CH}_2\text{OH}$; e o anômero β possui o -OH cis em relação ao grupo $\text{-CH}_2\text{OH}$ (SOLOMONS & FRYHLE, 2002).

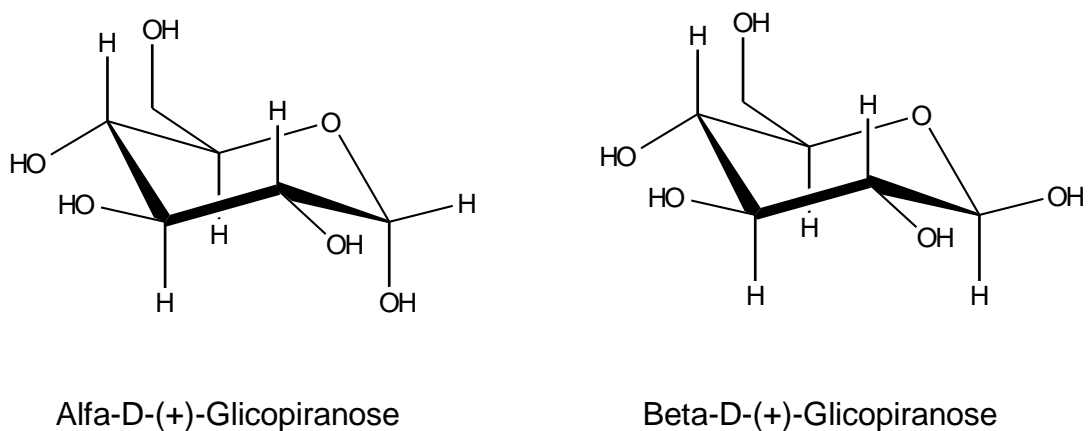


Figura 4. Forma cíclica da Glicose mostrando o anômero α : -OH trans em relação ao grupo $\text{-CH}_2\text{OH}$ e o anômero β : -OH cis em relação ao grupo $\text{-CH}_2\text{OH}$.

Os acetais de carboidratos são chamados, em geral, de glicosídeos: um acetal de glicose é chamado glicosídeo, acetais da manose são manosídeos, acetais da frutose são frutosídeos etc. Os glicosídeos são estáveis nas soluções básicas por serem acetais. Nas soluções ácidas, porém, os glicosídeos sofrem a hidrólise para

produzir açúcar e álcool. O álcool obtido pela hidrólise de um glicosídeo é conhecido como um aglicônio. (SOLOMONS & FRYHLE, 2002).

Tem-se estimulado a busca de novas estratégias no tratamento da Doença de Parkinson, uma delas recorre aos derivados glicosilados da dopamina capazes de penetrar na barreira hematoencefálica, através da utilização de sistemas de transportes específicos (FERNANDEZ et al., 2000; FERNANDEZ et al, 2003).

É sabido que a glicose, fonte de energia do cérebro, e outras hexoses são transportadas através da barreira hematoencefálica pelo transportador glicose GLUT-1. Este transportador protéico está localizado na membrana das células capilares endoteliais cerebrais que compõem a barreira hematoencefálica. Assim, poderíamos ter uma nova abordagem para liberar dopamina no SNC através de um neurotransmissor ligado a uma molécula de açúcar, resultando em um glicoconjugado, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, utilizando o transporte carreador-intermediado. Ao atingir o SNC, o pró-fármaco deveria ser enzimaticamente clivado para liberar o composto ativo (Figura 5). Alguns autores têm estudado este método em peptídeos e agentes citotóxicos para liberação destes compostos no SNC (FERNANDEZ et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2003; SIVAKUMAR et al., 2009).

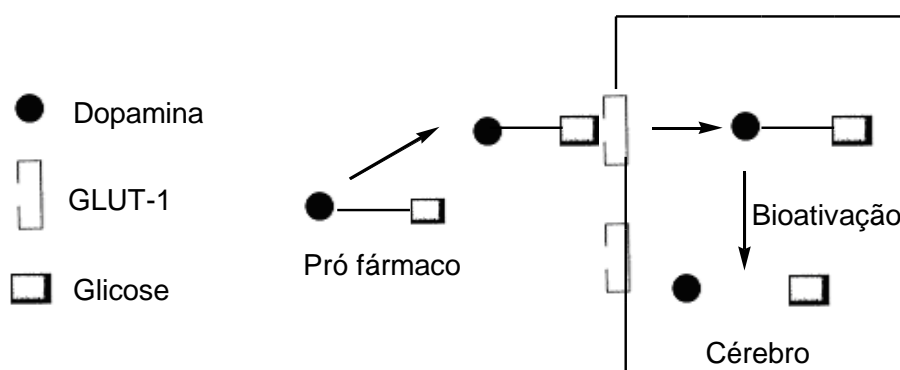


Figura 5. Representação esquemática da nova estratégia para liberar dopamina no SNC. Fonte: FERNANDEZ et al., 2000.

Após esta estratégia, foram sintetizados vários derivados glicosilados da dopamina como potentes agentes antiparkinsonianos, no qual o açúcar e o neurotransmissor estão ligados através de ligação éster, amida e glicosídicas (Figura 6) (FERNANDEZ et al., 2000).

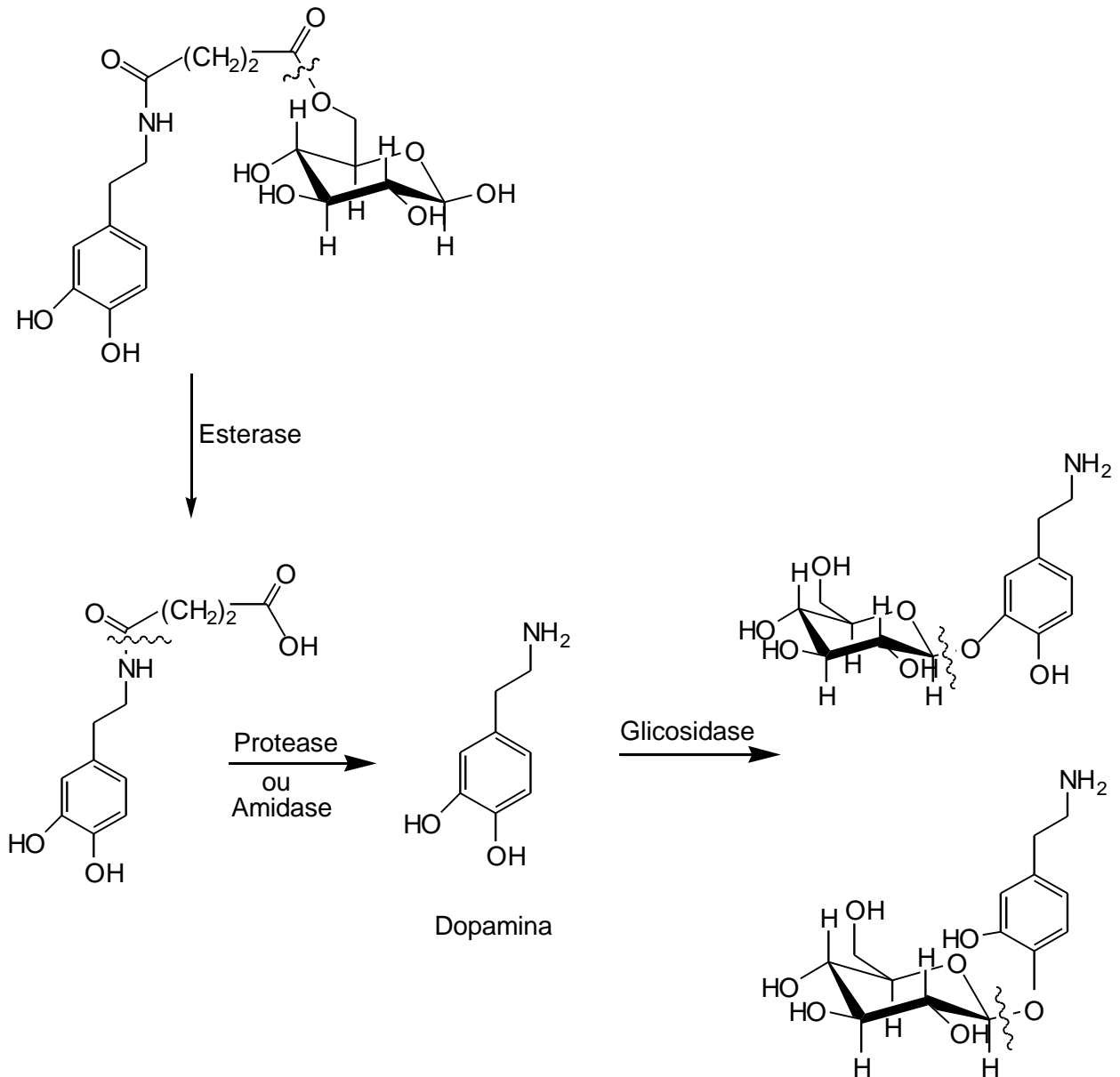


Figura 6. Derivados glicosilados da dopamina. Fonte: FERNANDEZ et al., 2000.

Essas ligações podem ser clivadas, enzimaticamente, no tecido cerebral para a liberação de dopamina. Uma série de compostos apresenta o grupo amino da dopamina ligado ao açúcar na posição C-6 (1 e 2, Figura 7) ou C-1(β) (3, Figura 7), através de uma ligação succinil. Em outra série, o açúcar é anexado aos grupos fenólicos da dopamina através de uma ligação glicosídica (4 e 5, Figura 7) (FERNANDEZ et al., 2000).

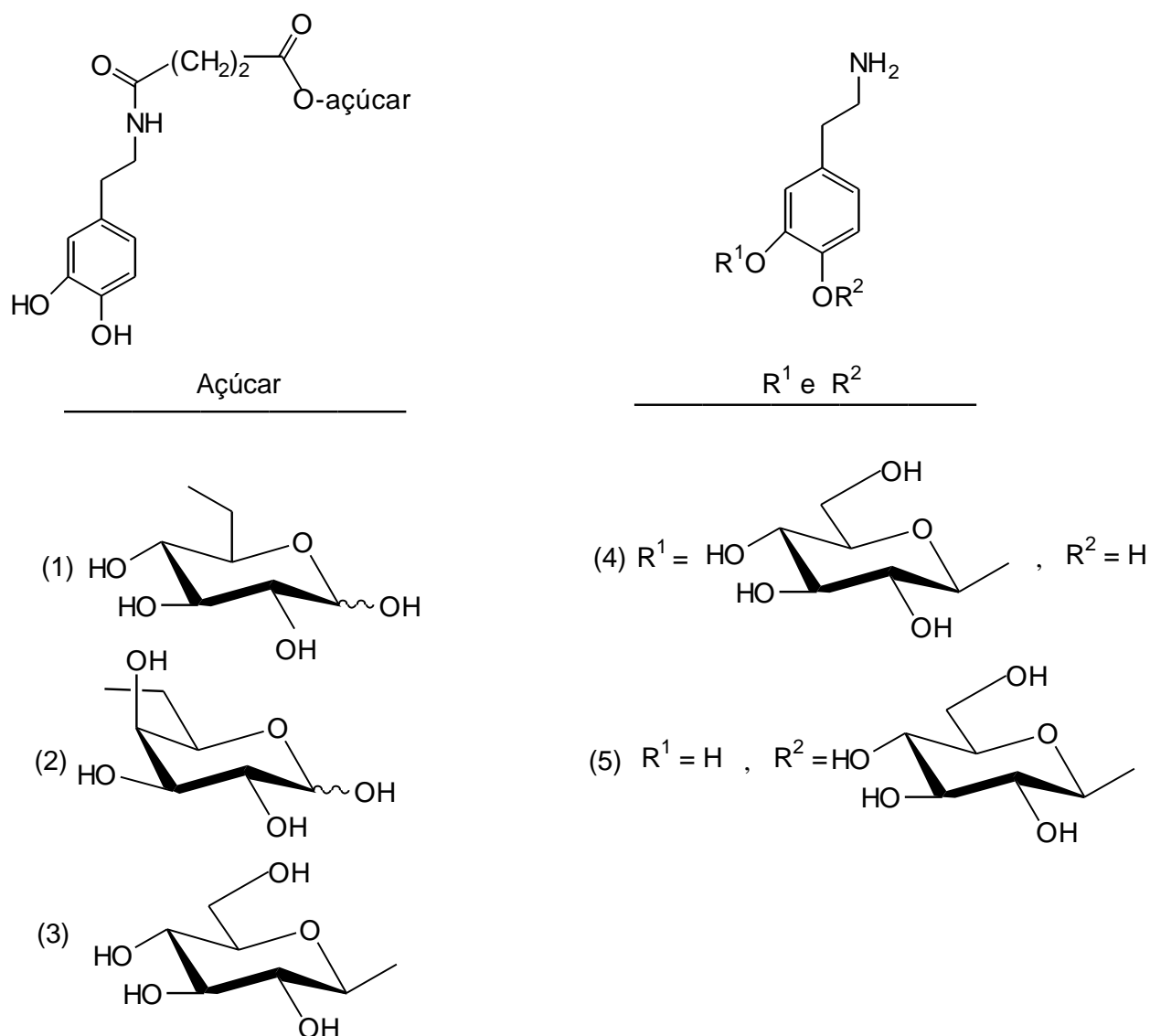


Figura 7. Derivados glicosilados da dopamina. Fonte: FERNANDEZ et al., 2000.

1.2 MÉTODOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Há vários métodos de biotransformação disponíveis para gerar metabólitos. Nos métodos *in vivo*, o fármaco é administrado a animais de laboratório ou seres humanos, e seus fluidos biológicos são examinados quanto à presença e identificação dos metabólitos. Os métodos *in vitro* incluem o uso de frações subcelulares elaborados a partir de sistemas de células e órgãos intactos e enzimas isoladas. Os métodos microbianos podem também ser utilizados para gerar metabólitos. E os métodos *in silico* são softwares capazes de prever as reações metabólicas (FURA et al., 2004; ASHA & VIDYAVATHI, 2009).

A elucidação e identificação da estrutura de metabólitos de mosaprida foi investigada em ratos. Após administração oral, as amostras de urina, bile, fezes e plasma de ratos foram coletadas e analisados por CLAE-EM/EM, 18 metabólitos foram encontrados. As estruturas moleculares de nove metabólitos de fase 1 e de seis metabólitos de fase 2 da mosaprida foram elucidadas por CLAE-EM/EM. Os metabólitos de fase 1 foram, principalmente, bioconvertidos por desalquilação, N-oxidação, clivagem do anel morfolina e hidroxilação, enquanto que na fase 2 metabólitos foram principalmente formados por glicuronidação (Figura 8) (SUN, et al., 2009_{a,b}).

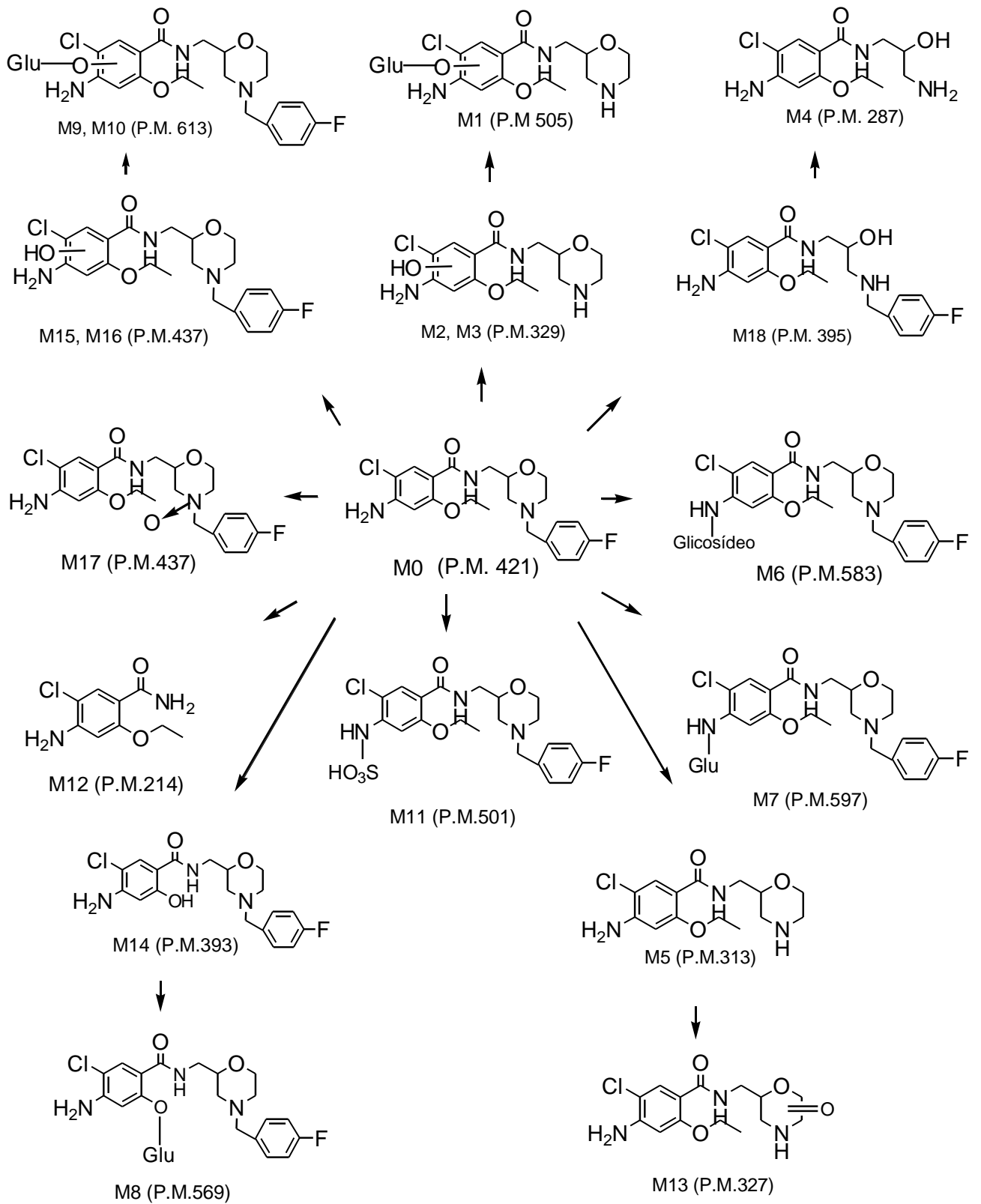


Figura 8. Proposta do perfil metabólico de mosaprida em ratos. Fonte: SUN, et al., 2009_b.

Smith e Rosazza (1974) propuseram pela primeira vez que biotransformações microbianas poderiam ser utilizados para a preparação de metabólitos mamíferos de fármacos. Uma vez identificados, geralmente por CLAE/EM, estes metabólitos poderiam ser preparados em quantidades suficientes para a preparação de padrões analíticos, para ter sua atividade biologicamente testada e para elaboração de fármacos. Entre as vantagens da utilização de microrganismos para a produção de metabólitos podemos citar que as culturas são relativamente fáceis de manutenção e crescimento. Em alguns casos, não é possível obter todos os metabólitos mamíferos pela transformação microbiana, mas por causa da simplicidade do método e a capacidade de fornecer grandes quantidades de metabólitos, a técnica permanece como uma útil opção (FURA et al., 2004; ASHA & VIDYAVATHI, 2009).

As vantagens do uso do modelo microbiano sobre o uso de animais de laboratório e culturas de células ou tecidos em estudos do metabolismo são (FURA et al., 2004; ASHA & VIDYAVATHI, 2009; SUN et. al., 2009_b):

- Técnica simples, fácil e de baixo custo;
- A triagem para um grande número de cepas é um simples processo repetitivo;
- A grande quantidade de metabólitos formados permite fácil detecção, isolamento e identificação estrutural;
- Novos metabólitos podem ser isolados;
- Pode ser utilizado para as reações de síntese, envolvendo muitas etapas;
- Úteis nos casos em que régio- e estéreo-especificidades são necessários;
- A manutenção de estoques de culturas de microrganismos é mais simples e mais barata do que a manutenção de culturas de células ou tecidos ou de animais de laboratório;
- Facilidade de manutenção, crescimento e manipulação;
- Resultados reprodutíveis.

O uso de animais de laboratório e culturas de células ou tecidos apresenta as seguintes desvantagens (FURA et al., 2004; ASHA & VIDYAVATHI, 2009; SUN, et. al., 2009_{a,b}):

- O custo da manutenção de culturas de células ou tecidos;
- O custo dos animais experimentais;
- Variações das espécies;
- Preocupações éticas;

- A toxicidade do fármaco limita a quantidade que pode ser administrada e, portanto, apenas uma pequena quantidade de metabólito pode ser isolada.

Os biocatalisadores empregados nos processos de bioconversão, também, apresentam vantagens quando comparados aos catalisadores químicos usuais, dentre as quais podemos citar (FABER, 2004):

- Enzimas são catalisadores eficientes, a velocidade das reações aumenta cerca de 10^8 - 10^{12} , o que é muito além da aceleração observada por catalisadores químicos;
- É uma técnica que se enquadra dentro da “química verde”, definida pela concepção, desenvolvimento e aplicação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias perigosas à saúde humana e ao meio ambiente. Diferente dos metais pesados, por exemplo, os biocatalisadores são completamente degradados no meio ambiente (PRADO, 2003; HAI-FENG et al., 2008);
- As enzimas são compatíveis entre si, uma vez que atuam sob condições similares, diversas reações biocatalíticas podem ser realizadas em um recipiente. Assim, reações sequenciais podem ser desenvolvidas usando sistemas multienzimáticos a fim de simplificar processos reacionais;
- As enzimas são capazes de atuar em uma grande variedade de substratos sintéticos não naturais. Muitas delas apresentam uma elevada especificidade para um determinado tipo de reação, aceitando uma ampla diversidade estrutural em seus substratos;
- A biodiversidade enzimática fúngica pode ser demonstrada pela geração de moléculas que podem apresentar atividade farmacológica diferente do fármaco original.

As enzimas são catalisadores altamente seletivos, apresentando todos os tipos de seletividade química essenciais à química orgânica sintética, que são a quimiosseletividade, a regiosseletividade e a estereosseletividade:

- Quimiosseletividade: as enzimas agem em grupos funcionais específicos, assim, outros sítios da molécula permanecem inalterados. Observa-se uma menor ocorrência de reações paralelas indesejadas, resultando em produtos

mais puros e com uma purificação menos trabalhosa quando comparadas às catálises químicas;

- Regiosseletividade: devido à estrutura tridimensional complexa das enzimas, podem distinguir grupos funcionais idênticos situados em regiões diferentes da molécula do substrato;
- Estereosseletividade: as enzimas são formadas por L-amino ácidos e assim são catalisadores quirais. Dessa forma, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é reconhecido formando o complexo enzima-substrato. Substratos pró-quirais podem ser transformados em produtos opticamente ativos e ambos estereoisômeros de um substrato racêmico podem reagir em diferentes velocidades e serem separados por resolução cinética (ABOURASHED, et. al., 1999; FABER, 2004).

As desvantagens do uso de biocatalisadores são:

- A dificuldade de se encontrar um biocatalisador adequado e por isso o emprego de extensos procedimentos de seleção (AZERAD, 1999);
- Poucos solventes podem ser utilizados, não podendo trabalhar com pH extremos;
- As enzimas são encontradas apenas em uma forma enantiomérica. Assim, não é possível inverter a quiralidade de um processo enzimático simplesmente substituindo o catalisador por seu outro enantiômero, estratégia utilizada na síntese química (FABER, 2004);
- Os baixos rendimentos obtidos podem ocorrer devido à grande variedade de produtos formados (FABER, 2004).

As reações de bioconversão utilizando fungos filamentosos, dotados de monoxigenases capazes de hidroxilar moléculas, como *Cunninghamella echinulata*, *Beauveria bassiana*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor plumbeus*, *Mortierella isabelina*, têm sido bastante utilizadas por serem uma alternativa promissora para a elucidação da rota metabólica de fármacos de diferentes classes farmacológicas (AZERAD, 1999; ASHA & VIDYAVATHI, 2009). O desenvolvimento de uma metodologia analítica de monitoramento da reação apropriada é essencial para o sucesso deste estudo, as técnicas mais utilizadas são CCD, CG, CLAE, CG-EM ou CLAE-EM e a RMN.

1.3 CUNNINGHAMELLA

O fungo *Cunninghamella*, da família Cunninghamellaceae pertence à seguinte taxonomia simplificada, sugerida por Dixon e Fromtling, 1995 (KONEMAN et al., 2001, ASHA & VIDYAVATHI, 2009):

Classe: Zygomycetes

Ordem: Mucorales

Gênero: *Cunninghamella*

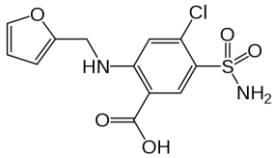
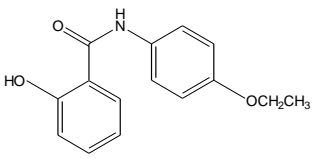
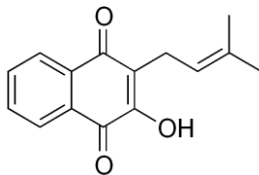
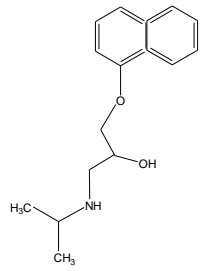
O gênero *Cunninghamella* contém espécies de importância em micologia médica e em processos biotecnológicos (KONEMAN et al., 2001, ASHA & VIDYAVATHI, 2009). É um fungo filamentosso encontrado no solo e material vegetal, especialmente no Mediterrâneo e zonas subtropicais. Também foi recuperado a partir de material animal, queijo e castanhas do Brasil (ASHA & VIDYAVATHI, 2009).

O gênero *Cunninghamella* contém atualmente 16 espécies, destacadas a seguir (UNIPROT CONSORTIUM, 2010; ZHENG & CHEN, 2001; ASHA & VIDYAVATHI, 2009):

Cunninghamella bainieri
Cunninghamella bertholletiae
Cunninghamella binariae
Cunninghamella blakesleeana
Cunninghamella clavata
Cunninghamella echinulata
Cunninghamella elegans
Cunninghamella homothallica
Cunninghamella intermedia
Cunninghamella multiverticillata
Cunninghamella phaeospora
Cunninghamella polymorpha
Cunninghamella septata
Cunninghamella sp A18
Cunninghamella sp CL023
Cunninghamella vesiculosa

Dentre as espécies a *C. bertholletiae*, a *C. elegans* e a *C. echinulata* são as mais encontradas, porém *C. bertholletiae* é conhecida apenas como patógeno humano e animal. As espécies de *Cunninghamella* são capazes de metabolizar uma grande variedade de xenobióticos, utilizando tanto reações de biotransformação de fase 1 como de fase 2. Têm a capacidade de metabolizar uma grande variedade de xenobióticos, em posições régio- e estéreo-seletivas, semelhante aos sistemas enzimáticos de mamíferos (Quadro 1) (DAVIS, 1988; ASHA & VIDYAVATHI, 2009).

Quadro 1. Gênero *Cunninghamella* - Exemplos de metabolismo microbiano x metabolismo mamífero de fármacos farmacologicamente ativos.

| <i>Cunninghamella</i> | Fármaco | Atividade Farmacológica | Metabólitos de mamíferos | Metabólitos microbianos |
|---|--|--------------------------------------|--|--|
| <i>C. elegans</i> | <p>Furoseמידا</p>  | Diurético | N-desalquilação; formação de óxido de areno; formação de glicuronídeo 1-O-acil | N-desalquilação; formação de glicosídeo 1-O-acil |
| <i>C. blakesleeana</i> AS 3.153 | <p>Etofesalamida</p>  | Antipsoríase | Glicuronidação | Conjugações glicosídeos e ribosídeos |
| <i>C. echinulata</i> | <p>Lapachol</p>  | Antitumor, antibiótico, antimalárico | Hidroxilação alílica grupo metila e oxidação do ácido carboxílico; formação glicuronídeo | Hidroxilação alílica grupo metila e formação de éster de lactato; glicosilação |
| <i>C. echinulata</i> ; <i>C. bainieri</i> | <p>Propranolol</p>  | β-bloqueador | N-deisopropilação; desaminação oxidativa de OH ou ácido carboxílico; hidroxilação do anel C-4 e glicuronidação | N-deisopropilação; desaminação oxidativa de OH ou ácido carboxílico; hidroxilação do anel C-4 e C-8 e conjugação indeterminada |

Fonte: ASHA & VIDYAVATHI, 2009.

1.4 METABOLISMO

Antes que os fármacos sejam aprovados para uso em humanos, amplos estudos são exigidos para estabelecerem eficácia e segurança. A elucidação do metabolismo dos fármacos constitui um importante e necessário passo para esta evolução, levando a um completo conhecimento de fatores farmacocinéticos, essenciais para o uso adequado e seguro. Utilizam-se técnicas analíticas sensíveis e eficazes, aliadas a procedimentos de extração eficientes e quantitativos, de maneira a permitir a elucidação da estrutura química dos metabólitos, inclusive de centros estereogênicos quando presentes (ABOURASHED et. al., 1999; AZERAD, 1999; FABER, 2004).

Para alguns autores, metabolismo é o estudo do destino total do fármaco na biofase, incluindo as etapas de absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Outros consideram o metabolismo apenas como biotransformação do fármaco, isto é as modificações químicas, enzimaticamente promovidas, que o fármaco sofre na biofase, distinguindo, portanto do aspecto farmacocinético (absorção/distribuição). Atualmente, o termo metabolismo é empregado para descrever as transformações enzimáticas de substâncias endógenas, a exemplo acetilcolina, enquanto biotransformação compreende a metabolização de xenobióticos, como os fármacos (THOMAS, 2003; ASHA & VIDYAVATHI, 2009).

A bioconversão envolve, principalmente, reações de detoxificação, onde o fármaco metabolizado no interior de células do fígado, rins, entre outros órgãos, produz metabólitos mais polares, hidrossolúveis, a fim de serem eliminados do organismo. Tal processo pode envolver as reações de fase 1 (oxidação, redução e hidrólise) e de fase 2 (conjugação) catalisadas por uma variedade de enzimas (AZERAD, 1999, THOMAS, 2003; FURA, 2006).

Na maioria dos casos, o metabolismo de fármacos leva a inativação farmacológica do composto através da biotransformação em moléculas inativas. No entanto, o metabolismo de fármacos pode também resultar em ativação farmacológica, onde metabólitos farmacologicamente ativos são formados. A formação de metabólitos ativos (bioativação) pode ser mediada, como descrito acima, tanto pela fase 1 como pela fase 2. As reações de fase 1 são mediadas por enzimas tais como CYP450, flavina monoxigenase, esterases e amidases, sendo a bioativação resultante do CYP450 a via mais comum. Nas reações de fase 2, pequenas moléculas endógenas polares (por exemplo, ácido glicurônico e sulfato) são conjugadas com os grupos

funcionais formados durante as reações de fase 1. Mas a conjugação direta das moléculas endógenas também pode ocorrer se o composto já tiver grupos funcionais adequados. Estas reações de conjugação são mediadas por enzimas, tais como glicuronosiltransferase, sulfotransferase e acetiltransferase (Figura 9) (FURA, 2006).

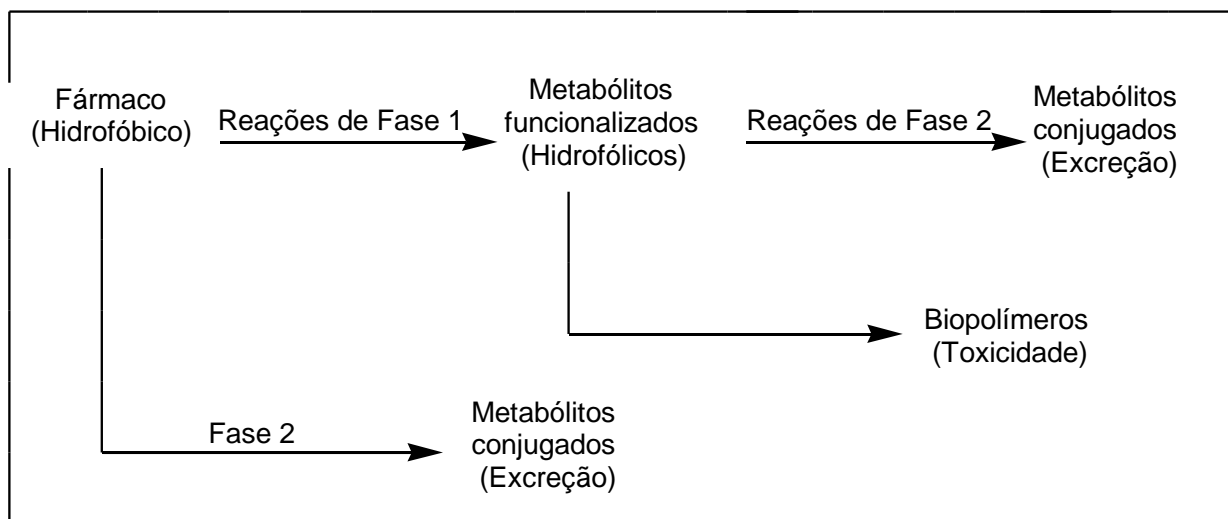


Figura 9. Transformação metabólica de fármacos. Fonte: AZERAD, 1999; FURA, 2006.

O metabolismo dos fármacos, ou seja, suas biotransformações, são as reações químicas responsáveis pela conversão de fármacos em outros produtos dentro do organismo antes e depois de atingir seus sítios de ação. A quantidade de um fármaco que atinge um receptor dependerá da quantidade incorporada pelos outros tecidos e também da quantidade do fármaco que é metabolizada antes que este atinja seu sítio de ação. Quase todas essas reações são catalisadas por enzimas, portanto, tenderão ser estereoespecíficas. Em consequência, o conhecimento sobre metabolismo faz-se importante tanto no desenho de novos fármacos, bem como para o aperfeiçoamento dos já existentes (FABER, 2004; THOMAS, 2003).

Willians (1959) classificou a biotransformação em duas fases, considerando a primeira fase do metabolismo de um fármaco na biofase, as reações de oxidações, reduções e hidrólises; e a fase 2, compreendendo a etapa de conjugação, envolvendo reações de glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e a formação de adutos com

glutaciona. Normalmente, ambos os tipos de reações produzem metabólitos que são mais hidrossolúveis e desse modo mais facilmente excretados que o fármaco original (WILLIANS, 2001).

Nas reações de fase 1 o aumento da solubilidade em água geralmente ocorre pela introdução de grupamentos polares que aumentam a solubilização em água, tais como $-OH$, $-COOH$ e $-SO_3H$. Por exemplo, a procaína, anestésico local, é metabolizada na corrente sanguínea por hidrólise catalisada por esterases, gerando compostos com grupamentos ácidos e alcoólicos mais polares (Figura 10) (WILLIANS, 2001; THOMAS, 2003).

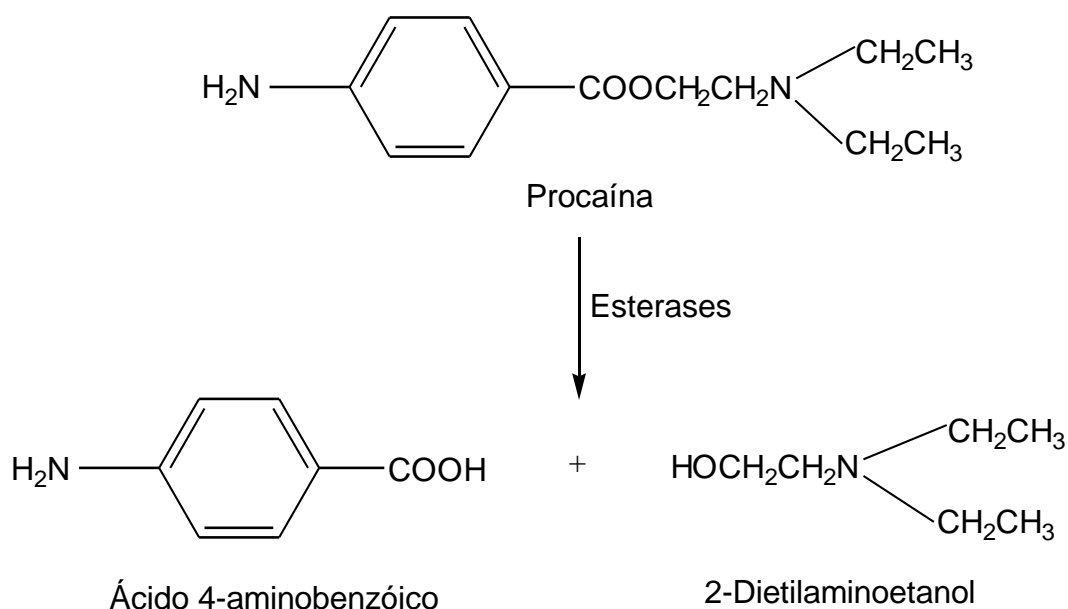


Figura 10. Bioconversão da Procaína. Fonte: THOMAS, 2003.

A oxidação é provavelmente a reação mais comum no metabolismo dos xenobióticos. Esta reação é catalisada pelo sistema enzimático monoxigenase CYP P450. O principal sistema enzimático envolvido no metabolismo dos fármacos compreende as enzimas microssomais hepáticas, em que destacam o CYP450, uma hemoproteína oxidativa e uma flavoproteína, NADPH-Citocromo C Redutase, que associadas a lipídeos, formam o sistema MFO (oxidases de função mista). Embora o fígado seja o principal sítio de metabolização dos fármacos, outros órgãos e tecidos

também podem biotransformar, a exemplo o trato gastrintestinal, os pulmões e os rins (AZERAD, 1999; WILLIANS, 2001).

As reações de fase 2, que também são conhecidas como reações de conjugação, aumentam a hidrossolubilidade através da combinação de um reagente que aumenta a solubilidade em água com o fármaco, formando um derivado altamente polar, algumas vezes chamado de conjugado. Estas reações são sínteses enzimáticas através das quais um grupo funcional, tais como álcool, fenol, amina, é mascarado pela adição de um novo grupo, por exemplo, acetil, sulfato, ácido glicurônico, ou certos aminoácidos, que aumentam a polaridade do fármaco ou do xenobiótico (WILLIANS, 2001; THOMAS, 2003).

As reações de conjugação representam provavelmente a mais importante reação de biotransformação dos xenobióticos. Somente depois das reações de conjugação ter acrescentado uma subunidade iônica hidrofílica nos xenobióticos, tais como, ácido glicurônico, sulfato ou glicina, a solubilidade em água é aumentada e a solubilidade em lipídios diminui o suficiente para tornar possível a eliminação pela urina e pela bile. A maioria das substâncias sofre reações de fase 1 e fase 2, sequencialmente (WILLIANS, 2001).

Os xenobióticos reagem com a forma ativa do ácido glicurônico, o ácido glicurônico difosfato de uridina (UDPGA), formando um conjugado glicuronídeo altamente solúvel em água. Essa reação é catalisada pelas uridina difosfato glicuronil transferases (UDPG transferases) (Figura 11) (WILLIANS, 2001; THOMAS, 2003).

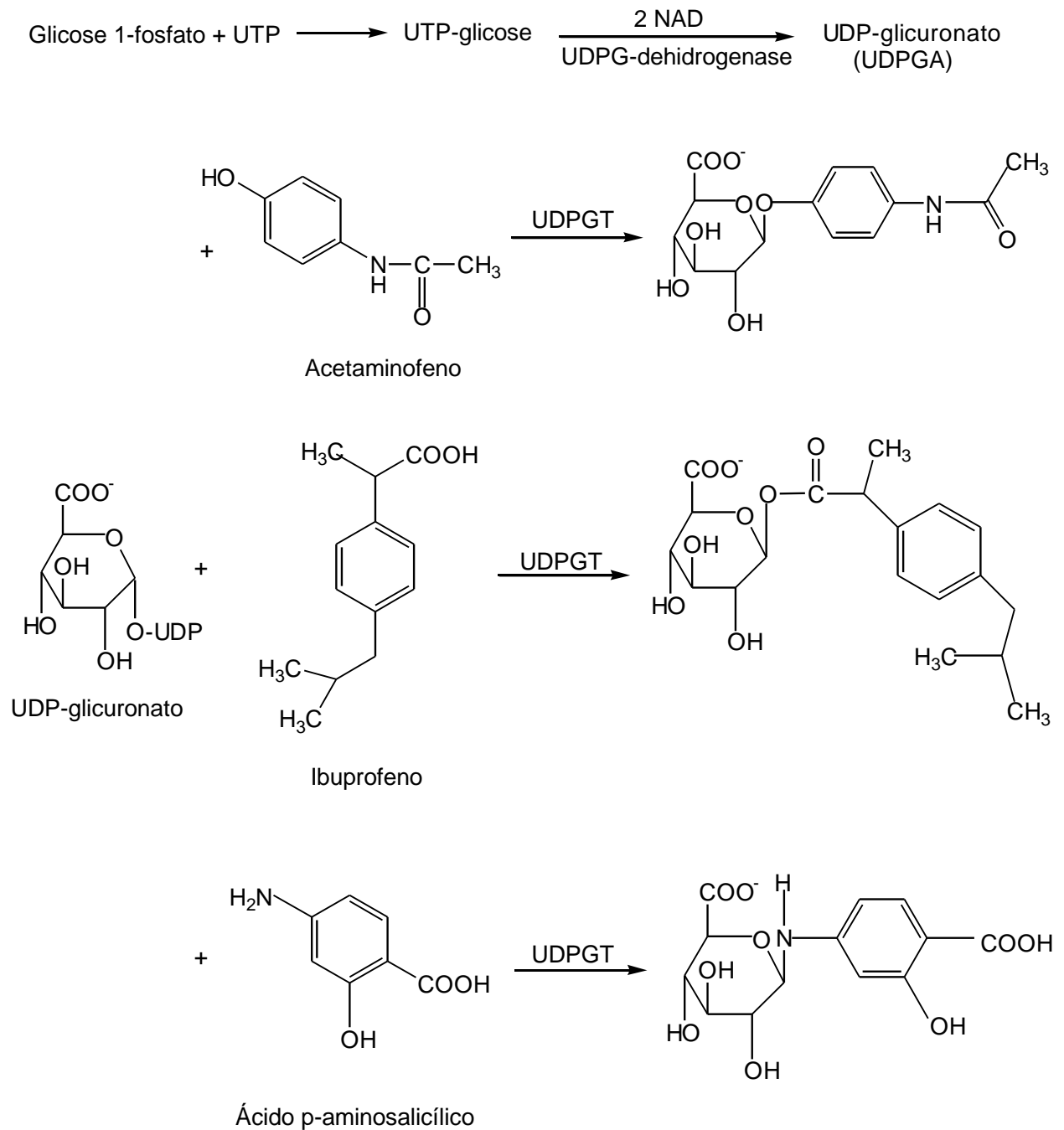


Figura 11. Via glicuronidação catalisada por UDP-glicuronosil transferases (UDPG transferases). Fonte: WILLIANS, 2001.

Para a maioria dos xenobióticos, a conjugação é um mecanismo de detoxificação, porém alguns compostos formam intermediários reativos, os quais têm sido implicados em carcinogênese, reações alérgicas, e danos no tecido (WILLIANS, 2001).

1.5 METABÓLITOS

Metabólitos ativos podem ser superiores as respectivas moléculas de origem quanto a parâmetros farmacológicos, farmacocinéticos e perfis de segurança. Como resultado, uma série de metabólitos ativos têm sido desenvolvidos e comercializados como fármacos com perfis superiores em relação as suas moléculas de origem. Exemplos de metabólitos ativos desenvolvidos e comercializados como fármacos incluem acetaminofeno, oxifenbutazona, oxazepam, cetirizina (Zyrtec[®]), fexofenadina (Allegra[®]) e desloratadina (Clarinet[®]). Cada um desses fármacos proporciona um benefício específico sobre a molécula de origem e é superior em um ou mais dos parâmetros descritos acima (FURA et al., 2004).

A completa caracterização dos perfis de segurança e a elucidação das estruturas de metabólitos de novas entidades químicas muitas vezes não são concluídas até o início ou até mesmo no final do estágio de desenvolvimento do fármaco, isto pela dificuldade de detecção e caracterização de metabólitos dentro de um prazo compatível com o ritmo acelerado da descoberta do fármaco. Além disso, uma rápida síntese química de metabólitos por métodos tradicionais é muitas vezes difícil. Também é frequentemente difícil ou impossível prever se um determinado composto pode formar um metabólito farmacologicamente ativo. Por exemplo, a mesma biotransformação, a hidroxilação de cadeia lateral alquila, produz um metabólito farmacologicamente inativo de fenobarbital, ao passo que a hidroxilação na cadeia lateral alquila de flutamida leva a um metabólito que é mais ativo e duradouro do que o composto de origem. A sulfatação de minoxidil leva à formação de um metabólito farmacologicamente ativo, enquanto que a sulfatação do acetaminofeno leva a bioinativação. O metabólito 6-O-glicuronídeo da morfina é farmacologicamente ativo, enquanto a morfina 3-O-glicuronídeo não é (Figura 12) (FURA et al., 2004).

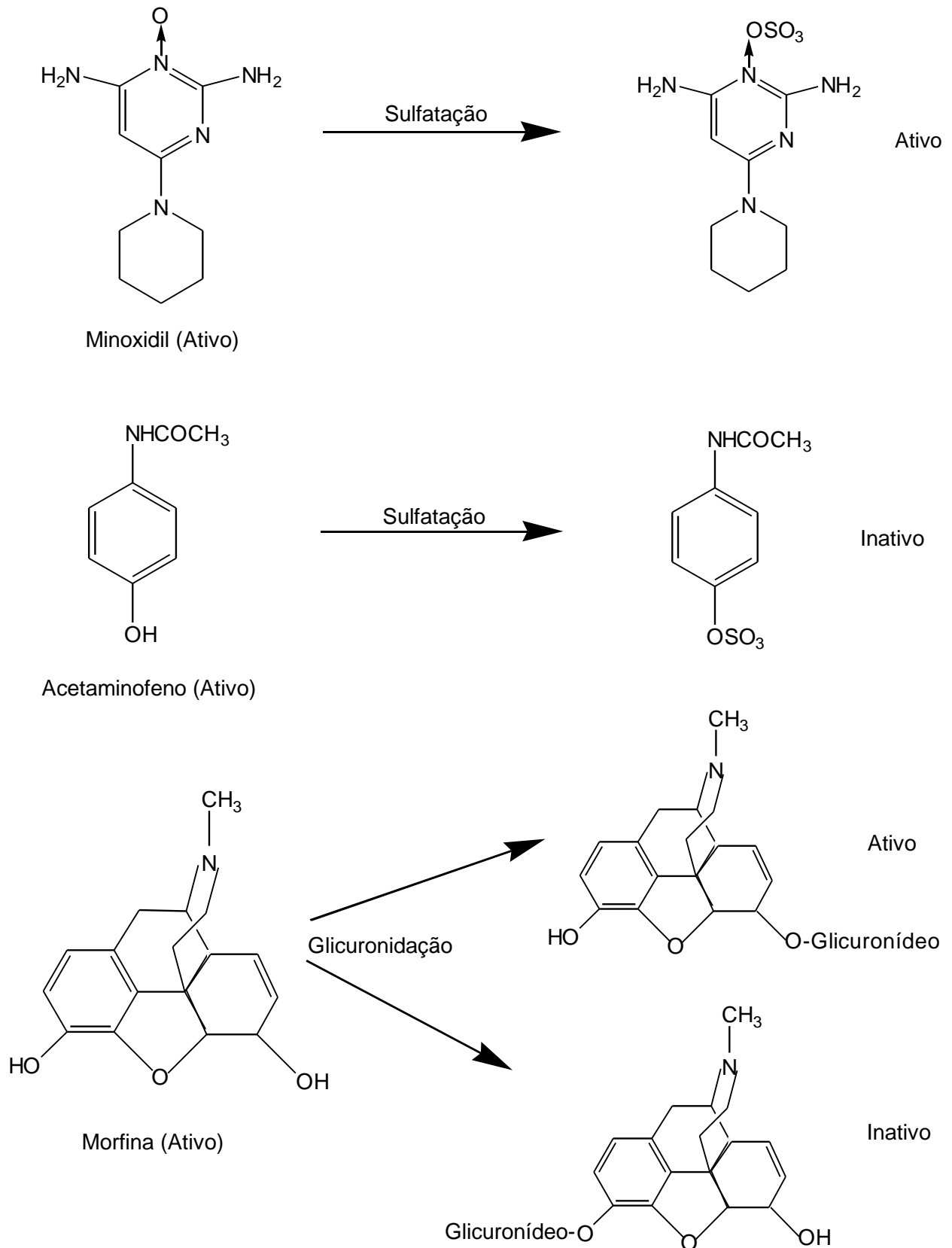


Figura 12. Exemplos de reações de biotransformações que levam a metabólitos farmacologicamente ativos ou inativos. Fonte: FURA et al., 2004.

A morfina-6-O-glicuronídeo, amplamente usada como analgésico, é um metabólito ativo da morfina possuindo atividade farmacológica superior ao composto de origem. No tratamento crônico, o perfil farmacocinético de morfina-6-O-glicuronídeo atinge concentrações plasmáticas mais elevadas que a morfina, contribuindo para uma melhor eficácia clínica. E também, demonstrou um melhor desempenho quanto ao efeito secundário, com menor incidência de náuseas e vômitos, que o fármaco de origem (RITTER, 2000; FURA et al., 2004).

Assim, os métodos experimentais são necessários para gerar, detectar e caracterizar importantes metabólitos ativos. A concentração do composto de origem normalmente é a única medição feita. Por conseguinte, não há informações sobre o número, identidade e significado farmacológico dos metabólitos que podem ter sido formados. Mesmo quando o perfil metabólico é concluído e seus metabólitos são identificados, a informação é normalmente utilizada para a síntese direta de análogos com estabilidade metabólica superior (FURA et al., 2004).

Há várias vantagens para selecionar metabólitos ativos como candidatos a novos fármacos. O processo pode levar à descoberta de um candidato apresentando melhor farmacodinâmica, farmacocinética, perfil de segurança, propriedades físico-químicas como solubilidade, entre outras. A exemplo, a desloratadina (Clarinx[®]), agora comercializada como um anti histamínico de segunda geração, é um metabólito ativo da loratadina (Claritin[®]). É aproximadamente 10 vezes mais potente, *in vivo*, em humanos do que o fármaco de origem (FURA et al., 2004; FURA, 2006).

Faz-se necessário ressaltar que dentro de uma espécie fatores biológicos como a idade, o sexo, a genética, e fatores ambientais como o estilo de vida, ou seja, dieta precária, bebidas alcoólicas, tabagismo, automedicação, abuso de drogas, afetam o metabolismo dos fármacos (THOMAS, 2003; BARREIRO & FRAGA, 2008).

1.6 PARKINSONISMO

O Parkinsonismo é uma síndrome clínica denominada por quatro sinais cardeais: tremor, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural. As manifestações menos proeminentes relacionam-se com o humor e o intelecto, função anatômica e sistema

sensorial. Dentre os distúrbios não motores na Doença de Parkinson, podemos citar as seguintes manifestações (JANKOVIC, 2005):

Anormalidades neurocomportamentais:

Alterações na personalidade (apatia, falta de confiança, medo excessivo, ansiedade, abstinência social, dependência);

Demência (desorientação espacial, paranóia, psicose, alucinações);

Bradifrenia (lento processo de pensamento, perda de concentração, dificuldade na formação de conceitos);

Depressão;

Distúrbio do sono;

Disfunção sexual;

Efeitos colaterais psiquiátricos do tratamento.

Outras manifestações não motoras:

Disfunção autonômica (hipotensão ortostática, desregulação respiratória, vermelhidão, constipação, disfunções esfinteriana e sexual);

Sintomas sensoriais (parestesias, dores, acatisia, disfunções visual, olfativa e vestibular);

Seborréia, fadiga, perda de peso.

A média de idade do início dos sintomas é de 55 anos, com cerca de 1% das pessoas com 60 anos ou mais apresentando a doença. Os homens são afetados mais frequentemente que as mulheres em uma relação de 3:2 (JANKOVIC, 2005).

A concentração normalmente elevada de dopamina nos gânglios da base do cérebro encontra-se reduzida no parkinsonismo, e as tentativas farmacológicas de restaurar a atividade dopaminérgica com levodopa e com agonistas dopaminérgicos foram bem sucedidas no alívio de muitas das manifestações clínicas da doença (AMINOFF, 2003).

Foram identificados pelo menos dois subtipos principais da doença de Parkinson: um subtipo é caracterizado pelo tremor como característica parkinsoniana, e outro é dominado pela instabilidade postural e pela dificuldade na marcha. Vários outros distúrbios além da doença de Parkinson podem causar pelo menos parte da

síndrome parkinsoniana, e podem ser distinguidos clinicamente pela presença de achados atípicos, ausência ou paucidade do tremor e pobre resposta a levodopa (JANKOVIC, 2005).

As causas da Síndrome Parkinsoniana podem ser (JANKOVIC, 2005):

Parkinsonismo Primário (Idiopático):

Doença de Parkinson;

Parkinsonismo juvenil.

Parkinsonismo Secundário (Adquirido, Sintomático):

Infecioso: pós-encefálico, vírus lento;

Fármacos: neurolépticos, reserpina, lítio, flunarizina, cinarizina;

Toxinas: metanol, etanol, CO;

Vascular: multiinfarto, choque hipotensivo;

Trauma;

Outros: anormalidades paratireoideanas, hipotireoidismo, degeneração hepatocerebral, tumor cerebral.

Parkinsonismo heredodegenerativo:

Doença de Wilson;

Doença do corpúsculo de Lewy autossômica dominante;

Neuroacantocitose;

Parkinsonismo familiar com neuropatia periférica.

Degeneração de Múltiplos Sistemas (Parkinsonismo-Plus):

Paralisia supranuclear progressiva;

Atrofia de múltiplos sistemas;

Degeneração nigroestriada;

Doença de Alzheimer.

1.7 DOENÇA DE PARKINSON

Embora várias hipóteses estejam sendo atualmente investigadas, a causa da doença de Parkinson (DP) é ainda desconhecida, podendo ocorrer após isquemia cerebral, encefalite viral ou induzida por fármacos, sendo os principais fármacos envolvidos os que reduzem a quantidade de dopamina no cérebro (reserpina), ou que bloqueiam os receptores de dopamina (fármacos antipsicóticos, como a clorpromazina) (RANG et al., 2004; JANKOVIC, 2005; RAUTIO et al., 2010).

Os sinais mais típicos da doença de Parkinson são a perda neuronal com despigmentação da substância negra e a presença de corpúsculos de Lewy, que são inclusões eosinofílicas citoplasmáticas nos neurônios consistindo em agregados de proteínas normais e anormais. Pelo menos uma perda de 60% dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e o mesmo grau de depleção de dopamina no estriado tem de aparecer antes que os sintomas clínicos da doença de Parkinson se tornem evidentes (RANG et al., 2004; JANKOVIC, 2005; RAUTIO et al., 2010).

Os sintomas motores resultam principalmente da degeneração da via nigroestriada, que provoca deficiência de dopamina; alguns sintomas neurocomportamentais e deficiências cognitivas têm sido atribuídos à degeneração das vias dopaminérgicas mesocorticais e mesolímbicas; a disfunção autonômica associada pode ser causada pela depleção de dopamina no hipotálamo e pela neurodegeneração de alguns núcleos do tronco cerebral. O comprometimento de outros neurotransmissores pode ser responsável por alguns dos achados associados, como a degeneração do *locus cerules* noradrenérgico pode contribuir para alguns dos sintomas autonômicos e pela depressão, e a degeneração do núcleo basal colinérgico se relaciona provavelmente com a demência que compromete eventualmente um terço dos pacientes com doença de Parkinson (JANKOVIC, 2005).

O tratamento da DP envolve administração oral de levodopa, um precursor da dopamina, combinado com um inibidor de DOPA decarboxilase, tais como carbidopa, para inibir a descarboxilação de levodopa na periferia. Durante esse tratamento, catecol-O-metiltransferase (COMT) passa a ser a principal enzima para metabolizar levodopa (RAUTIO et al., 2010).

Porém, a levodopa é degradada pela enzima COMT no sistema nervoso periférico, resultando em discinesias e oscilações motoras. A inibição da atividade da COMT pode prolongar a ação do levodopa e diminuir as oscilações na resposta. A

entacapona, um seletivo e reversível inibidor da COMT, é amplamente utilizada como complemento levodopa/inibidor DOPA descarboxilase no tratamento da doença de Parkinson. Ela reforça a absorção e reduz o metabolismo periférico da levodopa, levando a uma maior disponibilidade do fármaco no cérebro (SAVOLAINEN et al., 2000; YADAV et al., 2009).

A COMT é uma enzima amplamente distribuída encontrada em tecidos neuronais e não neuronais; sendo encontrada principalmente no citosol das células hepáticas e renais, bem como nas células cromafins (Figura 13) (RANG et al., 2004; O'CONNOR, 2005).

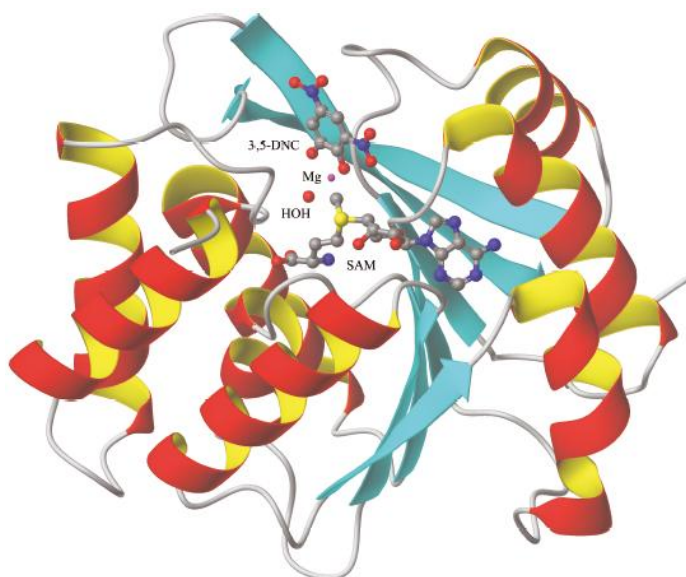


Figura 13- Representação esquemática da estrutura tridimensional da COMT. A S-adenosil-L-metionina-co-substrato (SAM), o inibidor 3,5-dinitrocatecol (3,5-DNC), os íons de magnésio, e as moléculas de água coordenadas são representados. Fonte: CHEM4513, 2010.

A COMT adiciona um grupo metila a um dos oxigênios hidroxílicos nos anéis diidroxifenil das catecolaminas, produzindo metanefrina (metoxiepinefrina a partir de epinefrina), normetanefrina (metoxinorepinefrina a partir de norepinefrina) ou metoxitiramina (a partir de dopamina) (RANG et al., 2004; O'CONNOR, 2005).

A seguir, as metanefrinas podem ser desaminadas pela MAO, produzindo ácido vanililmandélico (VMA), enquanto a desaminação da metoxitiramina pela MAO resulta

na formação do ácido homovanílico. Por conseguinte, a degradação enzimática completa das catecolaminas a VMA (a partir da epinefrina ou norepinefrina) ou ácido homovanílico (a partir da dopamina) envolve a ação sequencial de duas enzimas (MAO e COMT), que podem iniciar o processo, seguido de uma etapa da álcool desidrogenase no fígado (O'CONNOR, 2005).

Na corrente sanguínea, as catecolaminas apresentam meia-vida muito curta, da ordem de um a dois minutos, são depuradas da circulação em grande parte por captação neuronal, mas também estão sujeitas à excreção renal direta ou a sulfoconjugação no trato gastrointestinal (O'CONNOR, 2005).

1.8 INIBIDORES DA COMT: TOLCAPONA E ENTACAPONA

A inibição da dopa descarboxilase está associada à ativação compensatória de outras vias do metabolismo da levodopa, especialmente a COMT, aumentando os níveis plasmáticos de 3-O-metildopa (3OMD). A presença de níveis elevados de 3OMD tem sido associada a uma resposta terapêutica deficiente à levodopa, talvez, pelo fato da 3OMD competir com a levodopa por um mecanismo transportador ativo, que controla seu transporte através da mucosa intestinal e da barreira hematoencefálica (LEHTONEN et al., 1999_{a,b}; MANNISTO & KAAKKOLA, 1999; KAAKKOLA, 2000; AMINOFF, 2003; FORSBERG et al., 2005;).

Os inibidores seletivos da COMT, como tolcapona e entacapona, prolongam a duração da levodopa ao diminuir o seu metabolismo periférico. Logo, a depuração de levodopa encontra-se diminuída, com consequente aumento na sua biodisponibilidade relativa. Em geral, prefere-se o uso de entacapona ao uso de tolcapona, visto que entacapona não tem sido associada à hepatotoxicidade (AMINOFF, 2003).

1.9 ENTACAPONA

1.9.1 Fórmula estrutural e Mecanismo de ação

A entacapona ($C_{14}H_{15}N_3O_5$) - (*E*)-2-ciano-N,N-dietil-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil) acrilamida, cuja massa molecular é 305,3 (Figura 14) (MOFFAT et al., 2004), é um potente, seletivo e reversível inibidor da COMT, IC_{50} (MERELLO et al., 1994; NISSINEM et al., 1997; KESKI-HYNNILA et al., 2001;).

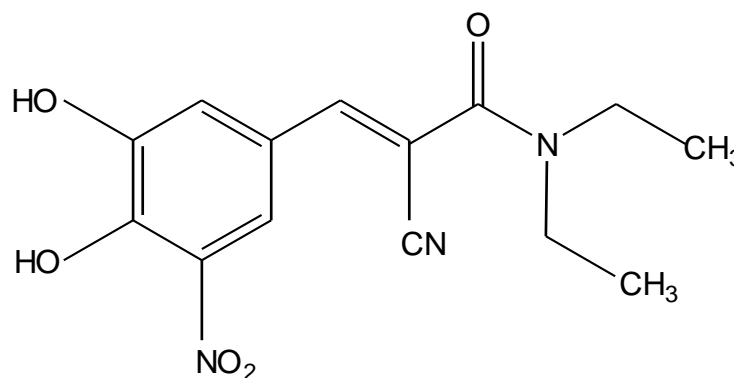
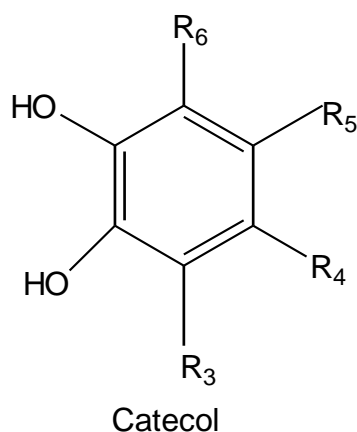


Figura 14. Fórmula estrutural da entacapona ($C_{14}H_{15}N_3O_5$) - (*E*)-2-ciano-N,N-dietil-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil) acrilamida.

Foi aprovado na União Europeia como adjuvante para as preparações padrão de levodopa/benserazida e levodopa/carbidopa para utilização em pacientes com doença de Parkinson. Foi sugerido que a ação benéfica acrescentando a entacapona na terapia padrão é baseada numa maior biodisponibilidade do levodopa (LEHTONEM et al., 1999_a). Levodopa, o fármaco mais comumente utilizado em doença de Parkinson, é fortemente inativado pela COMT, então a adição de entacapona no esquema terapêutico diminui a perda metabólica da levodopa para 3-O-metildopa, aumentando a quantidade de levodopa disponível no cérebro (LEPPANEN et al., 2000; KESKI-HYNNILA et al., 2001; LEPPANEN et al., 2001).

A enzima COMT catalisa a transferência do grupo metil da S-adenosil-L-metionina para o grupo de substratos fenólicos que contenham uma estrutura catecol.

Substratos fisiológicos da COMT incluem dopa, catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina) e seus metabólitos hidroxilados. Esta enzima é importante na eliminação de catecóis biologicamente ativos e alguns outros metabólitos hidroxilados, ou seja, na inativação extraneuronal das catecolaminas, e em fármacos com estruturas catecol (Figura 15) (RANG et al., 2004; O'CONNOR, 2005; MUKARRAM, et al., 2007).



Entacapona:

R₃: NO₂

R₅: CH=C(CN)CON(CH₂CH₃)₂

Carbidopa:

R₄: CH₂C(NHNH₂)(CH₃)COOH

L-dopa:

R₄: CH₂CH(NH₂)COOH

Dopamina:

R₄: CH₂CH₂NH₂

Figura 15. Estrutura catecol de fármacos: Entacapona, Carbidopa, Levodopa e Dopamina.

Na presença de um inibidor da descarboxilase, COMT passa a ser a principal enzima de metabolização de levodopa, que catalisa o metabolismo de 3-metoxi-4-hidroxi-L-fenilalanina (3-OMD) no cérebro e na periferia. Está presente na maioria dos tecidos, em ambos sistema nervoso central e periférico. A mais alta atividade é encontrada no fígado, intestino e rins (MUKARRAM, et al., 2007).

1.9.2 Farmacocinética

A presença de grupo nitro na posição *orto* do grupo hidroxila é crítico para potência da entacapona e para a capacidade em inibir a COMT. É rapidamente absorvida após a administração oral com biodisponibilidade de 35%, secundário ao “clearance” de primeira passagem, e quase completamente metabolizado antes da extração (0,1–0,2% da dose inalterada na urina). O fármaco apresenta um perfil farmacocinético linear ao longo da média de dose de 5–800 mg. Entacapona é 98% ligado a proteínas plasmáticas *in vitro*, principalmente a albumina na concentração de 0,4–50 µg/mL (YADAV et al., 2009).

É um ácido fraco (pKa 4,5) e é, portanto, ionizado no pH do intestino delgado. Em geral, as moléculas que tenham um grupo ionizável são melhores absorvidas através da parede intestinal do que quando estão em uma forma não ionizada. Por outro lado, sendo um ácido fraco, a solubilidade aquosa da entacapona diminui com o pH diminuído, e assim a baixa solubilidade da entacapona em pH baixo pode dificultar a sua absorção no estômago (SAVOLAINEN et al., 2000).

Leppanen et al. fizeram um estudo propondo sintetizar um fosfato éster de entacapona, a fim de aumentar a solubilidade aquosa e a velocidade de dissolução. O fosfato éster 2 foi suposto para ser enzimaticamente hidrolisado por fosfato esterases e assim servir como um pró-fármaco de entacapona (Figura 16) (LEPPANEN et al., 2000).

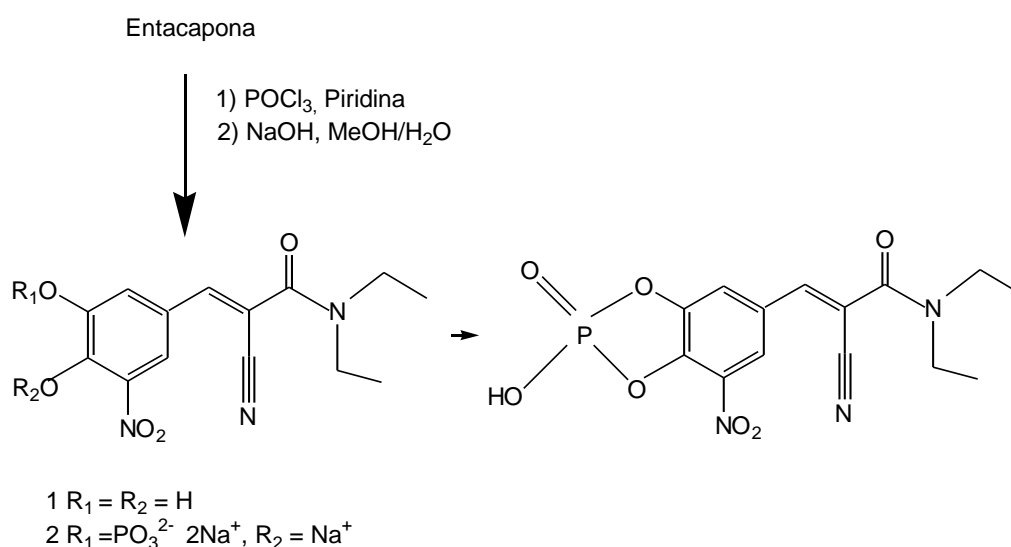


Figura 16. Síntese de monofosfato da entacapona. Fonte: LEPPANEN et al., 2000.

Foi desenvolvido recentemente um método de Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar para a separação do 3-*O*-glicuronídeos de entacapona e seu (*Z*)-isômero (Figura 17). Estes glicuronídeos são os dois principais metabólitos urinários da entacapona em seres humanos (LEHTONEN et al., 1999_a).

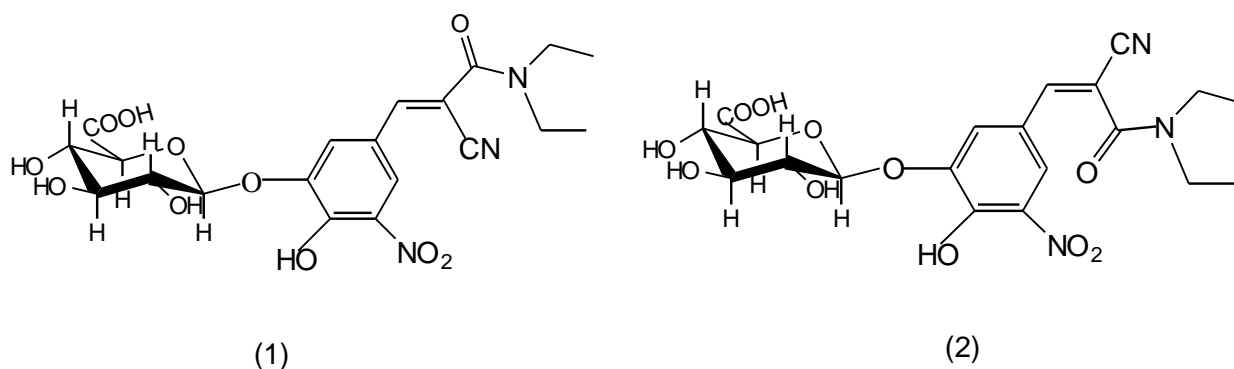


Figura 17. Estrutura do glicuronídeo da entacapona (1) e de seu (*Z*) Isômero (2). Fonte: LEHTONEN et al., 1999_a.

Wikberg et al. (1993) identificaram quatro metabólitos da entacapona em seres humanos e oito metabólitos em urina de rato. Os glicuronídeos da entacapona (70%) e seu (*Z*)-isômero (25%) foram os principais metabólitos urinários formados. O (*Z*)-isômero de entacapona e dois menos abundantes metabólitos urinários foram obtidos pela redução da cadeia lateral carbono-carbono da dupla ligação. O (*Z*)-isômero foi encontrado somente na fase 1 do metabolismo em adição da entacapona no plasma humano (YADAV et al., 2009).

Poucos métodos bioanalíticos são relatados para a separação e quantificação do (*E*)- e (*Z*)-isômeros da entacapona em matrizes biológicas (Figura 18). Keski-Hynnily et al., 1998, 2000 e 2001, relataram a análise do tipo nitrocatecol-glicuronídeos em amostras de urina por CLAE-EM e eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa respectivamente. O limite de detecção de 3-*O*-glicuronídeos da (*E*)-entacapona e (*Z*)-entacapona em ambos os métodos foi de 100 ng/mL. Em outro método eles descreveram a quantificação de glicuronídeos da entacapona e isômeros em plasma de rato por CLAE-EM. A separação cromatográfica foi atingida em um tempo de corrida de 20 minutos e a quantificação foi possível em uma extensa faixa de 0,0025–100 µg/mL (YADAV et al., 2009) .

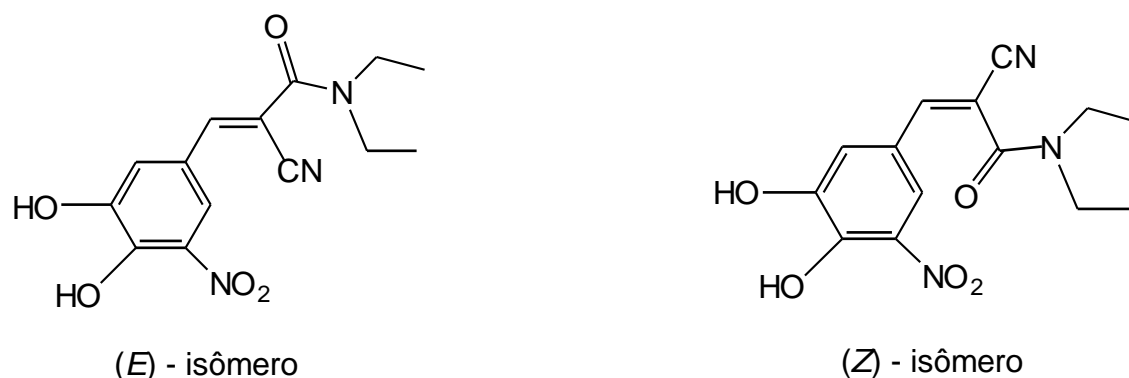


Figura 18. Fórmula estrutural do (E)-isômero e do (Z)-isômero da entacapona. Fonte: SANMARTI et al., 2008.

Dois métodos baseados na cromatografia capilar eletrocinética micelar foram desenvolvidos por Lehtonen et al. para a separação de dois principais metabólitos urinários da entacapona em seres humanos. O eletrograma em ambos os métodos requerem 18 minutos para completa resolução do 3-O-glicuronídeo isômeros (*E* e *Z*) da entacapona. O limite de quantificação foi de 2 µg/mL para ambos os analitos e o ensaio foi linear no intervalo de 2–100 µg/mL e 2–150 µg/mL, respectivamente (LEHTONEN et al., 1999_{a,b}; YADAV et al., 2009).

Ramakrishna et al., 2005, desenvolveram um método seletivo para quantificação de (*E*)-entacapona em plasma humano por CLAE-UV. E Karlsson e Wikberg, 1992, apresentaram um método fase reversa de CLAE com detecção amperométrica para analisar entacapona e seu *Z*-isômero em urina e plasma humano (YADAV et al., 2009).

2. OBJETIVOS

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa a biossíntese de novos compostos biologicamente ativos e considerando a importância da glicose na funcionalização de fármacos ativos no SNC, objetivamos neste trabalho:

- Selecionar fungos filamentosos para bioconversão da entacapona;
- Identificar, purificar e caracterizar os derivados formados pela bioconversão da entacapona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da bioconversão da entacaponina foram utilizadas cepas de fungos filamentosos mantidas no Laboratório de Bioconversão (LABIOCON) da Faculdade de Farmácia – UFG, obtidas da coleção ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, e uma delas sendo isolada do Cerrado pertencente ao gênero *Beauveria*.

As cepas de fungos filamentosos utilizadas foram:

Absidia blakesleeana ATCC 26617

Aspergillus candidus ATCC 1009

Beauveria bassiana ATCC 7159

Beauveria sp

Cunninghamella echinulata ATCC 9244

Cunninghamella echinulata ATCC 9245

Cunninghamella elegans ATCC 26169

Rhizopus arrhizus ATCC 11145

3.1 SUBSTRATO

O substrato utilizado neste estudo foi a entacaponina, procedência Synfine Research, lote A-1215-135, validade junho/2010.

3.2 MICRORGANISMO

Os microrganismos utilizados na bioconversão da entacaponina foram *Absidia blakesleeana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 26169, *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 e *Beauveria* sp.

3.3 MEIOS DE CULTURA

3.3.1 Meio Sólido Ágar Batata Modificado

Para o preparo do meio de manutenção das cepas foram dissolvidos 39 g de ágar glicose batata (marca Merck, lote VM190530350), 5 g de extrato de malte (marca BD, lote 7159036), 5 g de extrato de levedura (marca BD, lote 7116730), 5 g de bacto peptona (marca BD, lote 7344708) em quantidade suficiente para 1000 mL de água destilada (KONEMAN et al., 2001; DIAS et al., 2005; NUNES, 2008).

Foram transferidos 5 mL do meio para tubos de vidro, com tampa de rosca e autoclavados por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

Após resfriar, os tubos foram mantidos inclinados à temperatura ambiente até a completa solidificação dos meios e armazenados em geladeira a 4 °C, para posterior repique e manutenção da cepa.

3.3.2 Meio Líquido PDSM

Para o preparo do meio líquido PDSM foram pesados 5 g de peptona bacteriológica (marca BD, lote 7344708), 5 g de fosfato de potássio monobásico (marca Synth, lote 71753), 5 g de cloreto de sódio (marca Vetec, lote 802040), 20 g de dextrose (glicose, marca Synth, lote 105435), 5 g de extrato de levedura (marca BD, lote 7116730) e dissolvidos em quantidade suficiente para 1000 mL de água destilada (KONEMAN et al., 2001; DIAS et al., 2005; NUNES, 2008).

Foram distribuídos 100 mL do meio em 10 frascos Erlenmeyers de vidro de 250 mL, de boca larga, e autoclavados à 121°C e 1 atm por 15 minutos.

3.4 MANUTENÇÃO E REPIQUE DAS CEPAS

Para o repique dos microrganismos no ágar batata modificado, após 7 dias de incubação a 25°C em incubadora BOD, foi realizada uma suspensão dos esporos com glicerina a 25%. Depois foi acrescentado 1 gota desta suspensão de esporos no meio líquido PDSM. Em seguida os Erlenmeyers foram submetidos à incubação de 72 horas em incubador rotativo Tecnal, a 27°C, sob agitação de 200 rpm.

3.5 TRIAGEM

Foi realizada uma triagem com as cepas para avaliar a capacidade delas em bioconverter a entacaona.

A metodologia aplicada para o desenvolvimento da bioconversão foi à seguinte (Figura 19):

Cultivo em meio sólido – Ágar batata modificado

Incubação por 7 dias a 26°C

Cultivo em meio líquido PDSM

Incubação por 72 horas com agitação a 27°C / 200 rpm

Adição do substrato, 50 mg – entacaona – o substrato foi dissolvido em etanol : dimetilformamida, 1:1, 2 mL foram acrescentados em cada Erlenmeyer.

Coleta das amostras de 24 em 24 horas: 24, 48, 72 e 96 horas

Término da incubação

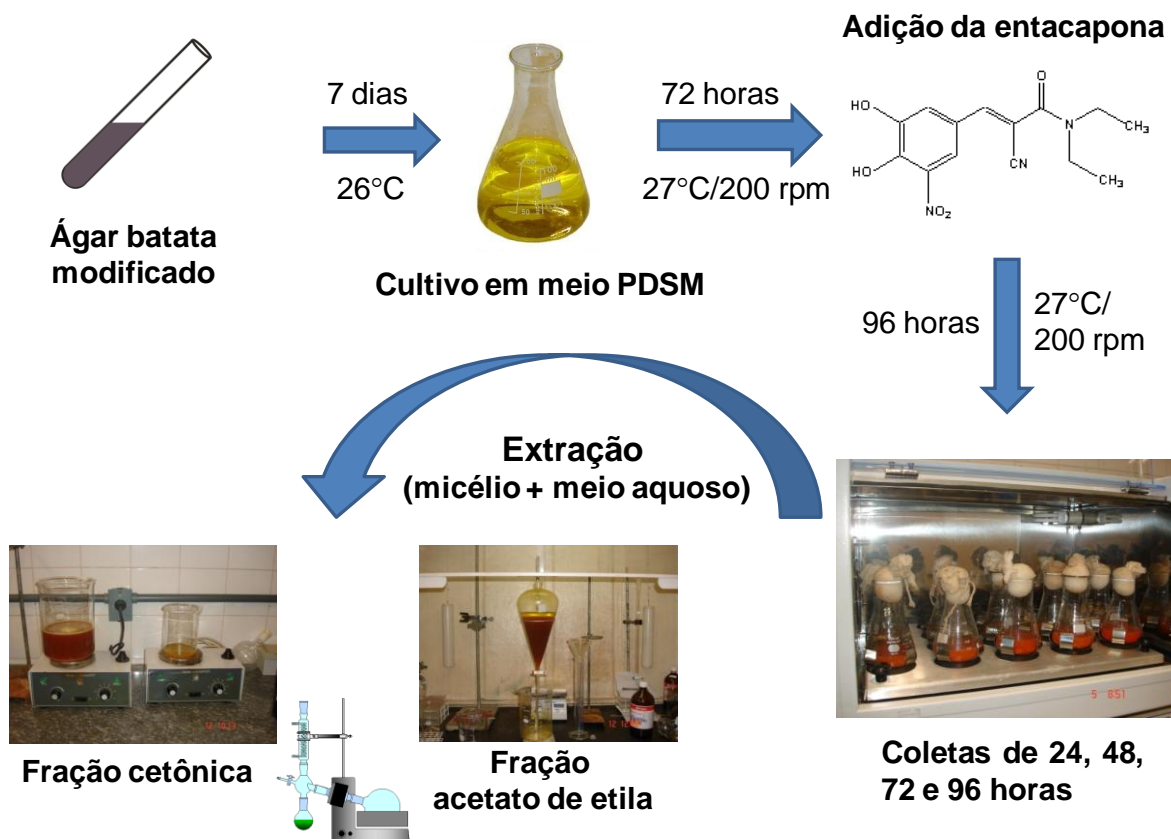


Figura 19. Metodologia aplicada para o desenvolvimento da bioconversão da entacapona, LABIOCON-FF-UFG.

Foram utilizados 2 Erlenmeyers de 250 mL para cada cepa. Foram coletadas amostras para branco: branco 1 (meio líquido PDSM), branco 2 de cada cepa (meio líquido PDSM + microrganismo), branco 3 (meio líquido PDSM + substrato), e amostras para cada cepa (meio líquido PDSM + microrganismo + entacapona). As amostras foram congeladas para posterior análise por CCD.

As condições foram padronizadas pelo Laboratório de Bioconversão (LABIOCON) da Faculdade de Farmácia – UFG.

3.6 FILTRAÇÃO E EXTRAÇÃO

As incubações foram interrompidas para a filtração e extração dos metabólitos formados após 96 horas de cultivo a 27°C, 200 rpm.

Os 16 frascos Erlenmeyers foram filtrados à vácuo, utilizando Kitasato e funil de Buchner coberto por gases, tipo queijo, em cruces.

Na extração fração Acetato de Etila, o filtrado obtido foi saturado com cloreto de sódio e a fase líquida supersaturada foi filtrada sob vácuo em funil de Buchner preparado com papel de filtro e uma camada de celite umedecida com água destilada. O filtrado foi transferido para funil de separação e extraído com 3 porções de acetato de etila (200 mL em cada extração) sob agitação mecânica manual, resultando em uma fração aquosa e uma fração acetato de etila. Foi adicionado sulfato de magnésio anidro e deixou-se decantar por 24 horas para absorver a água. A solução resultante foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº4 e depois rotaevaporada sob vácuo.

Na fração cetônica, os micélios retidos nas gases foram extraídos com acetona sob agitação constante (agitador magnético + barra magnética) por 1 hora. A massa fúngica foi filtrada em funil de vidro com papel de filtro usando acetona. A solução resultante foi rotaevaporada sob vácuo.

3.7 MONITORAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS DERIVADOS DA ENTACAPONA

3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD foi empregada durante o monitoramento das reações de bioconversão e na avaliação qualitativa dos prováveis derivados formados.

As amostras de 24, 48, 72 e 96 horas, à temperatura ambiente, foram saturadas com cloreto de sódio e extraídas com acetato de etila. As frações acetato de etila resultantes de cada cepa foram submetidas à análise por CCD.

Para a análise por CCD foi utilizada como fase estacionária cromatoplaquetas de alumínio preenchidas com sílica gel 60 F₂₅₄ e foram testadas as seguintes fases móveis: acetato de etila : metanol (95 : 5) e acetato de etila : metanol (70 : 30).

As placas cromatográficas foram reveladas em atmosfera de iodo, seguida pela determinação dos valores de R_f, calculando a distância percorrida no centro da mancha pela distância percorrida pelo solvente (AQUINO NETO et al., 2003).

3.7.2 Cromatografia em Coluna

A Cromatografia por adsorção em coluna de vidro, ou seja, a cromatografia líquido-sólido (JEFFERY et al.,1992) foi utilizada para separar os metabólitos encontrados no monitoramento por CCD.

Para a Cromatografia em coluna foram utilizadas: coluna de vidro de 35 cm de comprimento, 1,5 cm de diâmetro, 30 g de fase estacionária sílica gel Vetec, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh), proporção 1 g extrato bruto : 40 g de sílica, fase móvel acetato de etila: metanol, na proporção 70:30, temperatura ambiente. No preparo da pastilha foi utilizado o extrato bruto (fração acetato de etila) e sílica.

Foram coletadas alíquotas de aproximadamente 10 mL em tubos de ensaio, numerados de 1 a 50. Na CCD foi utilizada como fase estacionária cromatoplasmas de alumínio preenchidas com sílica gel 60 F₂₅₄ e a fase móvel utilizada foi acetato de etila : metanol, proporção 70 : 30. As cromatoplasmas foram reveladas em atmosfera de iodo.

As soluções resultantes dos tubos de ensaio foram separadas em balão de fundo redondo conforme a intensidade da mancha e os valores de R_f encontrados, depois foram rotaevaporadas sob vácuo.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DA ENTACAPONA

3.8.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C) e Hidrogênio (RMN ¹H)

Para caracterização da entacapona e do derivado I da entacapona foi utilizado o equipamento Bruker Avance III 11,75 T (500 MHz ¹H), sonda TBI de 5 mm.

Os espectros de RMN via HR-MAS foram obtidos no Laboratório de RMN do IQ/UFG no espectrômetro Bruker Avance III – AV500 de 11.75 Teslas, operando a 500 MHz (frequência do hidrogênio) equipado com os seguintes acessórios: TBI (Sonda multinuclear para tubo de 5 mm de diâmetro com detecção inversa e gradiente de campo no eixo z.); BBO (Sonda multinuclear para tubo de 5mm de diâmetro com

detecção direta e gradiente de campo no eixo z.); HR-MAS (Sonda HR-MAS de 4 mm com detecção inversa e gradiente de campo na direção z.); MAS (Sonda CP-MAS, multinuclear de 4mm, para análise de sólidos).

O solvente deuterado utilizado para a preparação da amostra foi Metanol-D4 (99,8%), DLM 24-50, CAS 811-98-3, lote 8C-105, Fabricante CIL (Cambridge Isotope Laboratories).

3.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM).

As análises da CLAE-EM/EM foram realizadas em um Varian 1200L triplo quadrupolo EM/EM. Todos os experimentos foram conduzidos no modo negativo (ESI-). As condições cromatográficas foram otimizadas em uma coluna ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) SB-C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) a fim de descobrir a proporção da mistura de diastereoisômero.

As condições reacionais foram: Solvente A: Água, 10 mM formiato de amônio, pH 4.3; Solvente B: Acetonitrila; Fluxo: 0.4 mL/min; Gradiente: 0 min–9 min, 0 %B; 9 min–11 min, 25 %B; Tempo de corrida: 11 min; Intervalo de injeção: 5 min; Volume de injeção: 1 μL de amostra.

Para caracterizar as estruturas dos compostos foram realizadas infusões com uma bomba mantendo o fluxo na seringa de 20 μL/min. Foram feitas varreduras de massas de 50-700 Da. Foram testados os modos de ionização positivo e negativo. Os íons de interesse foram selecionados e foi realizada uma quebra com energia potencial no cone de 30 Volts. Os íons filhos foram analisados e as estruturas foram elucidadas.

3.8.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

As análises foram realizadas por transmissão, em equipamento FTIR espectro 400 da Perkin Elmer, na região IV médio de 400 – 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ fazendo 12 varreduras.

No preparo da amostra foi utilizado brometo de potássio (KBr) na proporção de 1%.

3.9 PONTO DE FUSÃO

Para a determinação do ponto de fusão da entacapona e do derivado I da entacapona foi utilizado o equipamento GEHAKA PF 1500.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOCONVERSÃO DA ENTACAPONA

Os derivados formados na fração acetato de etila a partir da bioconversão da entacapona pelas cepas *Absidia blakesleeana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Beauveria sp*, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 e *Rhizopus arrhizuz* ATCC 11145 foram monitorados por CCD, a fase móvel escolhida foi acetato de etila : metanol na proporção 70 : 30. Na fração cetônica não houve formação de metabólitos.

As cepas dos fungos filamentosos *Absidia blakesleeana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria sp*, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 e *Rhizopus arrhizuz* ATCC 11145 foram eficazes na transformação da entacapona e formaram metabólitos, denominados metabólito I para a cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, metabólito II para *Beauveria sp*, metabólito III para *Rhizopus arrhizuz* ATCC 11145, metabólito IV para *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, e metabólito V para *Absidia blakesleeana* ATCC 26617 e *Aspergillus candidus* ATCC 1009. Os metabólitos da entacapona formados foram separados pelos valores de Rf e intensidade de coloração da mancha (Tabela 1).

Tabela 1. Bioconversão da entacapona por cepas de fungos filamentosos.

| Microrganismos | Metabólitos (Rf) | | | | |
|--|------------------|------------|-------------|------------|-----------|
| | I 0,40 | II 0,44 | III 0,54 | IV 0,57 | V 0,66 |
| <i>Absidia blakesleeana</i> ATCC 26617 | - | - | - | - | + |
| <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 1009 | - | - | - | - | + |
| <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 | - | - | - | - | - |
| <i>Beauveria sp</i> | - | ++ | - | - | - |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 | - | - | - | ++ | - |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245 | +++++ | - | - | - | - |
| <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169 | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizopus arrhizuz</i> ATCC 11145 | - | - | + | - | - |

Legenda: Quantidade relativa dos metabólitos (I, II, III, IV e V) formados após 96 horas de incubação a 27°C, 200 rpm e monitorados por CCD, com os respectivos Fatores de Retenção e intensidade de coloração da mancha: + baixa; ++ média; +++++ alta intensidade.

Com o objetivo de elucidar a estrutura química dos metabólitos foi realizada uma extração com o “pool” das misturas reacionais dos microrganismos: *Absidia blakesleeana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Beauveria sp*, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 e *Rhizopus arrhizuz* ATCC 11145. Para a separação dos metabólitos foi utilizada a cromatografia de adsorção em coluna de vidro. Após determinação dos valores de Rf foram encontrados metabólitos da entacaponina nos tubos 9 e 10 (Rf 0,61), 12 a 16 (Rf 0,41 e 0,61), 17 a 26 (Rf 0,41) (tabela 2).

Tabela 2. Bioconversão da entacaponina resultante do “pool” das misturas reacionais dos microrganismos.

| Tubos de ensaio | Metabólitos (Rf) | |
|-----------------|------------------|------|
| | I | |
| | 0,41 | 0,61 |
| 9 e 10 | - | + |
| 12 a 16 | +++++ | + |
| 17 a 20 | +++++ | - |
| 24 a 26 | +++++ | - |

Legenda: Quantidade relativa dos metabólitos formados nas alíquotas coletadas da cromatografia de adsorção em coluna, em tubos de ensaio numerados de 1 a 50 e monitoradas por CCD. Com os respectivos Fatores de Retenção e intensidade de coloração da mancha: + baixa; ++ média; +++++ alta intensidade.

Os metabólitos da entacaponina monitorados por CCD foram comparados com os metabólitos separados por cromatografia de adsorção em coluna de vidro, quanto aos parâmetros valores de Rf e intensidade da coloração da mancha.

Após análise minuciosa dos valores de Rf encontrados para os derivados I, II, III, IV e V, observou-se que o valor de Rf do derivado I, majoritário, da entacaponina (Rf 0,40) formado a partir da cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 foi compatível com o valor de Rf separado no “pool” das misturas reacionais dos microrganismos, tubos 17 a 26 (Rf 0,41) e está isolado em uma única mancha cromatográfica, o peso do extrato formado foi de 111,4 mg, rendimento 18,1% (Figura 20).

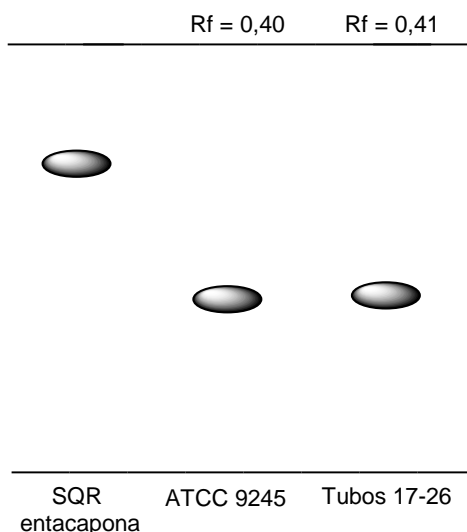


Figura 20. CCD do derivado I formado a partir da cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 e dos tubos 17 a 26.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

A estrutura de uma molécula é a base para compreensão de mecanismos, previsão de propriedades físicas e organização dos conhecimentos sobre reatividade e atividade biológica. Embora existam outros métodos para determinar a estrutura de uma molécula, tais como confirmação por uma síntese independente ou correlação com materiais conhecidos, as ferramentas espectroscópicas são normalmente mais práticas (SOLOMONS & FRYHLE, 2001; LOPES & FASCIO, 2004). O derivado I obtido a partir da bioconversão da entacapona foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) e Hidrogênio (RMN ^1H), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM) e Espectroscopia no Infravermelho (IV).

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) e Hidrogênio (RMN ^1H)

Para ajudar na elucidação do derivado I da entacapona foram realizadas as análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C da entacapona, substância química de referência (Figura 21). As estruturas dos compostos foram identificadas com base nos dados espectrais ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC e HSQC.

A RMN ^1H fornece informações sobre o número, o tipo e a vizinhança dos hidrogênios, o que auxilia na determinação estrutural, bem como, pode dar informações sobre a estereoquímica da substância analisada. Cada hidrogênio, em seu deslocamento químico típico, pode aparecer no espectro com um sinal único ou múltiplo, dependendo do número de hidrogênios vizinhos e da sua condição química e magnética. A RMN ^{13}C indica o número de carbonos do esqueleto e, dependendo da técnica utilizada, o número de hidrogênios ligados a cada um dos átomos de carbono (KAISER, 2000; ANDREI et al., 2003).

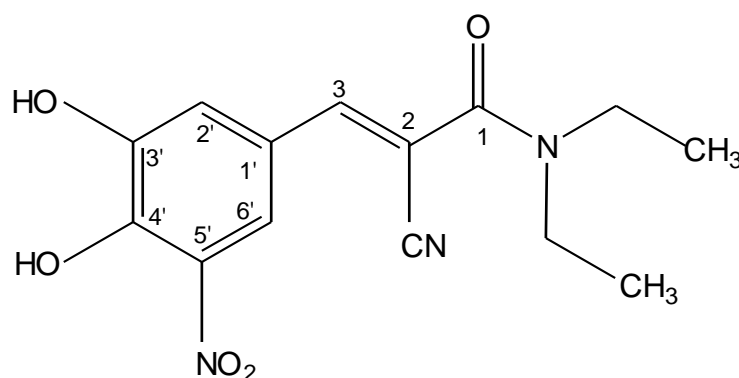


Figura 21. Entacapona ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$) (*E*)-2-ciano-*N,N*-dietil-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil) acrilamida.

O espectro de RMN ^1H da entacapona em metanol deuterado apresentou os seguintes deslocamentos químicos (δ) em ppm: δ 8.00 (1H, d, $\text{H}_{6'}$), 7.74 (1H, d, $\text{H}_{2'}$), 7.50 (1H, s, H_3), 3.57 - 3.38 (4H, m, $-\text{CH}_2$), 1.33 - 1.10 (6H, m, $-\text{CH}_3$). Os valores obtidos dos deslocamentos químicos e os sinais característicos correspondentes a sua estrutura podem ser observados na Tabela 3 e no espectro da Figuras 22.

Tabela 3. Dados espectrais de RMN ^1H (500 MHz) da entacapona em metanol deuterado

| Carbono | ^1H | δ (ppm) | Nº de H | Multiplicidade |
|-----------------|------------------|----------------|---------|--------------------------------|
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - |
| 3 | H ₃ | 7,5 | 1 | s, H ligação dupla |
| 1' | - | - | - | - |
| 2' | H _{2'} | 7,74 | 1 | d, $J=1,5$ Hz, H _{2'} |
| 3' | - | - | - | - |
| 4' | - | - | - | - |
| 5' | - | - | - | - |
| 6' | H _{6'} | 8,00 | 1 | d, $J=1,5$ Hz, H _{6'} |
| CH ₂ | -CH ₂ | 3,57-3,38 | 4 | m, 2 CH ₂ |
| CH ₃ | -CH ₃ | 1,33-1,10 | 6 | m, 2 CH ₃ |

Legenda: Carbono (C), Hidrogênio (^1H), Deslocamento químico (δ), Número de hidrogênios (Nº. H).

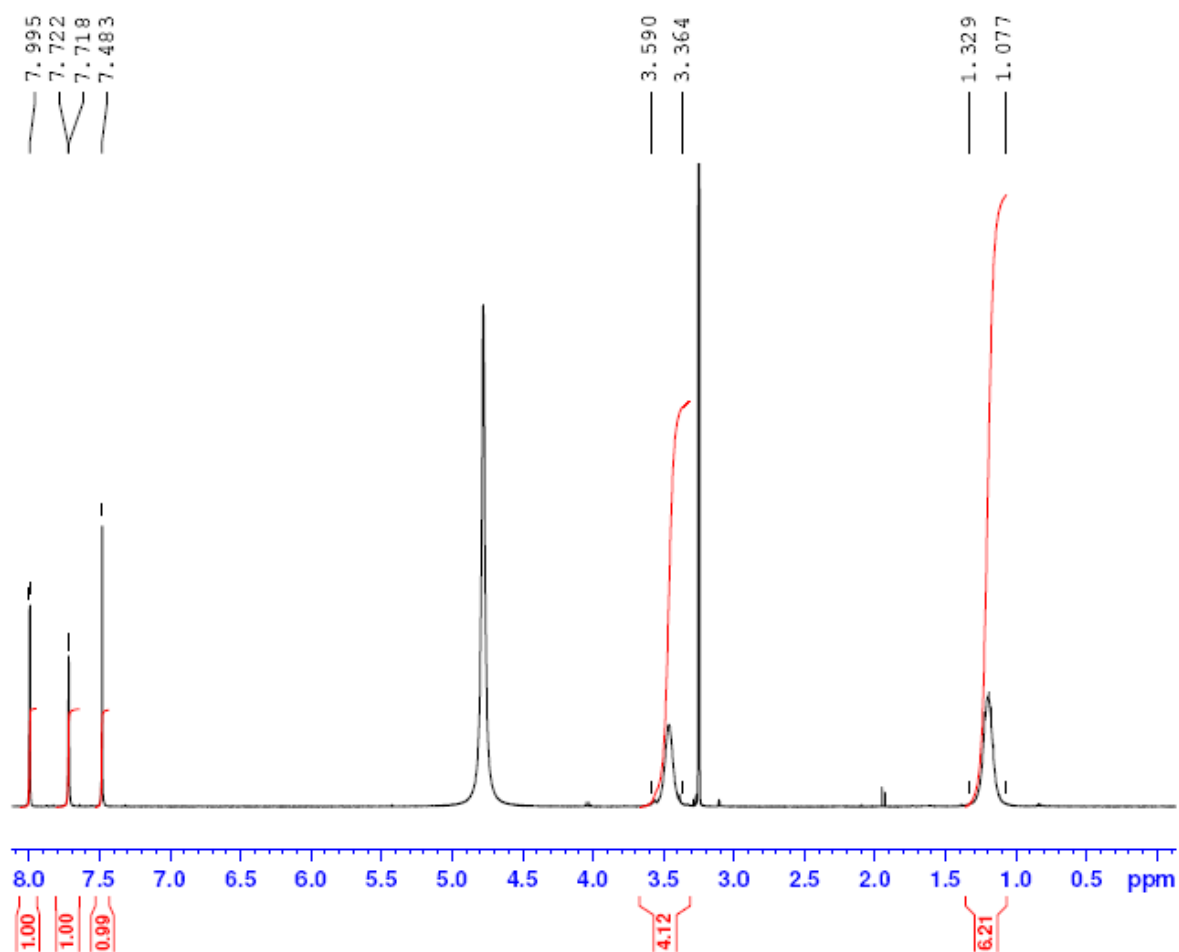


Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H da entacapona, de 8,0 a 0,5 ppm.

Os sinais dos hidrogênios da porção alifática $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, da porção aromática H_2' e H_6' juntamente com a porção alifática H_3 da entacapona encontram-se, respectivamente, expandidos nas figuras 23 e 24.

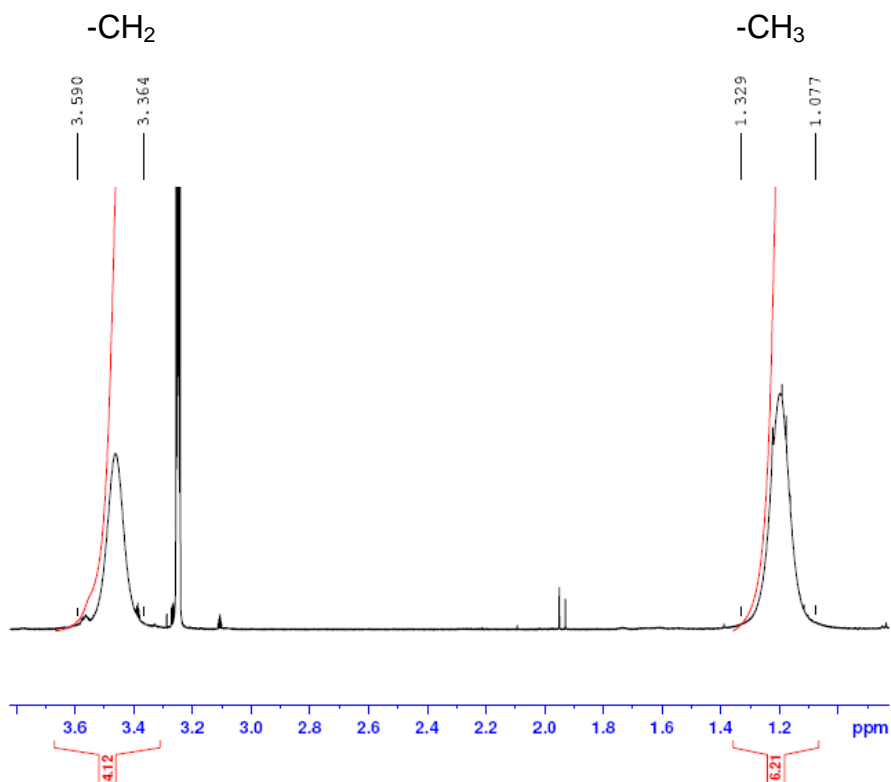


Figura 23. Expansão do espectro de RMN ^1H da entacapona, de 3,8 a 0,9 ppm (porção alifática $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$).

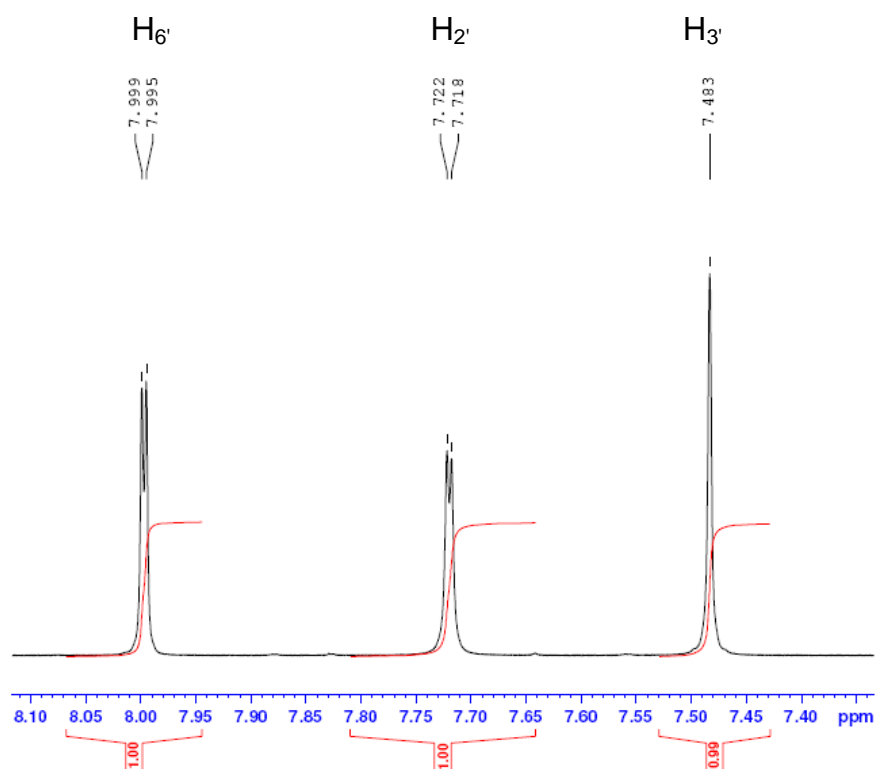


Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^1H da entacapona, de 3,8 a 0,9 ppm (porção aromática H_2' e H_3' , porção alifática H_3).

O espectro de RMN ^{13}C da entacaona em metanol deuterado apresentou os seguintes deslocamentos químicos (δ) em ppm: δ 165.5 (C-1), 149.1 (C-3), 146.5 (C-3'), 147.7 (C-1'), 145.0 (C-4'), 136.8 (C-5'), 120.4 (C-2'), 119.5 (C-6'), 116.9 (CN), 107.0 (C-2). Os valores obtidos dos deslocamentos químicos e os sinais característicos correspondentes a sua estrutura podem ser observados na Tabela 4 e no espectro da Figura 25.

Tabela 4: Dados espectrais de RMN ^{13}C da entacaona em metanol deuterado

| Carbono | Deslocamento Químico (ppm) |
|-----------------|----------------------------|
| 1 | 165,5 |
| 2 | 107 |
| CN | 116,9 |
| 3 | 149,1 |
| 1' | 147,7 |
| 2' | 120,4 |
| 3' | 146,5 |
| 4' | 145 |
| 5' | 136,8 |
| 6' | 119,5 |
| CH ₂ | 41,6 |
| CH ₃ | 13,8 |

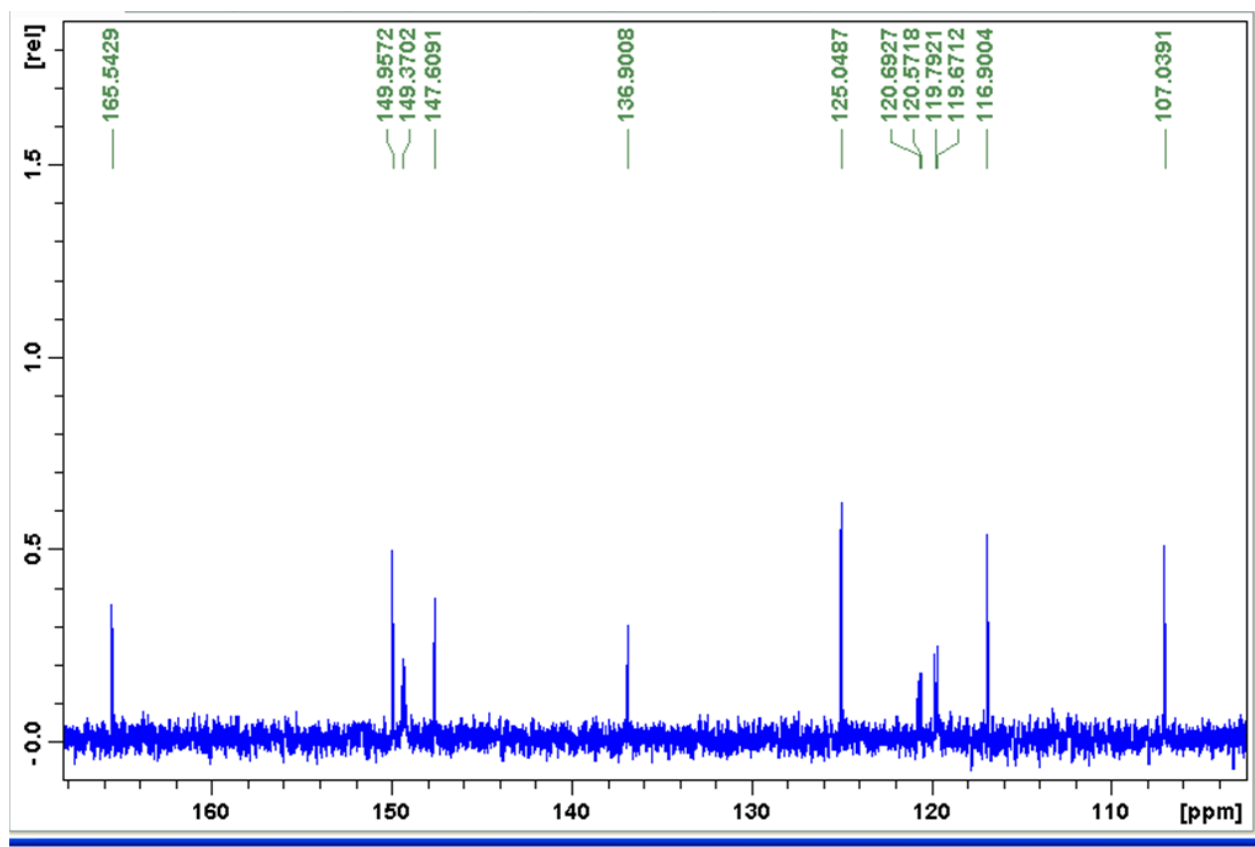


Figura 25. Expansão do espectro de RMN ^{13}C da entacapona, de 180 a 95 ppm.

Para ajudar na elucidação da entacapona e do derivado β -glicosilado da entacapona foram obtidos espectros unidimensionais e bidimensionais. As técnicas 2 D permitem correlacionar hidrogênios ou carbonos que possuem alguma relação escalar ou espacial entre si. Desta forma é possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando as técnicas 1 D (KAISER, 2000). Os espectros HMBC e HSQC da entacapona estão representados nas figuras 26 a 30.

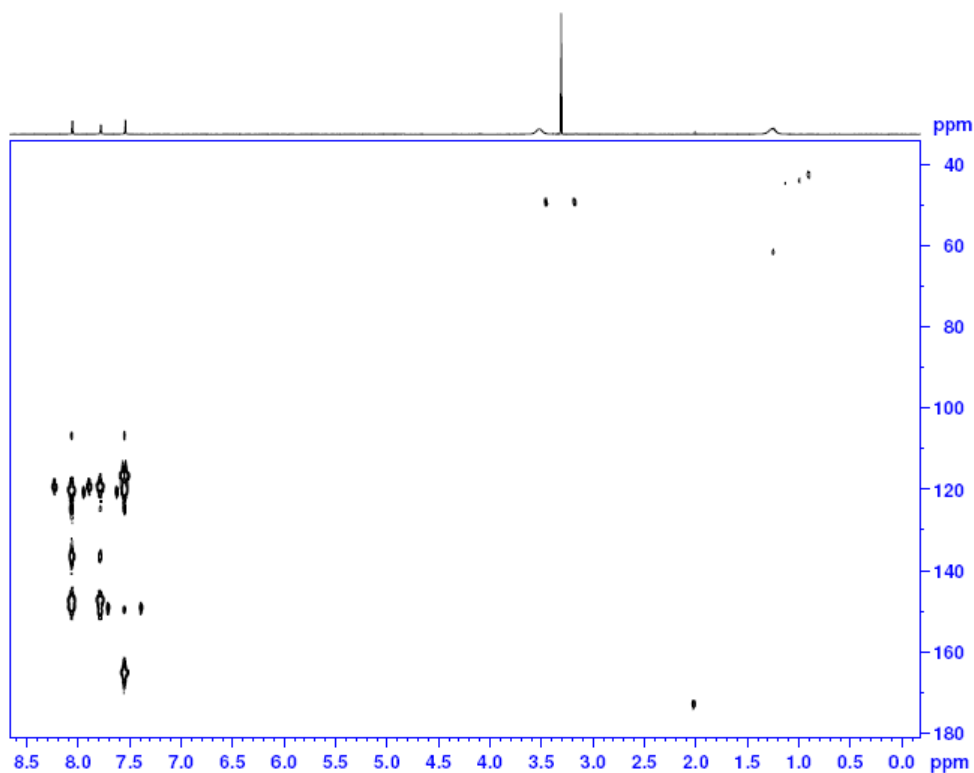


Figura 26. Expansão do espectro HMBC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (8,5-0,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (180-40 ppm).

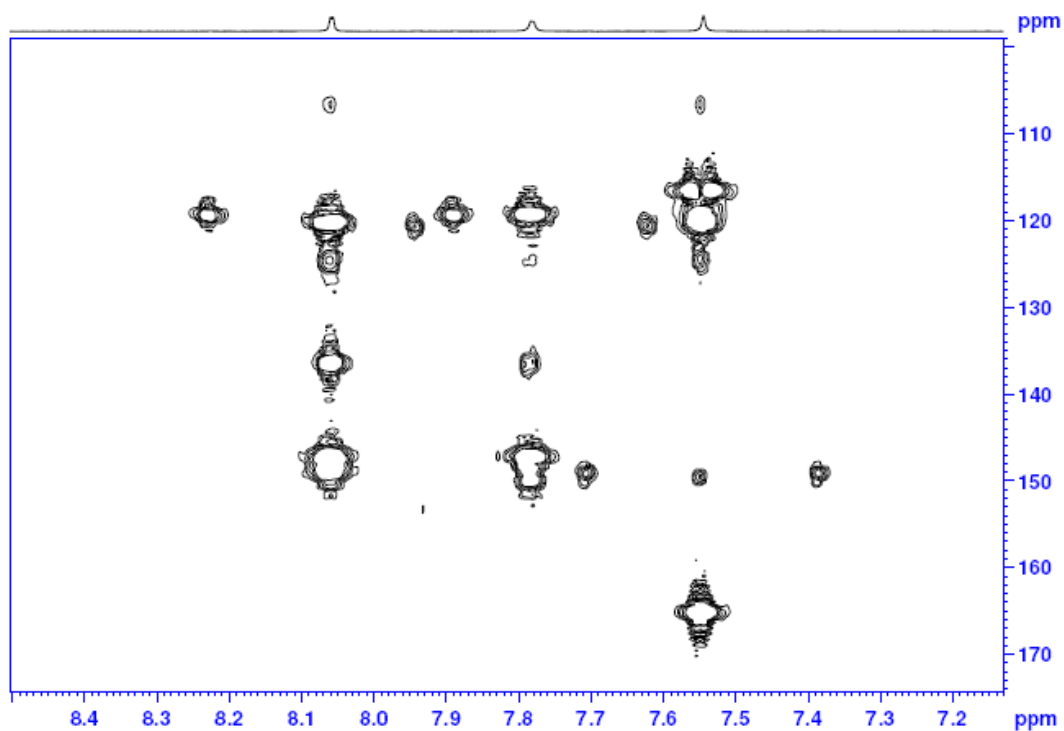


Figura 27. Expansão do espectro HMBC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (8,4-7,2 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (170-110 ppm).

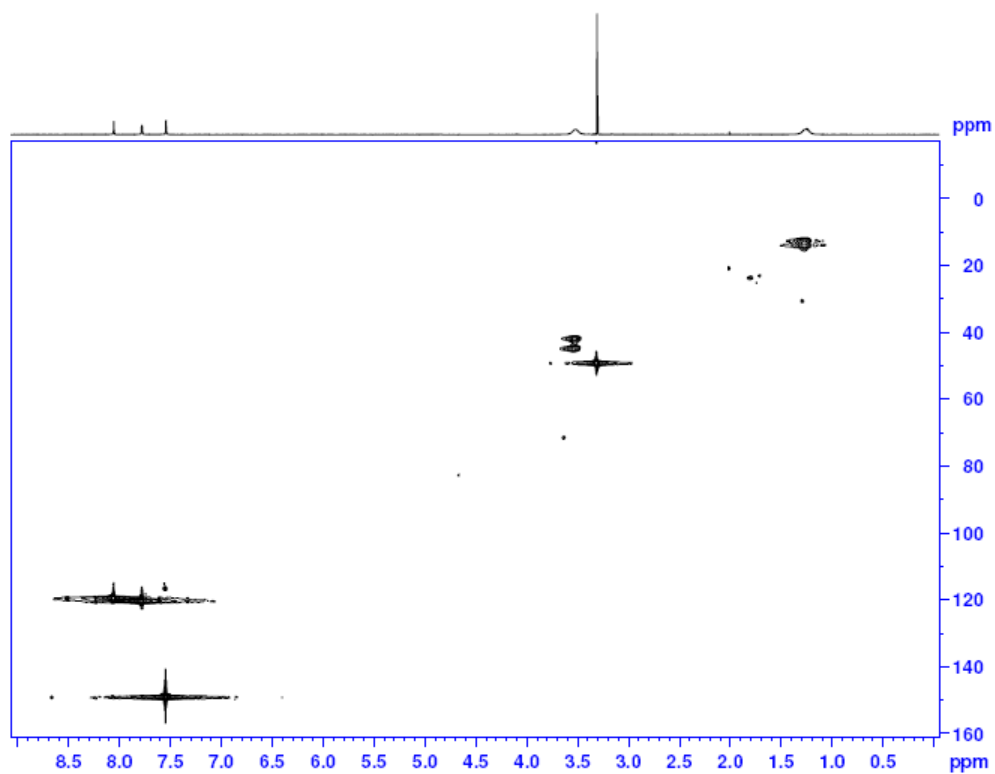


Figura 28. Expansão do espectro HSQC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (8,5-0,5 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (160-0 ppm).

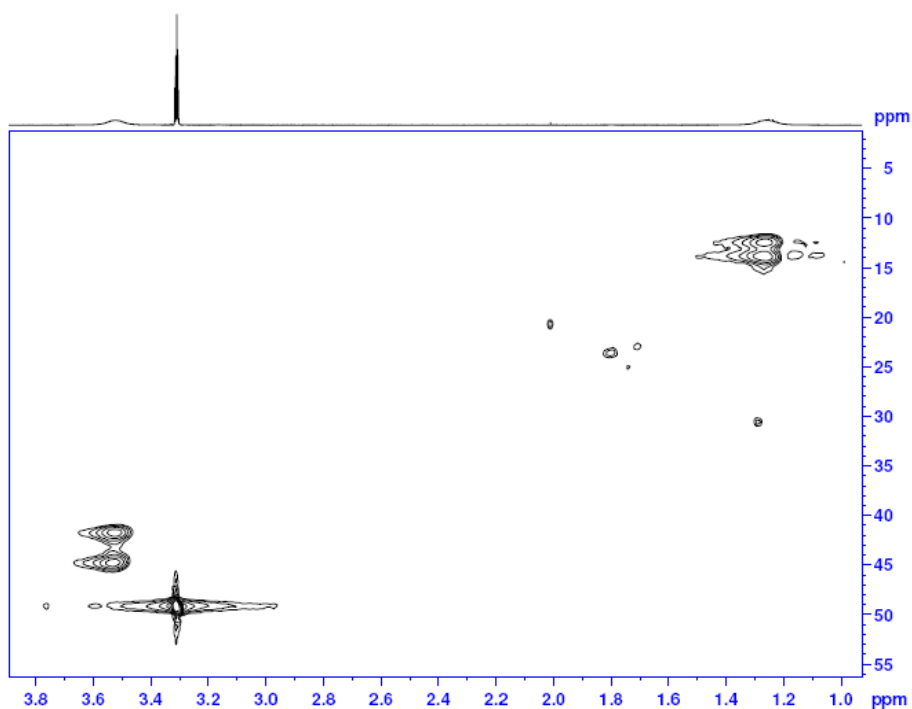


Figura 29. Expansão do espectro HSQC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (3,8-1,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (55-5 ppm).

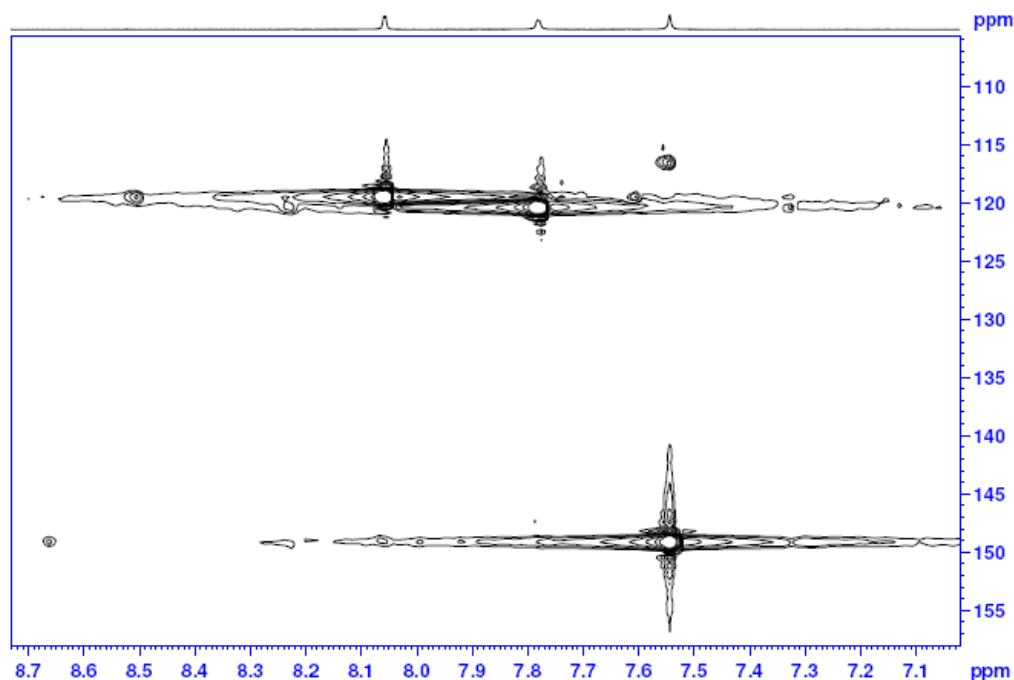


Figura 30. Expansão do espectro HSQC da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (8,7-7,1 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (155-110 ppm).

O derivado I da entacapona foi caracterizado por RMN 1H , RMN ^{13}C , HMBC e HSQC e apresentou em sua estrutura molecular a forma cíclica da *D*(+)-glicose. As formas cíclicas da *D*(+)-glicose são hemiacetais formados por uma reação intramolecular do grupo $-OH$ em C5 com o grupo de aldeído; e o acetal de glicose é chamado de glicosídeo. A ciclização cria um novo estereocentro em C1 e este estereocentro explica como duas formas cíclicas são possíveis. Estas duas formas cíclicas são diastereoisômeros que diferem entre si apenas na configuração do C1. Os diastereoisômero deste tipo são chamados de anômeros, e o átomo de carbono hemiacetal é chamado de átomo de carbono anomérico e cada anômero de glicose é designado como anômero α ou β (SOLOMONS & FRYHLE, 2002). A estrutura molecular do derivado I da entacapona, ou seja, da 4 hidroxí-5-nitrofenil-3-O-(β)-*D*-glicopirranose-(*E*)-2-ciano-*N,N*-dietil-3- acrilamida está representada pela Figura 31.

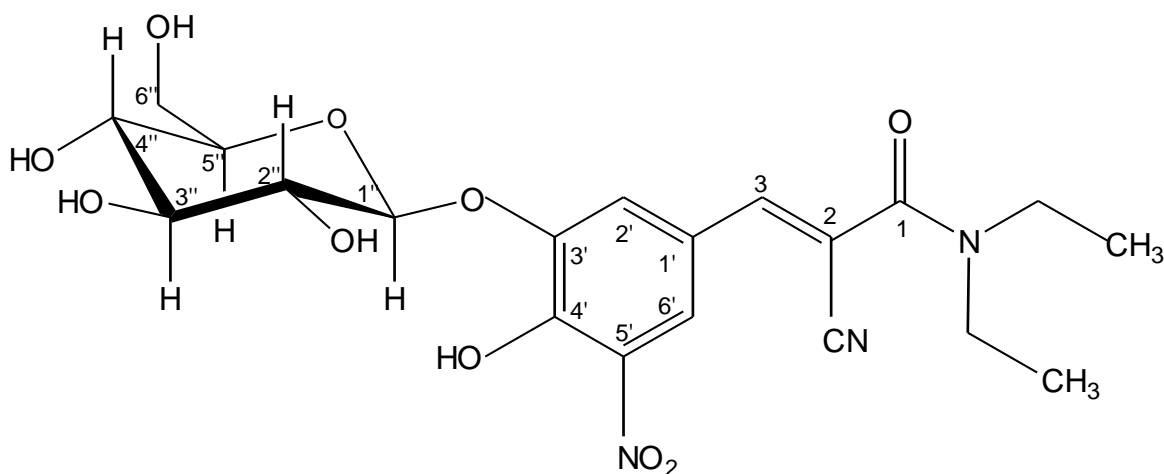


Figura 31. Fórmula estrutural do derivado I da entacapona: 4 hidroxi-5-nitrofenil-3-O-(β)-D-glicopiranosose-(*E*)-2-ciano-N, N-dietil-3-acrilamida.

O espectro de RMN ^1H do derivado I da entacapona em metanol deuterado apresentou os seguintes deslocamentos químicos (δ) em ppm: δ 8.06 (1H, d, $\text{H}_{6'}$), 7.78 (1H, d, $\text{H}_{2'}$), 7.54 (1H, s, H_3), 4.92 (1H, d, $\text{H}_{1''\beta}$), 3.96 (1H, dd, $\text{H}_{6''}$), 3.76 (1H, dd, $\text{H}_{6''}$), 3.52 -3.38 (4H, m, H- CH_2), 1.26 - 1.10 (6H, m, H- CH_3). Os valores obtidos dos deslocamentos químicos e os sinais característicos correspondentes a sua estrutura podem ser observados na Tabela 5 e nos espectros das Figuras 32 a 35.

Tabela 5: Dados espectrais de RMN ^1H do derivado I da entacapona em metanol deuterado

| C | ^1H | δ (ppm) | Nº. H | Multiplicidade |
|-----------------|--------------------------|----------------|-------|---|
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - |
| 3 | H ₃ | 7,54 | 1 | s, H ligação dupla |
| 1' | - | - | - | - |
| 2' | H _{2'} | 7,78 | 1 | d, $J=2,09$ Hz, H _{2'} |
| 3' | - | - | - | - |
| 4' | - | - | - | - |
| 5' | - | - | - | - |
| 6' | H _{6'} | 8,06 | 1 | d, $J=2,02$ Hz, H _{6'} |
| CH ₂ | H-CH ₂ | 3,52-3,38 | 4 | m, CH ₂ -N |
| CH ₃ | H-CH ₃ | 1,26-1,10 | 6 | m, CH ₃ |
| 1'' | H _{1''} β | 4,92 | 1 | d, $J=7,4$ Hz, H _{1''} β |
| 2'' | - | - | - | - |
| 3'' | - | - | - | - |
| 4'' | - | - | - | - |
| 5'' | - | - | - | - |
| 6'' | H _{6''} | 3,96 | 1 | dd |
| 6''' | H _{6'''} | 3,76 | 1 | dd |

Legenda: Carbono (C), Hidrogênio (^1H), Deslocamento químico (δ), Número de hidrogênios (Nº. H).

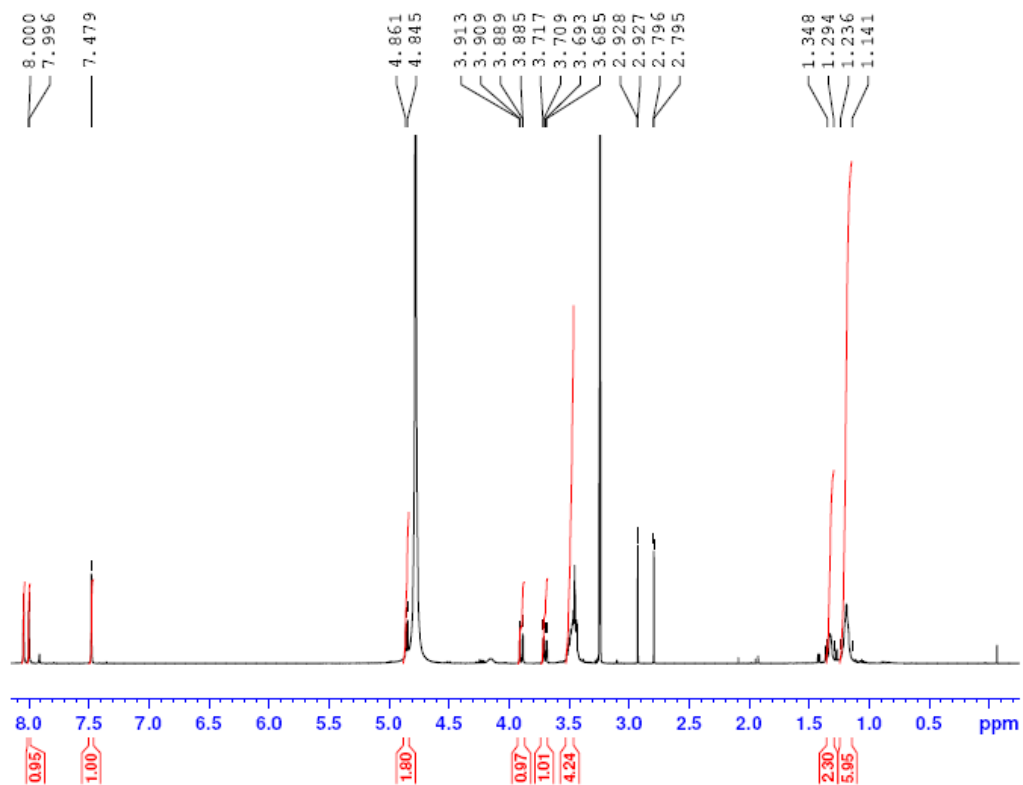


Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H do derivado I da entacapona, de 8,0 a 0,5 ppm.

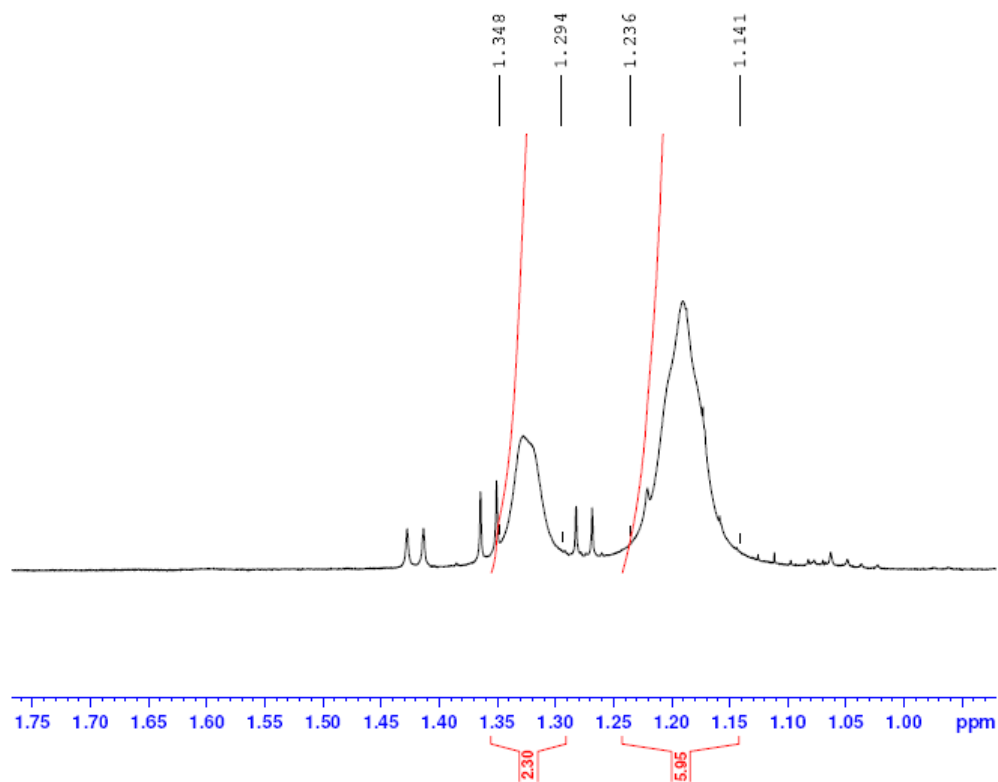


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H do derivado I da entacapona, de 1,75 a 1,0 ppm.

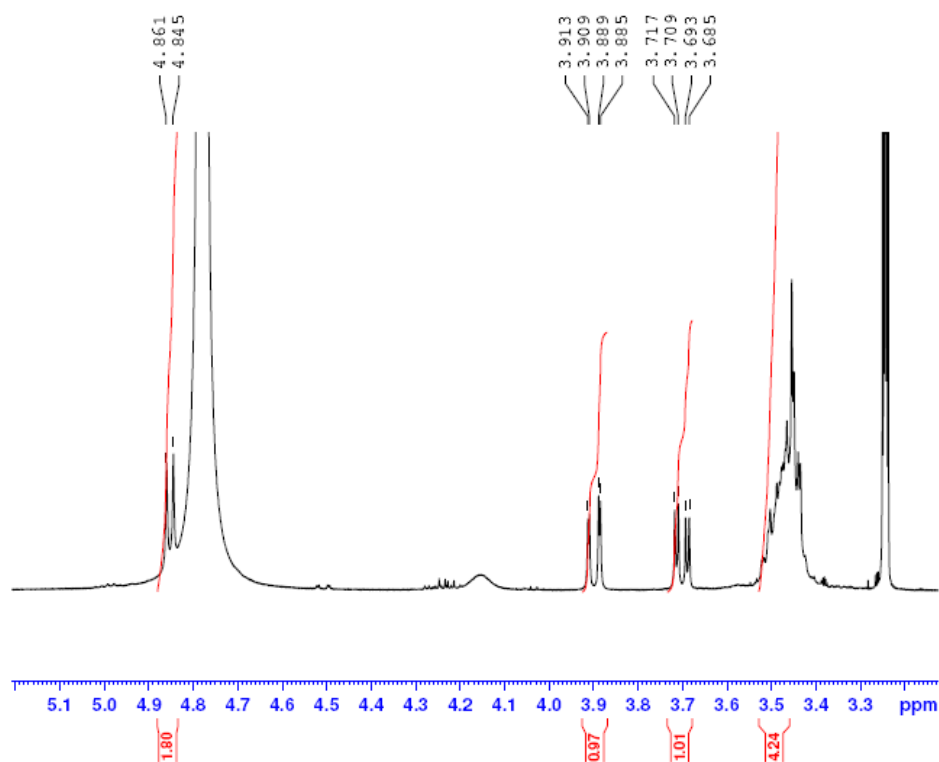


Figura 34. Expansão do espectro de RMN ^1H do derivado I da entacapona, de 5,1 a 3,3 ppm.

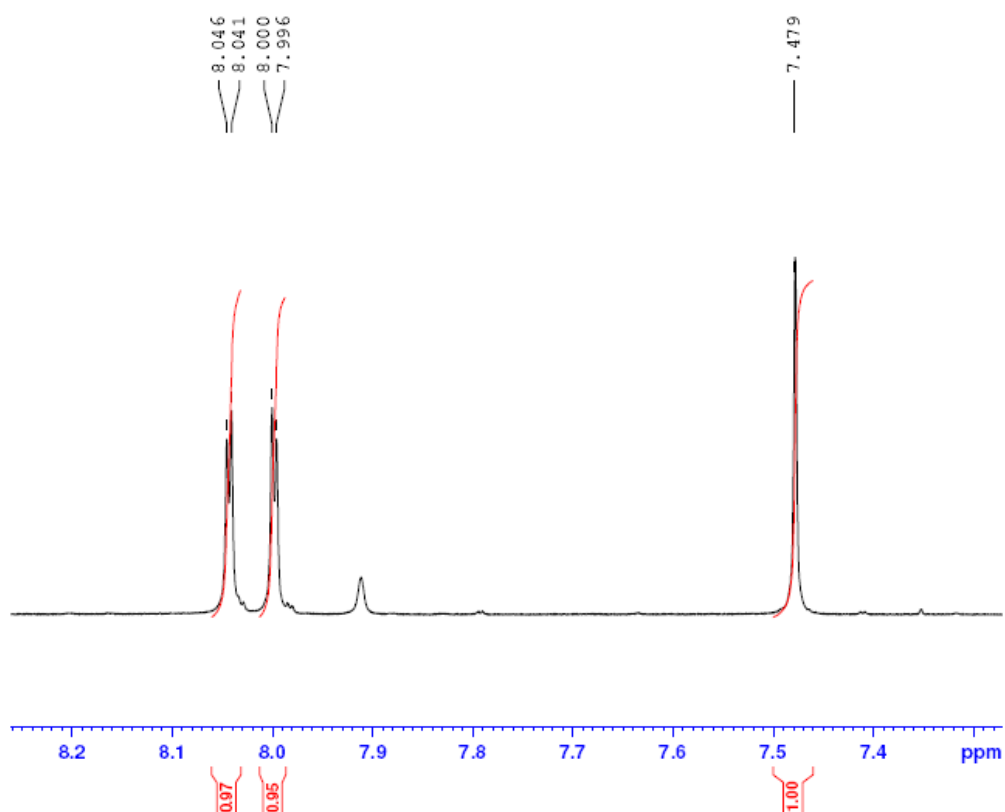


Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^1H do derivado I da entacapona, de 8,2 a 7,4 ppm.

O espectro de RMN ^1H do derivado glicosilado da entacapona apresentou os sinais correspondentes ao hidrogênio anomérico, observado como um dubleto com 4,92 ppm, com uma constante de acoplamento $J = 7,4$ Hz. Este valor para J confirma a configuração β para a β -Glicosilação da entacapona.

FERNÁNDEZ et al., 2000 determinaram derivados β -glicosilados da dopamina, o 3,4-dihidroxi-3-O-(β)-D-glicopiranoose-feniletilamônio trifluoroacetato e o 3,4-dihidroxi-4-O-(β)-D-glicopiranoose-feniletilamônio trifluoroacetato, os quais apresentaram resultados para os deslocamentos químicos por RMN ^1H δ 4,96 (d, 1 H, J 7,4 Hz, H-1) e 4,91 (d, 1 H, J 7,6 Hz, H-1) respectivamente, compatíveis com aqueles encontrados para o derivado β -glicosilado da entacapona, 4 hidroxi-5-nitrofenil-3-O-(β)-D-glicopiranoose-(*E*)-2-ciano-N,N-dietil-3-acrilamida (δ 4.92 (d, 1H, J 7,4, H $_1$)).

Os espectros de RMN ^{13}C , HMBC e HSQC do derivado I da entacapona em metanol deuterado apresentou os seguintes deslocamentos químicos (δ) em ppm: δ 166.1 (C-1), 150.6 (C-3), 147.7 (C-1'), 146.5 (C-3'), 145.0 (C-4'), 136.8 (C-5'), 120.4 (C-2'), 119.5 (C-6'), 116.9 (CN), 107.0 (C-2), 102.9 (C-1''), 77.7 (C-2''), 77.1 (C-3''), 74.4 (C-4''), 70.5 (C-5''), 61.7 (C-6''), 41.4 (CH $_2$) e 20.5 (CH $_3$). Os valores obtidos dos deslocamentos químicos e os sinais característicos correspondentes a sua estrutura podem ser observados na Tabela 6 e nos espectros das Figuras 36 a 45.

Tabela 6: Dados espectrais de RMN ^{13}C do derivado I da entacapona em metanol deuterado.

| Carbono | Deslocamento Químico (ppm) |
|-----------------|----------------------------|
| 1 | 166,1 |
| 2 | 107 |
| CN | 116,9 |
| 3 | 150,6 |
| 1' | 147,7 |
| 2' | 120,4 |
| 3' | 146,5 |
| 4' | 145 |
| 5' | 136,8 |
| 6' | 119,5 |
| CH ₂ | 41,4 |
| CH ₃ | 20,5 |
| 1" | 102,9 |
| 2" | 77,7 |
| 3" | 77,1 |
| 4" | 74,4 |
| 5" | 70,5 |
| 6" | 61,7 |

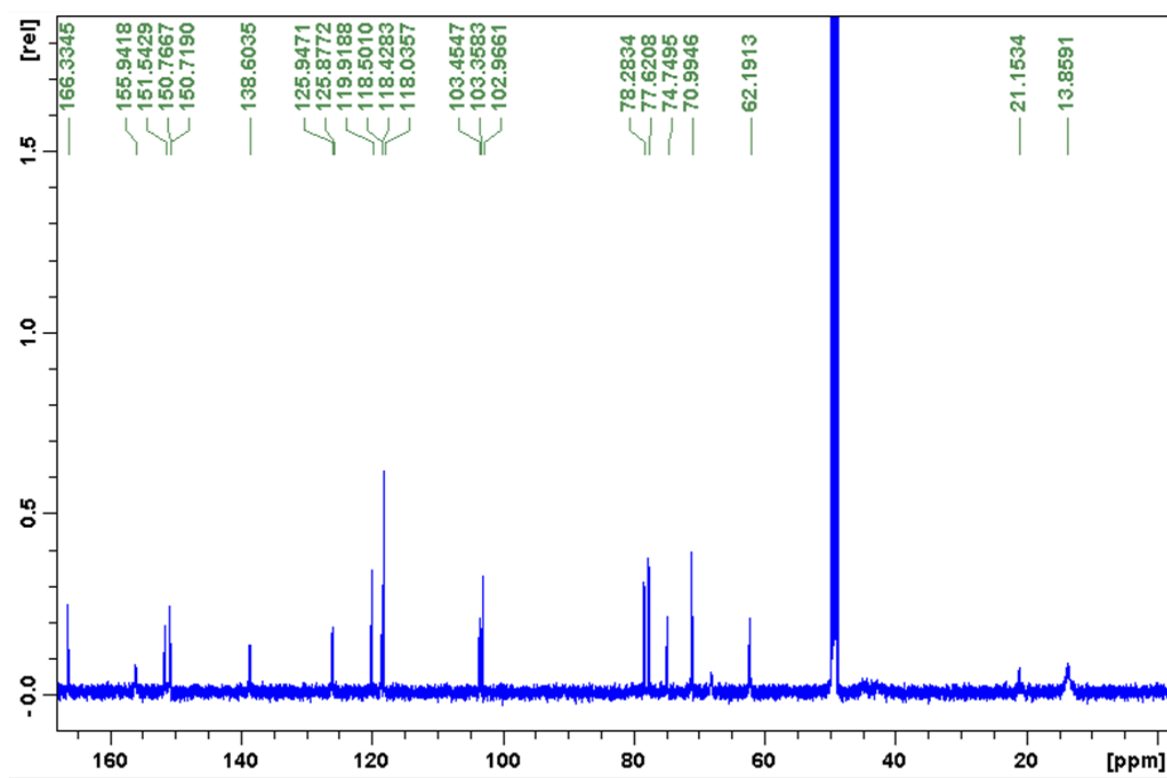


Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C do derivado I entacopona, de 165 a 0 ppm.

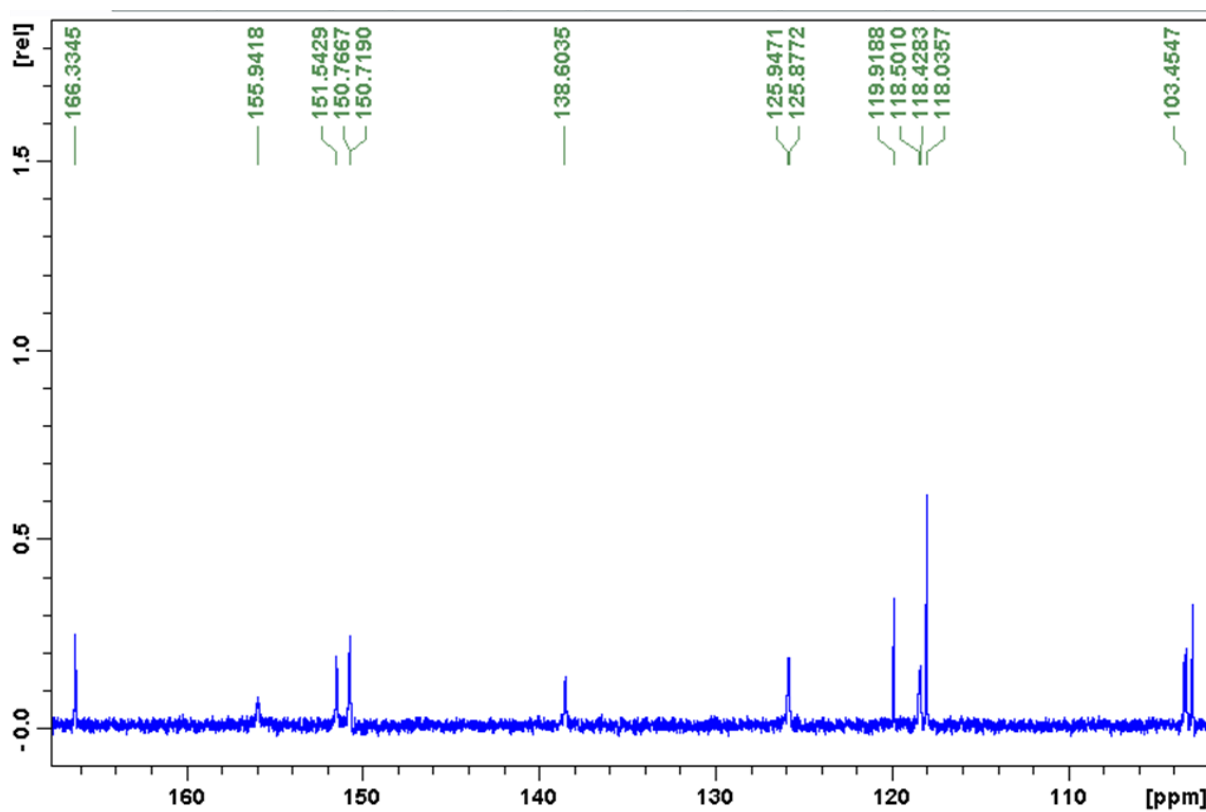


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C do derivado I entacopona, de 168 a 102 ppm.

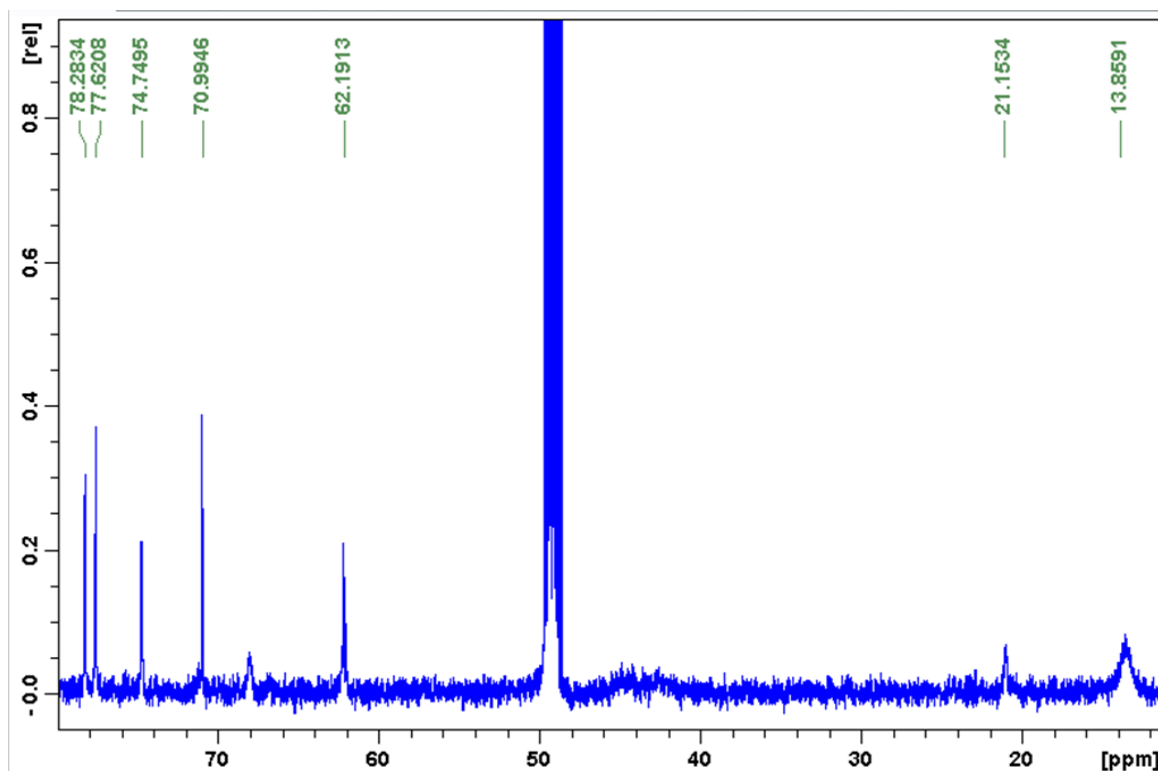


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C do derivado I entacapona, de 78 a 12 ppm.

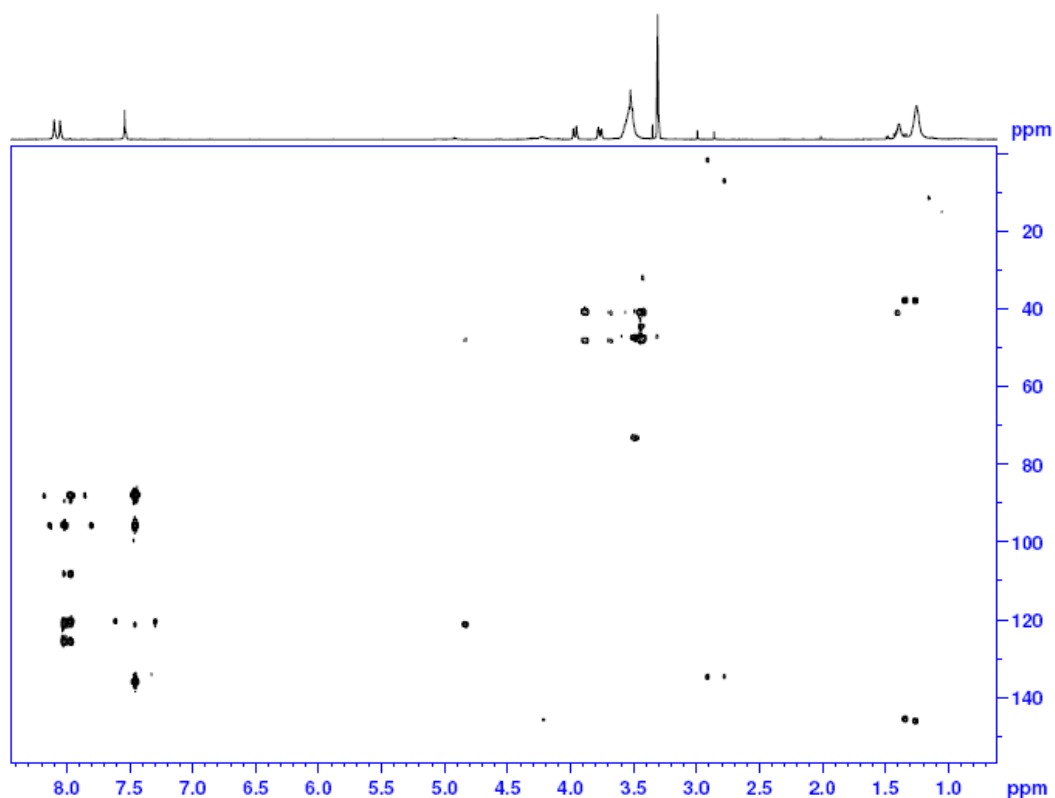


Figura 39. Expansão do espectro HMBC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_{H} (8,5-0,7 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_{C} (140-0 ppm).

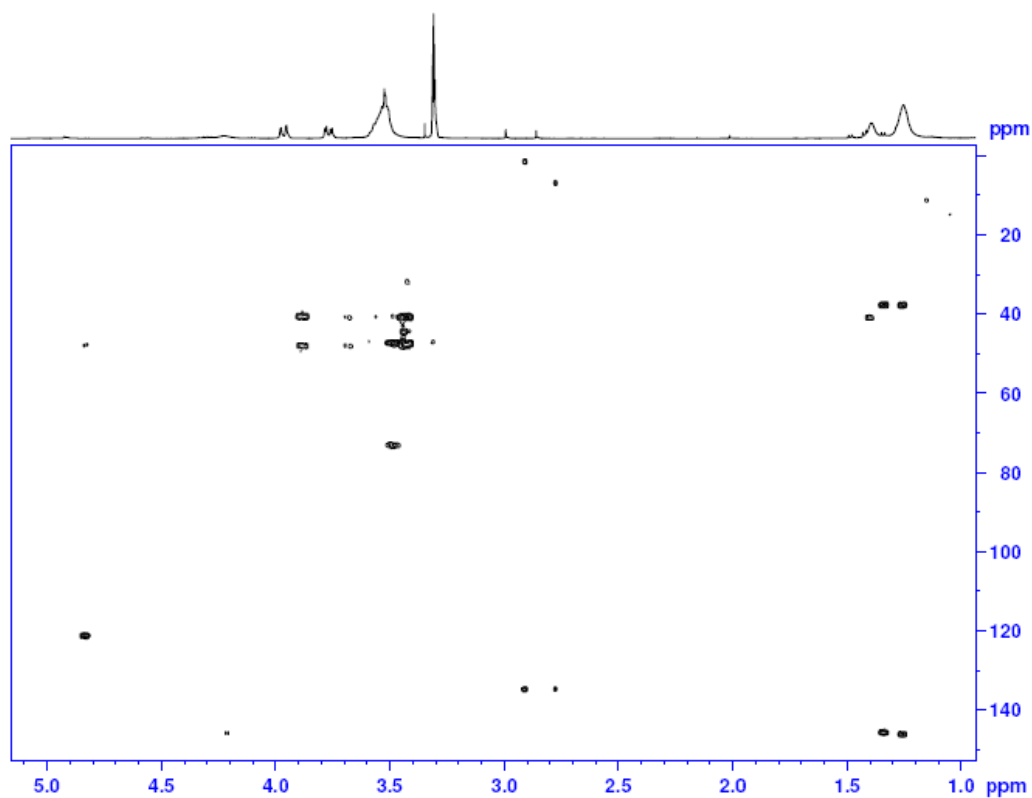


Figura 40. Expansão do espectro HMBC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (5,0-1,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (140-0 ppm).

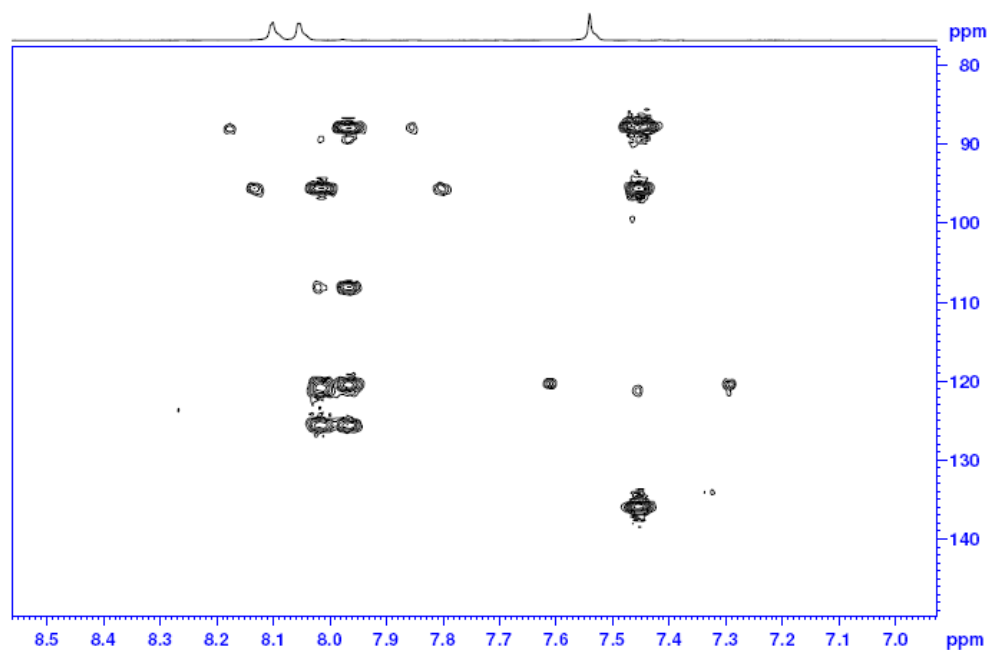


Figura 41. Expansão do espectro HMBC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (8,5-7,0 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (140-80 ppm).

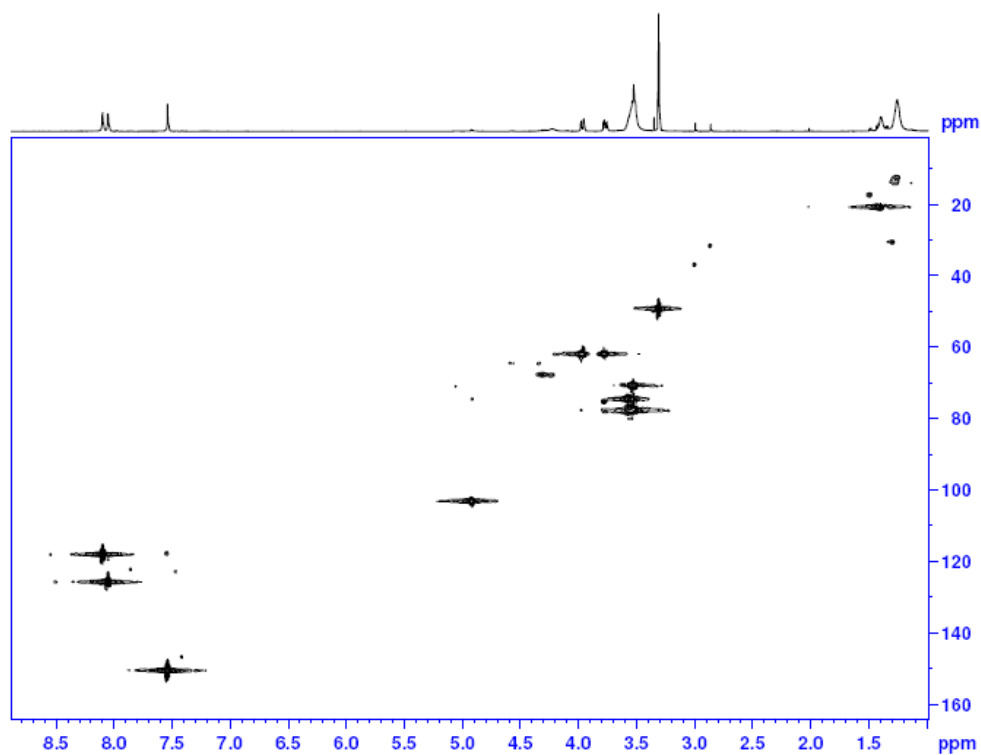


Figura 42. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (8,5-1,5 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (160-20 ppm).

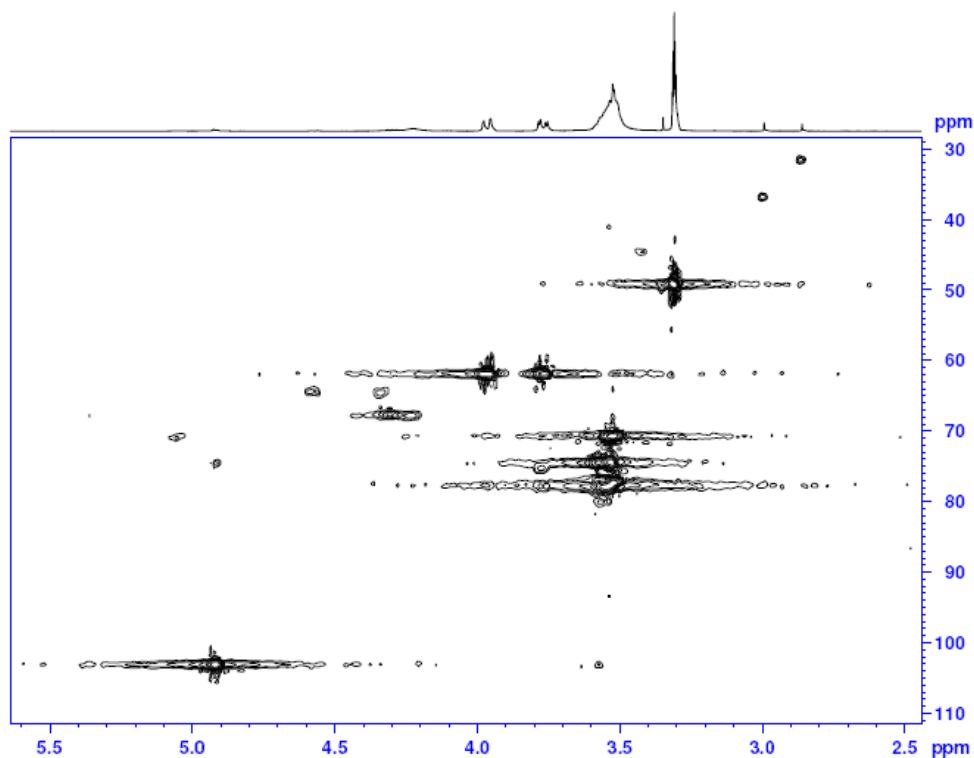


Figura 43. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (5,5-2,5 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (110-30 ppm).

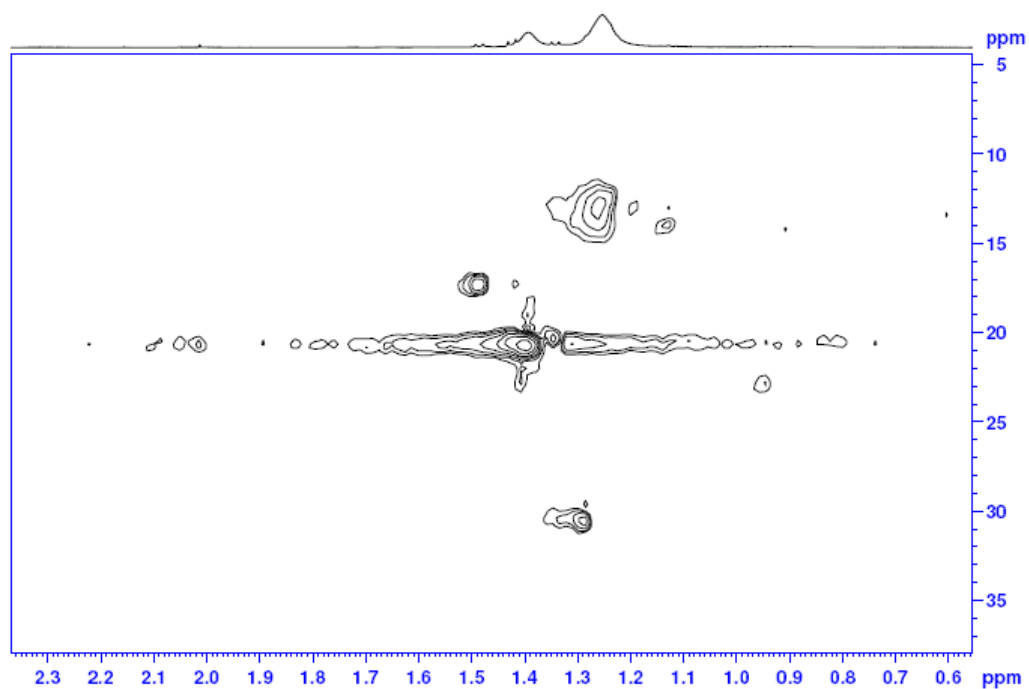


Figura 44. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (2,3-0,6 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (35-5 ppm).

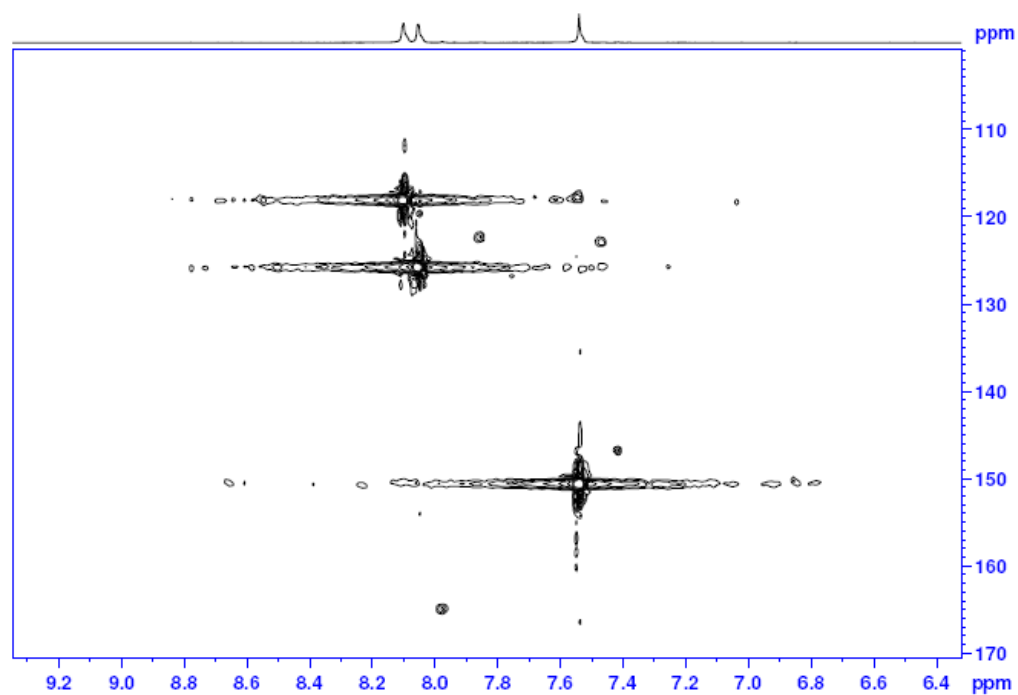


Figura 45. Expansão do espectro HSQC do derivado I da entacapona, eixo horizontal correspondendo aos δ_H (9,2-6,4 ppm) e o eixo vertical correspondendo aos δ_C (170-110 ppm).

Os derivados β -glicosilados da dopamina apresentaram resultados de deslocamentos químicos por RMN ^{13}C , porção da glicose, compatíveis com aqueles encontrados para o derivado β -glicosilado da entacapona, o 4-hidroxi-5-nitrofenil-3- O -(β)- D -glicopiranosose-(E)-2-ciano- N,N -dietil-3-acrilamida (102.9 (C-1''), 77.7 (C-2''), 77.1 (C-3''), 74.4 (C-4''), 70.5 (C-5''), 61.7 (6-6'')), cujos resultados para o 3,4-dihidroxi-3- O -(β)- D -glicopiranosose-feniletilamônio trifluoroacetato e o 3,4-dihidroxi-4- O -(β)- D -glicopiranosose-feniletilamônio trifluoroacetato são respectivamente δ 104,4 (C-1), 78,7, 77,9, 75,1, 71,8 (C-2, -3, -4, -5), 62,9 (C-6) e 104,3 (C-1), 78,2, 77,5, 74,8, 71,2 (C-2, -3, -4, -5), 62,3 (C-6) (FERNÁNDEZ et al., 2000).

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM)

A caracterização do derivado I da entacapona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM) sugeriu, assim como determinado por RMN, que houve a inclusão de uma molécula de glicose (β -glicosilação) na posição 3' da entacapona - (E)-2-ciano- N,N -dietil-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil) acrilamida, identificando 2 derivados o (E)-entacapona glicosídeo e o (Z)-entacapona glicosídeo (Figura 46).

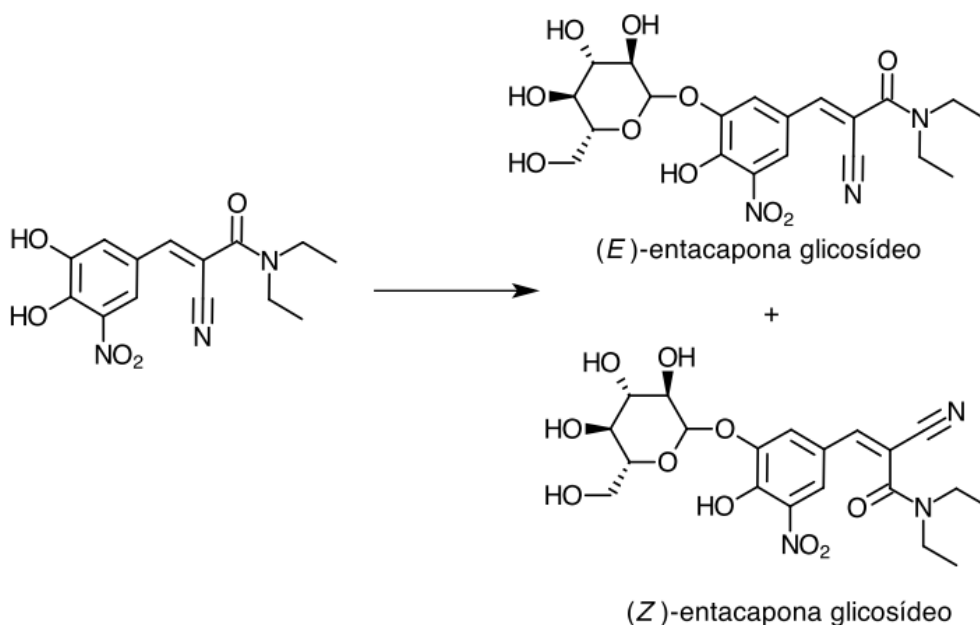


Figura 46. Bioconversão da entacapona formando o (E)-entacapona glicosídeo e o (Z)-entacapona glicosídeo, determinado por CLAE-EM/EM.

Obteve-se uma boa separação dos isômeros derivados (*E*)-entacapona glicosídeo e o (*Z*)-entacapona glicosídeo por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas CLAE-EM/EM (Figura 47).

Relação diastereoisomérica dos produtos (*E*) / (*Z*)



Figura 47. Separação cromatográfica de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) da entacapona glicosilada (*E*) / (*Z*), eixo horizontal corresponde ao tempo em minutos e o eixo vertical corresponde à intensidade.

A CLAE separa os componentes de uma mistura, enquanto o espectrômetro de massa dá informação estrutural de cada um (SOLOMONS & FRYHLE, 2001; CHEN, 2007). No espectrômetro de massa, ao invés da emissão de energia, ocorre um bombardeamento da amostra com um feixe de elétrons, sendo que a quantidade de energia pode alcançar até 70 eV (elétron-volt). Como resultado direto da aplicação dessa energia, ocorre fragmentação da molécula em espécies positivas, que são registradas quantitativamente originando, dessa forma, um espectro. Trata-se de um espectro, ou gráfico, de distribuição das massas dos íons correspondentes ao peso fórmula de uma molécula, aos fragmentos derivados da molécula, ou a ambos. A separação dos fragmentos positivos é feita pela relação massa/carga (m/z) (SOLOMONS & FRYHLE, 2001; ANDREI et al., 2003; CHEN, 2007).

A análise por CLAE-EM/EM do derivado I glicosilado da entacapona, 4 hidroxi-5-nitrofenil-3-*O*-(β)-D-glicopirranose-(*E*)-2-ciano-N,N-dietil-3-acrilamida, massa molecular igual a 467,4, apresentou espectro de massa com picos principais em *m/z* igual a 468,1, 306,0 e 233,1 (Figura 48).

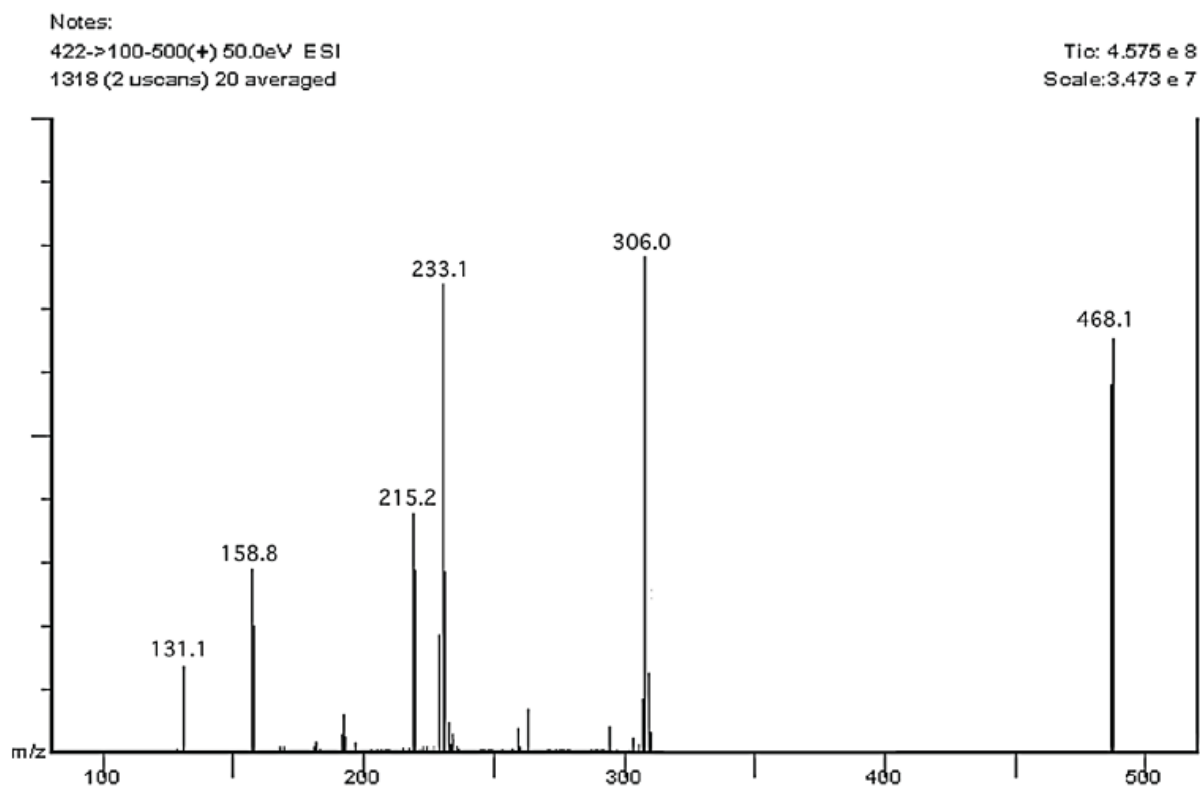


Figura 48. Espectro de massa do derivado glicosilado da entacapona: pico íon molecular $m/z=468,1$ e pico base $m/z=306,0$, varredura de 100 a 500 u.m.a.

Estes picos correspondem $m/z=468,1$ [M^+] ao pico íon molecular do derivado glicosilado da entacapona, $m/z=306,0$ [$M - 162,1$] $^+$ (100%) pico base com perda da glicose, correspondendo à massa molecular da entacapona aproximadamente igual a mais 1, e $m/z=233,1$ [$M - (162,1 + 72,9)$] $^+$ com perda de dietilamina (Figura 49).

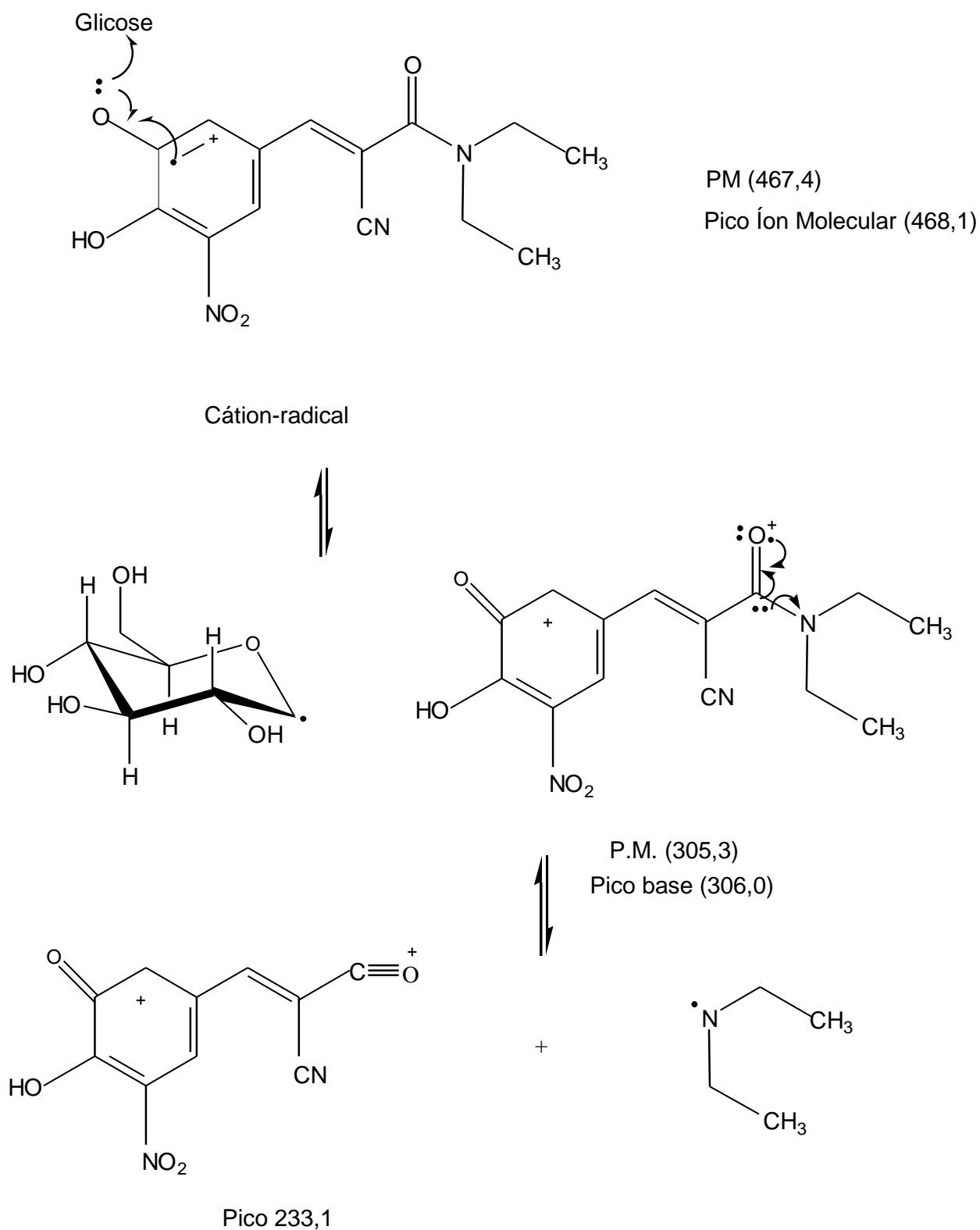


Figura 49. Proposta de fragmentação do derivado glicosilado da entacapona por EM.

Frequentemente, a conformação de uma molécula desempenha um papel importante na natureza de sua atividade. Os estereoisômeros possuem conformações diferentes, sendo assim os estereoisômeros biologicamente ativos exibirão diferenças

em suas potências e/ou atividade. Além de um efeito sobre a atividade, os diferentes estereoisômeros também alteram outras propriedades físicoquímicas, tais como a absorção, o metabolismo e a eliminação. Por exemplo, o (-) –norgestrel é absorvido com uma velocidade duas vezes maior do que o (+)-norgestrel através das membranas vaginal e bucal (THOMAS, 2003).

A formação de análogos pela introdução de novos substituintes na estrutura de um protótipo pode resultar num análogo com propriedades químicas e, por conseguinte, farmacocinéticas significativamente diferentes. Por exemplo, a introdução de um novo substituinte pode causar alterações significativas na lipofilicidade, o que afeta o transporte do análogo através das membranas e dos vários líquidos no corpo. Isto também mudaria a conformação, o que poderia resultar em restrições conformacionais que afetam a ligação ao sítio alvo. Ademais, a presença de um novo grupamento pode introduzir uma nova via metabólica para o análogo. Logo, estas alterações alteram as propriedades farmacodinâmicas do análogo. Por exemplo, elas podem ter como consequência um análogo com aumento ou diminuição de potência, duração de ação, estabilidade metabólica e efeitos colaterais indesejáveis (THOMAS, 2003).

Os picos sobre o eixo x de um espectro de massa referem-se à distribuição das massas produzidas pelas moléculas do composto que está no espectro de massa. A altura do pico é medida ao longo do eixo y e indica a quantidade relativa de cada íon que é produzida pela molécula. Juntos, o peso e a abundância de cada íon podem elucidar a estrutura da molécula (SOLOMONS & FRYHLE, 2001).

RAMAKRISHNA et al. (2005) desenvolveram um método simples, sensível e seletivo por CLAE com detecção UV (315 nm) para quantificação da entacapona em plasma humano.

YADAV et al. (2009) desenvolveram e validaram uma técnica seletiva, sensível e com alto rendimento separação cromatográfica com posterior quantificação de (*E*)-entacapona e (*Z*)-entacapona em plasma humano, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. O composto de origem e o produto íon de transição para ambos os isômeros (m/z 306,1 – m/z 233,0 (eliminação de dietilamina)) foram monitorados em um espectrômetro de massa triplo quadripolo, operando com monitoramento de reações múltiplas por RMN e modo íon positivo. O efeito da matriz foi avaliado pela experiência de infusão pós-coluna dos analitos e a eficiência encontrada no processo / extração foi de 94,3% e 89,3% para (*E*) e (*Z*)-isômeros respectivamente (Figura 50).

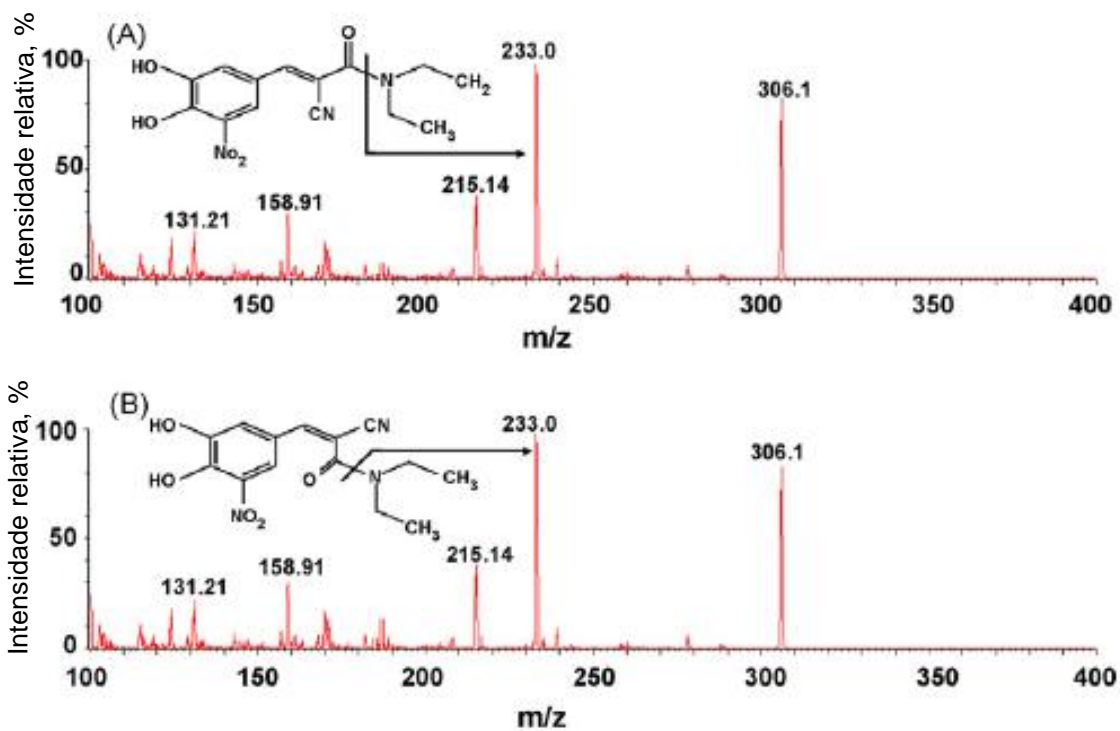


Figura 50. Espectro de massa do produto íon (A) - (*E*)-entacapona (m/z 306,1 – 233,0, varredura 100-400 u.m.a) e (B) – (*Z*)-entacapona (m/z 306,1 – 233,0, varredura 100-400 u.m.a.) em modo de ionização positiva. Fonte: YADAV et al., 2009.

4.2.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho da entacapona e do derivado I da entacapona foram sobrepostos na figura 51.

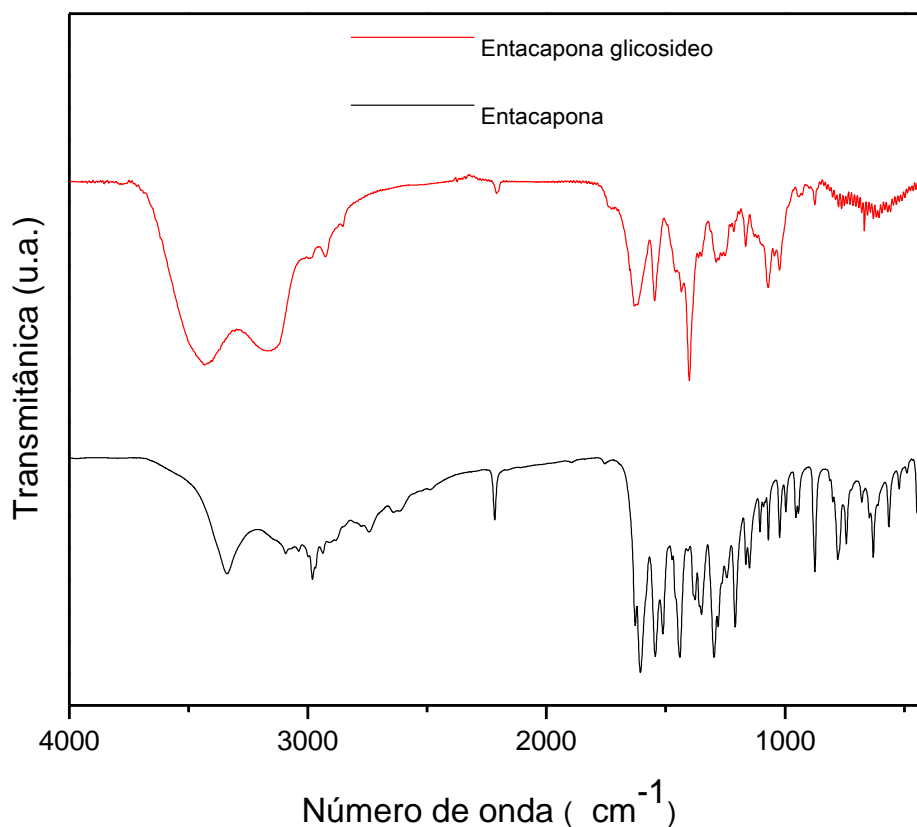


Figura 51. Espectros de absorção na região do infravermelho da entacapona e do derivado I - entacapona glicosídeo em pastilhas de KBr.

As absorções de infravermelho encontradas características de grupos funcionais da entacapona foram IV máx. (cm⁻¹): 3337 (ν OH); 3088 (ν CH); 2210 (ν CN); 1628 (ν CO). E as absorções de infravermelho características de grupos funcionais da entacapona glicosídeo foram 3427 (ν OH); 3148 (ν OH-açúcar); 3108(ν CH); 2200 (ν CN); 1631 (ν CO).

SOUKHOVA et al. (2010) identificaram a entacapona por FT-IV, encontrando nos espectros uma banda de absorção acentuada em 2217 cm^{-1} devido ao grupo CN, bandas de absorção em 3000 cm^{-1} devido ao estiramento CH e uma banda em 3340 cm^{-1} devido ao fenol OH, consistentes com a estrutura da molécula.

4.3 DERIVADO I DA ENTACAPONA

Aplicando os modelos “*in vitro*” do metabolismo foi possível a obtenção e caracterização do derivado I, majoritário, da entacapona o β - glicosídeo da entacapona (*E*, *Z*): 4 hidroxi-5-nitrofenil-3-*O*-(β)-D-glicopirranose-(*E*)-2-ciano-N, N-dietil-3-acrilamida, cuja faixa de fusão encontrada foi de $134,0 - 137,0^\circ$. O ponto de fusão encontrado para entacapona foi de $153,1^\circ$, estando dentro do intervalo de $153^\circ - 156^\circ$ (MOFFAT et al., 2004).

É bem reconhecido que reações de conjugação são importantes vias metabólicas de muitos compostos tanto em microrganismos como em mamíferos. Metabólitos conjugados (glicuronídeos, glicosídeos e sulfatos) podem ser formados por modelos microbianos em fármacos. Em comparação com glicuronidação, sulfatação, glicosidação representa um número relativamente menor de conjugações nos seres humanos (CERNIGLIA et al., 1982; XIE et al., 2005).

A glicosilação microbiana da entacapona abre um novo e valioso caminho para o estudo da entacapona, assim como podemos observar com outros fármacos, a exemplo:

- O diurético furosemida foi metabolizado pelo fungo *Cunninghamella elegans* (ATCC 36112) formando o conjugado de fase 2 Furosemida 1-*O*-acil glicosídeo, caracterizado por ^1H RMN, EM, UV e CLAE (HEZARI & DAVIS, 1992).

- *Absidia coerulea*, 3.3382, promoveu a bioconversão de quatro antraquinonas do ruibarbo: crisofanol, fisciona, emodina e aloeemodina, aos seus correspondentes metabólitos glicosilados. As estruturas dos produtos foram caracterizados por ^1H e ^{13}C RMN e IV em crisofanol 8-*O*- β -D-glicosídeo, fisciona 8- *O*- β -D-glicosídeo, emodina 6-*O*-

β -D-glicosídeo e aloe-emodina-1-O- β -D-glicosídeo. Estas antraquinonas livres representam as principais ações farmacológicas da substância bruta, possuem atividades bacteriostática, antiinflamatória, purgativo e antitumoral (ZHANG et al., 2004).

- Dois glicosídeos conjugados do pantoprazol foram formados por *Cunninghamella blakesleeana* AS 3.153 e foram identificados como novos metabólitos. A transformação microbiana do pantoprazol tem algumas semelhanças com o metabolismo de fármacos em mamíferos. Após 96 h de incubação, o pantoprazol foi metabolizado a seis metabólitos: pantoprazol sulfona, pantoprazol tioéter, 6-hidroxi-pantoprazol tioéter, 4'-O-demetil-pantoprazol tioéter, pantoprazol tioéter-1-N- β -glicosídeo e o glicosídeo conjugado do pantoprazol tioéter, sendo que dos metabólitos de pantoprazol de fase 1 produzidos por *C. blakesleeana* quatro eram essencialmente similares aos obtidos em mamíferos (XIE et al., 2005).

- O metoprolol foi bioconvertido por *Cunninghamella blakesleeana* AS 3.153 em 7 metabólitos: O-desmetilmetoprolol, ácido metoprolol, α -hidroximetoprolol, N-desalquilmetoprolol, metoprolol desaminado, hidroxil-O-desmetilmetoprolol e conjugados glicosídeos do O-desmetilmetoprolol. As estruturas dos metabólitos e as vias de biotransformação proposta por *C. blakesleeana* são comparadas com aquelas que foram identificadas em mamíferos. Um conjugado glicosídeo foi detectado neste estudo, em consonância com anteriores, os quais demonstram que a glicosilação de fármacos pode ser formada por modelos microbianos (MA et al., 2007).

- Flavonóis (3-hidroxi-flavona) foi eficientemente O-glicosilado pelo fungo filamentoso *Cunninghamella echinulata* CBS 596.68. Esta bioconversão está prevista para ser aplicável no preparo de flavonóides glicosilados, os quais são comumente encontrados em plantas e metabólitos mamíferos de compostos relacionados. Os flavonóides são biologicamente sintetizadas em plantas e mostram várias atividades biológicas como agentes antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatórios, agentes antitumorais, bem como pigmentos naturais. Recentemente, flavonóides e seus derivados glicosilados demonstraram inibir glicosidases, podendo ser útil para o tratamento da obesidade (MIYAKOSHI et al., 2010).

A capacidade dos fungos filamentosos para simular o metabolismo dos mamíferos e realizar bioconversões tem demonstrado claramente que os sistemas microbianos podem prever rotas potenciais da biotransformação de mamíferos em candidatos a novos fármacos, e também podem ser usados para a compreensão da química e da biologia no metabolismo, com facilidade de detecção e isolamento. Assim, os modelos podem ser ampliados com facilidade para a preparação de metabólitos para posterior estudos farmacológicos e toxicológicos (MA et al., 2007).

5. CONCLUSÕES

- *Absidia blakesleeana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria* sp, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 e *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 foram eficazes na bioconversão da entacapona possibilitando a detecção de cinco derivados funcionalizados;
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 demonstrou ser a cepa mais promissora para a produção do derivado majoritário da entacapona;
- A bioconversão com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 possibilitou a obtenção e caracterização do derivado β -glicosilado da entacapona (*E*, *Z*): 4 hidróxi-5-nitrofenil-3-*O*-(β)-D-glicopiranosose-(*E*)-2-ciano-N,N-dietil-3-acrilamida.

6. PERSPECTIVAS

- Identificação e caracterização dos derivados minoritários da entacapona;
- Otimização das condições analíticas empregadas para obtenção em maiores quantidades dos outros derivados;
- Estudos farmacológicos e das propriedades físico-químicas do novo derivado funcionalizado da entacapona;
- Aplicação de modelagem molecular nos estudos de relação estrutura/atividade;
- Glicosilação como estratégia de latenciação para transporte da entacapona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. M. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review. **Curr. Med. Chem.** 6(5): 359-74, 1999.

ANDREI, C.C.; FERREIRA, D.T.; FACCIÓN, M.; FARIA, T.J. **Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular**. 1ª. Ed. Barueri, SP: Manole, 2003, cap. 1, p. 21-27, cap. 4, p. 65-95.

AMINOFF, M.J. Tratamento Farmacológico do Parkinsonismo & de Outros Distúrbios do Movimento. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2003, cap. 28, p. 404-410.

AQUINO NETO, F. R.; SILVA, D.; NUNES, S. **Cromatografia Princípios Básicos e Técnicas Afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003, cap. 4, p. 27-42.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Cunninghamella – A microbial model for drug metabolism studies – A review. **Biotechnol. Ad.** v. 27, p. 16–29, 2009.

AZERAD, R. **Microbial models for drug metabolism**. Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology, ed. K. Faber, T. Scheper, p.169-218, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares de Ação dos Fármacos**. 2ª. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2008, cap. 1, p. 19-67.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Síntese de Glicoaminoácidos de Interesse Biológico. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1027-1033, 2008.

CERNIGLIA, C. E., FREEMAN, J. P.; MITCHUM, R. K. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. **Appl. Environm. Microbiol.** 43:1070-1075, 1982.

CHEM4513, 2010. Fonte: <http://chem4513.pbworks.com/Treatment-of-Parkinson's-Disease>. Acesso em 21-10-2010.

CHEN, C.; GONZALEZ, F. J.; IDLE, J. R. LC-MS-Based Metabolomics in Drug Metabolism. **Drug Metab. Rev.**, v. 39, nº. 2-3, p. 581-597, 2007.

DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian drug metabolism. **Dev. Ind. Microbiol.** 29:197–291, 1988.

DIAS, L. E. S.; ANDRADE, C. H.; PAZINE, F.; DE OLIVEIRA, F. Preparação de Novos Metabólitos de Lamivudina por bioconversão com Fungos Filamentosos. **Revista Eletrônica de Farmácia** Suplemento, v. 2(2), p. 64-66, 2005.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 5^a. ed. Germany: Springer, 2004, cap. 1, p. 1-27.

FERNÁNDEZ, C.; NIETO, O.; RIVAS, E.; MONTENEGRO, G.; FONTENLA, J. A.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A. Synthesis and biological studies of glycosyl dopamine derivatives as potential antiparkinsonian agents. **Carbohydr. Res.**, v. 327, p. 353–365, 2000.

FERNÁNDEZ, C.; NIETO, O.; FONTENLA, J. A.; RIVAS, E.; CEBALLOS, M. L.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A. Synthesis of glycosyl derivatives as dopamine prodrugs: interaction with glucose carrier GLUT-1. **Org. Biomol. Chem.** v.1, p. 767-771, 2003.

FORSBERG, M. M.; HUOTARI, M.; SAVOLAINEN, J.; MANNISTO, P. T. The role of physicochemical properties of entacapone and tolcapone on their efficacy during local intrastriatal administration. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 24, p. 503–511, 2005.

FURA, A.; SHU, Y. Z.; ZHU, M.; HANSON, R. L.; ROONGTA, V.; HUMPHREYS, W. G. Discovering Drugs through Biological Transformation: Role of Pharmacologically Active Metabolites in Drug Discovery. **J. Med. Chem.**, v. 47, n^o 18, p. 4339-4351, 2004.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug Discov. Today**, v.11, p.133-142, 2006.

HAI-FENG, Z.; GUO-QING, H.; JING, L.; HUI, R.; QI-HE, C.; QIANG, Z.; JIN-LING, W.; HONG-BO, Z. Production of gastrodim through biotransformation of p-2-hydroxybenzyl alcohol by cultured cells of *Armillaria luteo-virens* Sacc. **Enzyme Microb. Technol.**, v.43, p. 25-30, 2008.

HEZARI, M. & DAVIS, P. J. Microbial Models of Mammalian metabolism Furosemide Glucoside Formation Using the Fungus *Cunninghamella elegans*. **Drug Metab. Dispos.**, v. 21, n. 2, p. 259-267, 1992.

HUANG, H.; MA, G.; SUN, Y.; LI, Q., ZHONG, D. Phase II metabolites of etofesalamide in filamentous fungi. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 26(7), p. 893-896, 2005.

IBRAHIM, A. R. S.; GALAL, A. M.; MOSSA, J. S.; EL-FERALY, F. S. Glucose-Conjugation of the Flavones of *Psiadia Arabica* by *Cunninghamella elegans*. **Phytochemistry**, v. 46, nº. 7, p. 1193-1195, 1997.

JANKOVIC, J. Parkinsonismo. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil, Tratado de Medicina Interna**. 22ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, v. 2, cap. 443, p. 2697-2700.

JEFFERY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1992, cap. 8, p.178-193.

KAAKKOLA, S. Clinical pharmacology, therapeutic use and potential of COMT inhibitors in Parkinson's disease. **Drugs**, v.59, p.1233-1250, 2000.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e Gradiente de Campo na Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos. **Quím. Nova**, v. 23(2), p. 231-236, 2000.

KARLSSON, M.; WIKBERG, T. Liquid chromatographic determination of a new catechol-O-methyltransferase inhibitor, entacapone, and its Z-isomer in human plasma and urine. **J. Pharm. Biomed Anal.** v.10, p. 593-600, 1992.

KESKI-HYNNILA, H.; ANDERSIN, R.; LUUKKANEN, L.; TASKINEN, J.; KOSTIAINEN, R. Analysis of catechol-type glucuronides in urine samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 794 , p. 75-83, 1998.

KESKI-HYNNILA, H.; RAANAA, K.; TASKINEN, J.; KOSTIAINEN, R. Direct Analysis of Nitrocatechol-Type Glucuronides in Urine by Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. **J. Chromatogr. B**, 749, p. 253-263, 2000.

KESKI-HYNNILA, H.; RAANAA, K.; FORSBERG, M.; MANNISTO, P.; TASKINEN, J., KOSTIAINEN, R. Quantitation of entacapone glucuronide in rat plasma by on-line coupled restricted access media column and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr.** v. 759, p. 227–236, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, JR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, cap. 18, p. 995 – 1071, 2001.

LEHTONEN, P.; LEHTINEN, S.; MALKKI-LAINE, L; WIKBERG, T. Micellar electrokinetic capillary chromatography method for direct determination of glucuronides

of entacapone and its (Z)-isomer in human urine. **J. Chromatogr. A**, v. 836, p.173–188, 1999_a.

LEHTONEN, P.; MALKKI-LAINE, L.; WIKBERG, T. Separation of the glucuronides of entacapone and its (Z)-isomer in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 721, p. 127–134, 1999_b.

LEPPANEN, J.; HUUSKONEN, J.; SAVOLAINEN, J.; NEVALAINEN, T.; TAIPALE, H.; VEPSALAINEN, J.; GYNTHNER, J.; JARVINEN, T. Synthesis of a Water-Soluble Prodrug of Entacapone. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 10, p. 1967-1969, 2000.

LEPPANEN, J.; WEGELIUS, E.; NEVALAINEN, T.; JARVINEN, T.; GYNTHNER, J.; HUUSKONEN, J. Structural studies of acyl esters of entacapone. **J. Mol. Struct.**, p. 562, p. 129-135, 2001.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho. **Quím. Nova**, v. 27(4), p. 670-673, 2004.

MA, B.; HUANG, H.; CHEN, X.; SUN, Y.; LIN, L.; ZHONG, D. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Acta Pharmacol. Sin.**, 28 (7): 1067–1074, 2007.

MANNISTO, P. T.; KAAKKOLA, S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, p. 593-628, 1999.

MERELLO, M.; LEES, A.J.; BOVINGDON, M.; GORDIN, A. Effect of entacapone, a peripherally acting catechol-O-methyltransferase inhibitor, on the motor response to acute treatment with levodopa in patients with Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 57, p. 186-189, 1994.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S. KUZUYAMA, T. Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 110, n. 3, p. 320-321, 2010.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3^a ed. London Chicago: PhP Pharmaceutical Press, 2004, v. 2, p. 977-978.

MUKARRAM, S. M. J.; KHAN, R. A. R.; YADAV, R. P. Efficient Method for the Manufacture of (E)-Entacapone Polymorphic Form A. **United States Patent Application Publication nº. 20070004935A1**, U.S. Cl. 558/410, 2007.

MUKHOPADHYAY, B.; KARTHA, K. P. R.; RUSSELL, D. A.; FIELD, R. A. Streamlined Synthesis of Per-O-cetylated Sugars, Glycosyl Iodides, or Thioglycosides from Unprotected Reducing Sugars. **J. Org. Chem.** 69, 7758-7760, 2004.

NISSINEN, E.; KAHEINEN, P.; PENTTIL, K. E.; KAIVOLA, J.; LINDÉN, I. B. Entacapone, a novel catechol-O-methyltransferase inhibitor for Parkinson's disease, does not impair mitochondrial energy production. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 340, p. 287–294, 1997.

NUNES, E. S. Aplicação da Biconversão da Zidovudina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 na Síntese de Derivados Funcionalizados por Carboidratos. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás – UFG**, Goiânia, 2008.

O'CONNOR, D.T. Medula Supra Renal, Catecolaminas e Feocromocitoma. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil, Tratado de Medicina Interna**. 22^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, v. 2, cap. 241, p. 1651-1652.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química no novo milênio. **Quím. Nova**, v. 26, n. 5, 738-744, 2003.

RAMAKRISHNA, N.V.S.; VISHWOTTAM, K.N; WISHU, S.; KOTESHWARA, M.; CHIDAMBARA, J. High-performance liquid chromatography method for the quantification of entacapone in human plasma. **J. Chromatogr. B**, v. 823, p. 189-194, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, cap. 11, p.182-208 e cap. 34, p.567-573.

RAUTIO, J.; LEPPANEN, J.; LEHTONEN, M.; LAINE, K.; KOSKINEN, M.; PYSTYNEN, J.; SAVOLAINEN, J.; SAIRANEN, M. Design, synthesis and in vitro/in vivo evaluation of orally bioavailable prodrugs of a catechol-O-methyltransferase inhibitor. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 20(8):2614-6, 2010.

RITTER, J. K. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. **Chem.-Biol. Interact.**, v.129, p. 171–193, 2000.

RUTTENS, B.; BLOM, P.; VAN HOOF, S.; HUBRECHT, I.; VAN DER EYCKEN, J.; SAS, B.; VAN HEMEL, J.; VANDENKERCKHOVE, J. Carbohydrate-Based Macrolides Prepared via a Convergent Ring Closing Metathesis Approach: In Search for Novel Antibiotics. **J. Org. Chem.** 72, 5514-5522, 2007.

SANMARTI, B. M.; ROCABERT, S. J. G.; NICOLAU, P. F.; PONCE, M. A. Process for the preparation of entacapone and intermediates thereof. **EUROPEAN PATENT APPLICATION. EP 1 978 014 A1**. Boletim 2008/41, 2008.

SAVOLAINEN, J.; LEPPANEN, J.; FORSBERG, M.; TAIPALE, H.; NEVALAINEN, T.; HUUSKONEN, J.; GYNTHNER, J.; MANNISTO, P. T.; JARVINEN, T. Synthesis and *in vitro/in vivo* evaluation of novel oral *N*-alkyl- and *N,N*-dialkyl-carbamate esters of entacapone. **Life Sci.**, v. 67, p. 205-216, 2000.

SIVAKUMAR, R.; PONRASU, T.; DIVAKAR, S. Syntheses of dopa glycosides using glucosidases. **Glycoconj. J.**, v. 26, p.199–209, 2009.

SMITH, R.V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 161, p. 551-558, 1974.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2001, volume 1, cap. 2, p. 41-75 e cap. 9, p. 312-364.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2002, volume 2, cap. 22, p. 321-365.

SOUKHOVA, N.; KASSYMBEK, Z.; BRADBY, S.; MARTIN-ESKER, A.; WHITE, P.; WAHAB, S. Development of characterization methods for entacapone in a pharmaceutical bulk. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, p. 1-22, 2010.

SUN, X.; NIU, L.; LI, X.; LU, X.; LI, F. Characterization of metabolic profile of mosapride citrate in rat and identification of two new metabolites: Mosapride *N*-oxide and morpholine ring-opened mosapride by UPLC–ESI-MS/MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 50, p. 27–34, 2009_a.

SUN, X.; MAN, F.; PANG, L.Y.; GAO, G.H.; LI, X.Q.; QI, X.L.; LI, F.M. Fungal biotransformation of mosapride by *Cunninghamella elegans*. **J. Mol. Catal. B- Enzym.**, v. 59, p. 82–89, 2009_b.

THOMAS, G. **Química Medicinal Uma Introdução**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan S.A., 2003, cap. 1, p. 1-22; cap. 2, p. 23-70 e cap. 92, p. 257-294.

UNIPROT CONSORTIUM, 2010. Disponível em: <http://beta.uniprot.org/taxonomy/4852>. Acesso em: 20/08/2010.

XIE, Z. Y.; HUANG, H. H.; ZHONG, D. F. Biotransformation of pantoprazole by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Xenobiotica**, 35(5): 467–477, 2005.

YADAV, M.; DIXIT, P.; TRIVEDI, V.; GANDHI, A.; SENGER, A.; GUTTIKAR, S.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P. S. Chromatographic separation of (*E*)- and (*Z*)-isomers of entacapone and their simultaneous quantitation in human plasma by LC–ESI-MS/MS. **J. Chromatogr. B**, v. 877, p. 533–540, 2009.

WIKBERG, T.; VUORELA, A.; OTTOILA, P.; TASKINEN, J. Identification of major metabolites of the catechol-O-methyltransferase inhibitor entacapone in rats and humans. **Drug Metab. Dispos.**, v. 21, p. 81-92, 1993.

WILLIAMS, D. A. **Foye`s Principles of Medicinal Chemistry**. 5^a. Ed. Philadelphia: Lippincot, 2001, cap. 8, p. 174-233.

WILLIAMS, R.T. **Detoxication Mechanisms: The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds**. 2^a Ed., J. Wiley & Sons. Inc.: Nova Iorque, EUA, 1959.

ZHANG, W.; YE, M.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; GUO, D. Microbial glycosylation of four free anthraquinones by *Absidia coerulea*. **Biotechnol. Lett.**, 26: 127–131, 2004.

ZHENG, R.L.; CHEN, G.Q. A monograph of *Cunninghamella*. **Mycotaxon**, 80:1-75, 2001.