

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO *IN VITRO* DA AMBRISENTANA E DA
RIFAMPICINA ATRAVÉS DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

Rafaela Martins Sponchiado

Porto Alegre
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO *IN VITRO* DA AMBRISENTANA E DA
RIFAMPICINA ATRAVÉS DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

Tese apresentada por **RAFAELA
MARTINS SPONCHIADO** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof.^a Dr. Cássia Virginia Garcia

Porto Alegre
2019

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Aline Zimmer

Profa. Dr. Patrícia Gomes

Profa. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

CIP - Catalogação na Publicação

Sponchiado, Rafaela Martins
ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO IN VITRO DA AMBRISSENTANA
E DA RIFAMPICINA ATRAVÉS DE FUNGOS FILAMENTOSOS /
Rafaela Martins Sponchiado. -- 2019.
161 f.
Orientador: Cassia Virginia Garcia.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. Biotransformação. 2. Metabólitos. 3.
Ambrisentana. 4. Rifampicina. I. Garcia, Cassia
Virginia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos CAPES.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade de estar finalizando mais uma etapa importante em minha em minha vida pessoal e profissional.

Agradeço, aos meus pais Paulo José Sponchiado e Denise Martins Sponchiado, a minha irmã Mariana Sponchiado, pelo incentivo aos estudos, pelo amor, pela paciência e por sempre acreditarem em mim, vocês são meu exemplo e minha base, essa conquista é de vocês também.

Agradeço muito ao meu marido, Idamir Mascarello Junior, pelo amor, pela paciência, pela dedicação, pela parceria, pelas idas e vindas de Porto Alegre a Erechim, meu parceiro de vida e de estudos, Te amo!

Agradeço, de forma especial, minha orientadora, Prof^a Cassia Virginia Garcia, por ter acredito em mim e por sua dedicação ao longo desses quatro anos. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo a pesquisa.

Agradeço aos professores que colaboraram para que este trabalho acontecesse com sucesso: Prof Martin Steppe e Prof Alexandre Fuentesfria, obrigada pelos ensinamentos e dedicação. Agradeço também os demais professores do grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade de Farmacêutico.

Aos meus colegas do Laboratório 402, em especial à Leticia, Julia, Joanna e Mariana. Obrigada pela ajuda de sempre, convívio e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

Ao PPGCF pela oportunidade da realização da pós-graduação de excelência reconhecida.

Enfim, agradeço a todas as pessoas envolvidas, que mesmo não citadas participaram dana minha formação pessoal e profissional durante a construção deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações, para uma melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução: contendo a apresentação do tema;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Revisão Bibliográfica;
- Capítulo I: Modelo microbiano para estudo de metabolismo: biotransformação da ambrisentana através da *Cunninghamella elegans* ATCC 9245;
- Capítulo II: Biotransformação da rifampicina através da *Cunninghamella elegans* ATCC 9245;
- Capítulo III: Biotransformação da ambrisentana através do *Aspergillus niger* ATCC 9029 e *Penicillium minioluteum* URM 6889;
- Capítulo IV: Biotransformação da rifampicina através do fungo *Aspergillus niger* e avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos propostos;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências;
- Anexos.

RESUMO

A biotransformação de fármacos através de microrganismos é considerada uma tecnologia econômica e ecologicamente viável, sendo muito utilizada para modificar estruturas de compostos biologicamente ativos, estudar o metabolismo de novos fármacos e eliminar ou reduzir sua toxicidade. Estes estudos constituem uma alternativa promissora para elucidação dos metabólitos formados de diferentes classes farmacológicas. Este trabalho teve como objetivo empregar três diferentes fungos filamentosos: *Cunninghamella elegans*, *Penicillium mineoluteum* e *Aspergillus niger*, para estudar a biotransformação dos fármacos ambrisentana e rifampicina. Os fármacos foram escolhidos por apresentarem metabolismo via CYP450 e também por não haver relatos na literatura sobre estes estudos. Para o monitoramento da formação dos metabólitos foi necessário desenvolver metodologias analíticas com características adequadas para esta aplicação. O monitoramento da formação dos metabólitos foi empregado por cromatografia líquida de alta eficiência e para identificação destes foi empregado cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-QTOF/MS). O **Capítulo I** apresenta a biotransformação da ambrisentana (AMB) através do fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. Primeiramente, foi realizada a otimização do estudo (meio de cultura, pH, concentração do fármaco e agitação) para identificar a melhor condição de biocatálise. A metodologia analítica para monitoramento dos metabólitos formados foi desenvolvida e validada. A biotransformação da AMB resultou na formação de um metabólito conhecido como glicosídeo da ambrisentana ($C_{28}H_{33}N_2O_9$), ainda não relatado na literatura, confirmado a capacidade do fungo em realizar fase II do metabolismo. O **Capítulo II** apresenta os resultados obtidos no estudo de biotransformação utilizando o mesmo fungo filamentoso para o fármaco rifampicina (RIF). A concentração de inóculo foi otimizada (10^{16} esporos), a fim de verificar o aumento na formação dos possíveis metabólitos. Os resultados relacionados à RIF mostram que ocorre o consumo do fármaco pela *C. elegans*, representado pela redução da concentração do mesmo, assim como formação de um metabólito já conhecido como produto de degradação, em maior concentração no meio biotransformado quando comparado com o controle negativo. Além disso, foi observada a presença de picos adicionais não observados nos controles. Posteriormente, as amostras foram analisadas em UHPLC-QTOF/MS para a elucidação estrutural dos sinais formados. Com isso, foi identificada a rifampicina quinona e um sinal de menor polaridade formado somente no meio de biotransformação (452 m/z), o qual foi proposto como uma mono-oxigenação da RIF. No **Capítulo III**, foi

realizado o estudo de biotransformação da ambrisentana através dos fungos *Aspergillus niger* ATCC 9029 e *Penicillium mineoluteum* URM 6889, empregando meio de cultura Czapek. No meio reacional com o *A.niger*, ocorre formação de dois sinais mais polares que o fármaco, indicando a formação de possíveis metabólitos, que foram elucidados através da UHPLC-QTOF/MS. Foi possível propor dois metabólitos ainda não relatados na literatura de m/z 301,1339 e 313,1907, respectivamente. Entretanto, a biocatálise através do *P.mineoluteum* não apresentou formação de sinais adicionais quando comparado aos controles. No **Capítulo IV**, são apresentados os resultados obtidos da biotransformação da RIF através do fungo *A.niger*. O fungo foi capaz de reduzir drasticamente a concentração de RIF em meio reacional. Devido a isto, a amostra foi avaliada em UHPLC-QTOF/MS para verificar a possível formação de metabólitos. Foi observada a formação de dois compostos mais polares que a RIF com mesma massa e fragmentação (455.3115 m/z), caracterizando isômeros, além da RIF quinona. Posteriormente, foi investigada a atividade antimicrobiana da RIF após transformação através do método da microdiluição em poços preconizados por guia internacional, resultando em aumento da concentração inibitória mínima, conseqüentemente perda da atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que biostranformações com fungos são uma importante alternativa para mimetizar a biotransformação em humanos e também para obtenção de metabólitos de fármacos. Os dois fungos propostos nesse estudo *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 e *Aspergillus niger* ATCC 9029 apresentaram capacidade de metabolizar os fármacos ambrisentana e rifampicina.

Palavras-chave: ambrisentana, rifampicina, *Cunninghamella elegans*, *Penicillium mineoluteum*, *Aspergillus niger*, biotransformação, metabólitos.

ABSTRACT

Biotransformation of drugs by microorganisms is an economical and ecologically viable technology and is widely used to modify structures of some biologically active compounds, study the metabolism of molecules and eliminate or reduce their toxicity. These studies constitute a promising alternative for the elucidation of metabolites formed from different pharmacological classes. This work aims to employ three different filamentous fungi: *Cunninghamella elegans*, *Penicillium mineoluteum* e *Aspergillus niger*, to study the biotransformation of the drugs ambrisentan and rifampicin. These drugs were chosen because they have metabolism through CYP450 and also there are no reports in the literature about these studies. To monitor the formation of metabolites, it was necessary to develop and validate analytical methodologies with characteristics suitable for this application. High performance liquid chromatography was used to monitor the formation of the metabolites, and ultra-high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (UHPLC-QTOF/MS) was used to identify the metabolites. The first chapter presents the optimization of the study (culture medium, pH, drug concentration and agitation), the results obtained in the biotransformation of ambrisentan by the fungus *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 in Czapek medium, the development and validation of the analytical methodology for monitoring the metabolites formed and the identification of their molecular structures. The biotransformation of AMB resulted in the formation of a metabolite known as ambrisentan glycoside ($C_{28}H_{33}N_2O_9$), not reported yet in the literature, confirming the ability of the fungus to perform phase II metabolism. Chapter II presents the results obtained in the biotransformation study using the same filamentous fungus for the drug rifampicin (RIF). The inoculum concentration was optimized (10^{16} spores) in order to verify the increase in the formation of the possible metabolites. The results related to RIF show that the consumption of the drug by *C.elegans*, represented by the reduction of the concentration of the drug, as well as the formation of a metabolite already known as degradation product, in a higher concentration in the biotransformed medium when compared to the negative control. In addition, the presence of additional peaks not observed in the controls was demonstrated. Subsequently the samples were analyzed in UHPLC-QTOF/MS for the structural elucidation of the formed signals. With this, rifampicin quinone was identified along to another compound of lower polarity formed only in the biotransformation medium (452 m/z), which was proposed as a mono-oxygenation of the RIF. In Chapter III, the biotransformation of ambrisentan was carried out through the fungus

Aspergillus niger ATCC 9029 and *Penicillium mineoluteum* URM 6889, using Czapek culture medium. In the reaction medium with *A.niger*, formation of two more polar signals than the drug was observed, indicating the formation of possible metabolites, which were elucidated through UHPLC-QTOF/MS. It was possible to propose two metabolites not yet reported in the literature, with m/z 301.1339 and 313.1907, respectively. However, the biocatalysis through *P.mineoluteum* showed no additional signal formation when compared to the controls. In Chapter IV, the results obtained from the biotransformation of the RIF through the *A.niger* fungus are presented. The fungus was able to drastically reduce the concentration of RIF in reaction medium. Due to this, the sample was evaluated in UHPLC-QTOF/MS to verify the possible formation of metabolites. It was observed the formation of two more polar compounds than the RIF with the same mass and fragmentation (455.3115 m/z), characterizing isomers, besides RIF quinone. Subsequently, the antimicrobial activity of RIF was evaluated after transformation through the microdilution method in wells recommended by international guidelines, resulting in an increase in the minimum inhibitory concentration, consequently loss of antimicrobial activity. The results obtained in this study demonstrate that biotransformation with fungi are an important alternative to mimic the biotransformation in humans and also to obtain drug metabolites. The two fungi proposed in this study *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 and *Aspergillus niger* ATCC 9029 were able to metabolize the drugs Ambrisentan and Rifampicin.

Keywords: ambrisentan, rifampicin, *Cunninghamella elegans* ATCC 9245, *Penicillium mineoluteum*, biotransformation, metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas importantes da ação dos fármacos. (Adaptado de PEREIRA, 2007).....	31
Figura 2: Principais famílias, subfamílias e enzimas de CYP envolvidas no metabolismo de fármacos (BARREIRO, 2014).....	32
Figura 3: Estrutura química da ambrisentana (AMB).....	41
Figura 4: Metabólitos descritos na literatura identificados em diferentes organismos (Fonte: Melvin et al., 2012).....	42
Figura 5: Coeficiente de incidência de tuberculose no Brasil, 2006 a 2015...43	
Figura 6: Estrutura química da Rifampicina.....	45
Figura 7: Metabólitos da Rifampicina descritos na literatura e identificados através de metodologias <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Fonte: Prasad; Singh, 2009).....	46
Figura 8: Estruturas elucidadas através dos estudos de biotransformação da ambrisentana com o fungo <i>Cunninghamella elegans</i> ATCCC 9245 e <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9029, pela técnica por UHPLC-QTOF/MS.....	138
Figura 9: Estruturas elucidadas através dos estudos de biotransformação da rifampicina com o fungo <i>Cunninghamella elegans</i> ATCCC 9245 e <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9029, pela técnica por UHPLC-QTOF/MS.....	138
Figura 10: Cromatograma representativo da avaliação da especificidade do método bioanalítico para o fármaco ambrisentana.....	156
Figura 11: Cromatograma da especificidade do método bioanalítico validado para a rifampicina.....	159
Figura 12: Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis no ensaio de robustez do método desenvolvido por CLAE-DAD usando o <i>design</i> de Plackett-Burman.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS

AMB	Ambrisentana
ANOVA	Análise de variância;
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência;
CLAE/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas sequencial
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência;
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DAD	Detecção de arranjo de diodos;
DPR	Desvio padrão relativo;
EM	Espectrometria de massas;
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
<i>m/z</i>	Relação massa/carga;
OMS	Organização Mundial de Saúde;
r	Coeficiente de correlação;
RIF	Rifampicina
TB	Tuberculose
UHPLC-QTOF/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
USP	<i>The United States Pharmacopoeia/ Farmacopeia Americana;</i>

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1 Metabolismo de fármacos.....	30
3.2 Utilização de fungos em processos de biotransformação.....	34
3.3 Técnicas analíticas aplicadas ao monitoramento, identificação e quantificação de metabólitos.....	37
3.4 Ambrisentana.....	39
3.5 Rifampicina.....	42
4. CAPÍTULO I: BIOTRANSFORMAÇÃO DA AMBRISENANA ATRAVÉS DO FUNGO FILAMENTOSO <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245.....	48
4.1 Introdução.....	50
4.2 Artigo científico: A microbial model to mammalian metabolism: biotransformation on ambrisentan by <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245.....	52
5. CAPÍTULO II – ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DA RIFAMPICINA UTILIZANDO FUNGO FILAMENTOSO <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245.....	70
5.1 Introdução.....	72
5.2 Artigo científico: Rifampicin: biotransformation study with a fungi <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245.....	74
6. CAPÍTULO III – ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DA RIFAMPICINA E DA AMBRISENTANA UTILIZANDO <i>Penicillium mineoluteum</i> URM 6889.....	88
6.1 Introdução.....	90

6.2 Artigo científico: Biotransformation of ambrisentan by <i>A.niger</i> and <i>P. mineoluteum</i>	92
7. CAPÍTULO IV – BIOTRANSFORMAÇÃO DA RIFAMPICINA ATRAVÉS DO FUNGO <i>Aspergillus niger</i> E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS METABÓLITOS PROPOSTOS.....	108
7.1 Introdução.....	110
7.2 Artigo científico: Biotransformation of rifampicin by <i>Aspergillus niger</i> and antimicrobial activity of proposed metabolites.....	111
8. DISCUSSÃO GERAL.....	130
9. CONCLUSÕES.....	140
10. REFERÊNCIAS.....	144
11. ANEXOS.....	154

O metabolismo é definido como uma modificação estrutural e química de fármacos por sistemas enzimáticos que levam à formação de substâncias de polaridade crescente, a fim de facilitar a sua eliminação pelo organismo. Desempenha um papel importante na eliminação de fármacos e impede que estes compostos permaneçam por tempo indefinido no organismo (BEALE e BLOCK, 1998).

Antes de um medicamento ser aprovado pelas agências reguladoras, devem ser realizados estudos extensivos para estabelecer sua eficácia e segurança, sendo que um dos fatores importantes na avaliação é o conhecimento de como o fármaco é metabolizado. Além disso, é importante identificar os metabólitos formados a fim de verificar a sua toxicidade e/ou ação no organismo (AZERAD, 1999).

O metabolismo, *in vivo*, ocorre em vários órgãos do corpo humano como intestinos, pulmões, cérebro, epitélio nasal e pele. Porém, o fígado é o mais importante por ser uma rica fonte de ferro heme, e por conter principalmente o sistema enzimático citocromo P450 (CYP450). O organismo humano faz uso das reações de biotransformação como defesa diante de substâncias xenobióticas, incluindo fármacos e produtos químicos ambientais. Neste caso, essas reações geralmente resultam em moléculas mais polares que as de partida e conseqüentemente eliminadas mais facilmente pelo organismo (FURA, 2006; PIEPER *et al.*, 2009; TESTA, PEDRETTI e VISTOLI, 2012).

A biotransformação através de microrganismos é considerada uma tecnologia economicamente e ecologicamente viável, sendo muito utilizada para modificar estruturas de alguns produtos biologicamente ativos, estudar o metabolismo de fármacos, eliminar e reduzir a toxicidade (YU-JUAN *et al.*, 2010). O uso de microrganismos para prever a biotransformação de fármacos é um método *in vitro* que não requer uso de animais, sendo assim uma metodologia menos complexa para elucidar a transformação de novas moléculas no organismo humano, uma vez que alguns microrganismos tem a capacidade de metabolizar fármacos de maneira similar ao que ocorre nos

mamíferos. Desta maneira, estudos *in vitro* com a utilização, principalmente, de fungos tem recebido especial atenção (SUN *et al*, 2004).

Microrganismos podem ser utilizados na produção de medicamentos, na degradação de agentes poluentes e na recuperação de ambientes quimicamente contaminados. É relatado que os processos de biotransformação são considerados uma área altamente promissora especialmente para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de fármacos e produtos químicos, assim são denominadas de “química verde” (BORGES *et al*, 2009). A utilização destes em processos de biotransformação pode gerar metabólitos já existentes ou novos produtos, inclusive em escala industrial, constituindo uma alternativa para a produção de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas (POLLARD e WOODLEY, 2007).

Tendo em vista que o emprego de fungos na biotransformação de fármacos pode ser uma importante fonte de metabólitos conhecidos e desconhecidos, os quais podem ser empregados em estudos para o estabelecimento de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, e que se trata de uma metodologia que não utiliza animais, mas passível de mimetizar os metabólitos formados em humanos, esta se mostra uma técnica relevante para estudos iniciais no desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, ainda não há relatos na literatura científica sobre estudos de biotransformação através de fungos filamentosos para fármacos propostos (ambrisentana e rifampicina), portanto o presente estudo avaliou a capacidade de biotransformação da Ambrisentana e da Rifampicina por três diferentes fungos: *Cunninghamella elegans*, *Penicillium mineoluteum* e *Aspergillus niger*, além do desenvolvimento de novas metodologias analíticas para o monitoramento e identificação dos possíveis metabólitos formados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a biotransformação *in vitro* dos fármacos ambrisentana e rifampicina empregando fungos filamentosos, visando estabelecer quais metabólitos serão formados nas reações, bem como desenvolver metodologias analíticas para o monitoramento destas reações.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a detecção e quantificação dos fármacos e seus metabólitos;
- Otimizar as condições dos estudos de biotransformação;
- Verificar a formação dos possíveis metabólitos no período de incubação em meio de cultivo;
- Verificar o perfil de decaimento da concentração dos fármacos no período de incubação em meio de cultura líquido;
- Realizar a elucidação estrutural dos metabólitos formados a partir da biotransformação com os fungos propostos;
- Determinar o espectro antimicrobiano dos biotransformados da rifampicina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Metabolismo de fármacos

Os tecidos do corpo humano são diariamente expostos a substâncias estranhas que não são encontradas naturalmente no corpo. Os fármacos são utilizados para modular funções corporais com finalidade terapêutica. Esses quando absorvidos no organismo são modificados por uma enorme variedade de enzimas. As transformações biológicas efetuadas por essas enzimas podem alterar o composto, tornando-o benéfico, prejudicial ou simplesmente sem efeito farmacológico desejado (TANIGUCHI E GUENGERICH, 2011).

Os medicamentos e outras substâncias químicas ambientais que penetram em nosso organismo sofrem uma série de biostranformações que resultam geralmente em produtos de metabolismo de maior polaridade, que por sua vez, serão mais facilmente eliminados através da urina, fezes ou ainda da respiração e do suor. Desta forma, durante o processo de desenvolvimento de um novo fármaco, os estudos de metabolismo possibilitam a identificação de sítios moleculares mais vulneráveis à metabolização, a estrutura química dos principais metabólitos e sua toxicidade, além de identificar protótipos que apresentam maior atividade do que o fármaco original (pró-fármacos) (PEARSON e WIENKERS, 2005).

A ação de um fármaco, quando administrado a humanos ou animais, pode ser dividida em três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica (Figura 1). Na fase farmacêutica, ocorre a desintegração da forma de dosagem, seguida da dissolução da substância ativa. A fase farmacocinética abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A fase farmacodinâmica está relacionada com a interação do fármaco com seu alvo (receptor, enzimas etc.) e a consequente produção do efeito terapêutico (PEREIRA, 2007).

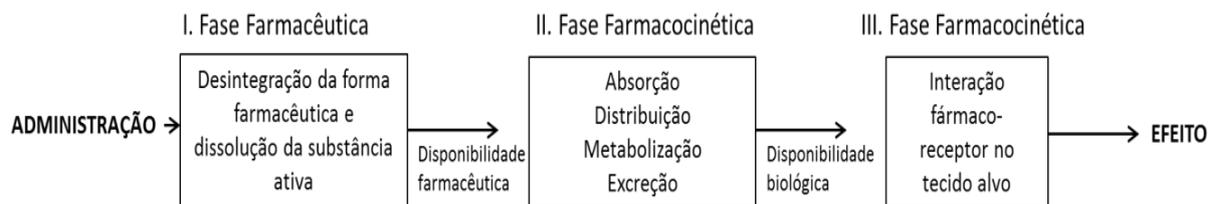


Figura 1: Etapas importantes da ação dos fármacos (Adaptado de PEREIRA, 2007).

O metabolismo dos mamíferos ocorre principalmente em células do fígado e rins e pode ser dividido em duas fases: Fase I ou funcionalização, que engloba reações de oxidação, redução e hidrólise; e Fase II ou conjugação, que envolve reações de conjugação do fármaco com moléculas endógenas, como ácido glicurônico, sulfato, glicina, acetato, grupos metila e ácidos inorgânicos. Normalmente, as duas vias resultam na formação de metabólitos que são mais hidrossolúveis e desse modo serão mais facilmente excretados (ABOURASHED, 1999, AZERAD, 1999). Esses produtos, por sua vez, podem ser inativos ou ativos. Em relação ao fármaco de origem, os metabólitos ativos podem agir por mecanismos de ação similares ou diferentes, ou até mesmo por antagonismo (LIN e LU, 1997).

Na fase I, ocorrem reações que aumentam a hidrofiliabilidade dos fármacos pela adição ou exposição de grupos funcionais polares, como grupos hidroxila (-OH), tiol (-SH) ou amina (-NH₂). Com frequência, esses metabólitos são farmacologicamente inativos e podem ser secretados sem qualquer modificação adicional. Todavia alguns produtos de reações de oxidação e de redução necessitam de modificações adicionais antes de serem excretados. As reações de Fase II, por sua vez, modificam os compostos por meio da ligação de grupos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, criando conjugados mais polares e que são rapidamente excretados pela urina ou nas fezes. Essas reações de conjugação ocorrem independentemente das reações de oxidação/redução e que as enzimas envolvidas nas reações de fase I e II frequentemente competem pelos substratos (LIN e LU, 1997; ISIN e GUENGERICH, 2007).

No entanto, em alguns casos, o metabolismo de fármacos pode produzir substâncias farmacologicamente ativas ou metabólitos tóxicos reativos, justificando, assim, a necessidade de um estudo farmacológico e toxicológico detalhado do destino metabólico do fármaco.

As enzimas responsáveis pelo metabolismo de fármacos participam de uma série de reações bioquímicas inter-relacionadas, de natureza oxidativa ou redutora, nas quais o produto de uma reação pode constituir-se em substrato para outra reação (THOMAS, 2003). As reações metabólicas que ocorrem em mamíferos são, geralmente, catalisadas pelo sistema enzimático citocromo P-450 (CYP450), cujas enzimas são mais predominantes no fígado e rins e requerem NADPH como coenzima e oxigênio usado como substrato. Esta superfamília de enzimas (CYPs) pode ser encontrada desde as bactérias até ao homem, sendo até este momento conhecidas, pelo menos, 2400 formas de enzimas CYP (ASHA e VIDYAVATHI, 2009).

Em humanos, 57 genes funcionais de CYP450 foram identificados, codificando 18 famílias e 44 subfamílias de CYP. Apenas três entre as 18 famílias CYP estão relacionadas ao metabolismo de fármacos (Figura 2).

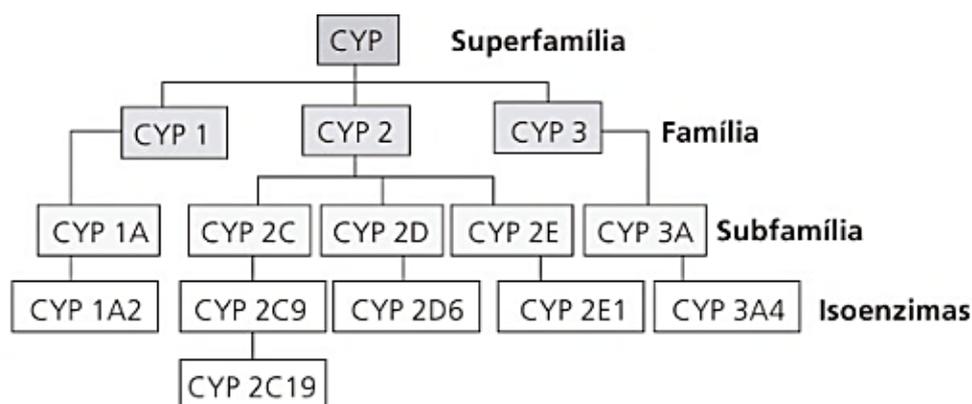


Figura 2: Principais famílias, subfamílias e enzimas de CYP envolvidas no metabolismo de fármacos (BARREIRO, 2014).

O complexo enzimático CYP450 constitui uma superfamília de proteínas heme-tiolato responsáveis pela metabolização de um grande

número de substratos endógenos e exógenos. A maior parte do metabolismo mediado pelos CYPs é baseado na reação de oxidação-redução, sendo a mono-oxigenação reação básica catalisada por essas enzimas, em que um átomo de oxigênio (derivado do O₂) é incorporado no substrato, e o outro átomo é reduzido a água com os equivalentes redutores do NADPH (GUENGERICH, 2007).

As enzimas CYP apresentam diferentes mecanismos de regulação e uma baixa especificidade em substrato, desta forma uma única enzima CYP pode metabolizar diferentes classes de substratos e um único substrato pode ser metabolizado por diferentes CYPs (TIMBRELL, 2008).

As enzimas P450 são capazes de catalisar uma grande variedade de reações, participando de mais de 20 diferentes, como hidroxilação, epoxidação, N-, S- e O-dealquilação, oxigenação, redução, desidrogenação, dehalogenação, dentre outras (DE MONTELLANO, 2005; FURGE; GUENGERICH, 2006).

O ciclo catalítico básico das enzimas do citocromo P450 envolve diversas etapas, iniciando com a ligação do fármaco ao citocromo P450 oxidado (Fe³⁺). A seguir, o primeiro elétron é transferido à enzima P450 via NADDPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo-P450 redutase, reduzindo o grupo heme ao estado ferroso. Um oxigênio molecular é incorporado ao grupo heme e o segundo elétron é transferido ao átomo de ferro, via NADPH-P450-redutase. A seguir, ocorre a clivagem da ligação O-O e liberação de uma molécula de água. Um complexo FeO³⁺ é formado, retirando um átomo de hidrogênio do substrato, seguido de transferência de um átomo de oxigênio ao substrato. Finalmente o produto é liberado e o grupo heme retorna ao estado férrico (FURGE e GUENGERICH, 2006).

O estudo do metabolismo de fármacos é uma etapa imprescindível na descoberta e desenvolvimento de fármacos. Pode ser realizado *in vivo*, utilizando modelos animais de pequeno porte, como ratos, cães e gato. Por meio da análise do plasma e da urina desses animais é possível identificar a formação de metabólitos. Este método sofre muitas limitações, como custo de

animais experimentais, questões éticas e variações interespecie. No entanto estudos *in vitro* e *ex vivo*, empregando cultura de células e tecidos, perfusão em órgão e preparações microssomais são utilizados como complemento ao uso de animais (COLLINS et al., 2001; SRISILAM e VEERESHAM, 2003). Esses estudos exigem o emprego de técnicas analíticas sensíveis e eficazes aliadas a procedimentos de extração eficientes e quantitativos conjugado com métodos de caracterização estrutural, de modo a garantir a elucidação inequívoca da estrutura química dos metabólitos formados, inclusive quanto à definição de centros estereogênicos quando presentes (BARREIRO, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) exige que o estudo do metabolismo de fármacos seja parte integrante obrigatória de todos os programas de avaliação pré-clínica e clínica de quaisquer novos medicamentos. Esses permitem identificar a presença de metabólitos ativos, os quais obrigatoriamente deverão ser estudados quanto a seu perfil de atividade e segurança, estabelecer a cinética de formação e as estruturas químicas dos metabólitos, estabilidade metabólica, entre outros (BARREIRO, 2014).

3.2 Utilização de fungos em processos de biotransformação

A biocatálise através de microrganismos tornou-se uma ferramenta cada vez mais valiosa para os químicos sintéticos por ser uma estratégia economicamente viável para síntese de substância de interesse farmacêutico. O desenvolvimento de novos métodos biocatalíticos é uma área em crescimento contínuo de química, microbiologia e engenharia genética, e novos microrganismos e/ou suas enzimas são sujeitos a rastreio intensivo. Frequentemente, as reações de biotransformação são quimio-, regio- e estereosseletivas, produzindo uma grande variedade de produtos químicos intermediários e/ou novos fármacos, ingredientes alimentares e intermediários agroquímicos (LAUMEN; KITTELMANN; GHISALBA, 2002).

Modelos utilizando microrganismos podem constituir uma alternativa

para a utilização de modelos animais, pois tem a capacidade de mimetizar o metabolismo dos mamíferos fornecendo informações sobre o destino metabólico do medicamento e também podem formar novos compostos que apresentam atividade farmacológica que são impossíveis de serem obtidos através de procedimentos químicos convencionais e também devido a fácil manipulação das células e biotransformar de maneira eficiente e rápida, os quais são pontos fundamentais sob o ponto de vista industrial. Além disso, o que foi relatado em vários estudos é a possibilidade de gerar metabólitos em formas enantioméricas puras (SRISILAM e VEERESHAM, 2003; BORGES *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2011).

Reações que ocorrem em mamíferos também ocorrem em modelos *in vitro* com microrganismos (fungos e bactérias), como as reações metabólicas de fase I em mamíferos (introdução de um grupo funcional) e as reações metabólicas de fase II (conjugação com compostos endógenos), dentre as quais de destacam a hidroxilação, desidrogenação e conjugação com sulfato e ácido glicurônico. Estas reações ocorrem predominantemente através do sistema enzimático CYP450, os quais são encontrados em diversas espécies de diferentes organismos, incluindo vegetais, microrganismos e humanos (WERCK-REICHART e FEYEREISEN, 2000; SUN *et al.*, 2004; ASHA e VIDYAVATHI, 2009).

Há uma série de vantagens na utilização de sistemas microbianos como modelos para metabolismo de fármacos como: os meios de culturas são facilmente preparados e de baixo custo; é possível realizar um estudo preliminar com diversas cepas de microrganismos para avaliar a metabolização; podem ser isolados novos metabólitos com atividade farmacológica nova ou diferente; reduzir a utilização de animais, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento do fármaco; permite melhor detecção pelo método analítico devido a grande quantidade de metabólitos formados, isolamento e elucidação estrutural; podem ser realizados estudos em larga escala para maior produção dos metabólitos formados, com isso pode ser realizado estudos farmacológicos e toxicológicos. O uso de microrganismos pode auxiliar na previsão das reações

metabólicas mais favoráveis em mamíferos (SRISILAM; VEERESHAM, 2003; ASHA e VIDYAVATHI, 2009).

Um dos primeiros empregos da biotransformação utilizando fungos visando à obtenção de novos compostos foi relatado em 1858 por Pasteur, usando o fungo *Penicillium glaucum* para obtenção de L-tartarato de amônia a partir de DL-tartarato de amônia. Outras espécies como *Cunninghamella sp*, *Beauveria bassiana*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor plumbeus* têm sido bastante utilizadas por serem uma alternativa promissora para elucidação dos metabólitos formados a partir de diferentes classes farmacológicas (PUPO *et al*, 2008).

Um grande número de estudos tem demonstrado que os fungos filamentosos, particularmente o gênero *Cunninghamella*, possuem um sistema enzimático citocromo P450 análogo ao dos mamíferos. Essa espécie é capaz de metabolizar uma grande variedade de xenobióticos, utilizando tanto reações de biotransformação de fase I e II. A habilidade dos fungos do gênero *Cunninghamella* em biotransformar fármacos já foi descrita algumas vezes, como por Zhong e colaboradores (2003) para o anti-inflamatório naproxeno; por Xie, Huang e Zhong (2005) para o inibidor da bomba de prótons pantoprazol e por Sun e colaboradores (2004) para o inibidor de canais de cálcio verapamil, entre outros (SUTHERLAND *et al.*, 2001; MOODY *et al.*, 2002; PEARCE; LUSHNIKOVA, 2006; ASHA e VIDYAVATHI, 2009). Abourashed e colaboradores (2012) realizaram um estudo de biotransformação microbiana da silibina (principal ativo da *Silybum marianum*) isolando quatro metabólitos, um metabólito de fase I produzido por *Beauveria bassiana* e outros três metabólitos de fase II produzidos pelo gênero *Cunninghamella*.

Cunninghamella é um fungo filamentoso encontrado no solo e material vegetal, particularmente em zonas mediterrânicas e subtropicais. São considerados um dos fungos mais importantes em processos de biotransformação de várias classes de substâncias químicas devido a sua capacidade metabolizar uma grande variedade de fármacos (QUINN *et al*, 2015; PISKA *et al*, 2016).

Dentre os inúmeros fungos que são utilizados para a realização da biotransformação, outro gênero de destaque é o *Penicillium*. Estudos demonstram o potencial de biotransformação desse gênero. No estudo de Eshrat e Aroona (2011), utilizou-se *Penicillium* para a biotransformação de progesterona em androstenediona e androston-1,4-dieno-17-diona. Parshiko e colaboradores (1999) utilizaram *Aspergillus niger*, *Cunninghamella verticillata* e *Penicillium simplicissimum* na biotransformação de N-acetilfenotiazina e observaram a transformação do fármaco em cinco metabólitos. Através do estudo da biotransformação da capsaicina utilizando fungo *Penicillium janthinellum* AS 3.510 foi possível obter nove metabólitos, que foram formados a partir de reações de hidroxilação, metilação, redução e epoxidação (Xin *et al*, 2017). Tai e colaboradores (2016) realizaram um estudo de otimização com o fungo *Penicillium digitatum* obtendo um melhor rendimento do metabólito de interesse α -terpenol a partir do limoneno.

Outro fungo filamentoso que tem grande atenção também é o *Aspergillus niger*, um fungo aeróbio que cresce sobre uma grande variedade de substratos e apresenta grande habilidade para produzir vitaminas como biotina, tiamina, riboflavina, que são amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica (PARSHIKOV e SUTHERLAND, 2014). Hussain e colaboradores (2016) realizaram um estudo de biotransformação do enantato de metenolona com dois fungos, entre eles o *Aspergillus niger*, identificando três metabólitos já descritos na literatura e três ainda não conhecidos.

3.3 Técnicas analíticas aplicadas no monitoramento, identificação e quantificação dos metabólitos

O monitoramento do processo de formação, identificação e quantificação de metabólitos no meio de cultivo é uma etapa importante do processo de biotransformação pelos fungos, para isto é necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis e precisas. Entre as técnicas existentes as de mais destaque é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A CLAE foi introduzida na análise farmacêutica pouco depois da sua descoberta no final da década de 1960. Está técnica fornece um número de variantes altamente seletivas para resolver quase todos os tipos de problema relacionados a separação, devido a isto pode ser considerada o método analítico mais importante na análise farmacêutica contemporânea (GAZDAG, 2011).

Está técnica é uma das mais utilizadas na determinação quantitativa de fármacos, sendo considerado o método de escolha para análises de rotina para determinação quantitativa e qualitativa de compostos ativos em formas farmacêuticas, para o monitoramento da estabilidade de medicamentos, com a capacidade de detectar os produtos de degradação e as impurezas. Por essas aplicações é um método de escolha nas indústrias farmacêuticas e é o mais preconizado pelos códigos oficiais. Além disso, apresenta inúmeras vantagens como: precisão, exatidão, seletividade e inovação em colunas e *softwares* de controle, versatilidade e separações rápidas, permitindo sua utilização nas mais diversas fases de desenvolvimento de produtos farmacêuticos (SKOOG, 2002; AHUJA e DONG, 2005; WATSON, 2005; SHABIR *et al.*, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com a espectrometria de massas (CLAE/EM) tornou-se o principal método de análise de misturas em pesquisa e desenvolvimento farmacêutico. É uma técnica analítica que combina a alta resolução da CLAE juntamente com a detecção, sensibilidade e seletividade do espectrômetro de massas. Geralmente sua aplicação é orientada para a determinação e identificação de fármacos em misturas complexas (JENA, 2011).

A espectrometria de massas sequencial associada à cromatografia líquida (CLAE-EM/EM) é uma técnica de química analítica que associa a capacidade de separação da CLAE e a análise da espectrometria de massas. Desempenha um papel importante nos estudos de farmacocinética e metabolismo em várias etapas do desenvolvimento dos fármacos, desde a sua introdução na indústria farmacêutica (JENA, 2011; STEVENSON; TARAFDE; GUIOCHON, 2012).

A aplicação desta técnica está muito associada a estudos de farmacologia e toxicologia, sendo considerada mais vantajosa em três áreas: desenvolvimento de métodos específicos para análise de rastreamento, detecção e caracterização de metabolitos e estudos de interações entre moléculas de fármacos e peptídeos. Geralmente sua utilização é orientada para detecção e identificação de produtos químicos na presença de outras substâncias (matriz complexa) (JENA, 2011).

Devido sua alta sensibilidade e seletividade a CLAE-EM/EM tornou-se uma técnica predominante em bioensaio e estudos farmacocinéticos e identificação de metabólitos. Além disso, outro novo desenvolvimento neste campo foi a introdução de colunas compostas por partículas ultrafinas permitindo a utilização de colunas curtas e análises rápidas sendo empregas em equipamento de CLUE (cromatografia líquida de ultra eficiência) (HOLME *et al.*, 2011).

3.4 Ambrisentana

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma síndrome causada pelo aumento progressivo da pressão arterial dos vasos que irrigam os pulmões caracterizados pela vasoconstrição e obstrução vascular que pode levar a um aumento da resistência vascular e insuficiência cardíaca, com consequente hipertrofia e falência do ventrículo direito que, se não abordadas de forma específica, evoluem em curto espaço de tempo para óbito (CHENG, 2008; RUFINO *et al*, 2013).

A lesão vascular na HAP ocorre de forma idiopática ou em associações com outras doenças, podendo-se citar a presença de insuficiência cardíaca congestiva, histórico de coagulo de sangue no pulmão, infecção por HIV, doença pulmonar ou de válvula cardíaca, distúrbios autoimunes que lesam os pulmões, como a esclerodermia e artrite reumatoide, e qualquer outra condição que cause níveis baixos de oxigênio no sangue. A caracterização da doença é dada em situação onde a pressão média pulmonar é maior do que

25 mmHg em repouso ou de 30 mmHg em exercício e também através dos sintomas pesquisados e encontrados na história clínica que traduzem o grau da doença, como: dispnéia, cansaço, fadiga, limitação para atividades diárias, dor precordial e torácica, tonturas, síncope, cianose (BARST *et al.*, 2007; ROMANO, 2010; TAICHMAN; MANDEL, 2013).

A classificação da doença segundo a OMS tem como objetivo caracterizar o impacto inicial da doença, sua influência nas atividades físicas habituais e servindo também para orientação prognóstica. Assim são classificadas em quatro classes: classe I pacientes que não apresentam sintomas na realização de atividades físicas; classe II na realização das atividades físicas habituais causam sintomas acarretando discreta limitação, não apresenta sintomas no repouso; classe III: mínima atividade física habitual causa importante limitação, não apresentam sintomas no repouso; classe IV: incapacidade para qualquer tipo de atividade física habitual, os sintomas podem estar presentes mesmo em repouso, sinais de falência de ventrículo direito (ROMANO, 2010).

A HAP é considerada uma doença complexa e rara. Devido ao fato de não ser “lembrada”, seu sub diagnóstico contribui para diminuir sua prevalência, porém registros como da França estimam uma prevalência de 15 casos por milhão de adultos. Estima-se que a HAP idiopática ocorra em torno de 5,9 casos por milhão de habitantes, com incidência de 2,4 novos casos por ano para cada 1 milhão de habitantes. Há um discreto predomínio no sexo feminino (relação de 1,7:1), principalmente jovens na 3ª década. Não há predomínio étnico. Em entre 6 a 10% dos pacientes com HAP idiopática, a transmissão hereditária tem sido notada. É uma doença incurável, com prognóstico ruim e aproximadamente 15% de mortalidade em 1 ano nos pacientes tratados com as terapias mais modernas. A média da expectativa de vida sem tratamento é de 2,8 anos (GAINE; RUBIN, 1998; MCLAUGHLIN *et al.*, 2009; ROMANO, 2010; RUFINO *et al.*, 2013).

A ambrisentana (Figura 3) é um agente vasodilatador e antiproliferativo que pertence à classe dos antagonistas da endotelina, inibindo seletivamente os receptores da endotelina. Estes receptores são classificados em 1, 2 e 3,

porém os receptores de endotelina Tipo 1 são os mais importantes em situações de distúrbios clínicos a eles associados. É o segundo fármaco antagonista do receptor A da endotelina oral disponível para o tratamento da HAP em doentes com sintomas da classe II ou III (CADA; LEVIEN; BAKER, 2007; CHENG, 2008).

A Ambrisentana, com nome químico (+)-2(S)-(4,6-dimetilpirimidina-2-iloxi)-3-metoxi-3,3-ácido difenilpropionico possui peso molecular de 378,4 gramas/Mol. A estrutura química da ambrisentana está demonstrada na Figura 3 a seguir.

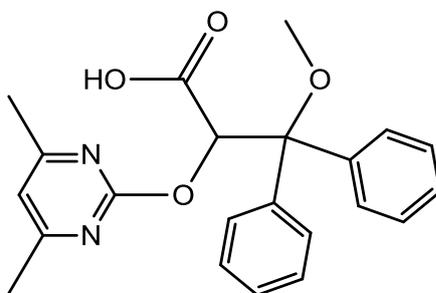


Figura 3: Estrutura química da ambrisentana (AMB)

Quando administrada por via oral, é bem absorvida, e alcança concentração plasmática máxima entre 1,7 e 3,3 horas após administração. Apresenta ligação às proteínas plasmáticas na fração de 99%. O fármaco é eliminado principalmente por vias não renais (77%) (DRUGBANK, 2017).

Dados *in vitro* indicam que o metabolismo da ambrisentana ocorre principalmente pela enzima uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferases (UGTs) 1A9S, 2B7S, 1A3S para formar ambrisentana glucuronideo. A ambrisentana também é metabolizada em menor grau por CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C19 para formar 4-hidroximetil ambrisentana que é adicionalmente glucorinidada em 4-hidroximetil ambrisentana glucuronideo (CHENG, 2008; CASSERLY e KLINGER, 2008, DRUGBANK, 2017). Na patente do fármaco constam os metabólitos elucidados encontrados em ratos, coelhos, cachorro e humanos (Figura 4).

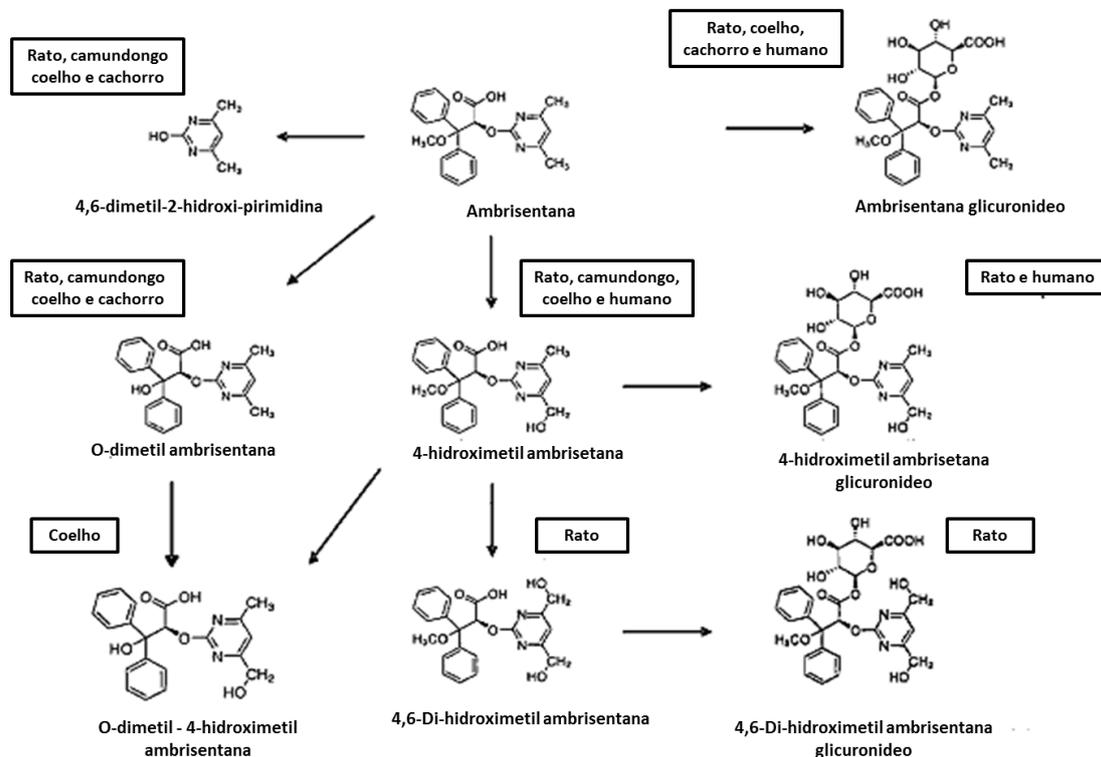


Figura 4: Metabólitos da Ambrisentana descritos na literatura identificados em diferentes organismos (Fonte: Melvin *et al.*, 2012).

A ambrisentana foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) em junho de 2007. É o medicamento recomendado para pacientes que tem resposta negativa para uso de vasodilatadores convencionais (CHENG, 2008; CONITEC, 2014).

3.5 Rifampicina

A tuberculose (TB) continua sendo mundialmente um importante problema de saúde, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle, considerando aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública. Segundo estimativas da OMS, é a doença infecciosa que mais mata no mundo, superando as mortes causadas pelo HIV e a malária juntos (DE SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

Segundo o Boletim Epidemiológico (2016), haviam sido diagnosticados e registrados, em 2015, 63.189 casos novos de tuberculose no Brasil. O coeficiente de incidência de tuberculose passou de 38,7 por 100 mil habitantes em 2006 para 30,9 por 100 mil habitantes em 2015, o que corresponde a uma redução de 20,2%. De acordo com a nova classificação da OMS 2016-2020, o Brasil ocupa a 20ª posição na lista dos 30 países com alta carga de TB (Figura 5) (BRASIL, 2016).

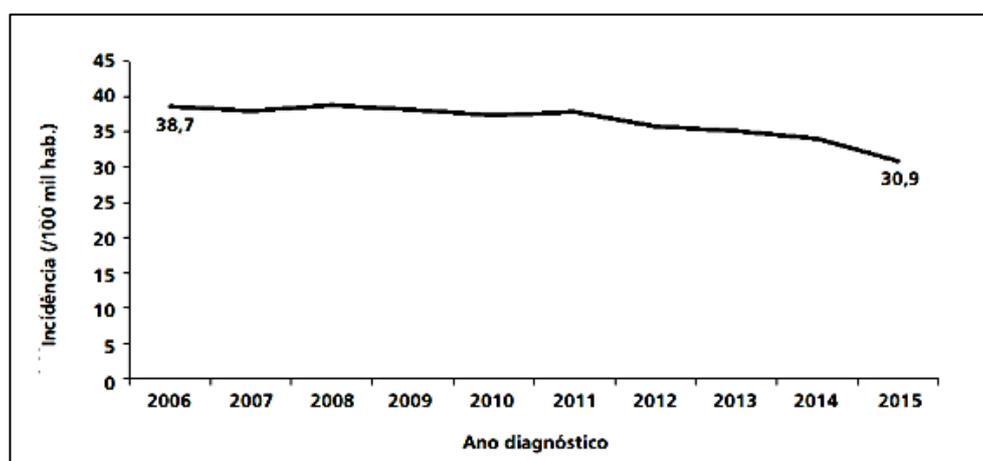


Figura 5: Coeficiente de incidência de tuberculose no Brasil, 2006 a 2015.

A tuberculose é considerada uma doença comum e fatal em pacientes imunocomprometidos, a qual compromete a vida de jovens e adultos em todo o mundo. Causada por um microrganismo chamado de *Mycobacterium tuberculosis* também denominado de Bacilo de Koch (BK). Outras espécies de micobactérias também podem causar a tuberculose, são elas: *Mycobacterium bovis*, *M. africanum* e *M. microt.* (PATIL e SURESH, 2009).

A transmissão direta ocorre pelo ar, quando uma pessoa inala pequenas gotas de saliva, contendo o BK, expelidas por um indivíduo acometido pela TB pulmonar ao falar, tossir ou espirrar. Quando um indivíduo entra em contato com o *M. tuberculosis*, este é fagocitado por macrófagos alveolares e reside no pulmão até que o sistema imune do hospedeiro humano seja comprometido, desencadeando, assim, a sua ativação resultando uma infecção sintomática eventual. Dentro de 2 a 10 semanas, no entanto, o

sistema imune usualmente intervém, impedindo que os bacilos continuem a se multiplicar, prevenindo disseminação posterior (BRASIL, 2002a).

A rifampicina (RIF) (Figura 6) é um antibiótico semissintético tuberculostático e hansenostático, obtida através da fermentação do *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685, muito usada para o tratamento da tuberculose com associações de outros tuberculostático. Apresenta atividade bactericida de amplo espectro, inibindo o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas e de numerosos microrganismos gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Klebsiella*. É altamente ativa contra *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* (SOUZA, 2005; NADEJDE et al, 2009)

O mecanismo de ação deste fármaco ocorre através do bloqueio da transcrição, inibindo a síntese do RNA do microrganismo, especificamente a enzima RNA-polimerase-DNA-dependente da bactéria, bloqueando assim, a síntese de RNA mensageiro que produz proteínas essenciais para a informação genética da bactéria, o DNA (SOUZA, 2005). Quando administrada via oral é bem absorvida e amplamente distribuída nos tecidos e fluidos corporais. É metabolizada no fígado e eliminada na bile e, em menor extensão, na urina (DRUGBANK, 2015).

A rifampicina sofre desacetilação e hidrólise hepática originando o metabólito desacetilrifampicina, o qual mantém praticamente toda a atividade antibacteriana, ocorre também formação de formilrifampicina que é resultante da hidrólise da RIF (GOODMAN GILMAN et al., 2003; RIFALDIN, 2017).

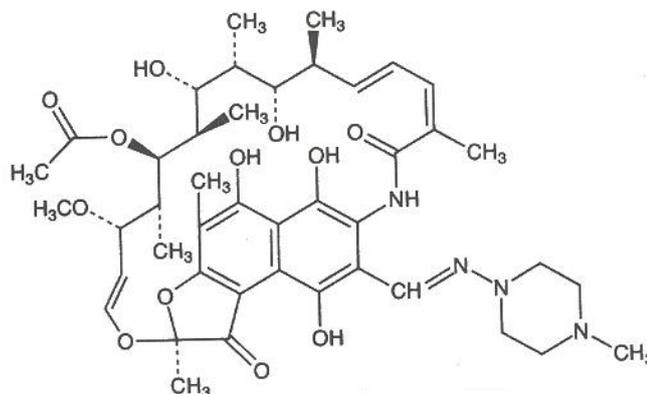


Figura 6: Estrutura química da Rifampicina (RIF).

Foi descoberta em 1965 e aprovada pelo FDA em 1989. A partir da sua utilização em 1966, a RIF vem sendo utilizada como um fármaco essencial no tratamento da TB, apresentando um sucesso terapêutico da ordem de 95% (SOUZA, 2005). É o medicamento de escolha, juntamente com associações, recomendado pela OMS, para o tratamento de várias formas de tuberculose, devido sua capacidade de combater a infecção causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (WHO, 2016).

A RIF com fórmula molecular C₄₈H₅₈N₄O₁₂, possui peso molecular de 822,94 gramas/mol. Apresenta-se como um pó cristalino, de cor castanho-avermelhada a vermelho-acastanhada, pouco solúvel em água, álcool e acetona, e solúvel em metanol (FB, 2010).

Em um estudo realizado por Prasad e Singh (2009) foram identificados, no total, 21 metabólitos, relatados e não relatados na literatura, através de duas metodologias *in vitro* (fração hepática S9 e microsomal de ratos) e *in vivo* (ratos Sprague–Dawley). Na figura 7 estão dispostos metabólitos encontrados pelos autores acima citados e conhecidos na literatura. Não há relatos na literatura sobre estudos de biotransformação utilizando fungos para este fármaco.

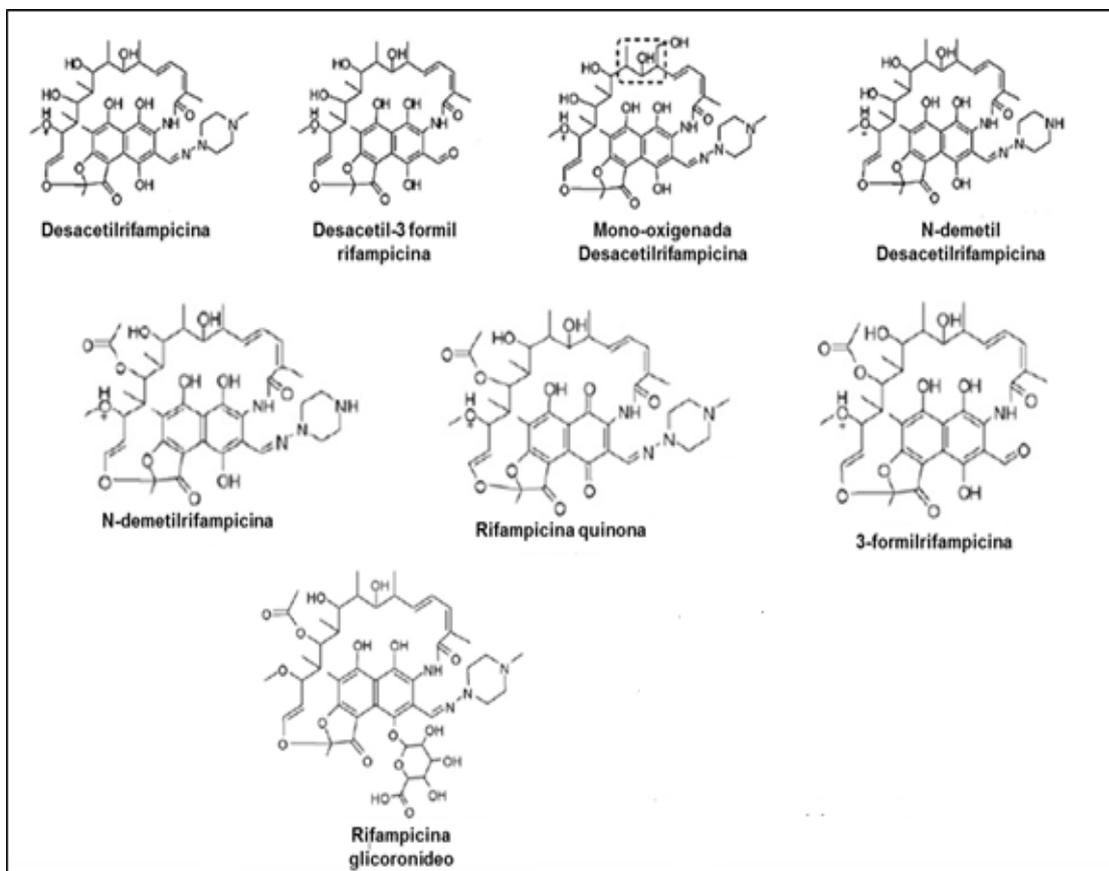


Figura 7: Metabólitos da Rifampicina descritos na literatura e identificados através de metodologias *in vitro* e *in vivo* (Fonte: Prasad e Singh, 2009).

**4. CAPÍTULO I – BIOTRANSFORMAÇÃO DA AMBRISENANA ATRAVÉS
DO FUNGO FILAMENTOSO *Cunninghamella elegans* ATCC 9245**

4.1 Introdução

Os fungos da classe Zygomycetes possuem habilidade de adaptação a diferentes condições ambientais, resultado de variações em duas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, representando um elemento fundamental na compreensão de seu comportamento celular, com vistas à identificação de mecanismos específicos de desenvolvimento, maturação, diferenciação e sobrevivência. E por isso são considerados organismos com grande potencial econômico, industrial e na medicina. Entre os fungos dessa classe encontram-se os do gênero *Cunninghamella*, foram primeiramente descritos em 1903 como fungos filamentosos (LIMA, 2003).

A *Cunninghamella elegans* é o principal representante dos desse gênero, possui caráter ubiqüitário, por sua ampla distribuição mundial e tem sido cotado por muitos autores, como hábeis em realizar vários processos biotecnológicos (FRANCO et al, 2005a).

Deste modo, no capítulo I está descrito o estudo de biotransformação da AMB através do fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. Inicialmente foi realizado a otimização do estudo de biotransformação a fim de determinar as melhores condições de estudo como: meio de cultura e sua concentração para verificar qual meio iria interferir menos na corrida cromatográfica e também formar os metabólitos; pH do meio de cultura evitando assim a degradação do fármaco e a atividade ótima a capacidade metabolômica do fungo; meio de cultura em agitação ou na condição estática, com a finalidade de verificar o melhor desempenho do fungo em estudo.

A formação dos metabólitos foi monitorada através de um método bioanalítico desenvolvido e validado, seguindo os parâmetros oficiais (BRASIL, 2003; FDA, 2013) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE/DAD) para determinação simultânea do metabólito formado e da AMB.

Um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-QTOF/MS) foi desenvolvido, e

posteriormente foram analisados os espectros formados a fim de propor a estrutura química do metabólito formado.

O trabalho está disposto na forma de artigo científico, de acordo com as normas da revista o qual foi publicado.

4.2 Artigo científico

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 53 – 68.

Sponchiado, R.; Sorrentino, J. M; Olegário, N.; Oliveira, S. S.; Cordenonsi, L. M.; Silveira, G. P.; Fuentefria A.M.; Mendez A.S.L.; Steppe M.; Garcia C.V. Microbial transformation of ambrisentan to its glycosides by *Cunninghamella elegans*. **Biomedical Chromatography**, p. 4496, 2019. DOI: 10.1002/bmc.4496

**5. CAPÍTULO II – ESTUDO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DA RIFAMPICINA
UTILIZANDO FUNGO FILAMENTOSO *Cunninghamella elegans* ATCC
9245**

5.1 Introdução

O modelo de metabolismo microbiano evoluiu como um dos modelos *in vitro* para substituir as desvantagens e falhas de modelos *in vivo* que mimetizam o metabolismo humano (DUBE; KUMAR, 2016).

A literatura revela um aumento crescente dos estudos com espécies do gênero *Cunninghamella*, devido a sua habilidade de metabolizar compostos xenobioticos de maneira similar ao que ocorre em mamíferos. Assim, esses microrganismos são estudados em função de sua potencialidade nos processos de biodegradação e biotransformação (LISOWSKA et al., 2006; PEARCE; LUSHNIKOVA, 2006; ÅBERG et al., 2010; MA et al, 2015).

As espécies do gênero *Cunninghamella* são principalmente fungos do solo das zonas mediterrânica e subtropical; Raramente são isolados em regiões menos temperadas (PISKA et al, 2016).

Estes fungos produzem enzimas de metabolização que podem realizar tanto as reações de biotransformação de fase I como de fase II. Está comprovado que *C. elegans* transporta pelo menos um gene que codifica uma enzima CYP estreitamente relacionada com a família CYP51 (PISKA et al, 2016). Apresentam habilidade de gerar quantidades significativas de metabólitos iguais e/ou diferentes daqueles produzidos em humanos e animais. Esses metabólitos podem ser produzidos em menor tempo e de forma mais rentável do que os produzidos por animais experimentais e cultura de células (MOODY et al, 2002).

É relatado que a rifampicina induz inúmeras enzimas em seu processo de metabolização, apresentando maiores efeitos na expressão do citocromo P450 3A4 no fígado e no intestino delgado (NIEMI et al., 2003). Até o momento não há relatos na literatura sobre estudo de biotransformação utilizando fungos com o fármaco proposto.

Nesse contexto, este capítulo descreve o estudo da biotransformação da RIF através do fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. Inicialmente foram realizados testes preliminares para otimizar as condições do estudo a fim de visualizar a formação dos metabólitos no meio Czapek.

Posteriormente foi desenvolvido e validado um método bioanalítico em cromatógrafo à líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE/DAD) com a finalidade de desenvolver um método sensível e preciso para verificar a formação do metabólito e a quantificação do decaimento da concentração da RIF com pureza de pico adequada.

Para elucidação dos metabólitos formados foi desenvolvido um método analítico em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-QTOF-MS), e analisado os espectros de massas das amostras: padrão (RIF), meio biotransformado (meio de cultura, fungo e fármaco; BIO), controle negativo (meio de cultura e fármaco; C-), controle positivo (meio de cultura e fungo; C+) e branco (meio de cultura; W),

O trabalho está disposto na forma de artigo científico.

5.2 Artigo científico

O texto completo do capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 75 – 87, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico

6. CAPÍTULO III – Biotransformação da ambrisentana através do *Aspergillus niger* ATCC 9029 e *Penicillium minioluteum* URM 6889.

6.1 Introdução

Assim como o metabolismo de mamíferos, o metabolismo de microrganismos permite modificações de grupamentos funcionais de produtos biologicamente ativos que, geralmente, só seriam possíveis através de reações químicas convencionais (SRISILAM; VEERESHAM, 2003; BORGES *et al.*, 2009).

Microrganismos são capazes de metabolizar moléculas orgânicas produzindo metabólitos muitas vezes semelhantes ao dos humanos. O uso de microrganismos para prever a biotransformação de fármacos é um método *in vitro* que dispensa o uso de animais. Além disso, os microrganismos podem ser aplicados na produção de medicamentos, na degradação de compostos poluentes e na recuperação de ambientes quimicamente comprometidos. A utilização de microrganismos em processos de biotransformação pode proporcionar a produção de metabólitos já existentes ou de novas substâncias com potencial atividade farmacológica (POLLARD; WOODLEY, 2007; ASHA; VIDYATHI, 2009).

O fungo *Aspergillus* é um gênero dos fungos filamentosos amplamente estudados. As espécies apresentam grande distribuição mundial, estando presentes na superfície, no ar e na água, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos (ROSA *et al.*, 2002).

As espécies do gênero *Penicillium* apresentam a capacidade de crescerem em vários ambientes, possuem o solo como seu habitat natural. A maioria dessas espécies não é muito exigente nutricionalmente e tolera diferentes condições físico-químicas. Assim, crescem em qualquer ambiente onde exista uma quantidade mínima de sais minerais ou as mais diversas e complexas fontes de carbono orgânico. O gênero *Penicillium* é de extrema relevância na natureza, pois as suas espécies atuam ativamente na degradação da matéria orgânica (PITT, 1991).

Além da importância ambiental na degradação de matéria orgânica, espécies de *Penicillium* possuem largo potencial biotecnológico, sendo amplamente utilizadas para a produção de enzimas de interesse industrial, ambiental, farmacêutico, alimentício, entre outros (BON et al., 2008).

Nesse contexto, este capítulo descreve o estudo da biotransformação da ambrisentana através dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* ATCC 9029 e *Penicillium mineoluteum* URM 6889.

O trabalho está disposto na forma de artigo científico, de acordo com as normas da revista o qual foi submetido.

6.2 Artigo científico

O texto completo do capítulo III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 93 – 107, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico

7. CAPÍTULO IV: Biotransformação da rifampicina através do fungo *Aspergillus niger* ATCC 9029 e atividade antimicrobiana dos metabólitos propostos

7.1 Introdução

Os microrganismos apresentam elevada capacidade de transformar estruturalmente compostos orgânicos, permitindo assim que sejam utilizados para inúmeras aplicabilidades biológicas, sendo o modelo de biotransformação de compostos orgânicos e os modelos de mimetização do metabolismo humano de fármacos bastante representativos. Somado a isso, a ideia da “química verde”, ou seja, a produção de moléculas de interesse farmacêutico com reduzida geração de resíduos tóxicos, que são comuns na síntese orgânica tradicional (ASHA e VIDYAVATHII, 2009; BORGES *et al.*, 2007; MURPHY; HORGAN, 2005; POLLARD e WOODLEY, 2007).

Os fungos filamentosos, como o *Aspegillus*, são utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia, por apresentarem características uteis e vantajosas na produção de diversos produtos e na biotransformação de moléculas (MEYER; WU; RAM, 2011). Dentre as vantagens desta espécie destacam-se a fácil manipulação e rápido crescimento, capacidade de fermentação de inúmeras matérias-primas com baixo custo e produção elevada do produto de interesse (MURPHY e HORGAN, 2005).

O fungo *Aspergillus niger* tem sido estudo há muitos anos, devido sua capacidade de transformar moléculas. Como um organismo de fermentação é economicamente importante para a produção de ácido cítrico, apresentando grandes rendimentos. É muito utilizado por crescer facilmente em qualquer lugar, que apresente uma variedade de nutrientes demonstrando assim sua grande versatilidade metabólica e flexibilidade nutricional (MAGNUSON e LASURE, 2004; BAKER, 2006).

Nesse contexto, este capítulo descreve o estudo da biotransformação da rifampicina através do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 9029, monitoramento do estudo através do CLAE-DAD e a identificação e elucidação estrutural através de métodos analíticos de alta sensibilidade. A atividade antimicrobiana dos metabólitos formados foi avaliada na amostra bruta para verificar a concentração inibitória mínima através do método padronizado pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

7.2 Artigo científico

O texto completo do capítulo IV, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 112 – 128, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico

8. DISCUSSÃO GERAL

A utilização de microrganismos em estudo de metabolismo foi intensificada a partir da década de 70 quando foi proposto o Modelo Microbiano do Metabolismo Animal por Smith e Rosazza. A partir de então, tanto bactérias como fungos são utilizados para mimetizar o metabolismo de xenobióticos em mamíferos (SMITH e ROSAZZA, 1983)

A biotransformação através de microrganismos é considerada uma tecnologia economicamente e ecologicamente viável, sendo muito utilizada para realizar modificações estruturais de substâncias bioativas, investigar o metabolismo de fármacos como forma de mimetizar o metabolismo humano, eliminar e reduzir a toxicidade de compostos. Além de ser empregada de maneira alternativa e complementar no estudo do metabolismo de fármacos, visto que não requer uso de animais de laboratório, as culturas são de fácil manuseio e baixo custo (ASHA e VIDYAVATHII, 2009; AZERAD, 2009).

Para tanto, o presente trabalho visou estudar a biotransformação de dois fármacos, ambrisentana e rifampicina através de fungos filamentosos, os quais não havia relatos na literatura referente a esses estudos. Em relação a escolha dos fungos utilizados foi devido apresentarem embasamento científico que apresentam capacidade de biotransformar compostos orgânicos, e expressam enzimas iguais aos seres humanos, desta forma esses mimetizam o que ocorre no organismo humano, sendo um método alternativo para estudos de metabolismo de novas moléculas.

No primeiro capítulo foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação da ambrisentana e identificação dos possíveis metabólitos formados. Este método foi aplicado no estudo de biotransformação utilizando o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. O desenvolvimento microbiológico requer um ambiente com condições adequadas, portanto o estudo foi otimizado em relação a pH do meio reacional, meio de cultura (Czapek e caldo batata), concentração do fármaco adicionado no meio e agitação.

A condição estática não proporciona o desenvolvimento de metabólitos no meio reacional, por este motivo optou-se por utilizar a condição de agitação. O pH do meio foi definido em 6 para evitar a degradação do

fármaco, por ocorrer em condições ácidas. Optou-se pela utilização do meio de cultivo Czapek líquido, por ser um meio amplamente utilizado em estudo de biotransformação, interferir menos na análise cromatográfica, por viabilizar a biotransformação por *C. elegans*, e apresenta em sua formulação macro e micronutrientes (sódio, potássio, magnésio e ferro) importantes para o metabolismo fúngico proporcionando um desenvolvimento adequado. Após esta etapa, foi realizada a biotransformação e monitorada por CLAE-DAD. Observou-se a formação de dois sinais cromatográficos sugestivos de metabólitos do fármaco em estudo. A validação do método bioanalítico para a ambrisentana assegurou a confiabilidade e credibilidade do método bioanalítico desenvolvido neste estudo, conforme guias normativas de validação (BRASIL., 2003; FDA, 2013).

Posteriormente as amostras foram analisadas em UHPLC-QTOF/MS com a finalidade de identificar os sinais formados. É ferramenta analítica que permite que substâncias químicas possam ser identificadas de acordo com suas razões massa-carga (m/z), fornecendo o valor do seu íon molecular e seus fragmentos moleculares (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Foi possível elucidar um metabólito ainda não relatado na literatura, ambrisentana conjugada com uma molécula de glicose, ambrisentana-glicosídeo. O fungo em estudo apresentou a capacidade de gerar metabólitos de fase II de biotransformação em humanos de forma economicamente e ecologicamente viável. Contudo as informações apresentadas neste capítulo representam o primeiro relato de uma biotransformação da ambrisentana com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 9245.

Posteriormente, no segundo capítulo, visou-se a realização do estudo de biotransformação da Rifampicina com o mesmo fungo (*C. elegans* ATCC 9245). A rifampicina é um fármaco semissintético, utilizado em esquema terapêutico padronizado com outros fármacos com duração de 6 meses para combater a tuberculose (ARBEX et al., 2010).

Desta forma, neste capítulo realizou-se a otimização do estudo através do ajuste da concentração do inóculo e no caldo Czapek (100 e 50%), a fim de verificar o aumento da formação de possíveis metabólitos e a capacidade do

fungo em estudo a biotransformar o fármaco. Na literatura não foram encontrados estudos que padronizam o inóculo do microrganismo utilizado na biotransformação. Porém, com o objetivo de acompanhar a metabolização do fármaco e permitir uma perspectiva transposição de escala considerou-se necessário que a quantidade de células incubadas fosse padronizada.

Entretanto, observou-se que não houve diferença em relação a novos sinais formados somente uma maior intensidade do sinal cromatográfico. Optou-se então por utilizar meio Czapek diluído a 50% e o inóculo 10^{16} UFM/mL, pois um ambiente de estresse microbiológico dado pela reduzida disponibilidade de fonte de carbono para o desenvolvimento fúngico propicia o consumo de substâncias exógenas ao meio. Desta forma, o consumo e metabolização de fármacos pelos fungos se tornam favorável.

Foi observada a formação de picos atribuídos à degradação do fármaco em meio Czapek em maior concentração no meio reacional do que no controle negativo, isso pode indicar que o fungo esteja atuando como catalisador na degradação do fármaco. Esta reação consiste na oxidação da rifampicina com consequente perda de dois hidrogênios formando a rifampicina quinona, uma reação já relatada e conhecida na literatura (PRASAD; SINGH, 2009) a qual ocorre devido a presença de oxigênio e favorecida em pH alcalino (7,5). Foi possível identificar e elucidar essa estrutura molecular através da análise das amostras por UHPLC-QTOF/MS.

No meio reacional na presença do fungo foi observada uma redução drástica da concentração da RIF, desta forma poderia estar formando sinais não detectados no CLAE-DAD, portanto foi feita uma análise minuciosa no UHPLC-QTOF/MS, a fim de encontrar possíveis metabólitos. Observou-se então a formação de mais um sinal detectado somente no meio de biotransformação, sendo assim indicativo de processo metabólico. O composto apresentou massa molecular de 452.3217 *m/z*. Este metabólito foi proposto baseado em estudo relatado na literatura (PRASAD; SINGH, 2009). Os autores sugerem uma forma mono-oxigenada da rifampicina, a qual é uma sugestão de metabólito, provavelmente responsável pela redução da polaridade da molécula.

No intuito de avaliar a biotransformação com diferentes fungos filamentosos que apresentam relatos na literatura de sua capacidade de metabolizar compostos, estudou-se a biotransformação ambrisentana com o fungo *Penicillium mineoluteum* URM 6889 e *Aspergillus niger* ATCC 9029.

Conforme pesquisa bibliográfica realizada, Tai e colaboradores (2016) realizaram estudo de biotransformação com o *Penicillium digitatum* DSM 6284, que apresentou a capacidade de transformar (*R*)-(+)-limonene em α -terpineol. Demyttenaere e colaboradores (2000) utilizaram o fungo *Penicillium chrysogenum*, que apresentou capacidade de biotransformar nerol em α -terpineol e outros compostos não identificados. Não há relatos na literatura de biotransformação dos fármacos em estudos utilizando o fungo *Penicillium mineoluteum*.

Em relação ao fungo *A.niger* existem inúmeros relatos de estudos de biotransformação com moléculas orgânicas obtendo grande quantidade de metabólitos. Severiano et al. (2013) estudaram a biotransformação de diterpeno (ácido *ent*-pimaradienoico) e obtiveram um composto já conhecido e três novos compostos, os quais foram isolados e identificados através de análises espectroscópicas e estudos computacionais. Em outro estudo Hussain e colaboradores (2016) estudaram a transformação de enantato de metenolona, um anabolizante androgênico utilizado no tratamento do carcinoma de mama pós-menopausa, através do fungo *A.niger*, foi possível a identificação de três moléculas novas e três já relatadas na literatura.

Desta forma, o terceiro capítulo relata o estudo de biotransformação da AMB com o fungo *A.niger* ATCC 9029 e *P.mineolluteum* URM 6889. O estudo *in vitro* foi realizado através da incubação da AMB em meio Czapek sobre condições controladas já pré-estabelecidas nos estudos anteriores com este mesmo fármaco (temperatura, agitação e inóculo) a fim de favorecer a formação de metabólitos.

A biotransformação com o fungo *A. niger* apresentou resultados promissores. Após 240h de experimento as amostras foram extraídas e avaliadas em HPLC-DAD, observou-se a formação de dois sinais adicionais mais polares que o fármaco, somente no meio de biotransformação (quando

comparado com os controles), sugestivo de metabólitos. Essas amostras foram então analisadas em UHPLC-QTOF/MS com a finalidade de elucidar as estruturas químicas. Desta forma, foi possível propor dois metabólitos formados um com 301.1339 m/z (M2) e outro 313.1907 m/z (M3). O M2 tem sua estrutura relatada em estudos como uma fragmentação da molécula da AMB (Ramiseti; Kuntamukkala, 2014; Rani et al, 2018,) enquanto que o M3 é uma estrutura ainda não relatada na literatura. Desta forma o trabalho demonstra a capacidade do fungo em metabolizar o fármaco em estudo, através de uma técnica economicamente e ecologicamente viável.

Por outro lado, quando realizado o estudo com o fungo *P. mineolluteum* não foi observado sinais sugestivos de metabólitos quando comparado com os controles, e também não se observou redução da concentração do fármaco. Este fungo apresentou grande dificuldade de crescimento e desta forma o estudo teve que ser adaptado.

Ainda no intuito de avaliar a biotransformação através do fungo *A.niger*, o capítulo quatro apresenta os resultados da biocatálise da rifampicina através deste último fungo. O estudo foi realizado utilizando caldo Cezapek, sob agitação de 120 rpm e temperatura mantida a 28 °C, condições iguais as otimizadas no primeiro capítulo. As amostras foram coletadas congeladas e após 312 horas de incubação foram analisadas em CLAE-DAD. Observou-se decaimento significativo na concentração da rifampicina em meio de biotransformação comparado ao controle negativo (fármaco e meio de cultura). Foram observados sinais adicionais em menos intensidade, desta forma essas amostras foram analisadas em UHPLC-QTOF/MS a fim de detectar e identificar possíveis metabólitos.

Com isso, foi possível observar a formação de três metabólitos, dois ainda não relatados na literatura e um já relatado (rifampicina quinona: 821 m/z) o qual foi também observado em nosso experimento com o fungo *C. elegans*.

Os metabólitos identificados como isômeros, apresentaram idêntica massa carga (455.3116) e mesmo padrão de fragmentação, indicando dessa forma que são estruturas idênticas. Sua estrutura foi elucidada baseada em

um artigo publicado por PRASAD e SINGH (2009) ocorrendo perda do anel piperazina, clivagem e hidroxilação da molécula, tornando-a mais polar, sendo característico de metabólito.

A rifampicina quinona, considerada um metabólito de fase I, por sofrer reação de oxidação da molécula, e também um produto de degradação, foi observada na análise por CLAE-DAD, quando comparada a análise do meio de biotransformação com o padrão da rifampicina quinona e posteriormente foi confirmada através da elucidação estrutural pelo UHPLC-QTOF/MS.

Ainda neste último capítulo foi avaliada a atividade antimicrobiana dos metabólitos formados, foi realizada com a amostra bruta, ou seja, os metabólitos não foram isolados, pois antes de realizar esta etapa seria importante verificar se a amostra bruta apresentaria redução da concentração inibitória mínima quando comparada com o padrão da rifampicina. O experimento foi realizado através de um método padronizado resultando em aumento da CIM, conseqüentemente os metabólitos não foram isolados. Esse resultado é relevante quando biorremediação, o qual é o uso de processos biológicos para degradar, transformar e/ou remover contaminantes de uma matriz ambiental, como água ou solo.

Para finalizar, este é o primeiro estudo que relata a biotransformação dos fármacos ambrisentana e rifampicina empregando fungos filamentosos. Os resultados apresentados contribuem para ampliar o conhecimento de biotransformação por fungos filamentosos de fármacos de diferentes classes. Portanto, as informações aqui prestadas podem ser usadas pra identificação e isolamento de novos metabólitos a serem empregados em estudos farmacológicos e toxicológicos, bem como para mimetizar os estudos de biotransformação em mamíferos.

- Para realização do estudo de biotransformação da Ambrisentana com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 9245, foi necessário otimizar as condições de biotransformação quanto aos parâmetros de agitação, pH do meio reacional, concentração final do fármaco, composição do meio de cultura, a fim de obter meio reacional ótimo para a formação de metabólitos;
- A validação do método bioanalítico para a ambrisentana assegurou a confiabilidade e credibilidade do método bioanalítico desenvolvido neste estudo para quantificar a ambrisentana e acompanhar a formação dos metabólitos, conforme guias normativas de validação bioanalítica;
- No experimento da biotransformação da ambrisentana com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 9245, foi possível detectar a formação de um metabólito após 240 horas de incubação. O metabólito formado foi identificado como um glicosídeo de ambrisentana;
- A biotransformação com o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 foi aplicada para o fármaco Rifampicina. Foram mantidas as condições otimizadas para o fármaco Ambrisentana, porém a concentração de inóculo foi alterada, o qual apresentou resultados positivos quando foi utilizado concentração 10^{16} UFM/mL;
- O método bioanalítico foi validado para o estudo de biotransformação da rifampicina o qual se apresentou específico, sensível, preciso e robusto para quantificar o fármaco e acompanhar a formação dos metabólitos;
- Foram identificados dois sinais formados no meio de biotransformação com o fungo *C. elegans* e rifampicina sendo considerados possíveis metabólitos. Rifampicina quinona, foi identificada quando realizada análise em UHPLC-QTOF-MS, a qual, além de um metabólito, pode ser considerada produto de degradação, por ser facilmente formada em meio aquoso. O segundo metabólito proposto apresentou característica de menor polaridade que a rifampicina. Desta forma, através de

embasamento da literatura, sugere-se que seja uma forma mono-oxigenada da rifampicina.

- A biotransformação do fármaco Ambrisentana empregando o fungo *Aspergillus niger* ATCC 9029 resultou na formação de dois compostos mais polares que o fármaco, sugestivos de metabólitos nas condições estudadas. Estes foram propostos através da técnica UHPLC-QTOF/MS, indicando a ocorrência de reações de descarboxilação caracterizando reação de fase I do metabolismo;
- Quando submetida ambrisentana ao estudo de transformação com o fungo filamentoso *Penicillium mineoluteum*, não se observou formação de sinais adicionais quando comparado com os controles;
- A rifampicina foi submetida ao estudo de biotransformação com o fungo *A.niger* ATCC 9029. Após 312 horas de estudo o fármaco foi consumido em grande quantidade pelo fungo. Após este tempo, foi observado formação de alguns sinais adicionais no CLAE-DAD, quando comparados os resultados analíticos do controle negativo com o meio de biotransformação, após as amostras foram avaliadas em UHPLC-QTOF/MS;
- Foram identificados dois metabólitos, a rifampicina quinona, metabólito já conhecido e considerado também um produto de degradação, e o outro um isômero da rifampicina;
- A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com a amostra bruta, ou seja, com os metabólitos formados juntos com a rifampicina em menor concentração, e observou-se um aumento da concentração inibitória mínima, conseqüentemente, perda da atividade.
- Os resultados apresentados nesse estudo contribuem para ampliar o conhecimento de biotransformação por fungos filamentosos de fármacos de diferentes classes

ÅBERG, A. T.; LÖFGREN, H.; BONDESSON, U.; HEDELAND, M. Structural elucidation of N-oxidized clemastine metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and the use of *Cunninghamella elegans* to facilitate drug metabolite identification. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 10, p. 1447-1456, 2010.

ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review. **Current medicinal chemistry**, v. 5, p. 359-374, 1999.

ABOURASHED, E. A.; MIKELL, J. R.; KHAN, I. A. Bioconversion of silybin to phase I and II microbial metabolites with retained antioxidant activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 9, p. 2784-2788, 2012.
AHUJA, S.; DONG, M.W. **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**. Waltham: Elsevier Academic Press, 2005.

ARBEX, M. A.; VARELLA, M. D. C. L.; SIQUEIRA, H. R. D.; MELLO, F. A. F. D. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations-part 1: first-line drugs. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, p. 626-640, 2010.

ASHA S., VIDYAVATHI M. *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism studies - a review. **Biotechnology Advanced**, v. 27, p. 16-29. 2009.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Advanced in Biochemical Engineering Biotechnology**, 63, 169-218, 1999.

BAKER, S. E. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. **Medical mycology**, v. 44, p. S17-S21, 2006.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed, 2014.

BARST, R. J. A review of pulmonary arterial hypertension: role of ambrisentan. **Vascular health and risk management**, v. 3, p. 11, 2007.

BEALE, J.M. JR; BLOCK, J.H. In: *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*; Philadelphia: Editora: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.

BORGES, K. B., DE SOUZA BORGES, W., DURÁN-PATRÓN, R., PUPO, M. T., BONATO, P. S., COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 4, p. 385-397, 2009.
BORGES, W. D. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1137-1163, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº. 899 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF; 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica. 6a ed. rev. e atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2002a.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/24/2016-009-Tuberculose-001.pdf>. Acessado em 18/03/2017.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/21/Apresentacao-sobre-os-principais-indicadores-da-tuberculose.pdf>. Acessado em 18/03/2017.**

CADA, D.; LEVIEN, T.; BAKER, D. Formulary Drug Reviews- Ambrisentan. **Hospital Pharmacy**, v. 42, n. 12, p. 1145-1154, 2007.
CASSERLY, B.; KLINGER, J. R. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Drug design, development and therapy**, v. 2, p. 265, 2008.

CHENG, J. W.M. Ambrisentan for the management of pulmonary arterial hypertension. **Clinical therapeutics**, v. 30, p. 825-833, 2008.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos : Norma Aprovada** Wayne, Pa, 2002.

CONITEC. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, Hipertensão Arterial Pulmonar. Portaria SAS/MS Nº 35, de 16 de janeiro, 2014.**

DE MONTELLANO, P. R. O. **Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry**. Springer Science & Business Media, 2005.

DE SOUZA, M. V. N; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, p. 678, 2005.
DEMYTTENAERE, J. C.; DEL CARMEN HERRERA, M.; DE KIMPE, N. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, v. 55, n. 4, p. 363-373, 2000.

DRUGBANK. AMBRISANTAN. Disponível em:

<https://www.drugbank.ca/drugs/DB06403> Acessado em 17/03/2017.

DUBE, Aman K.; KUMAR, Maushmi S. Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleeana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

ESHRAT, G.; AROONA, C. Biotransformation of progesterone by *Penicillium aurantiogriseum*. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 98, 2011.
FB. Farmacopeia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Ed. 5. Brasília. 2010.

FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation.U.S. Department of Health and Human ServicesRockville, MD, 2013.

FRANCO, L.O.; MONTENEGRO, C. T.; STAMFORD, N. P.; CAMPOSTAKAKI, G. M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, n. 14, 2005a.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug discovery today**, v. 11, n. 3, p. 133-142, 2006.

FURGE, L. L.; GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 34, n. 2, p. 66-74, 2006.

GAINE, S.P.; RUBIN, L.J. Primary Pulmonary Hypertension. **The Lancet**, Oxford, v. 352, n. 9129, pp.719- 725, 1998.

GAZDAG, M. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Related Techniques, Separation, Detection and Determination of Impurities by HPLC, v. 25, n. 04, 2011.

GOODMAN GILMAN, A.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. W. **Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica**. McGraw-Hill,, 2003.

GUENGERICH, F. Peter. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 21, n. 4, p. 163-168, 2007.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

HOLME, P.; PAYNE, K.; SMITH, S.; SPENCE, M. A generic bioanalytical method development strategy and fit-for-purpose qualification to support hERG in vitro sample analysis. **Bioanalysis**, v. 3, n. 24, p. 2739-2745, 2011.

HUSSAIN, Z.; DASTAGIR, N.; HUSSAIN, S.; JABEEN, A.; ZAFAR, S.; MALIK, R.; CHOUDHARY, M. I. Aspergillus niger-mediated biotransformation of methenolone enanthate, and immunomodulatory activity of its transformed products. **Steroids**, v. 112, p. 68-73, 2016.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

ISIN, E. M.; GUENGERICH, F. P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 3, p. 314–29, 2007.

JENA, A. K. HPLC: Highly Accessible Instrument in Pharmaceutical Industry for Effective Method Development. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v.3, n. 1, p. 1-9, 2011.

LAUMEN, K.; KITTELMANN, M.; GHISALBA, O. Chemo-enzymatic approaches for the creation of novel chiral building blocks and reagents for pharmaceutical applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, p. 55-66, 2002.

LIMA, M. A. B. **Aspectos bioquímicos e citoquímicos do polifosfato em Cunninghamella elegans**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2003.

LIN, J. H.; LU, A. Y.H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 4, p. 403-449, 1997.

LISOWSKA, K.; BIZUKOJC, M.; DŁUGOŃSKI, J. An unstructured model for studies on phenanthrene bioconversion by filamentous fungus Cunninghamella elegans. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, n. 7, p. 1464-1470, 2006.

MA, S., ZHENG, C., FENG, L., HUANG, Y., WANG, R., HUANG, C., GUO, F. Microbial transformation of prenylflavonoids from Psoralea corylifolia by using Cunninghamella blakesleeana and C. elegans. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 8-15, 2015.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic acid production by filamentous fungi. In: **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine**. Springer, Boston, MA, p. 307-340, 2004.

MCLAUGHLIN, V. V.; ARCHER, S.L.; BARST, B. R. J.; FARBER, H. W. F.; LINDNER, J. R.; MATHIER, M. A.; MYUNG, M. D. M. H.; ROSENSON, R. S.; RUBIN, L. J.; TAPSON, V. F. A report of the american college of cardiology

foundation task force on expert consensus documents and the american heart association. **Circulation**, v. 119, n. 16, p. 2250-2294, 2009.

MELVIN, L.S.; ULLRICHM, M.; HEGE, H.G.; WEYMANN, J. Inventors. gilead colorado inc and abbott gmbh e co. kg. Metabolites and derivates of ambrisentan. United States. US8,217,155 B2. 2012.

MEYER, V.; WU, B; RAM, A. F. J. Aspergillus as a multi-purpose cell factory: Current status and perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 469–476, 2011.

MOODY, J. D., FREEMAN, J. P., FU, P. P., CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug metabolism and disposition**, v. 30, n. 11, p. 1274-1279, 2002.

MURPHY, R. A. E HORGAN, K. A. **Antibiotics, Enzymes and Chemical Commodities from Fungi**. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi: Biology and Applications* (1a ed., pp. 113– 135). Chichester: Wiley. 2005.

NADEJDE, C.; CREANGA, D. E.; HUMELNICU, I.; FILIP, E.; DOROHAI, D. O. Study on the intermolecular interactions in rifampicina ternary solutions – Calculation of microscopic parameters of rifampicina molecules. **Journal of NIEMI, M;**, BACKMAN, J. T.; FROMM, M. F.; NEUVONEN, P. J.; KIVISTÖ, K. T. Pharmacokinetic interactions with rifampicin. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 9, p. 819-850, 2003.

PARSHIKOV, I. A.; FREEMAN, J. P.; WILLIAMS, A. J.; MOODY, J. D.; SUTHERLAND, J. B. Biotransformation of N-acetylphenothiazine by fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, n., p. 553-557, 1999.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2086-2100, 2014.

PATIL, J. S.; SURESH, S. Physicochemical characterization, in vitro release and permeation studies of respirable rifampicin-cyclodextrin inclusion complexes. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 71, p. 638, 2009.

PEARCE, C. M.; LUSHNIKOVA, M. V. Microbiological production of omeprazole metabolites by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 3, p. 87-91, 2006.

PEARSON, P. G.; WIENKERS, L. C. *Handbook of Drug Metabolism*, 2a. ed., Informa Healthy Care: New York, 2008. 14 Coleman, M. D. *Methods in drug metabolism in human drug metabolism: An Introduction*, John Wiley & Sons: England, 2005.

PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 171, 2007.

PIEPER, I., WECHLER, K., KATZBERG, M., BRUSCH, L., SØRENSEN, P.G., MENSONIDES, F. AND BERTAU, M. Biosimulation of drug metabolism - A yeast based model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p.157–170, 2009.

PISKA, K., ŻELASZCZYK, D., JAMROZIK, M., PEKALA, E. Cunninghamella Biotransformation-Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process. **Current drug metabolism**, v. 17, n. 2, p. 107-117, 2016.

PITT, J.I. *A laboratory Guide to Common Penicillium Species*. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing. 1991.

PRASAD, B.; SINGH, S. In vitro and in vivo investigation of metabolic fate of rifampicin using an optimized sample preparation approach and modern tools of liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 50, n. 3, p. 475-490, 2009.

QUINN, L.; DEMPSEY, R.; CASEY, E.; KANE, A.; MURPHY, C.D. Production of drug metabolites by immobilised Cunninghamella elegans: from screening to scale up. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 799–806, 2015.

RANI, P. J.; VISHNUVARDHAN, C.; NIMBALKAR, R. D.; GARG, P.; SATHEESHKUMAR, N. Metabolite characterization of ambrisentan, in in vitro and in vivo matrices by UHPLC/QTOF/MS/MS: Detection of glutathione conjugate of epoxide metabolite evidenced by in vitro GSH trapping assay. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 155, p. 320-328, 2018.

RIFALDIN®: rifampicina. Sanofi. Farm. Resp.: Silvia Regin Brollo. Bula de remédio. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTrasacao=9457492015&pIdAnexo=2916409. Acessado em 05/10/2017.

ROMANO, Silvana Elena. Revisão conceitual de hipertensão pulmonar; Pulmonary hypertension. *Pulmão RJ*, v. 19, n. 1/2, p. 33–39, 2010.
RUFINO, R.; DA COSTA, C. H.; ABBUD, B.; MACRI, M.; FERREIRA, E. Pulmonary arterial hypertension: a multidisciplinary proposol/Hipertensao arterial pulmonar: uma proposta multidisciplinar. **Revista HUPE**, v. 12, n. SUP 1, p. 61-74, 2013.

SHABIR, G.A., LOUGH, W.J.; ARAIN, S.A.; BRADSHAW, T.K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311-333, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. São Paulo: Boohman, 2002.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial systems for study of the biotransformations of drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 6, p. 785-814, 1975.

SOUZA, M. V. N. Rifampicina, um importante fármaco no combate à tuberculose. **Revista Brasileira de Farmácia** v.86, p. 92-94, 2005.

SRISILAM K, VEERESHAM C.. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advanced**. v. 21, p. 3-39, 2003.

STEVENSON, P. G.; TARAFDER, A.; GUIOCHON, G. Comprehensive two-dimensional chromatography with coupling of reversed phase high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1220, p. 175-178, 2012.

SUN L.; HUANG H.H.; LIU L.; ZHONG D.F. Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. **Applied on Environmental Microbiology**, 70, 2722–2727, 2004.

TAI, Y. N.; XU, M.; REN, J. N.; DONG, M.; YANG, Z. Y.; PAN, S. Y.; FAN, G. Optimisation of α -terpineol production by limonene biotransformation using *Penicillium digitatum* DSM 62840. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, n. 3, p. 954-961, 2016.

TAICHMAN, D. B; MANDEL, J. Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension. **Clinics in Chest Medicine**, v. 34, n. 4, p. 619–637, 2013.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F. P. Drug metabolism. **Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**, p. 43, 2011.

TESTA, B.; PEDRETTI, A.; VISTOLI, G. Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. **Drug discovery today**, v. 17, n. 11, p. 549-560, 2012.

THOMAS, G. **Química medicinal – uma introdução**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

TIMBRELL, J.A., Principles of biochemical toxicology. Taylor & Francis Ltd., London, Reino Unido, 2^a ed., 1991.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: a Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceuticals Chemists**, 2th ed., Elsevier Churchill Livingstone: Edinburgh, 2005.

WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Protein family review Cytochromes P450 : a success story. **Genome biology**, v. 1, p. 1–9, 2000.

XIN, X. L., WANG, Y., FAN, G. J., CHEN, L., SUN, C. P. Biotransformation of capsaicin by *Penicillium janthinellum* AS 3.510. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 210-214, 2017.

YU-JUAN, Q. I. N.; BING, F. E. N. G.; XIN-BO, S. O. N. G.; WEN-BIN, Z. H. O. U.; HE-SHUI, Y. U.; LI-LI, Z. H. A. O.; BAI-PING, M. A. Biotransformation of glycyrrhetic acid by *Cunninghamella blakesleeana*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 5, p. 373-381, 2010.

11.1 Ambrisentana: validação da metodologia bioanalítica desenvolvida por CLAE-DAD

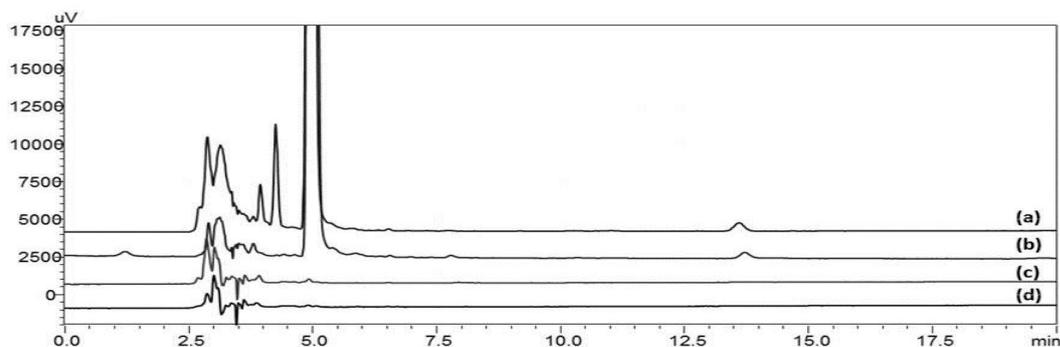


Figure 10: Cromatogramas representativos da avaliação da especificidade do método bioanalítico. (a) biotransformação da ambrisentana através da *Cunninghamella elegans* ATCC9245 após 240 h de incubação; (b) meio Czapek esterilizado mais AMB (c) meio de cultura na presença do fungo (d) meio de cultura.

A linearidade do método foi verificada por meio de regressão linear da área do padrão da AMB versus as concentrações nominais da AMB. O método foi linear no intervalo de concentração de 300-1000 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com os dados obtidos da ANOVA, é possível garantir uma regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 6711,94 \gg F_{\text{crítico}} = 5,06$) sem desvio da linearidade ($F_{\text{calculado}} = 0,189 < F_{\text{crítico}} = 5,41$).

O efeito matriz foi investigado comparando a inclinação da curva de calibração dos padrões RIF em solução com as matrizes. Os efeitos da matriz para o RIF foram de 13,39%. Os efeitos da matriz foram considerados baixos para uma faixa entre $-20\% < C\% < -20\%$ ou $20\% > C\% > 50\%$ e alta para as faixas $C\% < -50\%$ ou $C\% > 50\%$ (Niessen et al., 2006). Estes dados indicam que o AMB exibiu baixo efeito de matriz.

Os limites de detecção e quantificação foram de 0,06 e 0,21 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A precisão e exatidão do método foram avaliadas em termos de recuperação de AMB do meio de cultura ($n = 3$) (Tabela 1). Estes resultados mostram que o método é preciso e preciso dentro dos limites apropriados para validação analítica.

Tabela 1: Precisão e exatidão do método para quantificação da AMB em meio de cultura Czapek.

Concentração (µg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		DPR inter-dia
	Concentração recuperada	DPR intra-dia	Concentração recuperada	DPR intra-dia	Concentração recuperada	DPR intra-dia	
300	279,02	5,49	269,69	6,63	276,93	3,86	5,42
600	579,41	3,37	561,19	1,87	573,29	1,54	2,68
900	884,30	0,53	877,68	1,25	893,27	1,25	1,26

RSD (%); Recovery (µg/mL)

Tabela 2: Parâmetros alterados para verificar a robustez do método proposto.

Parâmetros	Fator cauda		Tempo de retenção		Pratos teóricos		Concentração AMB (µg/mL)	
	Medida	Variação (%)	Medida	Variação (%)	Medida	Variação (%)	Medida	Variação (%)
Inicial	1,23	-	5,78	-	10214	-	552,66	-
% orgânico (+)	1,26	2,44	5,2	10,03	9967	2,42	558,84	1,12
% orgânico (-)	1,22	0,81	6,21	7,44	10686	4,62	550,44	0,40
Fluxo (+)	1,23	-	4,64	19,72	7915	22,51	551,26	0,25
Fluxo (-)	1,24	0,81	7,53	30,28	11584	13,41	551,77	0,16
Coluna cromatográfica (Phenomenex)	1,33	8,13	5,96	3,11	10776	5,50	549,60	0,55

% orgânico: porcentagem de solvent orgânico alterada (+):duas unidades acima da condição normal; (-): duas unidades abaixo da condição normal.

Tabela 3: Avaliação da estabilidade da AMB em meio Czapek-Dox quando submetida a condições de congelamento e descongelamento.

Analito	Ambrisentana
Concentração da amostra	621
Estabilidade	
Ciclos de congelamento e descongelamento (n = 4)	
Extração após congelamento	
Concentração	573,57
Precisão	3,01
Exatidão	95,59
Extração antes do congelamento	
Concentração	537,01
Precisão	2,38
Exatidão	89,50
Temperatura ambiente por 12h (n = 4)	
Concentração	569,53
Precisão	2,04
Exatidão	94,92

Concentração ($\mu\text{g/mL}$), Precisão (DPR %), Exatidão (% recuperação).

11.2 Rifampicina: validação da metodologia bioanalítica desenvolvida por CLAE-DAD

A seletividade do método foi confirmada através da análise cromatográfica das amostras do meio de cultura Czapek com RIF, meio de cultura com o fungo *C. elegans* ATCC 9245 e somente o meio de cultura. Foi observado que não há picos interferentes nos mesmos tempos de retenção do analito. Esta informação foi confirmada pela pureza do pico cromatográfico da rifampicina (Figura 9).

A linearidade do método foi avaliada através de sete concentrações (30,0 – 300,0 $\mu\text{g/mL}$). O coeficiente de correlação (r) encontrado foi superior a 0,9989, mostrando não haver falta de ajuste para o método desenvolvido. Os dados analíticos foram analisados por meio de ANOVA que demonstrou uma regressão

linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 1647,30 \gg F_{\text{critico}} = 4,06$) e nenhum desvio significativo da linearidade ($F_{\text{calculado}} = 0,33 < F_{\text{critico}} = 2,96$). Durante o desenvolvimento de método bioanalítico é necessário considerar o efeito das matrizes envolvidas. O efeito matriz foi investigado comparando a inclinação da curva de calibração dos padrões RIF em solução com as matrizes. Os efeitos da matriz para o RIF foram de 11,57%. Os efeitos da matriz foram considerados baixos para uma faixa entre $-20\% < C\% < -20\%$ ou $20\% > C\% > 50\%$ e alta para as faixas $C\% < -50\%$ ou $C\% > 50\%$ (Niessen et al., 2006). Estes dados indicam que o RIF exibiu baixo efeito de matriz.

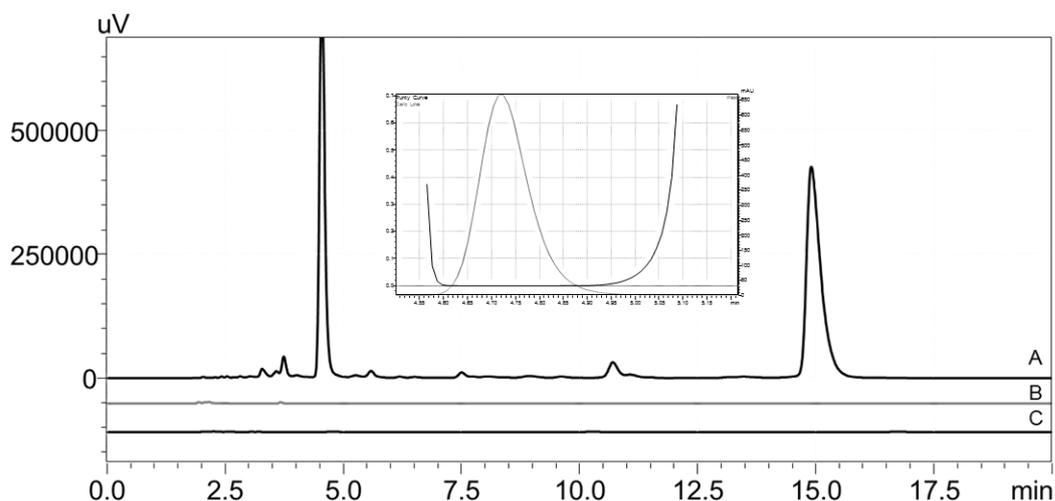


Figura 11: Cromatograma da especificidade do método (A) Biotransformação da RIF através do fungo *C.elegans* ATCC 9245 após 120 h de incubação; (B) meio de cultura na presença do fungo (C) meio de cultura Czapek-Dox.

Tabela 4: Precisão e exatidão do método para quantificação da RIF em meio de cultura Czapek.

Concentração (µg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		
	Concentração recuperada	DPR intra-dia	Concentração recuperada	DPR intra-dia	Concentração recuperada	DPR intra-dia	DPR inter-dia
100	86.95	1.88	85.39	0.81	87.83	0.87	1.29
200	258.57	2.75	261,19	2.34	244.11	2.05	2.75
300	301.43	2.99	378.65	0.77	359.38	4.70	4.02

Tabela 5: Avaliação da estabilidade da RIF em meio Czapek-Dox quando submetida a condições de congelamento e descongelamento.

Analito	Rifampicin
Concentração da amostra	478,32
Estabilidade Ciclos de congelamento e descongelamento (n = 4)	
Extração após congelamento	
Concentração	469,08
Precisão	3,42
Exatidão	98,07
Extração antes do congelamento	
Concentração	393,47
Precisão	9,03
Exatidão	82,26
Temperatura ambiente por 12h (n = 4)	
Concentração	443,68
Precisão	2,57
Exatidão	92,63

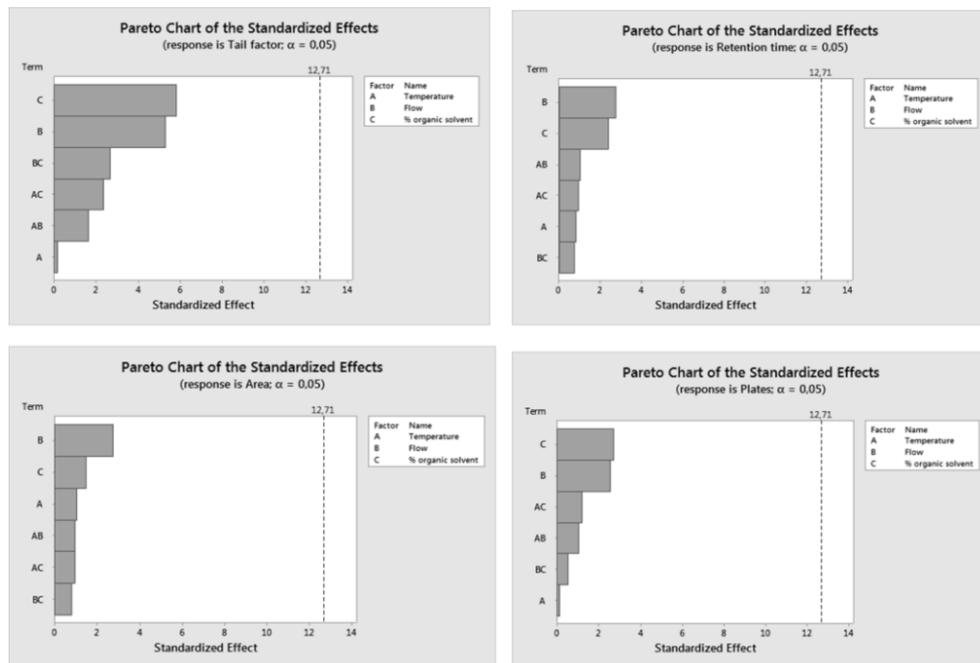


Figura 12: Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis no ensaio de robustez do método desenvolvido por CLAE-DAD usando o design de Plackett-Burman.