UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ELAINE SOUSA NUNES

APLICAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DA ZIDOVUDINA POR *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 NA SÍNTESE DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS POR CARBOIDRATOS

Goiânia
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Elaine Sousa Nunes

APLICAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DA ZIDOVUDINA POR *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 NA SÍNTESE DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS POR CARBOIDRATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Valéria de Oliveira

Goiânia

ELAINE SOUSA NUNES

APLICAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DA ZIDOVUDINA POR *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 NA SÍNTESE DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS POR CARBOIDRATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em Goiânia em 29/08/2008.

BANCA EXAMINADORA

_____
Profª. Drª. Valéria de Oliveira (FF)
Universidade Federal de Goiás

_____
Prof. Dr. Luciano Morais Lião (IQ)
Universidade Federal de Goiás

_____
Profª. Drª. Iêda Maria Sapateiro Torres (FF)
Universidade Federal de Goiás

_____
Prof. Dr. Ricardo Menegatti (FF) - Suplente
Universidade Federal de Goiás

Aos meus pais pelo amor dedicado a nossa família e irmãos, principalmente ao André, por sua força e coragem diante das dificuldades encontradas em seu caminho, exemplo de superação. Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença, força e sabedoria, por me mostrar que quanto mais próximo do saber, mas se torna concreta a certeza de Tua existência, pois a sabedoria é uma conquista que buscamos eternamente.

A Profª. Drª. Valéria de Oliveira pela orientação, disponibilidade e incentivo.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula e a prof. Dra. Maria Teresa Freitas Bara por seu incentivo e auxílio durante todo o período de participação neste Programa de Pós-graduação. E demais professores do programa pelo conhecimento transmitido.

Aos Profs. Drs. Clévia Ferreira Duarte Garrote, e Ricardo Menegatti pela participação da banca de qualificação e por suas valorosas correções e sugestões.

Aos Profs. Drs. Luciano Morais Lião, Iêda Maria Sapateiro Torres e Ricardo Menegatti pelo aceite de participação da banca de defesa.

A Líbia de Oliveira Santos e Castro por seu apoio na coordenação da secretaria de pesquisa e pós-graduação e valorosas orientações prestadas aos alunos.

A Fernanda Maura Ferreira Bellato por desenvolver seu trabalho na secretaria do Programa de Pós Graduação com exímio desempenho e dedicação, sempre com uma palavra de incentivo e carinho com os mestrandos.

A Profª. Drª. Cecilia Maria Alves de Oliveira pela colaboração com os espectros de RMN ^{13}C e ^{1}H.

A todos que amo: “cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra, passam mas não nos deixam só, pois levam um pouco de nós mesmos e deixam um pouco de si. Há os que levaram muito, mas não há os que não levaram nada. Pois duas almas não se encontram por acaso.” (Saint Exupéry).

Ao Marllon pelos motivos que me levaram a entrar nessa jornada..., incentivo a não desistir, sempre com uma palavra de carinho e desprendimento no presente que me facilitou o término da redação.

Aos amigos Camila, Fabiana e Lorena pela amizade e carinho.

Ao Emmanuel pelo apoio, paciência e ajuda em um dos momentos difíceis que passei, sem o qual não teria finalizado este trabalho. Pelo suporte e sugestões durante a realização deste trabalho “Maninho, só você pra agüentar tudo o que passamos sem desistir de mim.”

Aos meus irmãos André, Ivana e Mônica e familiares pelo apoio e compreensão constantes. Principalmente ao Casil e a minha cunhada, mais amada de todas, Ana Marta, pelas sugestões nos gráficos.

Ao Marcos, por sua paciência e dedicação em me conquistar, carinho, companhia e por aceitar minha ausência quase constantemente, parceiro até na hora de fazer extração e desenhar moléculas.

Aos meus pais Janos e Neila por me doarem seu amor, por sofrerem minhas derrotas e festejar minhas alegrias e por tornar meu crescimento de vida menos árido e mais significativo.

“A primeira lei da natureza é a tolerância, já que temos todos uma porção de erros e fraquezas.”

Voltaire

RESUMO

Bioconversões são reações de compostos orgânicos realizadas por enzimas que podem estar isoladas ou no interior de microrganismos. Esta tecnologia tem trazido resultados promissores, principalmente com o uso de fungos filamentosos dotados de monoxigenases. As reações de bioconversão são freqüentemente aplicadas na síntese de derivados dificilmente obtidos pelos métodos clássicos da química orgânica. Outra possibilidade é que as substâncias obtidas pela biotransformação microbiana sejam iguais aos produtos do metabolismo do fármaco em mamíferos, possibilitando a realização de estudos "in vitro". As reações de bioconversão são enzimaticamente catalisadas, e sendo assim, sua velocidade e performance é influenciada por diversos fatores, como a temperatura, concentração do substrato e pH. A utilização de microrganismos como modelos enzimáticos requer ainda a avaliação de outros parâmetros, relacionados a viabilidade das células, como a concentração de nutrientes e oxigênio. O monitoramento destes parâmetros e a avaliação da influência destes no rendimento das reações tem se tornado essencial. Neste trabalho, foi realizada a bioconversão do anti-retroviral zidovudina (AZT) por *Cunninghamella echinnulata* ATCC 9244 em escala laboratorial semi-preparativa com diferentes condições reacionais na tentativa de otimizar a reação e possibilitar a transposição dos experimentos desenvolvidos para escala preparativa (biorreator). Para isso foram realizadas seis incubação com diferentes condições reacionais e o parâmetro variado em cada uma delas analisado. Os parâmetros que possibilitaram maior rendimento foram: interrupção da incubação em 120 horas, temperatura de 29°C, velocidade de agitação 250 rpm, meio de cultura PDSM Padrão e pH 4,0 a 5,5. O monitoramento das reações foi feito por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e os diferentes produtos formados purificados por "flash" cromatografia em coluna de vidro e recristalização. O derivado obtido, denominado LaBioCon 66 foi caracterizado por Espectroscopia de Infravermelho (EI) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbonos (RMN ^{13}C) e Hidrogênios (RMN ^{1}H). As análises sugerem a formação de um derivado da zidovudinina funcionalizado pelo carboidrato β-D-ribopiranose.

Palavras chaves: Bioconversão, *Cunninghamella echinnulata* ATCC 9244, Zidovudina,

ABSTRACT

Bioconversions are reactions of organic compounds carried out by enzymes that can be isolated or inside of microorganisms. This technology has brought promising results, mainly with the use of filamentous fungi equipped with monoxigenases. The reactions of bioconversion are frequently applied in the synthesis of derivatives hardly obtained by traditional methods of organic chemistry. Another possibility is that substances produced by microbial biotransformation are equal to the products of metabolism of the drug in mammals, allowing the completion of studies "in vitro". Bioconversion reactions are enzymatically catalyzed, and thus, their speed and performance are influenced by various factors such as temperature, substrate concentration and pH. The use of microorganisms as enzymatic models still requires the evaluation of other parameters, related to the viability of cells, as the concentration of nutrients and oxygen. The monitoring of these parameters and the evaluation of their influence in the yield of reactions has become essential. In this current thesis, the bioconversion of anti-retroviral zidovudine (AZT) by *Cunninghamella echinnulata* ATCC 9244 was performed in preparative laboratory scale with different reaction conditions in an attempt to optimize it and enable the scale-up implementation of the experiments developed. To this end, six incubations were held with different conditions and the parameter varied in each of them was examined. The parameters that allowed higher yields were: interruption of incubation in 120 hours, temperature of 29° C, 250 rpm speed of agitation, the culture medium PDSM Standard and pH 4.0 to 5.5. The reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) and the products formed purified by column chromatography and recrystallization. The derivative obtained, named LaBioCon 66, was characterized by Infrared Spectroscopy (IR) and Nuclear Magnetic Resonance of Carbons (NMR ^{13}C) and Hydrogen (^{1}H NMR). The analyses suggest the formation of a derivative of zidovudine functionalizated by the carbohydrate β-D-ribopyranose.

Keywords: Bioconversion, *Cunninghamella echinnulata* ATCC 9244, Zidovudine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Bioconversão da progesterona em 11 α-hidroxiprogesterona por *R. nigricans*, adaptada de Peterson e Murry, 1952.	21
Figura 2	Proposta da rota de biotransformação da Cinobufagina, Bufalina e Resinobufogenina pelo fungo *P. aurantigriseum* A.S. 3.4512, adaptada de Xiao-Chi et al., 2007.	26
Figura 3	Obtenção da corticosterona por bioconversão da desoxicorticosterona por *C. simplex*, adaptada de Stoud, 1960.	28
Figura 4	Obtenção da testosterona a partir da deidroepiandrosterona por bioconversão com o microrganismo *Corynebacterium,* adaptada Charney e Herzog, 1967.	28
Figura 5	Transformação metabólica de fármacos, adaptada de Azerad, 1999.	30
Figura 6	Exemplos de reações de *p*-hidroxilação, epoxidação e *N*-desmetilação realizadas pelo citocromo P-450, adaptada de Abourashred, 1999.	33
Figura 7	Glicuronidação do Ibuprofeno catalisada pela enzima UGT, adaptada de Williams, 2001.	34
Figura 8	Bioconversão do 1-naftol por *C. elegans* e seus derivados conjugados, adaptada de Zhang et al., 1996.	37
Figura 9	Glicosilação das flavonas de *Psiadia arabica* por *C. elengans* NRRL 1392, adaptada de Ibraim et al., 1997.	38
Figura 10	Bioconversão do ácido kójico a ácido kójico 7-O-α-D-glicopiranosídeo por *Xanthomonas campestris*, adaptada de Husieh et al., 2006.	39
Figura 11	Morfologia do vírus HIV, desenhada no programa Chem Draw.	52
Figura 12	Alguns dos fármacos inibidores da transcriptase reversa nucleosídeo-nucleotídeo disponíveis no mercado: (A) ddI, (B) d4T, (C) ddC, (D) 3TC, (E) ABC, (F) Viread, adaptada de Moore et al., 2000.	55
Figura 13	Esquema geral da fosforilação dos fármacos inibidores da transcriptase reversa adaptada de Souza e Almeida, 2003.	56
Figura 14	Estrutura química da timidina, zidovudina e modelo bola-bastão da zidovudina, desenhada no programa ACD Labs, adaptada de Souza e Almeida, 2003.	57

Figura 15	Primeira rota sintética desenvolvida por Horwitz (1964) na comercialização da zidovudina pelos laboratórios Burroughs-Wellcome, adaptada de Souza e Almeida, 2003.	58
Figura 16	Esquema representando as três vias de metabolismo da zidovudina em humanos, adaptada de Veal e Back, 1995.	62
Figura 17	Estrutura química da zidovudina e seu metabólito hidroxilado produzido por bioconversão com a *S. maltophilia*, adaptada de Kruszewska et al., 2003.	66
Figura 18	Etapas de obtenção da fração cetônica após incubação com *C. echinulata* ATCC 9244.	77
Figura 19	Fluxograma da metodologia utilizada na obtenção das frações AcOEt e cetônicas.	78
Figura 20	Frações AcOEt utilizadas na cromatogafia de adsorção em coluna de vidro sob vácuo para purificação dos extratos obtidos na bioconversão da zidovudina pela *C. echinullata* ATCC 9244.	81
Figura 21	Formação do extrato bruto I que foi utilizado para recristalização e obtenção dos produtos purificados formados a partir da bioconversão da zidovudina pela *C. echinullata* ATCC 9244.	83
Figura 22	Fluxograma das etapas envolvidas na formação do LaBioCon 64.	84
Figura 23	Fluxograma das etapas da recristalização do LaBioCon 65.	85
Figura 24	Fluxograma das etapas envolvidas na recristalização do LaBioCon 66.	86
Figura 25	Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto com o aumento da temperatura de 27°C para 29°C mantendo a velocidade de agitação constante a 200 rpm.	94
Figura 26	Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto aumentando a temperatura de 27°C para 29°C mantendo a velocidade de agitação constante a 250 rpm.	95
Figura 27	Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto aumentando a velocidade de agitação de 200 para 250 rpm, mantendo a temperatura constante 27ºC.	96
Figura 28	Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto aumentando a velocidade de agitação de 200 para 250 rpm, mantendo a temperatura constante 29ºC.	97

Figura 29	Gráfico comparando os pesos dos extratos obtidos nas incubações realizados com o meio de cultura PDSM Padrão nas condições reacionais 27°C, 200 rpm e 29°C, 250 rpm.	97
Figura 30	Gráfico comparando os pesos dos extratos brutos das incubações realizadas com temperatura de 29°C velocidade de agitação 250 rpm nos meios PDSM Padrão e PDSM enriquecidos.	99
Figura 31	Gráfico comparando os pesos dos extratos das frações AcOEt e frações cetônicas das incubações realizadas com temperatura de 29°C velocidade de agitação 250 rpm nos meios PDSM e PDSM enriquecidos.	100
Figura 32	Variação do pH nos seis ensaios realizados na bioconversão da zidovudina por *C.echinulata* ATCC 9244.	103
Figura 33	Cromatoplaca representando o padrão do substrato, os meios de incubação e o meio PDSM Padrão com o microrganismo. Condições cromatográficas: Fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 nm.	106
Figura 34	Placas obtidas pela análise por CCD das frações AcOEt e cetônica produzidas no 1º e 2º ensaios. Condições cromatográficas: Fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm, (A), (B) respectivamente.	106
Figura 35	Monitoramento do processo de purificação por recristalização, mostrando análises da porção metanólica. Condições cromatográficas: Fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm, (A), (B), respectivamente.	109
Figura 36	Cromatoplaca de análise da zidovudina e LaBioCon 66 após recristalização. Condições cromatográficas: Fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, revelada em atmosfera de iodo (A) e visualizada em UV a 254 e 365 nm, (A), (B), respectivamente.	110
Figura 37	Espectro de IV da zidovudina.	112
Figura 38	Espectro de RMN ^{13}C da zidovudina.	113
Figura 39	Espectro de RMN ^{1}H da zidovudina.	114
Figura 40	Expansão do espectro de RMN ^{1}H da zidovudina, de 4,40 a 3,30 ppm	115

Figura 41	Expansão do espectro de RMN ^{1}H da zidovudina, de 6,40 a 5,10 ppm.	116
Figura 42	Expansão do espectro de RMN ^{1}H da zidovudina, de 11,30 a 7,30 ppm.	117
Figura 43	Espectro de IV do LabioCon 65.	119
Figura 44	Espectro de IV do LabioCon 66.	121
Figura 45	Espectro de RMN ^{13}C LaBioCon 66.	124
Figura 46	Espectro de RMN ^{1}H LaBioCon 66.	127
Figura 47	Expansão do espectro de RMN ^{1}H do LaBioCon 66 de 2,80 a 0,50 ppm.	128
Figura 48	Expansão do espectro de RMN ^{1}H do LaBioCon 66 de 5,40 a 2,60 ppm.	129
Figura 49	Estrutura química do LabioCon 66 obtido a partir da bioconversão da zidovudina por *C.echinulata* ATCC 9244 e suas respectivas nomenclaturas IUPAC.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação de alguns fármacos utilizados em bioconversão para estudo do metabolismo por apresentarem os mesmos metabólitos tanto em mamíferos quanto nos fungos filamentosos.	36
Tabela 2	Relação dos valores de pH observados durante a bioconversão microbiana de alguns fármacos com suas respectivas estruturas químicas e meio de cultura.	46
Tabela 3	Relação estrutura-atividade em diferentes posições do nucleosídeo.	60
Tabela 4	Parâmetros alterados durante as incubações realizadas na bioconversão da zidovudina por *C. echinulata* ATCC 9244.	69
Tabela 5	Relação das quantidades, marcas e lotes dos componentes utilizados na preparação dos meios de cultura Ágar Batata, PDSM Padrão, PDSM I com 25% a mais de Dextrose e PDSM II com 25% a mais de Lecitina de Soja	71
Tabela 6	Relação dos solventes, com suas respectivas marcas e lotes, utilizados nas técnicas de cromatografia e recristalização.	79
Tabela 7	Descrição macroscópica das características de *C. echinulata* ATCC 9244 em ágar batata inclinado, após sete dias de crescimento em câmara germinativa BOD.	90
Tabela 8	Aspecto morfológico da *C. echinulata* ATCC 9244, após 65 horas de incubação orbital nos ensaios realizados e sua descrição macroscópica	92
Tabela 9	Variação do pH nos seis ensaios realizados pela bioconversão de zidovudina pela *C.echinulata* ATCC 9244.	102
Tabela 10	Variação dos parâmetros que podem influenciar no rendimêntos das frações orgânicas e cetônicas obtidas via bioconversão da zidovudina.	103
Tabela 11	Fator de retenção e intensidade das manchas da zidovudina e derivados presentes nas frações orgânicas e cetônicas. Resultados correspondentes às análises de CCD. Condições cromatográficas: fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm.	107

Tabela 12	Fatores de retenção das manchas reveladas na análise por cromatografia em camada delgada das frações coletadas na coluna. Condições cromatográficas: coluna de vidro 26,5x2, fase estacionária sílica Gel 60 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) e fase móvel AcOEt/MeOH 95:5; CCD: fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm.	108
Tabela 13	Freqüência (υ) das bandas características observadas no espectro de IV da zidovudina, LaBioCon 65 e LaBioCon 66.	120
Tabela 14	Sinais evidenciados no espectro de RMN^{13}C da zidovudina e LaBioCon 66: δ_{13C} (75 MHZ, DMSO) δ_H (MHz).	123
Tabela 15	Sinais evidenciados no espectro de RMN^{1}H da zidovudina e LaBioCon 66: δ_{1H} (300 MHZ, DMSO).	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
AIDS	“Acquired Immunodeficiency Syndrome”
ATCC	“American Type Culture Colletion”
AZT	Zidovudina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CYP450	Citocromo P-450
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EI	Espectroscopia de infravermelho
EM	Espectrometria de massas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
i.v.	Intravenosa
LaBioCon	Laboratório de Bioconversão
MeOH	Metanol
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NRRL	“Northern Utilisations Research and Development Division”
PDSM	“Potato Dextrose Soy Medium”
ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN ^{1}H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênios
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbonos
RPM	Rotações por minuto
v/v	Ultravioleta
UV	Volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
β	Beta
J	Constante de acoplamento
D	Dubleto
δ	Deslocamento químico
υ	Freqüência
γ	Gama
°C	Grau Celsius
Hz	Hertz
MHz	Mega Hertz
M	Molar
M	Multipleto
O_2	Oxigênio molecular
S	Singleto
T	Tripleto

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	20
1.1	ASPECTOS GERAIS DA BIOCONVERSÃO	22
1.2	APLICAÇÕES DA BIOCONVERSÃO	24
1.2.1	**Modificação Estrutural**	27
1.2.2	**Estudo do Metabolismo**	29
1.3	PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM AS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO	39
1.3.1	**Período de Incubação**	40
1.3.2	**Morfologia do Microrganismo**	41
1.3.3	**Temperatura de Incubação**	42
1.3.4	**Velocidade de Agitação**	43
1.3.5	**Meio de Cultura**	44
1.3.6	**pH**	47
1.4	ESCALA DE PRODUÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS PELA BIOCONVERSÃO POR MICRORGANISMOS	48
1.4.1	**Escala Laboratorial Analítica**	49
1.4.2	**Escala Laboratorial Semi-Preparativa**	49
1.4.3	**Escala Laboratorial Preparativa**	50
1.5	SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (SIDA) E VÍRUS DA IMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (HIV)	50
1.5.1	**SIDA e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)**	50
1.5.2	**Zidovudina (AZT) e Inibidores de Transcriptase Reversa (IsTRN)**	54
1.5.2.1	Mecanismo de Ação e Metabolismo da Zidovudina	61
2	**OBJETIVOS**	63

3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	69
3.1	SUSTRATO	70
3.2	MICRORGANISMO	70
3.3	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	70
3.3.1	**Meios de Cultura**	70
3.3.1.1	Meio Sólido Agar Batata	72
3.3.1.2	Meio Líquido PDSM Padrão	72
3.3.1.3	Meio Líquido PDSM I	73
3.3.1.4	Meio Líquido PDSM II	73
3.3.2	**Solução glicerol a 25%**	73
3.3.3	**Manutenção e Repique do Microrganismo**	73
3.3.4	**Escala Laboratorial Semi-Preparativa: Semeadura do Microrganismo nos Meios PDSM Padrão, I, II e Adição do Substrato**	74
3.4	FILTRAÇÃO E EXTRAÇÃO	76
3.5	IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLICOS	79
3.5.1	**Técnicas Cromatográficas**	80
3.5.1.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	80
3.5.1.2	Cromatografia de Adsorção em Coluna de Vidro sob Vácuo	80
3.5.2	**Recristalização**	82
3.6	CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS	87
3.6.1	**Técnicas Espectroscópicas**	87
3.6.1.1	Infravermelho (IV)	87
3.6.1.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	87
4	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	89

4.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM AS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO DA ZIDODUDINA POR *C. echinulata* ATCC 9244	89
4.1.1	**Período de Incubação**	89
4.1.2	**Caracterização Morfológica Macroscópica do Microrganismo**	90
4.1.3	**Temperatura de Incubação**	93
4.1.4	**Velocidade de Agitação**	95
4.1.5	**Composição dos Meios de Cultura**	97
4.1.6	**Variação do pH**	104
4.2	MONITORAMENTO DOS METABÓLITOS FORMADOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	107
4.3	PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS	107
4.3.1	**Cromatografia de Adsorção em Coluna de Vidro sob Vácuo**	107
4.3.2	**Recristalização**	109
4.4	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA ZIDOVUDINA E LaBioCon 65 E LaBioCon 66	110
4.4.1	**Zidovudina**	110
4.4.2	**LaBioCon 65**	118
4.4.3	**LaBioCon 66**	120
5	**CONCLUSÕES**	132
6	**PERSPECTIVAS**	133
7	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	134

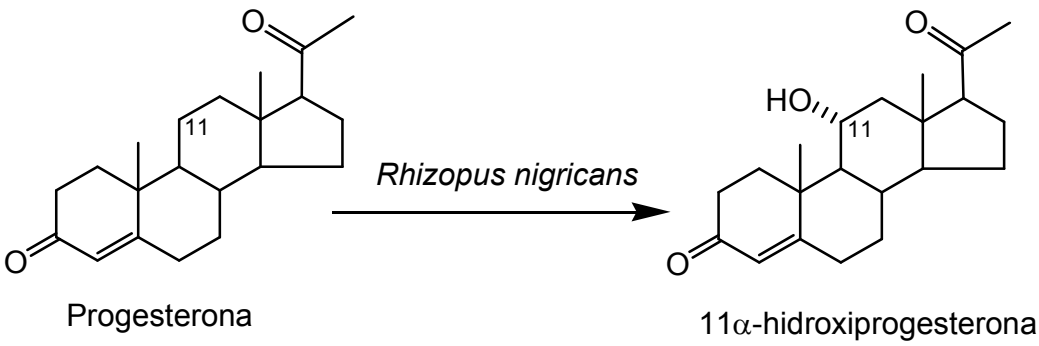
1 INTRODUÇÃO

Bioconversões são reações em compostos químicos realizadas por enzimas que podem estar isoladas ou no interior de microrganismos (bactérias, fungos e/ou leveduras). Por razões de ordem técnica e econômica, os microrganismos tem sido a fonte mais importante para a obtenção de produtos biotransformados, uma vez que eles apresentam uma taxa de crescimento rápida e toda a maquinaria enzimática está disponível. Os resultados têm sido satisfatórios, principalmente com o emprego de fungos filamentosos dotados de monoxigenases (LACROIX e AZERAD, 1997; HAUER e ROBERTS, 2004).

Atualmente, o uso de biocatalisadores para o desenvolvimento de moléculas orgânicas tem se destacado frente aos processos químicos clássicos. A escolha da bioconversão em relação à síntese química, além de ser justificada pela capacidade catalítica específica e diversidade dos compostos formados, também está fundamentada no maior rendimento, facilitando ensaios posteriores para detecção da atividade farmacológica e toxicidade, na rapidez e reprodutibilidade do método e no fato de que as enzimas são catalisadores que não agridem o ambiente (FABER, 2000; RASOR e VOSS, 2001).

Outra característica é que a bioconversão é realizada em meio aquoso não agredindo o meio ambiente. Dentre as vantagens do uso de células comparado a enzimas isoladas e purificadas, pode-se destacar o rendimento da produção que pode ser aumentado de maneira considerável pelo aprimoramento das linhagens microbianas e a otimização das condições reacionais (ABOURASHED et al.,1999; PAZINI, 2006).

Inicialmente, a bioconversão microbiana de fármacos foi realizada, principalmente em hormônios e antibióticos, no esforço de se obter substâncias mais ativas e menos tóxicas. Os estudos com esteróides desenvolvidos por Peterson e Murray (1952) impulsionaram o interesse pelos métodos de bioconversão e podem ser referidos como marco histórico na obtenção de derivados através de síntese microbiológica. O microrganismo *Rhizopus nigricans* realizou a partir da progesterona a hidroxilação químio, régio e estereosseletiva, obtendo a 11 α-hidroxiprogesterona, visualizada na figura 1 (PETERSON e MURRAY, 1952; STOUDT, 1960; CHARNEY e HERZOG, 1967).



Progesterona 11α-hidroxiprogesterona

Figura 1: Bioconversão da progesterona em 11 α-hidroxiprogesterona por *R. nigricans*, adaptada de Peterson e Murray 1952.

Atualmente, na biotransformação de fármacos, tem-se trabalhado com o objetivo de obter derivados de fármacos lançados no mercado há várias décadas e com patentes já em domínio público, procurando obter compostos que não tenham sido produzidos na fase de pesquisa original do fármaco e com isto obter compostos com propriedades farmacológicas melhores do que o fármaco original (ALEXANDRE et al., 2004; DE OLIVEIRA, 2007).

Outra possibilidade é que as substâncias obtidas sejam iguais aos produtos do metabolismo do fármaco em mamíferos (SMITH e ROSAZZA, 1983; HAN et al., 2002). Neste caso os metabólitos obtidos podem auxiliar na compreensão da farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco original (LACROIX, 1997; AZERAD, 1999).

1.1 ASPECTOS GERAIS DA BIOCONVERSÃO

A escolha da metodologia a ser utilizada nas reações de bioconversões, leva em conta a estabilidade do substrato, o pH do meio e a viabilidade do sistema enzimático microbiano. Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens que devem ser analisadas. Salienta-se que os microrganismos inteiros são mais empregados atualmente (BASTOS, 2005).

A seleção dos microrganismos para a bioconversão de um determinado substrato é uma etapa muito importante do procedimento. O “screnning” deve ser feito analisando os resultados disponíveis na literatura para o composto com o qual se deseja trabalhar ou para compostos semelhantes. As cepas podem ser obtidas em coleções de culturas de instituições de pesquisa ou serem isoladas da natureza – solo, plantas, ambientes marinhos, etc (GLAZER e NIKALDO, 1995).

Define-se o meio de cultura a ser utilizado e realizam-se então, experimentos em pequena escala com os microrganismos disponíveis, procedendo-se a análise das alíquotas obtidas do meio reacional, comparando-as a um controle ao qual não foi adicionado o substrato. Se houver a formação de novos metabólitos significa que aquele microrganismo realizou alguma transformação no substrato (GLAZER e NIKALDO, 1995).

Definida a cepa a ser empregada deve-se escolher a forma adequada para adição do substrato. Rotineiramente, ele é adicionado após a fase de crescimento da cultura. Inicialmente, o microrganismo é cultivado sob condições ótimas e o substrato é adicionado à biomassa na forma de solução em solvente hidrossolúvel não tóxico (HANSON, 1992; AZERAD 1995).

Outro fator a ser considerado para que a bioconversão ocorra é garantir que o substrato entre em contato com as enzimas produzidas pelo microrganismo. As enzimas podem ser extracelulares, nesse caso estão dispersas no meio de cultura, ou intracelulares. Neste último caso, o substrato deve ser capaz de atravessar a membrana celular da cepa. Quando o substrato é insolúvel em água é necessário realizar uma dispersão no meio líquido para que o composto orgânico entre em contato com a enzima que irá transformá-lo (CRUEGER e CRUEGER,1993).

Os produtos finais da biotransformação são normalmente extracelulares e são encontrados dissolvidos no meio de cultura. O micélio dos fungos é separado do meio por filtração e o material celular deve ser lavado repetidas vezes com solvente orgânico apropriado, uma vez que parte dos produtos formados pode estar adsorvido nas células do micélio. Os metabólitos presentes no meio podem ser recuperados por extração usando solventes adequados. Para a purificação dos metabólitos se utilizam as diversas técnicas cromatográficas e estando puros, pode-se realizar a elucidação estrutural e ensaios biológicos (CRUEGER e CRUEGER,1993).

O desenvolvimento de uma metodologia de monitoramento apropriada para esse fim é essencial para as reações de bioconversões. No acompanhamento das reações, as técnicas cromatográficas são tradicionalmente empregadas, como a cromatografia em camada delgada (CCD) (HOLLAND et al., 1999), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (KIM et al., 2005) e cromatografia gasosa (CG)

(VIAZZO et al., 1996). Estas técnicas são bastante utilizadas, tanto na etapa de triagem, permitindo a seleção do microrganismo de interesse de acordo com a produção de cada cepa, quanto no monitoramento dos diversos derivados produzidos por uma única cepa. Para identificação dos compostos formados, são necessárias técnicas mais específicas. Na maioria das vezes, emprega-se espectroscopia de infravermelho (EI) e ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e hidrogênio (RMN ^{1}H) e espectrometria de massas (EM) para a caracterização dos produtos formados (AZERAD, 1999; ALEXANDRE et al., 2004).

1.2 APLICAÇÕES DA BIOCONVERSÃO

A bioconversão representa, hoje, uma ferramenta útil no desenvolvimento de novos compostos que podem apresentar atividades farmacológicas melhoradas ou diferentes em relação a seus compostos de partida, ou aprimoramento das propriedades físico-químicas facilitando processos de absorção e distribuição dos fármacos (FOSTER et al., 1991; DE OLIVEIRA, 2007).

A bioconversão está sendo aplicada também nos estudos do metabolismo, que tradicionalmente são realizados em modelos animais, perfusão em órgãos e culturas de células normais ou malignas (AZERAD, 1999). Modelos microbiológicos podem constituir uma alternativa ou pelo menos um complemento aos estudos em sistemas animais, uma vez que podem mimetizar o metabolismo de mamíferos e fornecer algumas informações pertinentes sobre o destino metabólico de um fármaco, podendo ainda, fornecer maiores quantidades dos produtos formados em relação aos modelos animais favorecendo a detecção, identificação e elucidação estrutural (SMITH e ROSAZZA, 1975; GRIFFITHS et al., 1991).

Um bom exemplo da ampla aplicação da bioconversão é relatado por Xiao-Chi e colaboradores, com *Penicillium aurantigriseum* AS 3.4512 utilizando três bufadienolídeos tradicionalmente usados na medicina chinesa no tratamento de hepatomas e neoplasias da próstata. Foram obtidos dez metabólitos sendo que cinco foram exatamente iguais aos metabólitos formados por microssomos hepáticos “in vitro”, demonstrando que o sistema enzimático deste fungo filamentoso é similar às enzimas citocromo P-450 do fígado. Além disto, ensaios de citotoxicidade realizados com células de hepatoma humano (Bel-7402) sugeriram que os produtos obtidos foram menos citotóxicos em relação aos substratos analisados, indicando que a substituição por grupos hidroxila, cetona, ou diacetil podem significar um decréscimo “in vitro” da citotoxicidade, ressaltando que a transformação microbiana proporcionou a formação derivados menos tóxicos (XIAO-CHI et al., 2007).

Assim, Xiao-Chi e colaboradores demonstraram que a bioconversão com fungos filamentosos representa um modo simples e eficiente de estudo do metabolismo humano, além de possibilitar a obtenção de novas moléculas com atividade biológica otimizadas. A figura 2 ilustra os derivados obtidos neste trabalho.

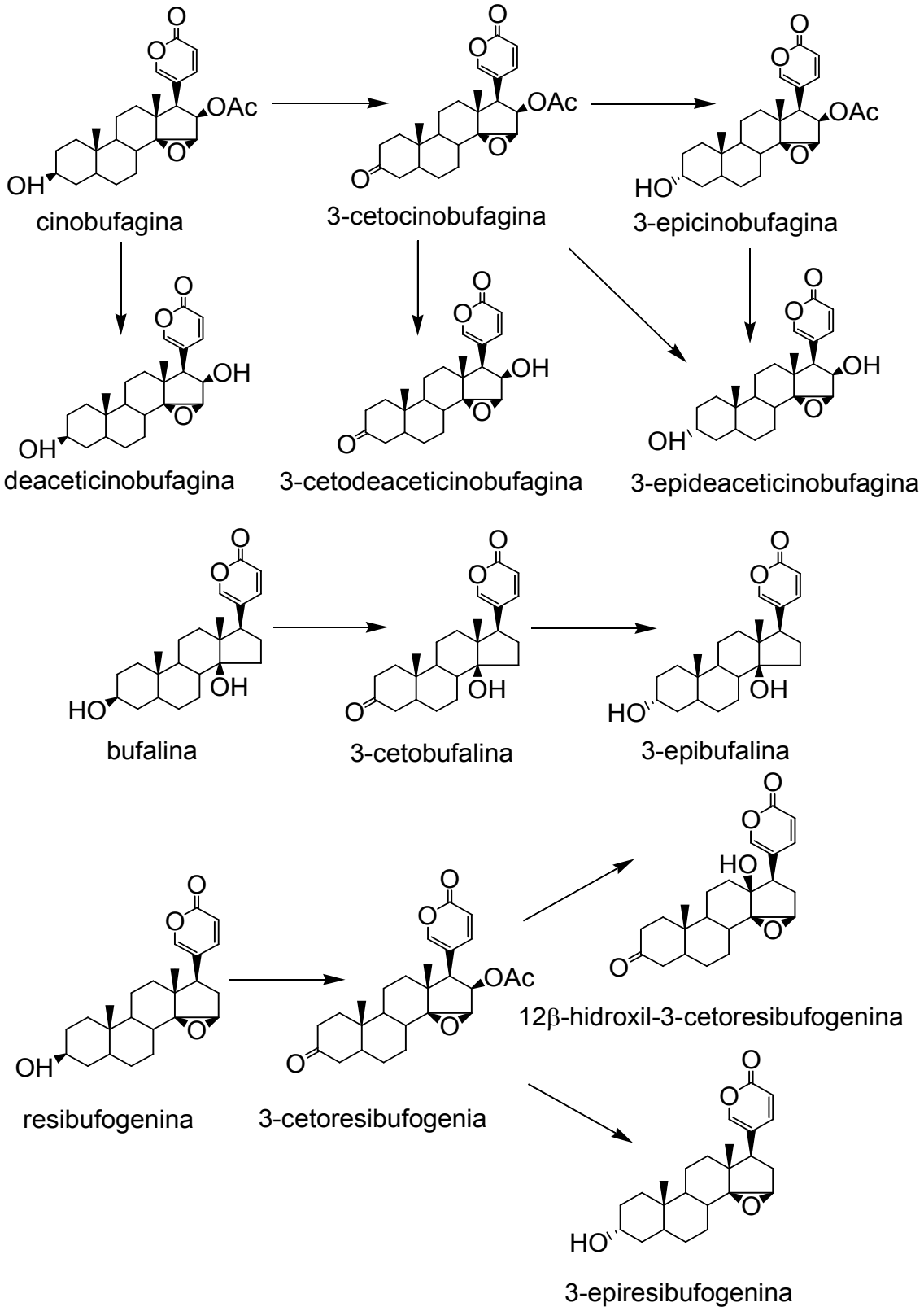


Figura 2: Proposta da rota de biotransformação da Cinobufagina, Bufalina e Resinobufogenina pelo fungo *P. aurantigriseum* AS 3.4512, adaptada de Xiao-Chi et al., 2007.

1.2.1 Modificação Estrutural

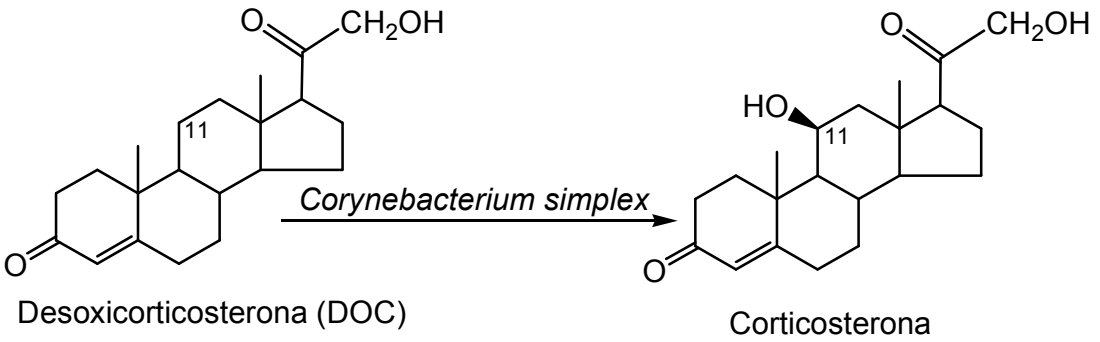
A utilização de fungos filamentosos para síntese químio, régio e estereosseletiva de fármacos, sobretudo pela químiodiversidade, determinando a biodiversidade gerada por estes microrganismos, é bem documentada na literatura (PAZINI, 2006).

Podemos enumerar algumas vantagens do uso de microrganismos nas reações de bioconversão na obtenção de derivados (FABER, 2000):

1. São catalisadores muito eficientes;
2. São ambientalmente aceitáveis (biodegradáveis);
3. Trabalham em condições reacionais brandas;
4. Possuem uma alta tolerância aos substratos;
5. Podem catalisar diferentes reações químicas.

Através da utilização da bioconversão como uma estratégia de modificação estrutural é possível obter modificações moleculares complexas que seriam laboriosas por métodos convencionais de síntese química (STRATHOF et al., 2002).

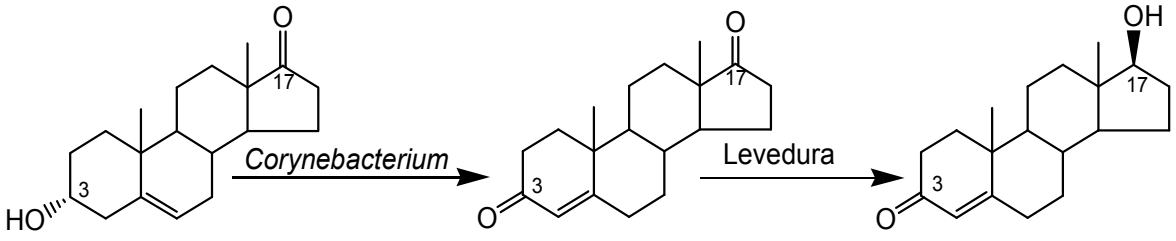
Charney e Herzog relatam os trabalhos desenvolvidos nessa área que conseguiram produzir a corticosterona, através da ação de microrganismos na desoxicorticosterona. Com a transformação microbiana foi possível funcionalizar o C-11 de forma muito mais simples que a proposta por síntese química, conforme ilustrado na figura 3. A corticosterona possui ação anti-inflamatória, por isso esta metodologia teve aplicação industrial tanto pela Merck quanto pela Schering (STOUDT, 1960; CHARNEY e HERZOG, 1967).



Desoxicorticosterona (DOC) Corticosterona

Figura 3: Obtenção da corticosterona por bioconversão da desoxicorticosterona por *C. simplex*, adaptada de Stoudt, 1960.

Para a química dos corticosteróides, esta metodologia foi de grande aplicabilidade pela indústria farmacêutica a partir da preparação da testosterona pela deidroepiandrosterona utilizando microrganismos (figura 4), viabilizando o desenvolvimento da produção dos hormônios sintéticos (CHARNEY e HERZOG, 1967; BASTOS, 2005).



Deidroepiandrosterona Testosterona

Figura 4: Obtenção da testosterona a partir da deidroepiandrosterona por bioconversão com o microrganismo *Corynebacterium,* adaptada de Charney e Herzog, 1967.

A biotransformação de esteróides por fungos filamentosos tornou-se um marco na indústria farmacêutica, pois a oxidação nas posições 6 e 11 é muito difícil de ser feita por métodos químicos, mas alguns fungos, como por exemplo o *Rhizopus arrhizus*, conseguem hidroxilar a progesterona na posição desejada. Outros fungos

como *Epicoccum oryzae* realizam redução de grupos cetonas, *Fusarium solani* é capaz de promover desidrogenação na posição 1, 2 ou epoxidação, assim como a *Curvularia lunata* (STOUDT, 1960; CHARNEY e HERZOG, 1967).

A partir desses estudos, as transformações microbianas passaram a ter grande aplicação na indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos e hoje cerca de 200 processos semelhantes já estão em uso (FABER, 2000).

Geralmente a bioconversão é útil comercialmente quando as reações químicas convencionais são muito caras ou laboriosas. A bioconversão em escala industrial envolve o crescimento do organismo em grandes fermentadores ou biorreatores, seguidos pela adição, há um tempo apropriado, do composto químico a ser convertido. Apesar de todas as críticas hoje, as novas tecnologias têm gerado um impacto no mercado farmacêutico e em nossa habilidade para usar e desenvolver novos tipos de reações de biotransformações (RUSHMORE et al., 2000; LERESCHE e MEYER, 2006).

1.2.2 Estudo do Metabolismo

Outra aplicação interessante para as transformações microbianas é a comparação entre os metabólitos produzidos pelos microrganismos e os gerados pelos mamíferos, após a administração de fármacos. Smith e Rosazza (1974) notaram a similaridade entre os metabólitos de alguns microrganismos e os metabólitos de mamíferos, principalmente os de fase I, e então sugeriram que fungos e mamíferos provavelmente possuiriam um sistema enzimático de monoxigenases similar (FERRIS et al., 1973; SMITH e ROSAZZA, 1974; JEZEQUEL, 1998). Desde então, a utilização de microrganismos para estudo do metabolismo de xenobióticos e

muitos outros processos bioquímicos vem sendo explorada com grande eficácia, minimizando os custos por ser de fácil manipulação e por diminuir o número de animais utilizados em comparação com os métodos convencionais (AZERAD, 1999; LI et al., 2006).

O metabolismo dos fármacos compreende o processo enzimático capaz de produzir modificações estruturais nessas moléculas. No organismo humano, geralmente, resulta em substâncias mais polares e se dá por transformações enzimáticas em duas fases, classificadas em fases I e II, conforme esquematizado na figura 5 (AZERAD, 1999).

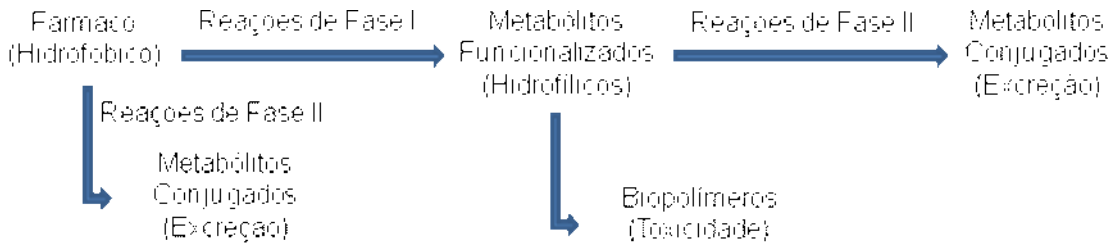


Figura 5. Transformação metabólica de fármacos, adaptada de Azerard, 1999.

A primeira fase do metabolismo, denominada de funcionalização, é onde um grupo funcional é adicionado ou modificado ao composto e engloba reações de oxidação, redução e hidrólise, transformando-o em derivados mais polares. Nas reações de oxidação catalizadas por citocromo P-450, que são responsáveis pelo maior número de metabólitos de Fase I, ocorre a introdução de um átomo de oxigênio em diferentes substratos (BARREIRO e FRAGA, 2001; WILLIAMS, 2001).

A fase II, denominada conjugação, envolve reações de glicuronidação sulfatação, acilação, metilação e formação de adutos com glutationa. Nessa fase, o

composto é conjugado com grupos hidrofílicos, geralmente, tornando-o bioinativo e facilitando sua excreção (BARREIRO e FRAGA, 1996; LEVSEN et al., 2005).

Entretanto, em alguns casos, este metabolismo, capaz de produzir modificações estruturais nas moléculas, pode conduzir para uma ativação, produzindo substâncias farmacologicamente mais ativas ou metabólitos reativos tóxicos, justificando, assim, a necessidade de estudos farmacológicos e toxicológicos detalhados do metabolismo dos fármacos (AZERAD, 1999; WILLIAMS, 2001).

O resultado final das reações envolvidas no processo de biotransformação ou metabolismo dos fármacos leva à formação de metabólitos em pequenas quantidades nos tecidos (sangue) e nos produtos de excreção (urina) (BARREIRO e FRAGA, 2001; VÉZINA, 2004).

O metabolismo de xenobióticos em humanos é realizado por reações diferentes, catalisadas por enzimas de natureza diversa, com atividade de monoaminoxidases; flavinas; oxidases e álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, amino oxidases, aromatases, epóxido hidrolases; esterases, amidases hepáticas e plasmáticas; e por monoxigenases citocromo P-450 (WILLIAMS, 2001; URLACHER e SCHMID, 2006).

Destas, o citocromo P-450 é o mais importante e amplamente estudado. Ele tem grande participação no metabolismo oxidativo de xenobióticos, particularmente de fármacos (figura 6) e na biossíntese de compostos endógenos. Esse grupo de enzimas está envolvido com a hidroxilação de inúmeras substâncias, através de uma cadeia transportadora de elétrons não fosforilante cuja finalidade é bioconverter diferentes compostos (MONTELLANO e CORREIA, 1995; SONO et al., 1996; ABOURASHRED et al., 1999).

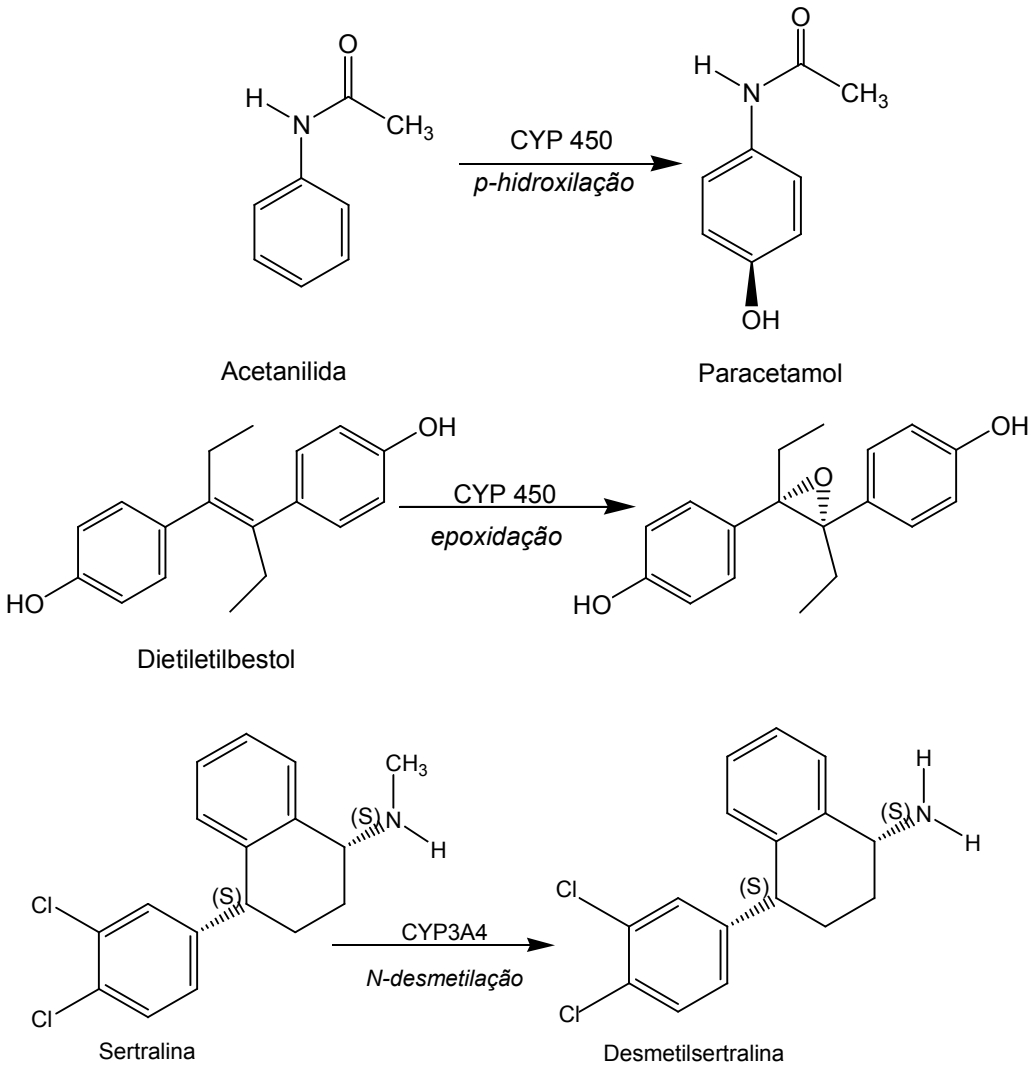


Figura 6: Exemplos de reações de *p*-hidroxilação, epoxidação e N-desmetilação realizadas pelo citocromo P-450, adaptada de Abourashed et al., 1999.

O citocromo P-450 apresenta várias isoformas. Dentre elas, o CYP3A4 é a mais abundante no fígado, estando presente também na parede intestinal. Esta isoforma é responsável pelo metabolismo de diversos fármacos como a ciclosporina, nifedipina, diltiazem, verapamil, celecoxibe, teofilina, lovastatina, indinavir, dentre outros e está envolvida em reações de hidroxilação e *N*-*O*-*S*-dealquilação, que podem

ser induzidas pelo rifampicina, carbamazepina, fenitoína e inibidas pela cimetidina, cetoconazol, amiodarona (GUENGERICH, 1995).

Uma avaliação do mecanismo de “clearance” metabólico de 315 fármacos diferentes revelou que 56% são eliminados primariamente através da ação das várias isoformas do citocromo; a CYP3A4 foi a mais importante (50%), seguida pela CYP2D6 (20%), CYP2C9 e CYP2C19 (15%) e o restante era biotransformado pelas CYP2E1, CYP1A2, CYP2A6 entre outras, de modo que pode-se estimar que 90% das reações de oxidação dos fármacos em humanos podem ser atribuídas a estas sete enzimas principais (OMURA, 1999; ABOURASHRED, 1999).

As reações de Fase II são catalisadas por enzimas transferases, que conjugam o fármaco ou metabólitos de Fase I com o ácido glicurônico ou grupamento sulfato, na maioria das vezes. A glicuronidação é provavelmente a maior e mais importante rota de formação de metabólitos de Fase II hidrossolúveis, e sua alta ocorrência é devido ao suprimento de ácido glicurônico disponível no fígado e à habilidade deste composto endógeno de conjugação com diferentes grupos funcionais, dentre eles fenóis, alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas. Esta reação é catalisada pela enzima UDP-glicuronil-transferase (UGT) e gera como produto um derivado glicuronado com configuração β no C-1 (WILIAMS, 2001). A glicuronidação do anti-inflamatório não-esteroidal ibuprofeno está esquematizada na figura 7.

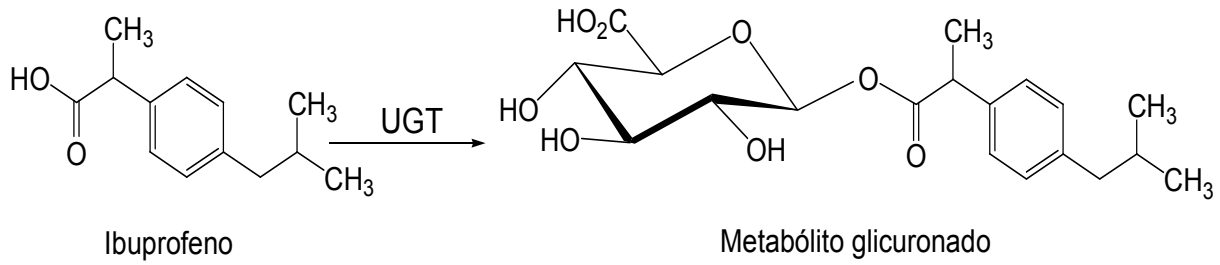


Figura 7: Glicuronidação do Ibuprofeno catalisada pela enzima UGT, adaptada de Williams, 2001.

A presença de citocromo P-450 em fungos foi descrita desde 1964, em cepas de *Sacharomyces cerevisae*. Esta cepa, assim como *Candida glabrata* e *C. albicans* promoveram a 14α-demetilação do lanosterol, uma etapa fundamental na biossíntese do colesterol, fitosterol ou ergosterol, sendo que esta reação é catalizada pelo CYP 14DM (BRINK et al., 1998; KAMBLE et al., 2005).

A participação das enzimas do citocromo P-450 de *C. elegans*, *C. echinulata, Mortierella isabelina* e *Beauveria bassiana* na hidroxilação de hidrocarbonetos poli aromáticos foi concluída de maneira indireta pelo uso de inibidores específicos do complexo enzimático citocromo P-450, devido à dificuldade de purificação destas enzimas (CERNIGLIA et al., 1997; OKUNO e MIYAZAWA, 2004).

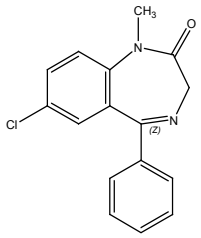
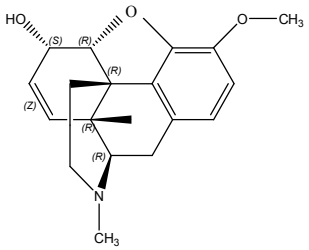
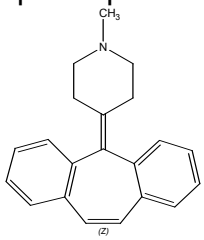
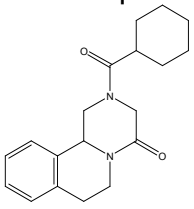
A habilidade de fungos filamentosos em promover hidroxilações aromáticas em acetanilida, anilina, benzeno, ácido benzóico, bifenil, clorobenzeno, cumarina, naftaleno, nitrobenzeno, tolueno e três isômeros de xilenos foram avaliados em trabalho realizado por Smith e colaboradores (1983). Para tal, foram testadas as capacidades metabolizadoras de *C. blakesleeana* ATCC 8688a, *Aspergillus niger*

ATCC 9241, *A. ochraceous* ATCC 1158w, *Rhizopus stolonifer* NRRL 1477 e *C. echinulata* ATCC 9244. A seleção dos substratos em estudo se baseou no fato de que cada um destes compostos já tinha sido estudado em mamíferos, permitindo sua comparação com os resultados encontrados pelos modelos microbianos sugeridos. Foi detectado um alto grau de paralelismo entre produtos gerados por mamíferos e os formados por fungos filamentosos, demonstrando que o padrão de hidroxilação para os substratos estudados mimetizava a hidroxilação ocorrida em mamíferos (SMITH e ROSAZZA, 1983).

Foster e colaboradores estudaram a biotransformação do bloqueador β-adrenérgico propranolol por *C. echinulata* e os derivados formados foram comparados aos metabólitos humanos. Três caminhos principais conduzem aos metabólitos humanos de fase I (4-hidroxipropranolol, desisopropilpropranolol, 1-ácido nafitoxilático, propranolol glicol e 1-ácido nafoxiacético) sendo a oxidação da cadeia lateral e a hidroxilação aromática. Todos os cinco metabólitos de fase I encontrados pela biotransformação do propranolol em humanos também foram formados em incubações com *C. echinulata*, demonstrando a importância deste fungo filamentoso em estudos do metabolismo (FOSTER et al., 1989).

A tabela 1 resume outros exemplos de fármacos, relacionando os metabólitos obtidos na biotrasformação em mamíferos e em fungos filamentosos, ilustrando suas estruturas químicas e respectivas atividades farmacológicas (AZERAD, 1999).

Tabela 1: Relação de alguns fármacos utilizados em bioconversão para estudo do metabolismo por apresentarem os mesmos metabólitos tanto em mamíferos quanto nos fungos filamentosos.

MICRORGANISMO	FÁRMACO/ATIVIDADE ESTRUTURA	METABOLISMO MAMÍFERO	METABOLISMO MICROBIANO
Aspergillus terreus e *Beauveria bassiana*	Ansiolítico/Diazepam 	*N*-desmetilação; C3-hidroxilação; hidroxilação aromática em C-4’	*N*-desmetilação; C3-hidroxilação; hidroxilação aromática em C-4’ (AZERAD, 1999)
Streptomyces sp.	Analgésico/Codeína 	*N*-desmetilação; glicuronidação; oxidação para cetona	*N*-desmetilação; C-14 hidroxilação (AZERAD, 1999)
Cunnighamella sp.	Antihistamínico/ Ciproheptadina 	*N*-desmetilação; hidroxilação aromática; 10,11 epxidação, *N*-oxidação	*N*-desmetilação; C-1, hidroxilação aromática em C-2 e C-3; 10,11 epxidação, *N*-oxidação (AZERAD,1999)
Cunninghamella echinulata e *Beauveria bassiana*	Antimalárico/ Praziquantel 	Mono e dihidroxilação anéis B, C e D	C-7 hidroxilação anel D, hidroxilações não identificadas (AZERAD, 1999)

Inicialmente, pensou-se que apenas metabólitos de Fase I eram produzidos por microrganismos. No entanto, recentemente os trabalhos vêm demonstrando um certo número de metabólitos de Fase II isolados e caracterizados em modelos microbianos (AZERAD, 1999). Fungos do gênero *Cunninghamella* são considerados na literatura como portadores de alta capacidade metabólica, sendo capazes inclusive de produzir tais metabólitos (CUTRIGHT, 1995; IBRAHIM et al., 1997; NING et al., 2003)

Zhang e colaboradores demonstraram que *C. elegans* produzem várias enzimas catalisadoras de reações de Fase II, dentre elas UDP-glicosil-transferase, UDP-glicuronil-transferase e PAPS Sulfo-transferase, detectadas através da bioconversão do 1-naftol, com formação dos derivados conjugados ilustrados na figura 8 (ZHANG et al., 1996).

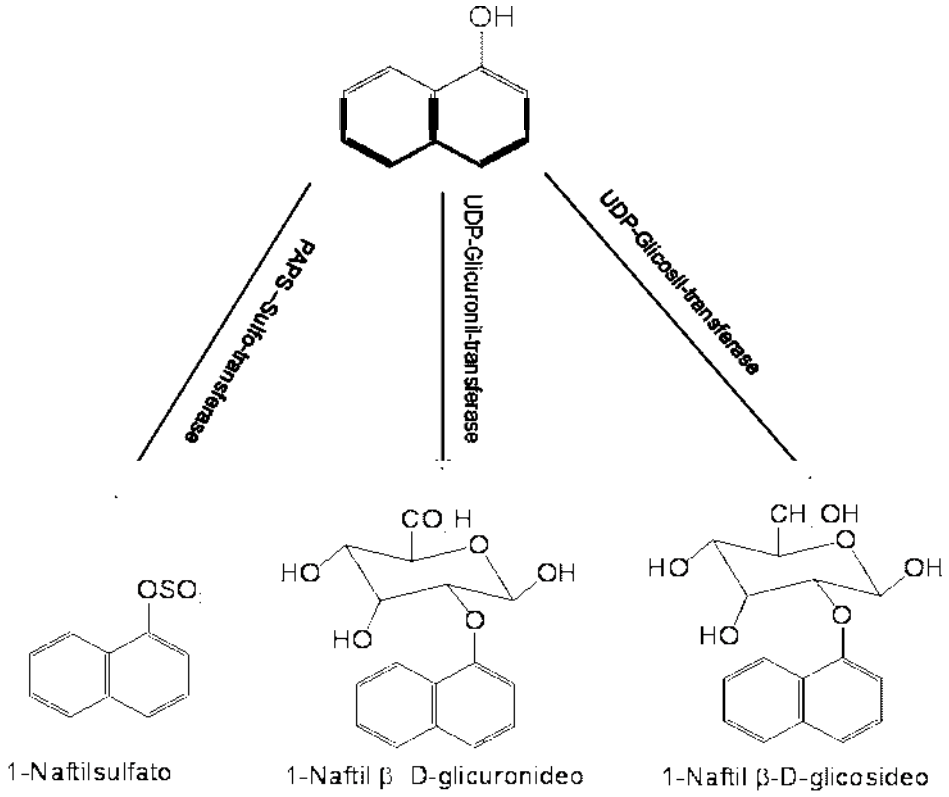


Figura 8: Bioconversão do 1-naftol por *C. elegans* em seus derivados conjugados, adaptada de Zhang et al., 1996.

.

A glicosilação é uma reação que merece destaque especial neste contexto. Isto porque os microrganismos parecem conjugar a D-glicose em sítios de glicuronidação em mamíferos, corroborando o paralelismo entre as biotransformações presente também na Fase II (AZERAD, 1999). Como exemplo, pode-se citar a conjugação com glicose das flavonas de *Psiadia arabica* por *C. elegans* NRRL 1392. Este fungo glicosilou a psiadiarabina e seu análogo 6-desmetoxi em seus respectivos derivados glicosilados, como ilustrada na figura 9 (IBRAHIM et al., 1997).

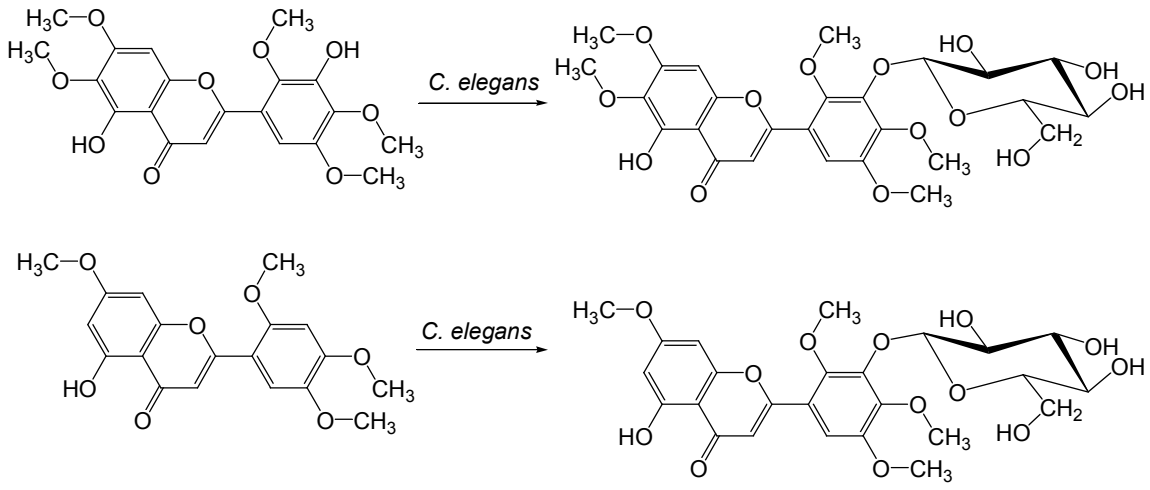
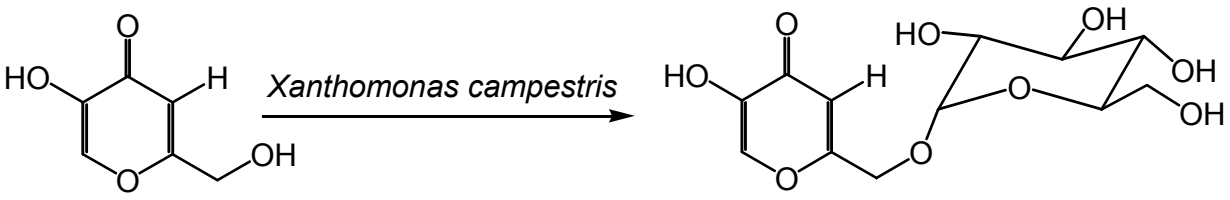


Figura 9: Glicosilação das flavonas de *Psiadia arabica* por *C. elengans* NRRL 1392, adaptada de Ibraim et al., 1997.

Hsieh e colaboradores produziram um derivado do ácido kójico funcionalizado pelo carboidrato glicopiranose, conjugado em α, através da bioconversão utilizando bactérias mutantes de *Xanthomonas campestris*, como representado na figura 10 (HSIEH et al., 2006).



Ácido Kójico

Ácido Kójico 7-*O*-α-D-glicopiranosideo

Figura 10: Bioconversão do ácido kójico a ácido kójico 7-O-α-D-glicopiranosídeo por *Xanthomonas campestris*, adaptada de Husieh et al., 2006.

Portanto, a funcionalização de moléculas por carboidratos, em reações de bioconversão, ocorre principalmente pela habilidade de alguns fungos filamentosos em realizar conjugações com a D-glicose, inclusive com a conformação α. A presença de 2'-desoxiribosil-transferase, enzima capaz de transferir 2'-desoxiribose para anéis de purina ou pirimidina, permitindo a síntese de nucleosídeos, foi demonstrada em *Bacillus coagulans* CECT 12, *Bacillus psychrosaccharolyticus* CECT 4074, *Lactobacillus sp*. CECT 4219 e *Psychrobacter immobilis* CECT 4492 (FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2006).

1.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM AS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO

Os fungos filamentosos são organismos morfologicamente complexos podendo apresentar estruturas diferentes em determinados momentos do ciclo de vida e de acordo com o ambiente físico em que se encontram. Os principais fatores que influenciam nas características das colônias fúngicas são: concentração de carbono, níveis de nitrogênio e fosfato, traços de minerais, oxigênio, monóxido de carbono, temperatura, pH, agitação, reologia. Outro fator importante a observar é a

relação entre a formação do produto e a morfologia do fungo empregado, parâmetro que sofre muita influência e que apesar de muitos estudos a respeito nas últimas décadas ainda possui muitos questionamentos (PAPAGIANNI, 2004).

O pouco conhecimento da diversidade microbiana aumenta a importância de se realizar mais pesquisas sobre bioconversão. O desenvolvimento analítico dessa técnica pode gerar muito lucro para as indústrias incluindo química, farmacêutica e biotecnológica. A biologia e a engenharia química terão grande avanço na síntese de catalisadores biomiméticos nos próximos anos. Assim em todo o mundo, estão sendo realizados estudos do monitoramento dos parâmetros para otimizar a utilização dos fungos filamentosos nos processos de bioconversão (FERNANDES et al., 1998; IBRAHIN et al., 2000; CÁNOVAS et al., 2005).

1.3.1 Período de Incubação

Estudos de bioconversão microbiana demonstram a importância de se padronizar o período de incubação. Tradicionalmente, as reações de bioconversão são interrompidas entre 3 a 14 dias após administração do substrato, variando de acordo com a sua sensibilidade, uma vez que pode ser degradado em períodos extensos ou não ser metabolizados em períodos curtos. Assim, torna-se necessário observar o tempo ideal de incubação de acordo com os metabólitos que se deseja obter (ABEL et al., 2003; CARDUS et al., 2004),

1.3.2 Morfologia do Microrganismo

A estrutura vegetativa de crescimento de um fungo filamentoso consiste em um filamento tubular conhecido como hifa, que se origina da germinação de um único esporo, estrutura reprodutiva. As hifas continuam a crescer e forma uma massa de filamentos conhecida como micélio. Quando esse crescimento ocorre em meio líquido, como culturas submersas, os fungos podem exibir diferentes morfologias, variando de hifas dispersas a massa amorfa densa conhecida como “pellets”, aglomerados esféricos de uma ou mais hifas. A morfologia desenvolvida por cada fungo nesses meios consiste de um equilíbrio entre forças de coesão e desintegração e isso irá depender de vários fatores, dentre eles a característica genética de cada espécie, a natureza do inóculo, do meio constituinte e das características físicas as quais esse meio está submetido (KOSSEN, 2000).

O monitoramento dos parâmetros que podem interferir nas reações de bioconversão é de fundamental importância, visto que elas determinam a predominância da morfologia do fungo a qual influenciará nos diversos metabólitos formados. A mudança na morfologia do fungo afeta o consumo de nutrientes e oxigênio do meio de cultura além de provocar mudanças significativas na reologia, aumentando a viscosidade da massa micelar e dificultando análises como a líquido-gás (PAPAGIANNI, 2004).

A formação de “pellets” também é influenciada pelo pH. Observa-se que alguns fungos como *A. niger* possui diferentes comportamentos dependendo do pH do meio de cultura em que se encontram. Os espóros dessa espécie são capazes de

formar coágulos em pH 5,0 o que não é observado em pH 2,0 (SCHÜGERL et al., 1998).

A variação na morfologia também é afetada pela temperatura. Schügerl e colaboradores (1998) demonstraram em seus estudos que o volume celular e as formas morfológicas eram determinados pela variação da temperatura na faixa de 25 a 35°C. O maior volume celular foi obtido a 25°C, onde apenas “pellets” foram observados. Os “pellets” formados após 50 horas de incubação a 30°C decompuseram-se em massa amorfa, já a 35°C formou-se principalmente massa amorfa e uma pequena quantidade de “pellets” e agregados foram formados. Segundo esses autores essa mudança na morfologia se deu devido à suplementação de oxigênio ser inadequada para as células em temperaturas elevadas, sugerindo que a variação na morfologia ocorreu devido ao estresse que a cultura foi submetida (SCHÜGERL et al., 1998).

1.3.3 Temperatura de Incubação

Estudos do efeito da temperatura no crescimento fúngico e na produção de metabólitos são poucos com relação a fungos filamentosos. Apesar de a temperatura ser um parâmetro fácil de controlar, mudanças bruscas produzem mudanças simultâneas em outros fatores que interferem na cultura dos microrganismos, como o requerimento nutricional e pH (PAPAGIANNI, 2004). De acordo com Abel e colaboradores (2003), a didesmetilação ocorrida na bioconversão da buprenorfina por *C. echinulata* NRRL 1384 pode ser praticamente inibida a 32°C e que a 28°C ocorre a formação máxima dos metabólitos.

As diferentes espécies microbianas variam amplamente na sua faixa de temperatura ótima para o seu crescimento, mas a maioria dos microrganismos consiste em formas mesófilas nas quais a temperatura ótima para crescimento é de aproximadamente 27°C. Em altas temperaturas, o suplemento de oxigênio às células torna-se inadequado, com formação de massa amorfa em 30°C e de agregados em 35°C devido ao estresse (GIBBS et al., 2000).

Os extremos de temperatura afetam a velocidade de crescimento e podem matar o microrganismo. A temperatura pode influenciar na tensão de oxigênio, pH e crescimento fúngico, além de interferir no sistema de transporte de soluto. As temperaturas viáveis para um bom crescimento do fungo são valores entre 27 a 35°C (PAPAGIANNI, 2004).

1.3.4 Velocidade de Agitação

A força de agitação utilizada vai depender do fungo, da sua necessidade de suprimento de oxigênio e nutriente, capacidade de fermentação ou metabolização e do volume de produtividade, além da resistência da hifa ao mecanismo de força estabelecido. Já foi observado que mudanças na força de agitação podem reduzir a produtividade esperada (CHEN e LIU, 1997; GIBBS et al., 2000).

A utilização de agitadores mecânicos nos processos de bioconversão por microrganismos é justificada para assegurar uma transferência suficiente do oxigênio durante toda a incubação. Este não é o único nutriente que pode tornar-se limitante devido a uma pobre agitação, mas é provavelmente o mais importante fisiologicamente, pois sua limitação pode resultar na supressão ou até na inibição total da produção de metabólitos em fungos aeróbios, apesar de sua concentração,

quando dissolvido no meio reacional, exercer pouca influência na morfologia das hifas (GIBBS et al., 2000).

A agitação do meio de cultura deve ser constante, sendo que uma pobre agitação resulta também em uma má homogeneização do sistema, levando ao mesmo tempo a uma limitação nutricional e a elevação do nível de estresse celular, podendo resultar na degradação e/ou mutação da cepa. Uma agitação precária também pode alterar a transferência de calor e de oxigênio por toda a biomassa dentro do recipiente de incubação. Este último, trata-se de um fator crítico para o crescimento de fungos aeróbios, devido a baixa solubilidade do oxigênio nos meios líquidos, que é de 8,69 mg/L em água a 25°C (GIBBS et al., 2000).

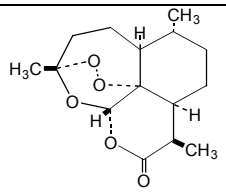
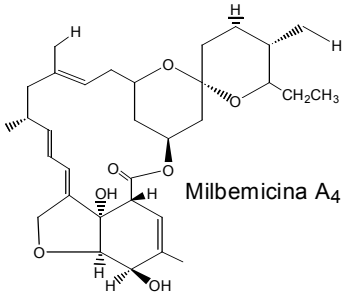
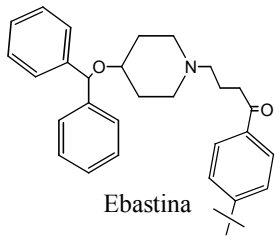
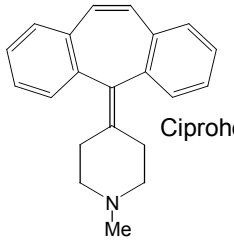
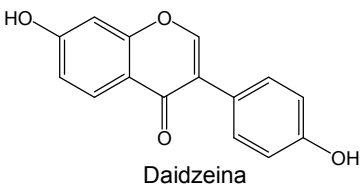
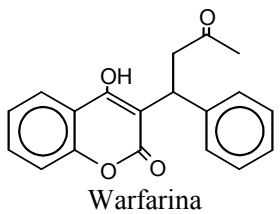
1.3.5 Meio de Cultura

A composição do meio de cultura utilizado em culturas submersas é um fator a ser avaliado por influenciar tanto no crescimento quanto na formação de produtos pelo microrganismo. Por serem organismos heterotróficos, eles utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia, sendo que os mais empregados são os açúcares, seguidos de polissacarídeos, aminoácidos, lipídeos, proteínas, etc. A omissão de nitrogênio no meio afeta profundamente o crescimento fúngico e a produção de metabólitos, sendo assim esse elemento pode ser fornecido na forma de amônia, nitrato, compostos orgânicos; aminoácidos e proteínas; e soja. Extrato de levedura, dentre outros, enquanto os fosfatos são empregados como fontes de fósforo. Sabe-se ainda que meios de cultura ricos em nutrientes facilmente assimiláveis reduzem formação de “pellets” em fungos filamentosos (PAPAGIANNI, 2004).

Em estudos de bioconversão podem ser empregados diversos tipos de meios diferentes, desde que atendam a uma composição mínima dos nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Assim, Freitag e colaboradores (1997), realizaram estudos de bioconversão com diferentes meios de incubação: caldo extrato de levedura, caldo ácido casamino, caldo peptona, caldo soja tripticase, caldo Sabouraud dextrose, caldo extrato de malte e caldo Czapek dox. Os resultados demonstraram que a composição do meio influenciou no metabolismo e que o caldo extrato de levedura foi o que apresentou a melhor biossíntese dos metabólitos estudados, comprovando a relevância do fator nutricional (FREITAG et al.,1997).

Além disso, a composição do meio de cultura influencia diretamente as variações de pH durante o crescimento do fungo. A tabela 2 relaciona alguns exemplos de fármacos bioconvertidos por microrganismos e seus respectivos valores de pH reacionais nos meios de cultura utilizados (ABOURASHED et al., 1999).

Tabela 2: Relação dos valores de pH observados durante a bioconversão microbiana de alguns fármacos com suas respectivas estruturas químicas e meio de cultura.

SUBSTRATO	MICRORGANISMO	pH	MEIO DE CULTURA
 Artemisinina	*Cunninghamella elegans* ATCC 9245	6,5	Sabouraud dextrose, sucrose, peptona (AZERAD,1999).
 Milbemicina A_4	*Cunninghamella echinulata* ATCC 9244	6,3≈ 6,5	Glicose, polipetona, extrato de levedura, extrato de malte (AZERAD, 1999).
 Ebastina	*Cunninghamella blakesleeana*	5,0	Peptona, soja, extrato de levedura, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, glicose (SCHWARTZ, 1996).
 Ciproheptadina	*Cunninghamella elegans* ATCC 9245 e ATCC 36112	5,6	Caldo Sabouraud dextrose (ABOURASHED, 1999).
 Daidzeina	*Aspergillus niger*	7,2	Sacarose, glicose, polipetona, sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de potássio, fosfato de potássio dibásico, $FeSO_4$ heptahidratado (MIYAZAWA, et al 2004).
 Warfarina	*Cunninghamella elegans*	7,0	Dextrose, farinha de soja, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, extrato de levedura, água destilada (PAZINI, 2006).

1.3.6 pH

O pH é mensurado avaliando a quantidade de íons H^+ presentes na solução. Fungos filamentosos geralmente crescem em uma faixa de pH entre 4,0 e 9,0 tendo seu crescimento e esporulação máxima em pH próximo ao neutro. A avaliação do pH é importante no processo de bioconversão por microrganismos devido a relação pH-crescimento fúngico a qual pode ser observada através do transporte do nutrientes, solubilidade dos nutrientes, reação enzimática e fenômenos de superfície (PAPAGIANNI, 2004).

É importante destacar que o pH do meio de cultura pode influenciar na morfologia da colônia, sendo que valores superiores a 5,5, de um modo geral, minimizam a formação de “pellets” em meios líquidos. Geralmente cada espécie de fungo possui um pH ótimo para o crescimento, para a formação de determinadas estruturas da sua morfologia e para a produção de metabólitos. Exemplificando, o *Penicillium chrysogenum,* durante a produção da penicilina, tem como pH ótimo para crescimento fúngico valores que não ultrapasse 7,0 e com a produção da penicilina há um aumento do pH no qual o valor estimado é de 7,4 (PAPAGIANNI, 2004).

Após estudos que demonstram que as enzimas produzidas pelos fungos são pH sensíveis, a utilização de reatores melhorou a capacidade de se obter um metabólito específico e a produtividade do mesmo, visto que pode se monitorar com maior eficiência o pH. Mas o fator mais relevante a ser observado é a capacidade de alguns fungos produzirem determinadas enzimas somente em uma faixa de pH. Por exemplo, geralmente há formação de α-amilase por *A. niger* em pH próximo a 6,0 em contraste com o crescimento do fungo que ocorre na faixa de pH de 3,0 a 7,0 (PAPAGIANNI, 2004).

Abel e colaboradores demonstraram em seus estudos sobre o efeito do pH na síntese dos intermediários da buprenorfina que a otimização da bioconversão por *C. echinulata* NRRL 1384 correu com o pH entre 5,0 e 6,0, sendo que a produção máxima ocorreu com pH 5,0, sendo mais favorável ao processo de *N*-demetilação catalisado por este microrganismo. A cinética da produção demonstrou que ocorreu uma diminuição dos derivados em pH 6,0 e que o melhor crescimento do fungo ocorreu em pH mais ácido em torno de 5,0. Já em pH 3,0, o crescimento fúngico é completamente inibido (ABEL et al., 2003).

Estudos realizados por Freitag e colaboradores com RAC-Mexiletina, um agente antiarrítmico, demonstraram a importância do pH para biossíntese dos metabólitos *p*-hidroxilados e hidroximetilados. A variação do pH em caldo extrato de levedura ocasionou um decréscimo na quantidade formada de 7,6 até 8,0 na qual não se encontrava mais nenhum metabólito. Entretanto, este trabalho nada constatou com relação à variação da preferência de síntese pelo composto *p*-hidroxilado, embora ocorresse variação na quantidade de derivado encontrado de acordo com a mudança do pH (FREITAG et al., 1997).

1.4 ESCALAS DE PRODUÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS PELA BIOCONVERSÃO POR MICRORGANISMOS

De acordo com a variação na quantidade dos derivados formados na bioconversão por microrganismos pode-se dividir a produção dos metabólitos em escalas laboratorial e industrial. A escala laboratorial é realizada em laboratórios de pesquisa científica e pode ser subdividida em escala analítica, escala semi-preparativa e escala preparativa. Apesar dos vários estudos de bioconversão já

realizados, ainda não se padronizou a quantidade de substrato utilizado e produto formado em cada uma destas etapas. Assim, cada laboratório, de acordo com o volume de pesquisa realizado, previamente define as quantidades que serão utilizadas no processo de bioconversão. Já a escala industrial é realizada para produção de matérias-primas, por exemplo fármacos, com obtenção dos metabólitos em quantidades para produção industrial de medicamentos (NUNES et al., 2007).

1.4.1 Escala Laboratorial Analítica

No início dos estudos de bioconversão, deve-se descrever a metodologia que será empregada e decidir qual o microrganismo que melhor realiza a bioconversão do substrato selecionado. No LaBioCon (Laboratório de Bioconversão), esta escala é realizada durante o “screening”, no qual os fungos são semeados em meio líquido com concentração final de 0,1 g/L de substrato. Amostras são coletadas de 24 em 24 horas após a adição do substrato para realizar análises por métodos de monitoramento adequados, principalmente cromatográficos (CARNEIRO et al., 2005; CIRILO, 2006; PAZINI, 2006).

1.4.2 Escala Laboratorial Semi-Preparativa

A Escala Semi-Preparativa é realizada com o microrganismo previamente selecionado na escala analítica, que teve um melhor rendimento na bioconversão do substrato a ser estudado, evidenciado por sua cinética de reação. Nesta etapa, no LaBioCon, utiliza-se concentração final de substrato de 0,5 mg/L no intuito de se obter

uma quantidade de metabólitos suficiente para sua elucidação estrutural (CARNEIRO et al., 2005; CIRILO et al., 2005; PAZINI, 2006).

1.4.3 Escala Laboratorial Preparativa

A escala preparativa, também realizada em laboratórios de pesquisa de bioconversão, visa obter quantidades de metabólitos suficientes para ensaios farmacológicos e toxicológicos. Pode-se utilizar biorreatores que têm capacidade média de cinco litros de meio de cultura, e atingem maiores rotações que as incubadoras do tipo “shakers”. A variabilidade na economia do processo de bioconversão varia com vários fatores dependendo do reator específico e das configurações necessárias (NUNES et al., 2007).

1.5 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (SIDA) E ZIDOVUDINA

1.5.1 SIDA e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), mais conhecida pela sigla AIDS, do inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome”, foi detectada inicialmente em 1981 em pacientes homossexuais masculinos procedentes de grandes cidades americanas, que apresentavam sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis carinii* (BALINT, 2001). A descoberta do agente causador da SIDA só ocorreu em 1984, sendo posteriormente classificado como um retrovírus e denominado Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana (HIV) (MOCK et al., 1999).

A SIDA é uma doença pandêmica e no mundo inteiro, estima-se que 33,4 milhões de pessoas sendo 32,2 milhões de adultos e 1,2 milhões de crianças com menos de 15 anos portadoras desta síndrome (PHIMISTER, 2003). No Brasil, os primeiros casos surgiram em 1982 e atualmente, através de inquéritos sorológicos feitos pelo Ministério da Saúde, constatou-se que cerca de 536.000 pessoas estão infectados pelo HIV (SOUZA e STORPIRTIS, 2004).

Atualmente são conhecidos os vírus HIV tipos 1 e 2, e o alvo principal do vírus HIV durante a infecção é o linfócito T CD4 (figura 11). Por esta razão, o quadro clínico da SIDA é determinado em função da contagem sangüínea de linfócitos T CD4 no indivíduo infectado com o HIV e da caracterização das condições clínicas relacionadas à infecção pelo HIV (GALLO e MONTAGNIER; 2003).

O mapa genético do HIV mostra três regiões principais: a região gag, que codifica as proteínas estruturais internas p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC) e p6, a região pol, que codifica a protease (p11, PR), transcriptase reversa (p66/p51, TR) e integrase (p31, IN) e, finalmente, a região envelope, responsável pela codificação das proteínas do envoltório, gp120 (SU) e gp41 (TM). O genoma do HIV-1 codifica ainda seis outras proteínas acessórias, sendo duas (tat e rev) relacionadas com a regulação da expressão gênica (SIMON et al., 2001).

Internamente às glicoproteínas de superfície (gp120 e gp41) e à membrana de lipídios, a proteína p17 completa o envelope viral. Já o cerne ou capsídeo viral é envolvido pela proteína p24. No interior do capsídeo há duas cópias do RNA genômico de mono-fita (35S RNA) que, supostamente, existe na forma de uma ribonucleoproteína contendo transcriptase reversa (TR), Integrase (IN) e a proteína p7 (NC) de ligação ao RNA. No interior do capsídeo encontram-se ainda as proteínas p6, Vif, Vpr e Nef, como pode ser visualizada na figura 11 (KILBY e ERON, 2003).

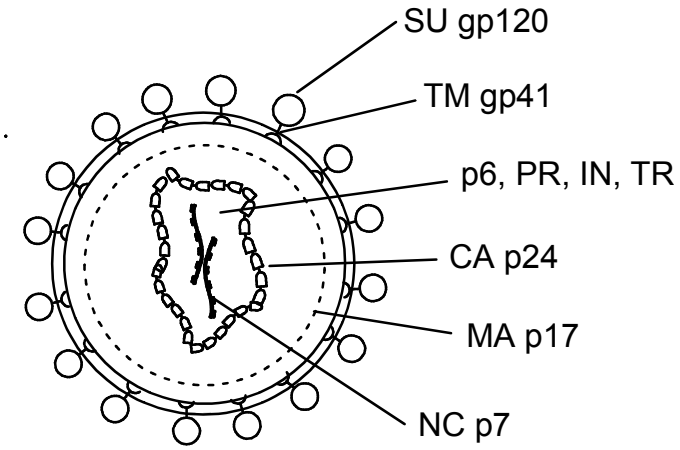


Figura 11: Morfologia do vírus HIV, desenhada no programa Chem Draw.

Após o contato com o vírus, a soro-conversão ocorre entre duas e três semanas após a infecção primária. A maior parte dos indivíduos passa a apresentar sorologia positiva para o HIV entre quatro e dez semanas após a exposição. Os indivíduos com contagens de CD4 inferiores a 50 células/mm^3 são considerados em estágio avançado de infecção pelo HIV, estando esse estágio relacionado a uma sobrevida mediana entre 12 e 18 meses quando a infecção não é tratada (EGGER et. al. 2002).

A sobrevida dos pacientes com SIDA aumentou com o advento da terapia anti-retroviral que desde 1996 vem reduzindo a mortalidade por esta síndrome (HADDAD et al., 2002). Atualmente, o Ministério da Saúde adotou política de controle da disseminação da SIDA no Brasil e assistência farmacêutica aos indivíduos infectados pelo HIV. Esta inclui, entre várias outras iniciativas, um programa de acesso universal e gratuito aos medicamentos anti-retrovirais na rede pública de saúde (BRASIL, MS 2002).

O ciclo de replicação do HIV apresenta diversos eventos exclusivamente relacionados a componentes virais, que podem ser utilizados como alvos para

intervenção quimioterápica. Os compostos disponíveis como fármacos anti-HIV, atuam na inibição no sítio de ligação da enzima transcriptase reversa, na inibição alostérica da transcriptase reversa ou na inibição competitiva da protease. Sendo que, uma eficácia clínica efetiva foi alcançada com a combinação de diferentes inibidores de transcriptase reversa e inibidores de protease (PARANG et al., 1998).

Apesar deste avanço terapêutico efetivo, que permitiu o aumento da expectativa de vida de pacientes soropositivos, a cura da SIDA ainda não foi alcançada. O principal fator envolvido é a alta taxa de ocorrência de mutações no HIV, conferindo resistência aos quimioterápicos utilizados. Além disso, vírus residentes em linfócitos T de memória não são erradicados através da terapia disponível, e mesmo os indivíduos que tornam sua carga viral indetectável não estão curados, pois se suspenderem o emprego dos fármacos, o vírus volta a aparecer (GOREMAKER, 2001).

Uma vez integrado ao genoma humano, o vírus se torna realmente inacessível a qualquer tipo de medicamento; esta forma, denominada pró-vírus, fica escondida no genoma e, quando a célula na qual penetrou ativa-se, o vírus volta a replicar. Possivelmente esta é a explicação para a não-resistência a fármacos aliada à persistência do vírus. Assim, o desenvolvimento contínuo de fármacos ativos contra cepas de HIV resistentes aos quimioterápicos disponíveis bem como a obtenção de agentes anti-HIV que atuem por outros mecanismos de ação se faz necessário e urgente (MONTANER et al., 1998).

1.5.2 Zidovudina (AZT) e Inibidores de Transcriptase Reversa (IsTRN)

Os fármacos inibidores de transcriptase reversa nucleosídeo-nucleotídeos (IsTRN) foram assim qualificados com base em sua capacidade de interação específica com a transcriptase reversa (TR) de HIV-1. A ausência de uma enzima análoga à TR em células humanas e o conhecimento prévio destes inibidores utilizados no tratamento de retroviroses, tornaram a inibição da TR o alvo terapêutico óbvio para o tratamento da infecção por HIV. O local de atuação dos IsTRN, o sítio de ligação do substrato, é o de domínio catalítico da transcriptase reversa, o heterodímero p66/p51, denominado de domínio palma (WEISS, 2002).

Dentre os IsTRN que estão disponíveis comercialmente para o tratamento da infecção por HIV pode-se destacar: zidovudina (AZT), didanosina (ddI), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), abacavir (ABC) e tenofovir diisopropil (viread), e a figura 12 mostra algumas de suas estruturas químicas (MOORE et al., 2000).

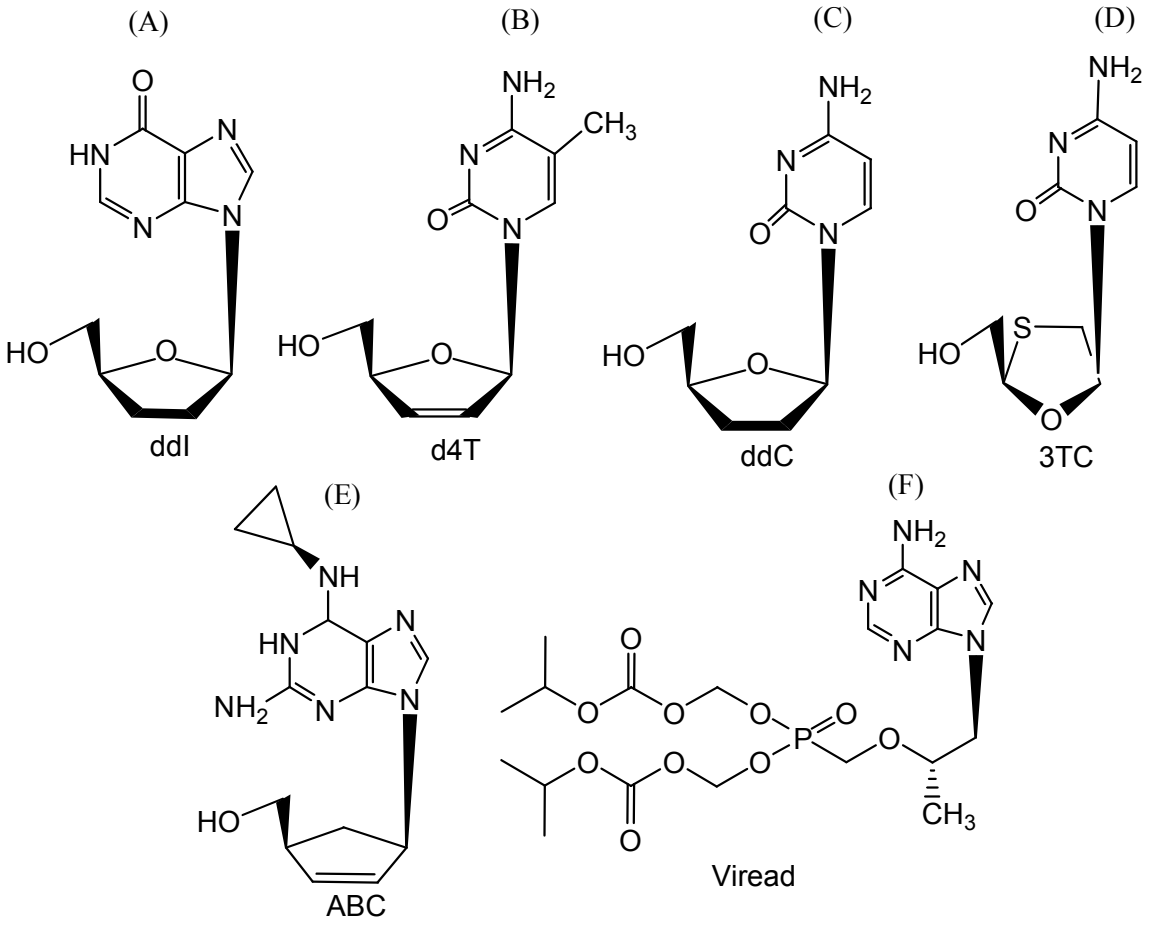


Figura 12: Alguns dos fármacos inibidores da transcriptase reversa nucleosídeo-nucleotídeo disponíveis no mercado: (A) ddI, (B) d4T, (C) ddC, (D) 3TC, (E) ABC, (F) Viread, adaptada de Moore et al., 2000.

O ponto chave para a atividade anti-HIV dos análogos de nucleosídeos é a etapa inicial de fosforilação por quinases intracelulares. Estes fármacos precisam sofrer fosforilação intracelular que os converte a sua forma 5'-trifosfato, a qual atua como um inibidor competitivo ou um substrato alternativo da enzima transcriptase reversa. Se o inibidor for incorporado à cadeia de RNA, torna-se impossível a continuidade do crescimento desta. Assim, os IsTRN atuam como terminadores de cadeia, como pode ser visualizado na figura 13 (SOUZA e ALMEIDA, 2003).

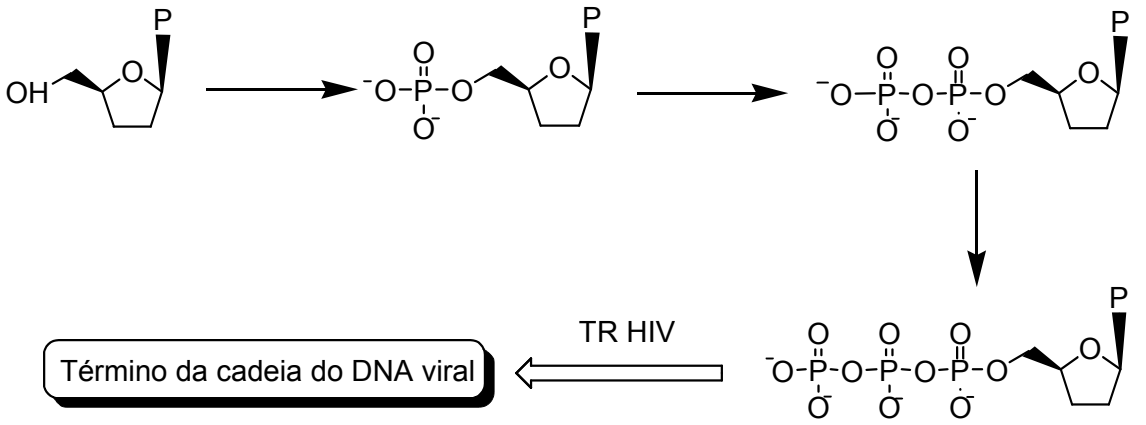


Figura 13: Esquema geral da fosforilação dos fármacos inibidores da transcriptase reversa, adaptado de Souza e Almeida, 2003.

Dentre os IsTRN, a zidovudina foi o primeiro fármaco para o tratamento da SIDA aprovado para comercialização pelo órgão americano de controle sobre produtos farmacêuticos, o “Food and Drug Administratration” (F.D.A., 1995). Sua estrutura química 3’-azido-2’,3’-didesoxitimidina, é semelhante à timidina endógena (figura 14), diferenciando apenas pela presença de um grupo não reativo azido (N_3), no anel da ribose ao invés da hidroxila na posição 3’ (SOUZA e ALMEIDA, 2003).

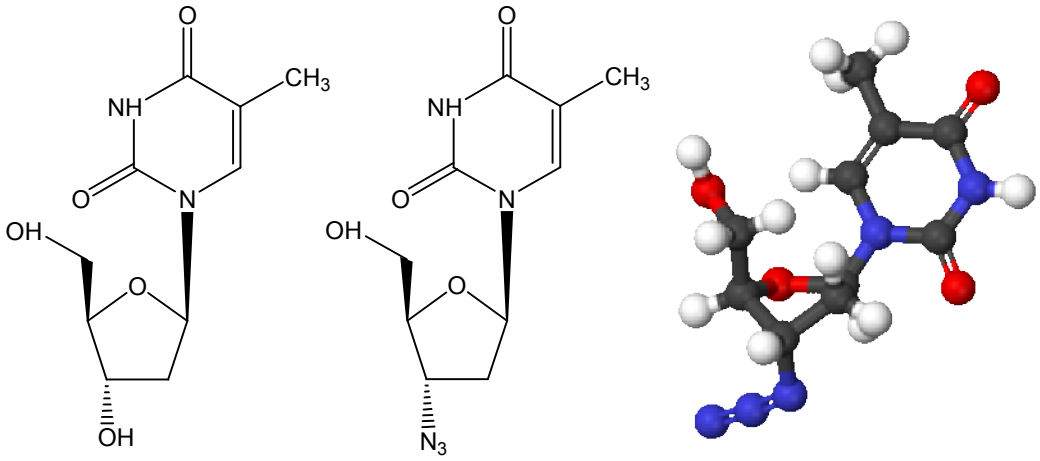


Figura 14: Estrutura Química da timidina, zidovudina e modelo bola-bastão da zidovudina, desenhada no programa ACD Labs, adaptada de Souza e Almeida, 2003.

A zidovudina foi sintetizada inicialmente como um agente anti-neplásico, mas apresentou atividade anti-retroviral inibitória do HIV-1 “in vitro”. A primeira rota sintética da zidovudina, para preparação industrial, foi realizada por Horwitz (1964) no laboratório Burroughs-Wellcome. Esta síntese tem como material de partida a timidina e foi realizada em seis etapas com um rendimento global de 30%, possuindo como etapa-chave a formação do intermediário cíclico 3, representada na figura 15 (HORWITZ et al., 1964 *apud* SOUZA e ALMEIDA, 2003).

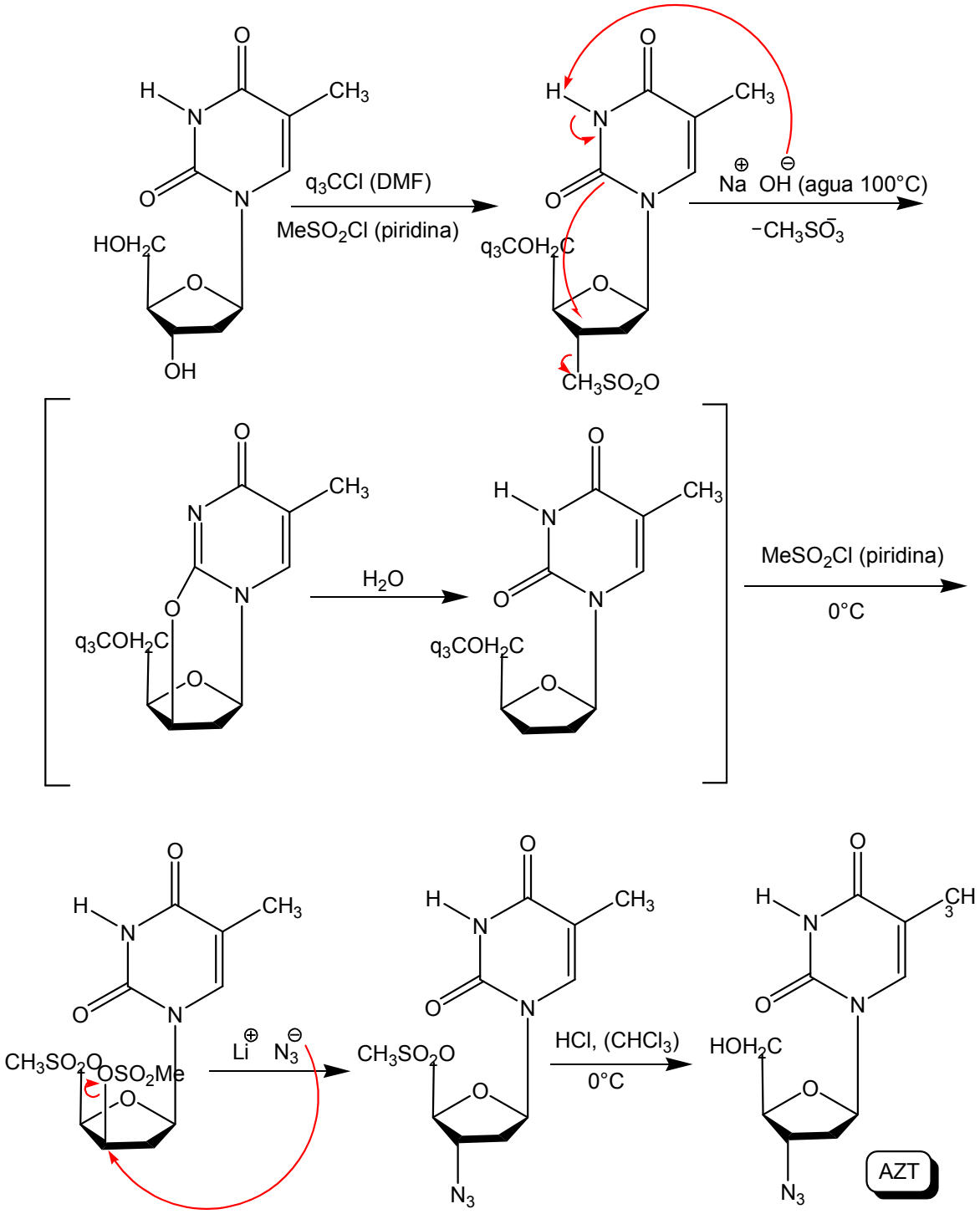


Figura 15: Primeira rota sintética desenvolvida por Horwitz (1964) na comercialização da zidovudina pelos laboratórios Burroughs-Wellcome, adaptada de Souza e Almeida, 2003.

Desde então, a zidovudina é amplamente utilizada para tratamento inicial de adultos infectados pelo HIV, apresentando contagem de células CD4 inferior a 500 células/mL. Seu uso é indicado também para crianças com mais de três meses de idade e mulheres grávidas infectadas pelo HIV e seus recém-nascidos e em casos de exposição ocupacional. Nos acidentes com materiais biológicos, o início imediato do uso de profilaxia pós-exposição ao HIV com zidovudina está associado a redução do risco de transmissão (MOODLEY et al., 1998).

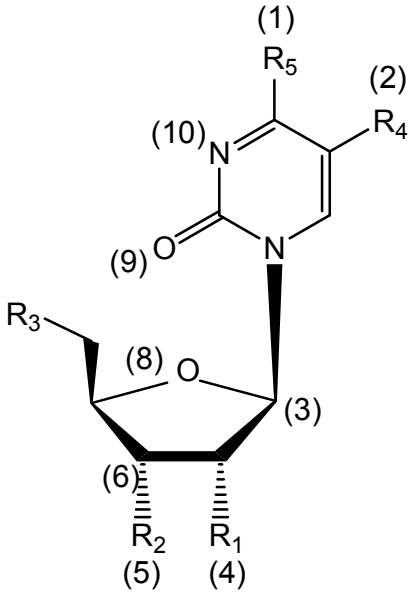
A taxa de transmissão vertical do HIV está associada ao tempo de uso da zidovudina, mesmo quando empregado tardiamente na gestação ou apenas no recém-nascido. A mulher que apresenta teste rápido reagente deve receber quimioprofilaxia com zidovudina aplicado por via intravenosa durante o trabalho de parto e no parto, o recém-nascido deve receber xarope de zidovudina. Além disto, seu uso esteve associado à redução na transmissão peri-natal do HIV, quando utilizado durante a gestação, no trabalho de parto e pelo recém-nascido com aleitamento artificial exclusivo (CARDO et al., 1997).

Devido à alta empregabilidade da zidovudina, desde a sua síntese, amplos estudos de estrutura-atividade (SAR="Structure Activity Relationship") foram realizados, o que permitiu a identificação das posições e grupos farmacofóricos e toxicofóricos que podem ser visualizados na tabela 3 (SOUZA e ALMEIDA, 2003).

Tabela 3: Relação estrutura-atividade em diferentes posições do nucleosídeo.

POSIÇÃO	ATIVO	INATIVO
1	H, OH, NH_2 ou NHMe	-
2	H, Me ou Halogênios	OH, OMe ou OEt
3	Ligação N-C	Ligação C-C
4	H	OH
5	H, N_3, F ou CH_2OH, Ligação Dupla R_1-R_2	OMe, OEt, CN, NH_2, SCN, alil, S-alquil, ClBr ou I, Ligação Dupla C-R_2
6	Substituição do COH por S ou O	I ou N
7	OH	CH_2N_3 ou Cabonilas
8	OH	C, N ou S
9	-	S
10	-	C, O ou S

ESTRUTURA QUÍMICA



1.5.2.1 Mecanismo de Ação e Metabolismo da Zidovudina

Para exercer sua ação anti-viral contra o HIV, a zidovudina deve ser fosforilada dentro dos linfócitos. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da incorporação da timidina dentro do RNA viral por meio da transcriptase reversa, levando conseqüentemente ao fim da cadeia de RNA realizado pelo fármaco ativo AZT-trifosfato (AZT-TP) (MOORE et al., 2000).

A efetiva ação da zidovudina no tratamento da infecção pelo HIV se concentra em torno de sua afinidade seletiva maior pela transcriptase reversa do HIV do que pela polimerase do DNA humano (FURMAN et al., 1986; ST. CLAIR et al., 1987). As polimerases α e β do DNA celular são enzimas importantes na síntese e reparação do DNA celular e são de 50 a 100 vezes menos sensíveis à zidovudina que à transcriptase reversa, mas a polimerase γ do DNA mitocondrial tem inibição clínica relevante a concentrações de zidovudina. Esta inibição da DNA polimerase γ está envolvida na toxicidade hematológica com o uso do fármaco “in vivo” (FURTADO et al., 1999; TAYLOR, 2008).

A zidovudina apresenta três vias importantes de metabolismo que podem ser visualizadas na figura 16. É fosforilada no interior da célula para monofosfato de zidovudina (AZT-MP) através da enzima timidina quinase celular; o monofosfato se converte em difosfato (AZT-DP) pela ação da timidilato quinase celular e logo se converte em trifosfato (AZT-TP) através da pirimidina nucleosídeo difosfato quinase. O trifosfato de zidovudina compete como substrato com o trifosfato de timidina natural para se incorporar às cadeias do DNA viral, que se formam pela ação da transcriptase reversa do retrovírus (DNA polimerase dependente de RNA) (VEAL e BACK, 1995).

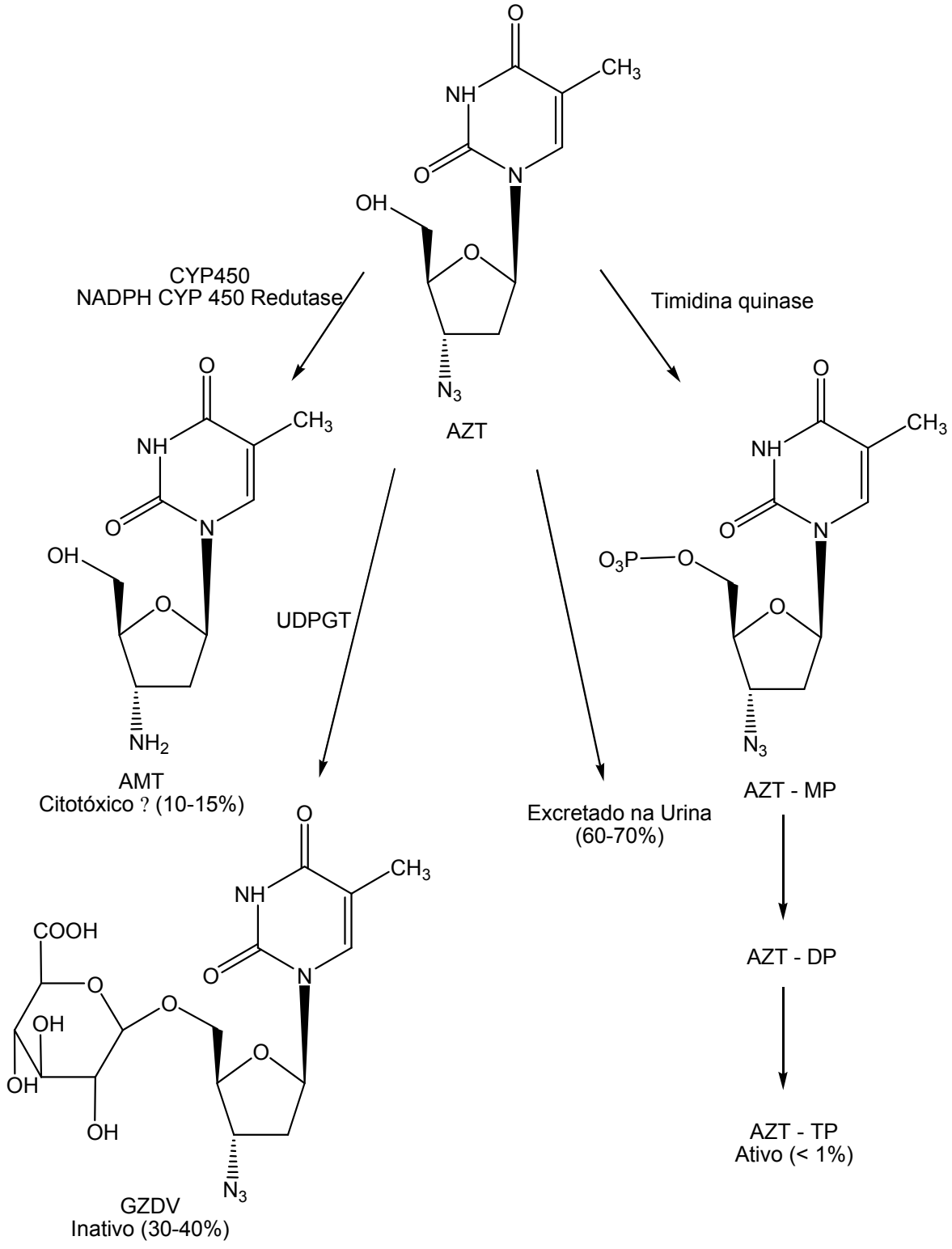


Figura 16: Esquema representando as três vias de metabolismo da zidovudina em humanos, adaptada de Veal e Back, 1995.

Uma vez incorporado, os anabólitos 5’-trifosfato de zidovudina interrompem prematuramente o crescimento da cadeia de DNA, já que o grupo 3'-azido impede novas uniões fosfodiéster-5'-3' e, portanto, inibe a divisão do vírus. A afinidade da zidovudina com a transcriptase inversa do retrovirus é maior que com a DNA-polimerase humana e permite a inibição seletiva da replicação viral sem bloquear a replicação celular (PARANG et al., 1998).

Mensurar a fosforilação intra-celular da zidovudina nos pacientes seria a chave para o conhecimento de sua eficácia e citotoxicidade. Importantes e recentes trabalhos demonstraram que pacientes HIV deteriorados (com contagem de linfócitos CD4 abaixo de 100 células) têm um decréscimo correspondente da AZT-monofosforilase intracelular o que acarretaria em implicações toxicológicas. (BERGER, et al., 1999; RIDDLER, 2008).

Entretanto, em termos quantitativos provavelmente menos de 1% do perfil metabólico segue esse caminho. Além da fosforilação, a zidovudina ainda tem mais duas outras rotas metabólicas que levam à formação de dois outros metabólitos. A glicuronidação é o caminho predominante do metabolismo da zidovudina, e em torno de 30 a 40% do fármaco é conjugado com o ácido glicurônico, pela ação da enzima UDP-glicuronil transferase (UDPGT) resultando na formação do 3’-azido-3’-deoxi-5’-beta-D-glicofuranosil-timidina ou 5’-glicuronil-zidovudina ou GZDV. Cerca de 60 a 70% do fármaco não é metabolizado sendo eliminado inalterado pela urina (VEAL e BACK, 1995).

A glicuronidação da zidovudina tem sido caracterizada por estudos em microssomos hepáticos humanos, nos quais a indometacina, por exemplo, foi usada para demonstrar a inibição “in vitro” da conjugação da zidovudina. Alguns fármacos, como o naproxeno, a probenicida e o fluconazol, que às vezes são co-administrados

em pacientes portadores do HIV, podem interferir na glicuronidação e ocasionar aumento da atividade da zidovudina, bem como da sua tocixidade. Tanto a zidovudina quanto o GZDV, seu principal metabólito, foram determinados “in vivo” em amostras clínicas por CLAE com boa reprodutividade (BEACH, 1998).

O terceiro passo metabólico é ocasionado por uma reação de redução com a formação de 3’-amino-3’-desoxitimidina (AMT). A formação do AMT é provavelmente mediada por enzimas citocromo P-45O e por NADPH citocromo P-45O redutase. O pico da concentração plasmática do AMT em pacientes usando zidovudina é aproximadamente 10 a 15%. Este metabólito é de grande importância devido sua potencial citotoxicidade (DOMS, 2004).

Eagling e colaboradores (1994) realizaram estudos do metabolismo da zidovudina em microssomos de fígado humano “in vitro” buscando a caracterização das enzimas envolvidas nas etapas de sua redução a AMT, pela avaliação de inibidores de enzimas envolvidas nestas reações. A maior inibição foi observada com cetoconazol (50% de inibição da concentração produzida = 78,0 μM), que agiu como inibidor não seletivo de várias isoenzimas CYP, sugerindo que a redução da zidovudina seja provavelmente mediada tanto pelas enzimas do citocromo P-45O, quanto do NADPH citocromo P-45O redutase (VEAL e BACK, 1995).

Embora o AMT seja o metabólito de menor quantidade a ser formado, ele é de grande importância, pois estudos usando células progenitoras hematopoiéticas demonstraram que ele é cinco a sete vezes mais tóxico ao homem que a zidovudina. Além disso, observou-se em ratos um decréscimo do gene IL-562 para transcrição de células leucêmicas, com um correspondente decréscimo no sistema hemoglobínico (EAGLING et al., 1994).

A maioria dos pacientes recebendo zidovudina tem toxicidade

hematológica, que resulta em anemia e granulocitopenia sendo importante buscarmos a relação entre a formação do AMT e estes efeitos. Embora o citocromo P-45O esteja normalmente associado com reações de oxidação, tem sido relatado que ele também está envolvido com a redução de vários grupos, dentre eles o grupo azido (URLACHER e SCHMID, 2006).

Com o conhecimento adquirido nestes 20 anos de epidemia, consegue-se hoje transformar uma infecção potencialmente letal em uma doença crônica e controlável. Apesar do tratamento da SIDA por quimioterapia ter avançado muito nos últimos anos, a busca por fármacos mais potentes a diferentes tipos de HIV resistentes, com baixos efeitos colaterais e custos reduzidos, tem sido objeto de intensa pesquisa e continua a ser uma área muito promissora, buscando-se proporcionar uma vida mais digna e produtiva para as pessoas soro-positivas (SOUZA e ALMEIDA, 2003).

O conhecimento sobre a rota metabólica é útil não só no desenho de novos fármacos, mas no aperfeiçoamento daqueles já existentes (AZERAD, 1999). A utilização da bioconversão como modelo microbiano do metabolismo de mamíferos pode ser aplicada como uma ferramenta útil para se compreender mais sobre o metabolismo da zidovudina e obter derivados valiosos com farmacocinética melhorada, menor toxicidade, com novas ou diferentes atividades, dado o grande número de reações que os fungos podem realizar no substrato.

A eficácia da bioconversão da zidovudina por microrganismo foi anteriormente demonstrada por Kruszewaska e colaboradores. Este trabalho detectou a presença de pequena quantidade de um composto por CLAE após dois dias de reação microbiológica com *Stenotrophomonas maltophilia* e após dez dias de transformação somente 3% da zidovudina permanecia inalterada. O rendimento

da reação foi em torno de 97% e um novo produto foi purificado e analisado por métodos espectroscópicos; EI, EM, RMN ^{13}C e ^{1}H. Através destas técnicas, foi possível comprovar a biotransformação da zidovudina em um novo produto, ainda não relatado na literatura, o 3'-azido-3'-deoxi-β-ribosiltimina, um metabólito hidroxilado da zidovudina. A figura 17 mostra introdução de um grupo OH no átomo do carbono C2' no anel da ribose (KRUSZEWSKA et al., 2003).

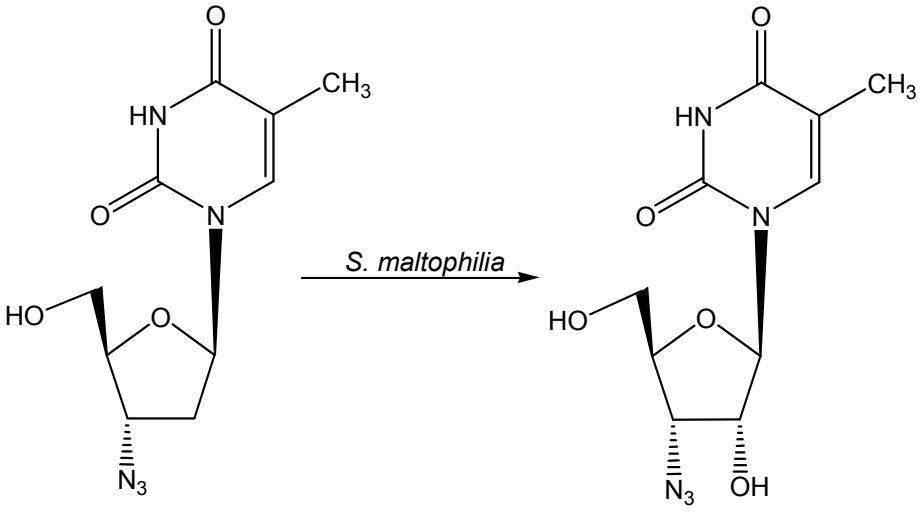


Figura 17: Estrutura química da zidovudina e seu metabólito hidroxilado produzido por bioconversão com *S. maltophilia*, adaptada de Kruszewska et al., 2003.

Estudos realizados no Laboratório de Bioconversão na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás indicaram que as distribuições dos metabólitos observadas na bioconversão da zidovudina para cada uma das cepas testadas na triagem foram diferentes, sendo possível selecionar a melhor cepa para produção dos derivados em grande quantidade. A análise do sobrenadante identificou que a melhor produção de metabólitos da zidovudina ocorreu com o fungo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e a presença de zidovudina residual com interrupção da incubação em um período de 96 horas após administração do substrato (RIOS et al., 2005).

Assim, observou-se a viabilidade de aplicar os processos de bioconversão com a finalidade de obter os principais metabólitos microbianos formados em maior escala para elucidação estrutural e futuros estudos farmacológicos e toxicológicos, que podem vir a caracterizá-los como novos candidatos a protótipos de fármacos.

2 OBJETIVOS

- Aplicação da bioconversão da zidovudina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

- Avaliação dos parâmetros reacionais empregados no processo de bioconversão da zidovudina por *C. echinulata* ATCC 9244 como: período de incubação, morfologia macroscópica, velocidade de agitação, temperatura, composição do meio de cultura e variação do pH.

- Identificação, purificação e caracterização dos derivados funcionalizados formados com a bioconversão da zidovudina

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho, para a bioconversão da zidovudina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, foram feitas seis incubações em escala semi-preparativa, sendo que em cada uma foi alterado pelo menos um dos parâmetros que podem interferir no processo de bioconversão (tabela 4). Os parâmetros avaliados, na tentativa de otimização, foram: período de incubação, temperatura, velocidade de agitação, quantidade de componentes do meio reacional e variação do pH. Após a identificação da melhor velocidade de agitação e temperatura de incubação na bioconversão da zidovudina, no intuito de avaliar a influência do meio reacional, foram testados, em escala semi-preparativa, o meio líquido PDSM com diferentes concentrações de fontes de carbono e nitrogênio. Foram observadas as alterações macroscópicas que ocorreram na morfologia do fungo após os ensaios e a interferência das condições reacionais no rendimento da reação.

Tabela 4: Relação dos parâmetros alterados durante as incubações realizadas na bioconversão da zidovudina por *C. echinulata* ATCC 9244.

PARÂMETROS	**1° Ensaio**	**2° Ensaio**	**3° Ensaio**	**4° Ensaio**	**5° Ensaio**	**6° Ensaio**
VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (rpm)	200	200	250	250	250	250
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)	27	29	27	29	29	29
MEIO REACIONAL	PDSM Padrão	PDSM Padrão	PDSM Padrão	PDSM Padrão	PDSM I	PDSM II

Legenda: Potato Dextrose Soy Medium

3.1 SUBSTRATO

O substrato utilizado neste estudo foi o anti-retroviral zidovudina (AZT), gentilmente fornecida pela Indústria Química de Goiás (IQUEGO), identificada com lote da IQEGO 26902/004, lote de fabricação 28047/04 e validade 12/2010. Sua característica morfológica é de um pó branco, amorfo, solúvel em etanol, com faixa de pH que varia de 3,5 a 5,5 e pKa igual a 9,8, sua fórmula molecular é $C_{10}H_{13}N_5O_4$ e seu peso molecular é de 267,24 (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1997; MESPLET et al., 2001).

3.2 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado na bioconversão da zidovudina foi a *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, procedente da coleção American Type Culture Collection, selecionado baseando-se em estudos realizados anteriormente por Rios e colaboradores (2005) no LaBioCon na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

3.3 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

3.3.1 Meios de Cultura

Para as incubações deste trabalho, foram utilizados os meios Ágar batata, PDSM Padrão (Potato Dextrose Soy Medium), PDSM I e PDSM II, cujos componentes estão relacionados na tabela 5.

Tabela 5: Relação das quantidades, marcas e lotes dos componentes utilizados na preparação dos meios de cultura Ágar Batata, PDSM Padrão, PDSM I com 25% a mais de Dextrose e PDSM II com 25% a mais de Lecitina de Soja.

COMPONENTES	QUANTIDADE	MARCA	LOTE
Meio Ágar Batata			
Potato Dextrose Agar	39,0 g	Merck	VM190530350
Água Destilada	qsp. 1000 mL		
Meio PDSM Padrão			
Peptona Bacteriológica	5,0 g	Synth	71943
Dextrose	20,0 g	CRQ	100001\05
Lecitina de Soja	5,0 g	Inlab	827700
Fosfato de Potássio Monobásico	5,0 g	Synth	71753
Cloreto de Sódio	5,0 g	Dinâmica	18042
Extrato de Levedura	3,0 g	Vetec	032958
Água Destilada	qsp. 1000 mL		
Meio PDSM I			
Peptona Bacteriológica	5,0 g	Synth	71943
Dextrose	25,0 g	CRQ	100001\05
Lecitina de Soja	5,0 g	Inlab	827700
Fosfato de Potássio Monobásico	5,0 g	Synth	71753
Cloreto de Sódio	5,0 g	Dinâmica	18042
Extrato de Levedura	3,0 g	Vetec	032958
Água Destilada	qsp. 1000 mL		
Meio PDSM II			
Peptona Bacteriológica	5,0 g	Synth	71943
Dextrose	20,0 g	CRQ	10000\05
Lecitina de Soja	6,25 g	Inlab	827700
Fosfato de Potássio Monobásico	5,0 g	Synth	71753
Cloreto de Sódio	5,0 g	Dinâmica	18042
Extrato de Levedura	3,0 g	Vetec	032958
Água Destilada	qsp. 1000 mL		

3.3.1.1 Meio Sólido Ágar Batata

Para preparar o meio de manutenção *da C. echinulata* ATCC 9244, foram dissolvidos 39 gramas do ágar batata em quantidade suficiente para 1000 mL de água destilada. O ágar foi mantido em contato com a água por cinco minutos e em seguida levado ao forno microondas para total solubilização. Foram distribuídos aproximadamente 2 mL do meio em tubos de vidro, com tampa de rosca e foram autoclavados por quinze minutos a 121°C e 1 atm para esterilização. Os tubos foram mantidos inclinados à temperatura ambiente, até a completa solidificação dos meios, e armazenados em geladeira a 4°C, para posterior repique e manutenção da cepa.

3.3.1.2 Meio Líquido PDSM Padrão

A lecitina de soja foi pesada e solubilizada previamente em um béquer com auxílio de agitador magnético. O restante dos componentes do meio foi pesado separadamente e solubilizado em pequena quantidade de água destilada em um outro béquer.

A solução de lecitina de soja foi adicionada aos outros componentes do meio e o volume de 1000 ml completado com água destilada. Após completa solubilização, foram distribuídos 100 mL do meio em dez Erlenmeyers de 250 mL de vidro e boca larga, que foram então autoclavados à 121^{o}C e 1 atm durante quinze minutos para esterilização do meio.

3.3.1.3 Meio Líquido PDSM I

Para o preparo do PDSM I foram seguidos os mesmos procedimentos de preparo do meio PDSM Padrão, alterando apenas a quantidade de dextrose utilizada, que teve um acréscimo de 25%, correspondendo ao peso de 25,0 g.

3.3.1.4 Meio Líquido PDSM II

Seguiu os procedimentos de preparo do meio PDSM Padrão, alterando apenas a quantidade de lecitina de soja utilizada, que teve um acréscimo de 25%, correspondendo a um peso de 6,25 g.

3.3.2 Solução de Glicerol a 25%

O veículo utilizado para o transporte dos esporos da *C. echinulata* ATCC 9244 foi solução de glicerol a 25%, preparada a partir de uma solução mãe a 87% (Merck, lote: Z759694414). Após a diluição, a solução de glicerol a 25% foi autoclavada a 120^{o}C e 1 atm durante quinze minutos e armazenada em geladeira a 4°C.

3.3.3 Manutenção e Repique do Microrganismo

Sub-culturas de *C. echinulata* ATCC 9244 foram continuamente repicadas para manutenção da cepa e composição da coleção do microrganismo do LaBioCon, que ficaram mantidas em geladeira a 4ºC. A cepa foi semeada em tubos de ensaio,

contendo ágar batata inclinado, com auxilio de glicerol a 25% Merck e incubada por sete dias a 25°C em câmara germinativa climatizada BOD (modelo Fanem 345 Micronal), para crescimento da cultura e formação dos esporos que serviram para o inóculo do PDSM. Ao final desse período, observou-se as características macroscópicas das colônias e os tubos empregados na inoculação foram vedados com Parafilme e armazenados no refrigerador.

3.3.4 Escala Laboratorial Semi-Preparativa: Semeadura do Microrganismo nos Meios PDSM Padrão, I, II e Adição do Substrato

Foram realizadas inicialmente quatro incubações com o meio PDSM Padrão no incubador rotativo Tecnal (modelo TE-420) com variações nos parâmetros, temperatura e velocidade de agitação. O primeiro ensaio foi realizado a 27°C e 200 rpm, o segundo a 29°C e 200 rpm, o terceiro a 27°C e 250 rpm e o quarto a 29°C e 250 rpm. Após análises que identificaram as melhores condições reacionais de temperatura e velocidade de agitação para a bioconverção da zidovudina pela *C. echinulata* ATCC 9244 realizou-se o quinto e o sexto ensaio variando o meio de cultura, utilizando para as incubações o meio PDSM I e o meio PDSM II, respectivamente.

Os seis experimentos seguiram os mesmos procedimentos de semeadura. Foram semeados dez Erlenmeyers com o meio de cultura reacional, sendo que em cada um dos experimentos um Erlenmeyer foi mantido como controle da reação, para avaliar possíveis interações entre o meio de incubação, o microrganismo que realizará a bioconversão e com substrato em estudo.

Foi acrescentado 1 mL da solução de glicerol a 25% autoclavada ao tubo de ensaio contendo a cepa repicada após sete dias de crescimento á 27ºC na BOD. O glicerol foi homogeneizado superficialmente às colônias e 0,5 mL da suspensão de espóros resultante foi utilizada para inocular cada um dos nove Erlenmeyers de vidro de 250 mL e boca larga, contendo 100 mL de meio líquido PDSM. Um Erlenmeyer foi mantido apenas com o meio PDSM e zidovudina, uma alíquota deste foi retirada e congelada para controle, como branco do meio de cultura.

Seguiu-se a incubação dos Erlenmeyers no incubador rotativo Tecnal (modelo TE-420) por 65 horas. Decorrido este período, foram pesados 500 mg de zidovudina em balança analítica que foram, solubilizados em 10 mL de etanol e 1 mL da solução AZT/Etanol (50 mg/mL) foi transferido a cada um dos dez Erlenmeyers, sendo que um ficou apenas com o meio e o substrato. Cada Erlenmeyer ficou com uma concentração final de 0,5 mg AZT/mL de meio. Antes da adição do substrato foi retirada uma alíquota do meio de cultura com a cepa para análise de possíveis interações do microganismo com o meio reacional.

Durante as incubações, foram retiradas alíquotas, de forma asséptica, a cada 24 horas após a adição do substrato. As amostras de 24, 48, 72, 96, 120 horas do sobrenadante do meio reacional foram utilizadas para monitorar a reação de bioconversão por cromatografia em camada delgada (CCD).

As alíquotas, coletadas com o auxílio de pipeta Pasteur, foram transferidas para “eppendorfs” devidamente identificados, e centrifugadas em microcentrífuga Fanem (modelo 243), e os sobrenadantes de incubação foram supersaturados com cloreto de sódio (Dinâmica, lote: 18042) e extraídos com acetato de etila (v/v agitados em vórtex). A fração do acetato de etila foi aplicada nas placas para análise em CCD.

O pH do meio reacional foi acompanhado durante todo o processo reacional com fita reativa MERCK.

3.4 FILTRAÇÃO E EXTRAÇÃO

As incubações foram interrompidas para a extração dos possíveis metabólitos, após cinco dias de incubação com o substrato. A biomassa contida nos Erlenmeyers foi separada por filtração com gase em funil de Büchner e Kitasato sob vácuo. Os micélios retidos na gaze foram extraídos com acetona, sob agitação constante no agitador magnético, por cerca de três horas, sendo a massa fúngica separada do extrato por filtração comum com papel de filtro. O material biológico resultante foi autoclavado e posteriormente descartado. A solução resultante foi rotaevaporada sob vácuo, mas uma quantidade de água residual permaneceu nesta fração. Essa solução foi então transferida para um béquer, ao qual foi adicionado sulfato seco de magnésio (Vetec, lote: 011288) para que o excesso de água fosse absorvido. Após, realizou-se um filtração em funil de vidro sinterizado número quatro e o extrato foi novamente rotaevaporado sob vácuo, resultando em um material seco denominado fração cetônica. A metodologia utilizada está representada na figura 18.

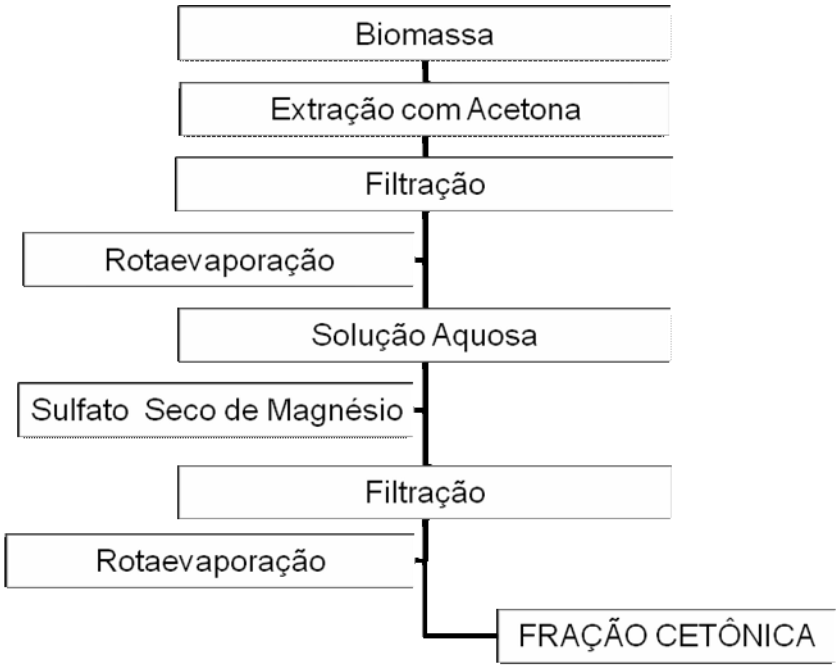


Figura 18: Etapas de obtenção da fração cetônica após incubação da zidovudina com *C. echinulata* ATCC 9244.

O filtrado obtido no Kitasato foi supersaturado com cloreto de sódio (Dinâmica, lote: 18042) para diminuir a solubilidade dos metabólitos na fração aquosa e evitar a formação de emulsões. A fase líquida supersaturada foi filtrada sob vácuo por uma camada de celite (Synth, lote: 69004). Após essa filtração, a solução denominada fração aquosa antes da extração foi transferida para um funil de adição de bola e extraída com três partes (300 mL) de acetato de etila sob agitação mecânica manual, obtendo-se duas frações: uma fração aquosa após extração e uma fração acetato de etila (AcOEt). A fração aquosa após extração foi mantida em refrigerador e posteriormente descartada após verificação por CCD da ausência de metabólitos nesta. Na fração AcOEt foi adicionado sulfato de magnésio anidro (Vetec lote 011288) para retirar o restante de água que possa ter permanecido e esta sendo então filtrada em funil de vidro sinterizado número quatro e o solvente evaporado sob

vácuo, resultando em um material seco denominado fração AcOEt metodologia utilizada esta representada na figura 19.

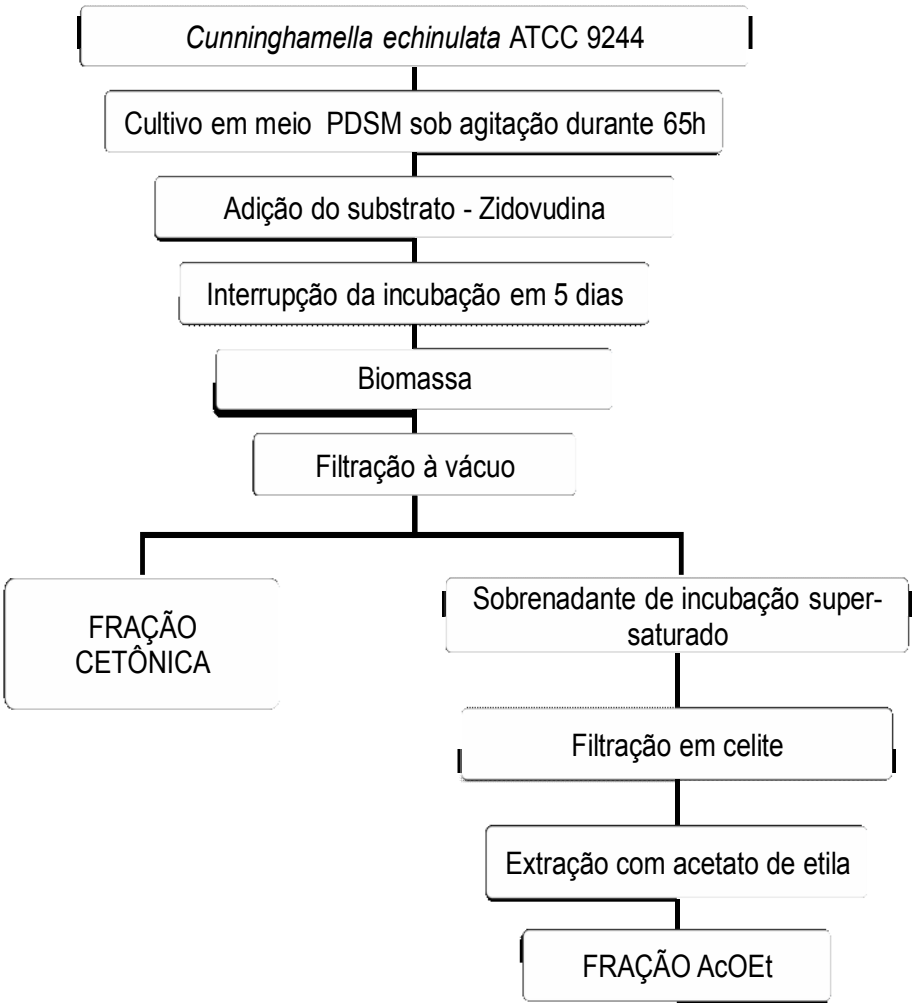


Figura 19: Fluxograma da metodologia utilizada na obtenção das frações AcOEt e cetônicas.

Todas as seis incubações realizadas com variações nos parâmetros velocidade de agitação, temperatura e meio de cultura seguiram o mesmo procedimento para produção das frações AcOEt e cetônicas, e as frações obtidas em cada ensaio foram identificadas pelo numeral romano correspondente I, II, III, IV, V e VI.

3.5 IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLICOS

Os metabólitos formados a partir da bioconversão da zidovudina por *C. echinulata* ATCC 9244 foram identificados por cromatografia em camada delgada (CCD) e purificados por cromatografia em coluna de vidro e recristalização. Para a realização das técnicas cromatográficas e recristalização, foram utilizados os solventes relacionados na tabela 6.

Tabela 6: Relação dos solventes, com suas respectivas marcas e lotes, utilizados nas técnicas de cromatografia e recristalização.

SOLVENTES	**MARCA**	**LOTE**
Acetato de Etila	Vetec	0480059
Acetonitrila	Vetec	0654387
Acetona	Synth	6827065
Diclorometano	Vetec	126559
Etanol grau HPLC	CRQ	493.04/2
Hexano	Synth	9874626
Metanol grau HPLC	Omnisol	43036307

3.5.1 Técnicas Cromatográficas

3.5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD foi uma técnica empregada no monitoramento de reações de bioconversão e para a avaliação qualitativa dos prováveis metabólitos formados.

Na CCD, foram utilizadas como fase estacionária cromatoplacas de alumínio 20x20cm preenchidas com sílica gel 60 F_{254}, espessura da camada de sílica de 0,25cm (placa analítica) ALUGRAM SIL G/UV (Macherey-Nagel, Germany) e as fases móveis testadas foram: AcOEt, acetato de etila/metanol (AcOEt/MeOH) 70:30, AcOEt/MeOH 90:10 e AcOEt/MeOH 95:05. As placas cromatográficas foram visualizadas em câmara de luz ultra violeta (UV) a 254 nm e 365 nm e reveladas por vapor de iodo. Diferentes valores de Rfs foram determinados.

3.5.1.2 Cromatografia de Adsorção em Coluna de Vidro sob Vácuo

A cromatografia de adsorção em coluna de vidro sob vácuo foi uma metodologia empregada na tentativa de separar os produtos presentes apenas nos extratos brutos das frações AcOEt I, II, III e IV, formados com a bioconversão da zidovudina pela *C. echinullata* ATCC 9244, representada na figura 20.

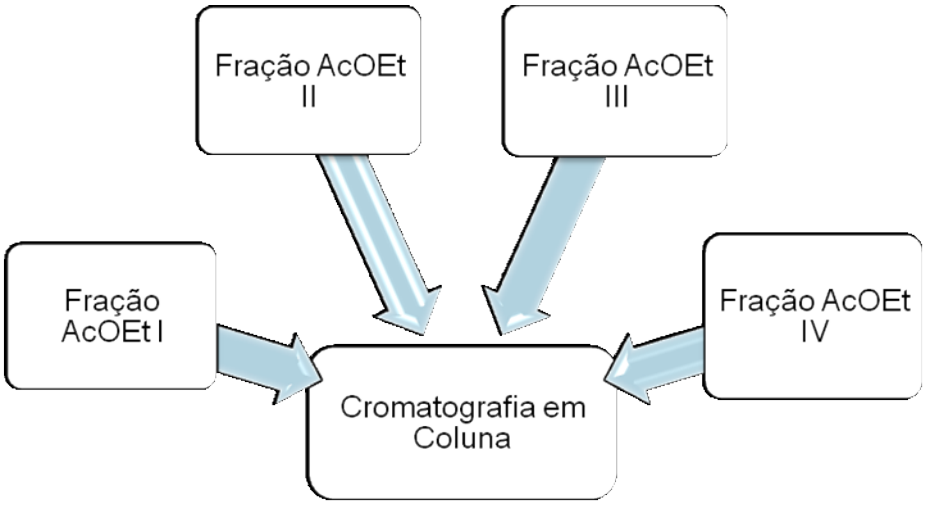


Figura 20: Frações AcOEt utilizadas na cromatogafia de adsorção em coluna de vidro sob vácuo para purificação dos extratos obtidos na bioconversão da zidovudina pela *C. echinullata* ATCC 9244.

Foi utilizada uma coluna de vidro com 26,5x2,0 cm de diâmetro, torneira de teflon e boca esmerilhada. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 Vetec, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh) e a fase móvel AcOEt/MeOH 95:05 a 25°C (temperatura ambiente). A coluna cromatográfica foi colocada em um suporte de metal, para iniciar a sua preparação e ao fundo da coluna foi adicionado lã de vidro e areia lavada e calcinada em quantidade suficiente para cobrir toda a lã de vidro. Em um béquer, misturou-se a sílica gel para cromatografia em coluna na fase móvel (AcOEt/MeOH 95:05) e toda a fase estacionária foi transferida com auxílio de um funil para a coluna de vidro. Posteriormente, fez-se a compactação dessa sílica com vácuo até a formação de uma coluna uniforme com cerca de 20 cm e a fase móvel ficou acima dela em torno de 2 cm. Os extratos brutos foram solubilizados em pequena quantidade de fase móvel AcOEt/MeOH (95:05) e adicionados à coluna com auxílio da sílica que incorporou as amostras. Após aplicação do extrato, foi adicionado mais

um pouco de areia lavada e calcinada selando a coluna. Foi acoplada uma ampola de vidro a coluna com a fase móvel para que esta escoasse pela coluna de forma lenta e contínua. Foram coletados 2 mL da solução que eluiu da coluna totalizando cinqüenta frações.

O monitoramento da coluna foi feito por CCD, utilizando como fase estacionária placa de alumínio analítica de sílica gel 60 F_{254} espessura 0,25 cm, 20X20 cm, da ALUGRAM SIL G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:05, visualizadas em UV 254 e 365 nm e revelados vapor de iodo. Pela similaridade dos derivados apresentados na CCD, os tubos que continham os mesmos fatores de retenção (Rfs) foram agrupados, resultando em oito balões com diferentes manchas que foram evaporados sob vácuo.

3.5.2 Recristalização

A recristalização foi empregada no intuito de separar e purificar os derivados, como uma metodologia adicional a cromatografia em coluna de vidro sob vácuo. Foram utilizados solventes de diferentes polaridades para a separação dos produtos, e todo procedimento foi acompanhado por CCD.

A separação obtida na cromatografia em coluna de vidro realizada forneceu um baixo rendimento o que inviabilizou as futuras análises de identificação das moléculas, por isso foi necessário agrupar as oito frações resultantes da cromatografia em coluna de vidro sob vácuo, frações AcOEt V e VI e frações cetônicas I, II, III, IV, V e VI, reunindo assim os extratos dos seis experimentos, formando um concentrado em um mesmo balão, denominado extrato bruto I, que foi realizadoa recristalização (figura 121).

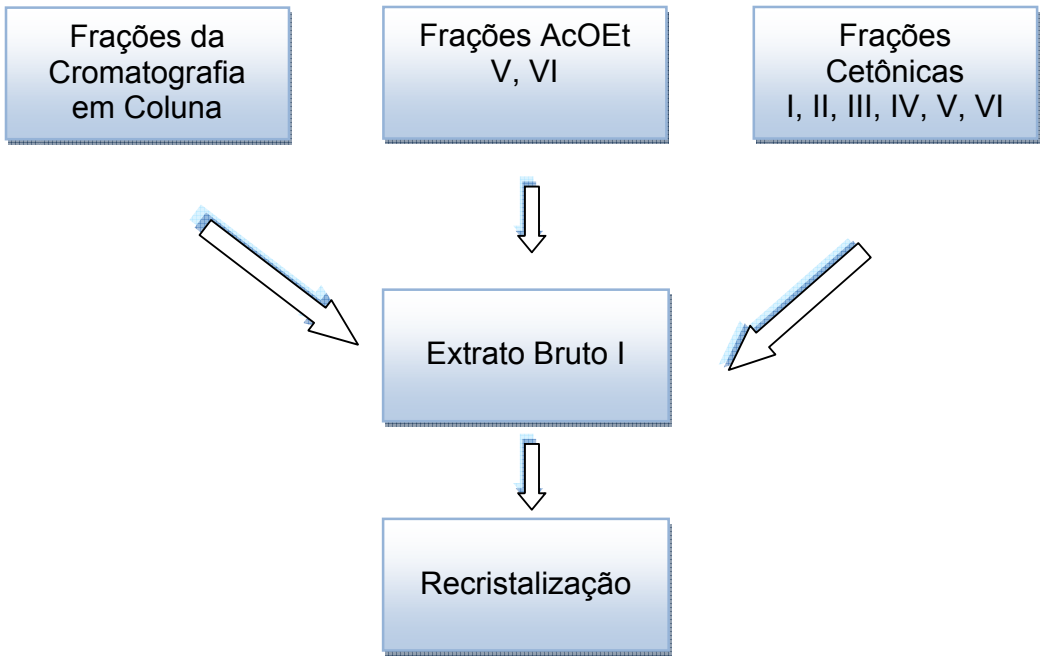


Figura 21: Formação do extrato bruto I que foi utilizado para recristalização e obtenção dos produtos purificados formados a partir da bioconversão do zidovudina pela *C. echinullata* ATCC 9244.

A partir da obtenção desse extrato bruto, procedeu-se a recristalização por diferença de solubilidade seguindo a ordem crescente de polaridade da série eluotrópica dos solventes. A escolha dos solventes utilizados baseou-se nos requisitos de que estes não deveriam reagir com a amostra, deveriam ser de fácil manipulação, levando-se em consideração também a volatilidade, a inflamabilidade e a quantidade de substância que seria capaz de dissolver os produtos em temperatura ambiente e com temperatura elevada. A cada solvente empregado os precipitados foram recuperados por decantação e separados dos sobrenadantes em balões de vidros de fundo redondo distintos.

O primeiro procedimento iniciou-se com a solubilização do extrato bruto I em hexano a temperatura ambiente, para eliminar qualquer impureza apolar da amostra. A seguir adicionou-se diclorometano, permanecendo um precipitado

insolúvel no fundo do balão, ao qual foi adicionado AcOEt. O precipitado foi separado e solubilizado em metanol, o que provocou a formação de cristais brancos insolúveis que foram separadas em frasco âmbar de vidro e denominados de LaBioCon 64, e o sobrenadante foi chamado de extrato bruto II, (figura 22).

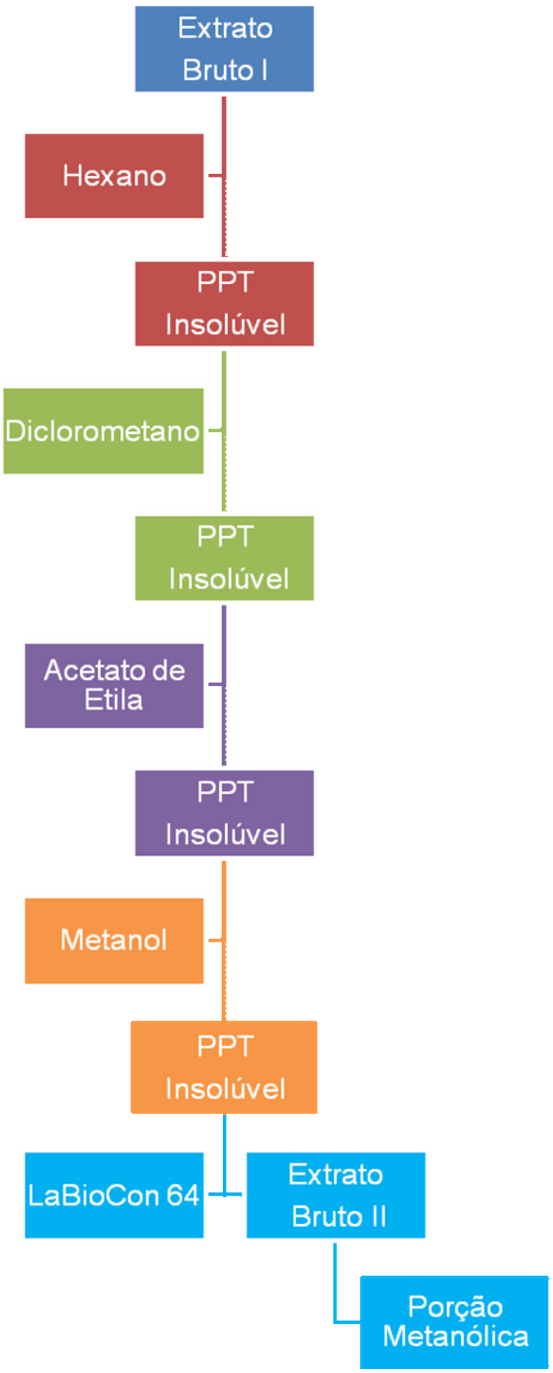


Figura 22: Fluxograma das etapas envolvidas na formação do LaBioCon 64.

O extrato bruto II foi seco à temperatura ambiente, foi adicionado diclorometano sob aquecimento, observou-se a permanência de um precipitado insolúvel no fundo do balão e um sobrenadante escuro que foi separado em um outro balão de vidro. A este, foi adicionado acetona lentamente, que provocou uma turvação na solução, ficando levemente amarelado. Esta solução foi resfriada provocando a recristalização de uma substância levemente amarelada que foi separada em frasco âmbar de vidro denominada de LaBioCon 65 e um sobrenadante denominado de extrato bruto III. As seqüências desta etapa estão esquematizadas na figura 23.

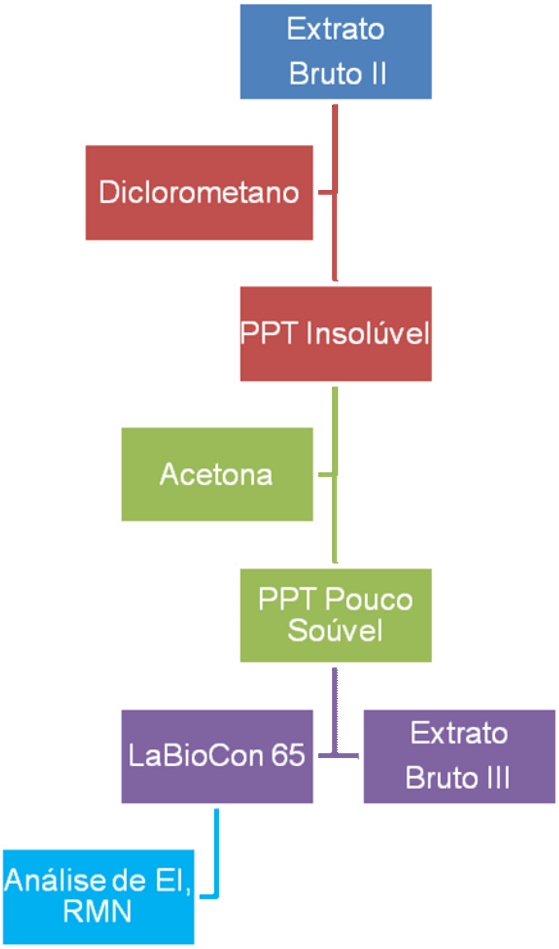


Figura 23: Fluxograma das etapas da recristalização do LaBioCon 65.

Ao extrato bruto III, seco à temperatura ambiente, foi adicionado acetonitrila lentamente homogeneizando sob agitação manual, o que resultou em um precipitado insolúvel ao fundo do balão e um sobrenadante escuro. Após a decantação solubilizou-se o precipitado com AcOEt, formando novamente um precipitado. O sobrenadante foi separado, rotaevaporado e denominado de extrato bruto IV, e este precipitado foi seco no dessecador de vidro com auxílio de sílica azul formando um pó acastanhado denominado LaBioCon 66 que foi separado em frasco âmbar de vidro (figura 24). Foi realizada análise de CCD e uma parte enviada para análise de Espectrometria de Infravermelho (EI) e Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e de hidrogênio (RMN ^{1}H).

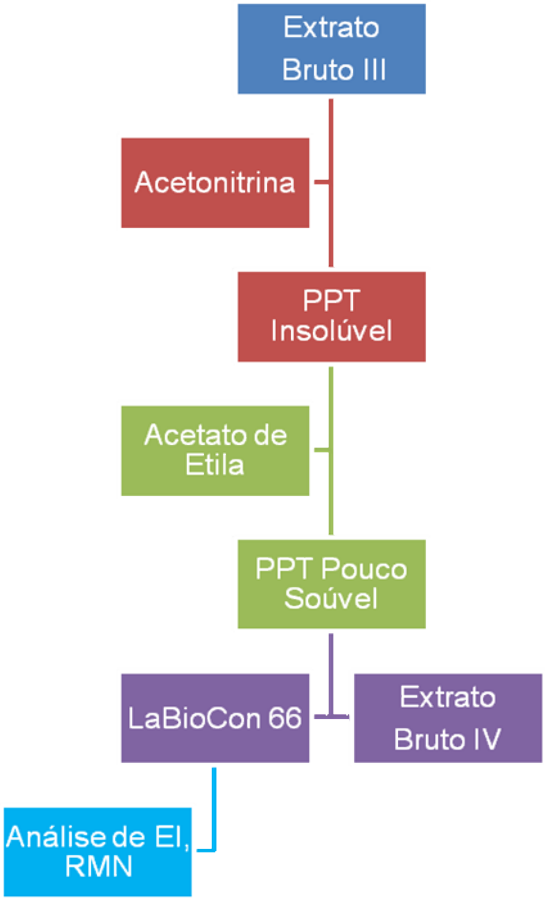


Figura 24: Fluxograma das etapas da recristalização do LaBioCon 66.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS

3.6.1 Técnicas Espectroscópicas

Uma vez purificados por recristalização, os produtos obtidos foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho (IV) e/ou Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e hidrogênio (RMN ^{1}H).

3.6.1.1 Infravermelho

Para as análises de EI as pastilhas foram preparadas com KBr (Vetec, Lote: 0054728) previamente dessecado em estufa à 120°C. Posteriormente, foram colocados 100 mg no pastilhador seguido de compressão em prensa hidráulica Perkin Elmer (modelo 4037) com pressão de 10ª toneladas por 2 minutos, para obtenção das pastilhas finas e transparentes. As análises foram realizadas em aparelho de Infravermelho BX/RX Perkin Elmer (modelo 60508). O equipamento foi mantido em sala com temperatura e umidade controladas. A faixa espectral utilizada compreendia números de onda entre 4000 e 4400 cm^{-1}, sendo utilizada resolução de 4 cm^{-1}.

3.6.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN de ^{13}C e ^{1}H foram realizadas a temperatura ambiente, no espectrômetro Mercury 300BB da VARIAN (7,05 T), utilizando sonda de 5 mm e pulsos de 45,0. Foi operado nas freqüências 75 MHz para carbono e 300 MHz para

hidrogênio. A zidovudina, LaBioCon 65 e LaBioCon 66 foram analisados usando o DMSO como solvente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM AS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO DA ZIDODUDINA POR *C. echinulata* ATCC 9244

As reações de bioconversão são enzimaticamente catalisadas, e sendo assim, sua velocidade e performance são influenciada por diversos fatores, como a temperatura, concentração do substrato e pH. A utilização de microrganismos como modelo enzimático requer ainda a avaliação de outros parâmetros, relacionados à viabilidade das células, como a concentração de nutrientes e oxigênio. O monitoramento destes parâmetros e a avaliação da influência destes no rendimento das reações tem se tornado essencial. Neste trabalho, a bioconversão da zidvudina por *C. echinnulata* ATCC 9244 foi realizada em escala laboratorial semi-preparativa com diferentes condições reacionais na tentativa de otimizar a reação e possibilitar a transposição dos experimentos desenvolvidos para escala preparativa (biorreator).

4.1.1 Período de Incubação

Estudos anteriores realizados no LaBioCon por Rios (2005), indicaram que a 96 horas de incubação de *C. echinulata* com zidovudina a 27ºC e 200 rpm ainda restava substrato não metabolizado (RIOS, 2005). Assim, neste experimento o tempo de incubação foi aumentado para 120 horas, ou seja, cinco dias. Neste período de reação, pequena quantidade do substrato foi detectada nas alíquotas do meio reacional. Em outros trabalhos de bioconversão, as reações ocorriam de cinco a dez dias (ABEL et al., 2003; MANOSROI, 2005).

4.1.2 Morfologia do Microrganismo

O inóculo utilizado nos ensaios realizados foram esporos de *C. echinulata* ATCC 9244 foram obtidos com o repique e crescimento deste fungo em meio sólido ágar batata. O aspecto morfológico macroscópico foi observado e está descrito na tabela 7.

Tabela 7: Descrição macroscópica das características de *C. echinulata* ATCC 9244 em ágar batata inclinado, após sete dias de crescimento em câmara germinativa BOD.

MICRORGANISMO	MORFOLOGIA	DESCRIÇÃO MACROSCOPICA
C. echinnulatta ATCC 9244		Hífas bastante ramificadas, formando colônias cotonosas, de coloração acinzentada, com grande produção de esporos.

Os fungos filamentosos apresentam diferentes estruturas durante seu ciclo de vida. Uma consiste em um filamento tubular conhecido como hífa a qual origina da germinação de um esporo. A hifa continua a crescer e forma uma massa de filamentos conhecida como micélio. Quando se desenvolvem em cultura submersa, os fungos exibem várias formas morfológicas diferentes, variando de filamentos miceliais dispersos a massa micelial densa conhecida como “pellets”. Essas morfologias não são determinadas apenas pelo material genético da espécie fúngica, mas também pela natureza do inóculo bem como pelas condições químicas (constituintes do meio,

concentração dos componentes) e físicas (temperatura, pH, agitação) (PAPAGIANNI, 2004).

A mudança na morfologia durante o crescimento afeta o consumo de nutrientes, a taxa de oxigênio na cultura submersa e pode ter um efeito nas propriedades físicas dos meios de incubação. Filamentos dispersos (massa amorfa) geralmente são altamente viscosos e apresentam um comportamento não Newtoniano (proporção entre a lise por estresse e a taxa de lise não é constante). Este comportamento é causado pelas interações entre os filamentos, como ligações de hidrogênio e entrelaçamento aumentando a estrutura do micélio e conseqüentemente a viscosidade do meio. “Pellets” em suspensão são menos viscosos que filamentos dispersos pelo fato de comportarem-se como esferas discretas e conseqüentemente exercerem menor influência nas propriedades de fluxo (GIBBS et al., 2000; PAPAGIANNI, 2004).

No presente trabalho, as culturas submersas obtidas nos seis ensaios com variação na temperatura de incubação, velocidade de agitação e meio de cultura líquido estão descritas na tabela 8.

Tabela 8: Aspecto morfológico da *C. echinulata* ATCC 9244, após 65 horas de incubação orbital nos ensaios realizados e sua descrição macroscópica.

CONDIÇÕES REACIONAIS	ASPECTO MORFOLOGICOS	DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA
27°C 200 rpm PDSM Padrão		Filamentos miceliais dispersos em uma massa amorfa, viscosa, com formação de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer, turvação do meio não alterando a coloração amarelada.
29°C 200 rpm PDSM Padrão		Filamentos miceliais dispersos em uma massa amorfa, viscosa, com formação de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer, turvação do meio não alterando a coloração amarelada
27°C 250 rpm PDSM Padrão		Filamentos miceliais dispersos em uma massa amorfa, viscosa, com formação de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer, turvação do meio não alterando a coloração amarelada.
29°C 250 rpm PDSM Padrão		Massa micelial densa, com formação de “pellets”, em forma de pequenas esferas, com formação de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer, turvação do meio não alterando a coloração amarelada.
29°C 250 rpm PDSM (I)		Massa micelial densa, formação de “pellets”, em forma de pequenas esferas, com formação de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer, turvação do meio com ligeira alteração da coloração para avermelhado.
29°C 250rpm PDSM (II)		Massa micelial densa, “pellets” em forma de esferas de tamanho pequeno, com formação de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer, turvação do meio com ligeira alteração da coloração para avermelhado.

Foi observado que a 29ºC e 250 rpm ocorreu uma mudança na morfologia, passando de massa amorfa para pequenos “pellets” com formação de halo na parede dos Erlenmeyers. É importante observar que este ensaio foi o que apresentou maior rendimento, com relação a diferentes temperaturas e velocidade de agitação, podendo esta morfologia estar relacionada a maior eficácia bioconversora.

Informações sobre a morfologia dos “pellets” produzidos é importante para se ter uma estimativa dos rendimentos. Maiores rendimentos são esperados com a formação de “pellets” pequenos, já que oferecem uma menor barreira para difusão de O_2 e outros nutrientes em relação a “pellets” compactos (GIBBS *et al*., 2000).

Sabendo que a morfologia dominante do microrganismo, a formação de “pellets” ou massa amorfa, em meio líquido pode interferir no desempenho dos processos biotecnológicos, o crescimento geral foi avaliado nos diferentes ensaios realizados (tabela 8).

4.1.3 Temperatura de Incubação

Variações na temperatura de incubação podem provocar mudanças simultâneas em variáveis como taxa de crescimento, pH, nutrientes e oxigênio dissolvidos. Um aumento na temperatura de incubação dentro da faixa fisiológica aumenta a taxa de crescimento, diferentemente da tensão do oxigênio dissolvido que varia de maneira inversa ao aumento da temperatura (PAPAGIANNI, 2004).

No primeiro ensaio, a bioconversão foi realizada a 27°C e 200 rpm, tendo obtido um extrato bruto (fração acetato de etila + fração acetona) de 722 mg, somando a fração orgânica e cetônica. Para avaliar a interferência da temperatura no

processo de bioconversão, o segundo ensaio foi realizado na mesma velocidade de agitação, porém com aumento de 2°C na temperatura, ou seja, a 29°C e 200 rpm, sendo obtido o peso das frações AcOEt e cetônica equivalente a 881 mg, indicando que o aumento da temperatura levou a um ganho de 159 mg do extrato bruto, o que representa um aumento de 22,02% no rendimento (figura 25).

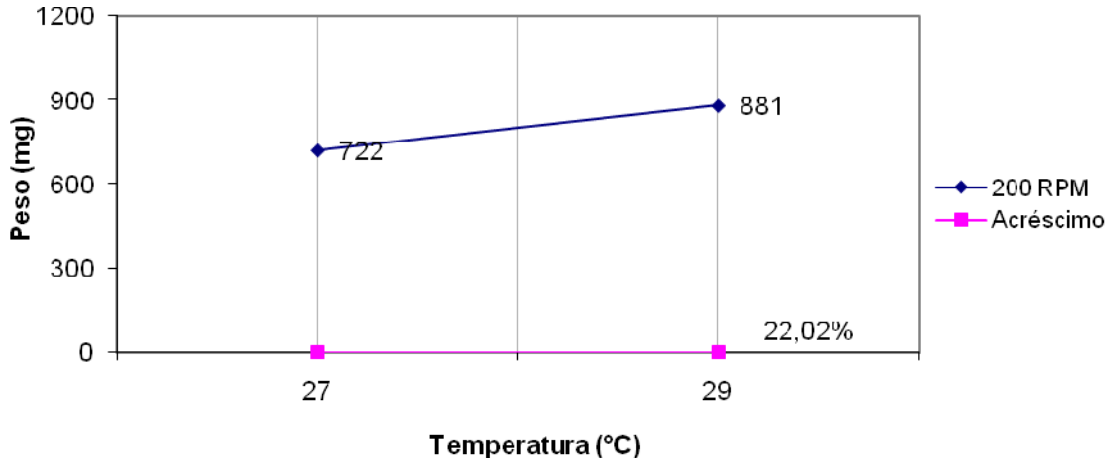


Figura 25: Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto com o aumento da temperatura de 27°C para 29°C mantendo a velocidade de agitação constante a 200 rpm.

O terceiro ensaio foi realizado aumentando a velocidade de agitação para 250 rpm e com temperatura de 27°C, e foi observado que a quantidade obtida do extrato bruto foi 1120 mg. O quarto ensaio foi realizado com velocidade de agitação de 250 rpm e aumento da temperatura para 29°C, e foi obtido 1810 mg de extrato bruto, indicando um ganho de 690mg no aproveitamento dos extratos AcOEt e cetônicos, representando um acréscimo de 61,61% no rendimento, em relação ao 3° experimento (figura 26).

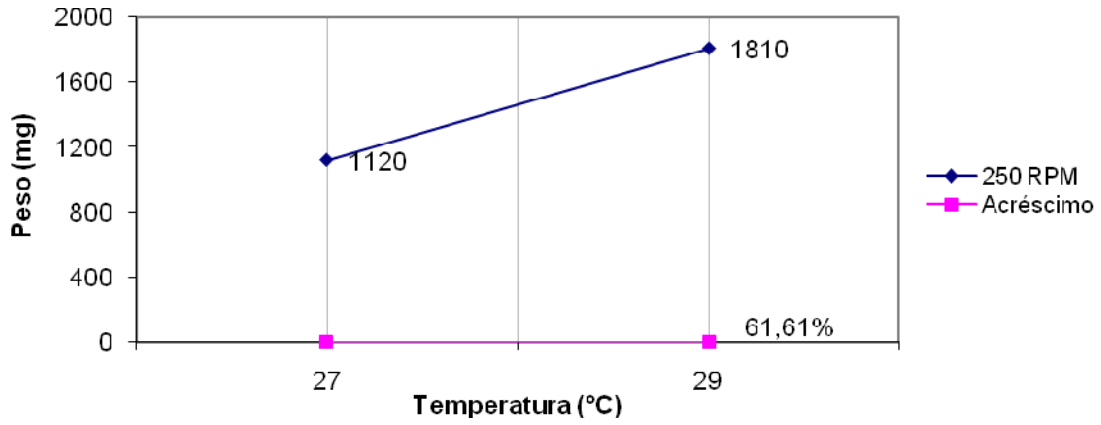


Figura 26: Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto aumentando a temperatura de 27°C para 29°C mantendo a velocidade de agitação constante a 250 rpm.

Assim como mencionado por Vecht e Lifshitz (1991) e Schügerl e colaboradores (1998), neste estudo, também foi verificado que o aumento na temperatura promoveu maiores rendimentos. Temperaturas maiores não foram ensaiadas, uma vez que já está bem estabelecido que fungos filamentosos não se desenvolvem bem acima de 31ºC.

4.1.4 Velocidade de Agitação

Feita uma avaliação da influência da velocidade de agitação no rendimento obtido, observa-se que a temperatura constante de 27°C e aumento da velocidade de agitação de 200 para 250 rpm ocorrendo o aumento no rendimento de 722 mg para 1120 mg respectivamente, representando um acréscimo de 55,12% no peso dos extratos (figura 27).

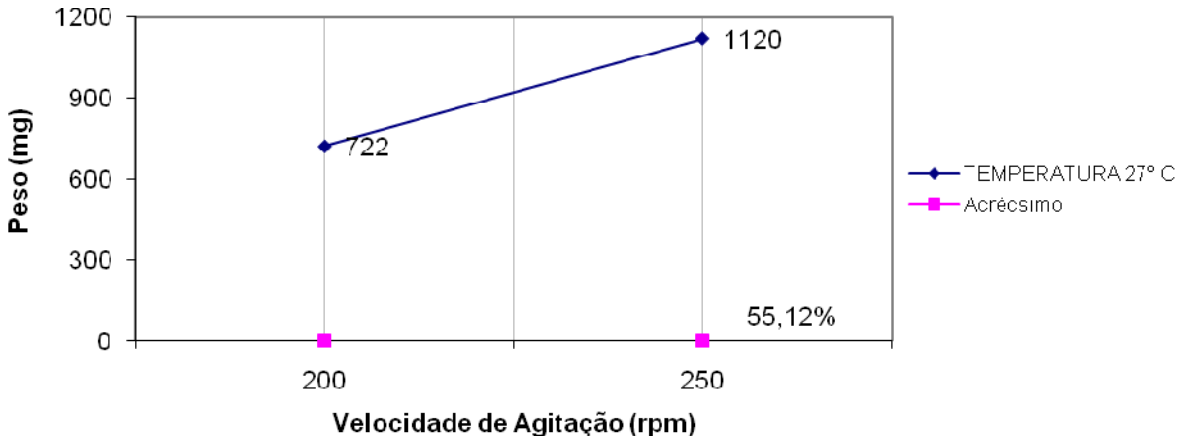


Figura 27: Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto aumentando a velocidade de agitação de 200 para 250 rpm, mantendo a temperatura constante 27ºC.

Tal fato também foi observado quando a temperatura é mantida a 29°C e a velocidade de agitação é aumentada de 200 para 250 rpm. Nestas condições, foram obtidos pesos de 881 mg e 1810 mg respectivamente, demonstrando que o aumento da velocidade de agitação nestas condições leva a um aumento no rendimento de 105,45% (figura 28).

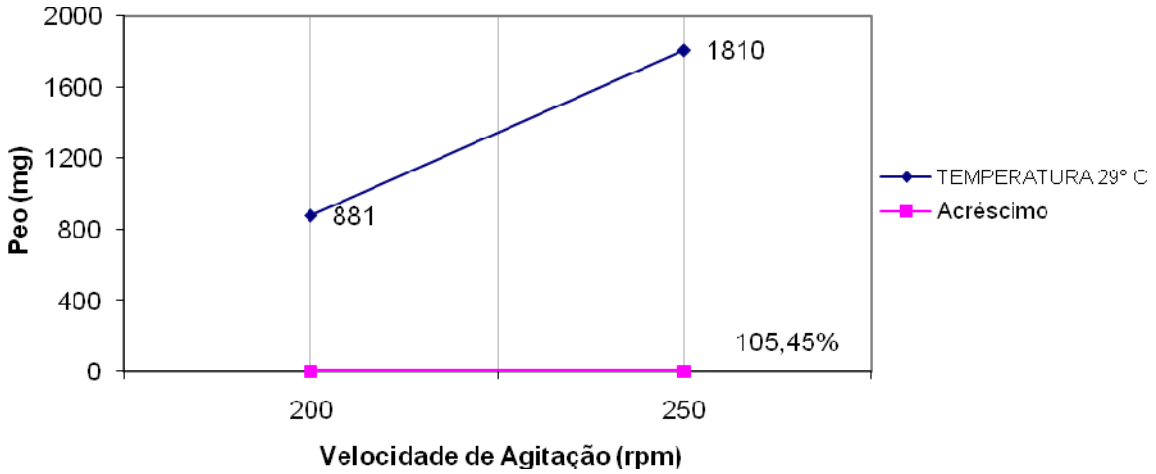


Figura 28: Gráfico comparando o ganho no peso do extrato bruto aumentando a velocidade de agitação de 200 para 250 rpm, mantendo a temperatura constante 29ºC.

Uma otimização simples é eficiente quando mais de dois fatores são simultaneamente mudados durante o experimento, com objetivo de encontrar o nível da variável requerida para aumentar a eficiência da enantioseletividade oxidativa de misturas racêmicas (MOLINARI et al., 1999). Comparando a velocidade de agitação com a temperatura de incubação, foi observado que foi obtido maior rendimento na bioconversão da zidovudina pela *C. echinulata* ATCC 9244 a 29°C 250 rpm (figura 29).

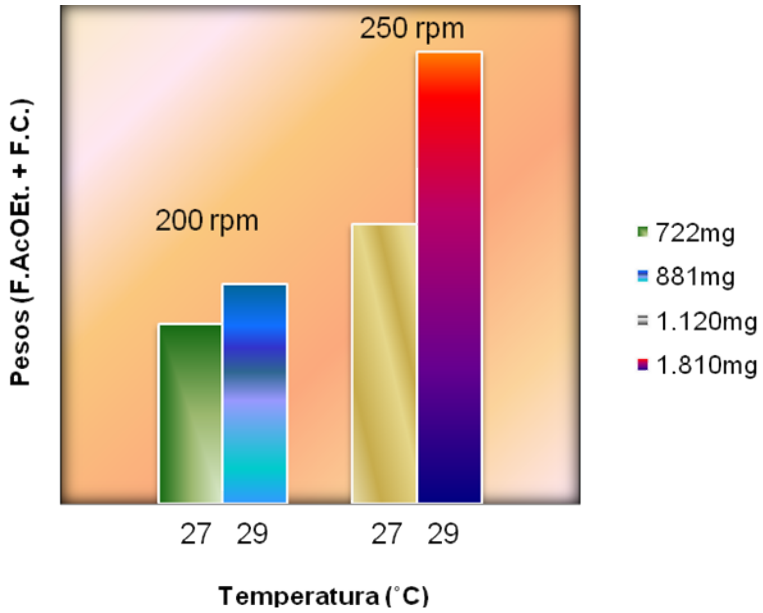


Figura 29: Gráfico comparando os pesos dos extratos obtidos nas incubações realizados com o meio de cultura PDSM Padrão nas condições reacionais 27°C, 200 rpm e 29°C, 250 rpm.

4.1.5 Composição dos Meios de Cultura

O meio de cultura PDSM Padrão foi selecionado por mostrar-se o meio mais adequado aos processos de bioconversão para a cepa selecionada conforme demonstrado em estudos anteriores no Laboratório de Bioconversão da Faculdade de

Farmácia da Universidade Federal de Goiás (COSTA, 2004; CIRILO, 2006; PAZINI, 2006) e pela capacidade de proporcionar um melhor crescimento e adaptação da cepa durante a incubação, além do menor custo, maior facilidade de preparo e conservação, facilidade de extração dos produtos formados, melhor expressão das enzimas bioconversoras, menor probabilidade de contaminação por culturas secundárias. A cinética de formação dos derivados é realizada em períodos de tempo compatíveis com a rotina laboratorial, com a possibilidade de transposição para escala industrial; ausência de lise e conseqüentemente de morte celular e conservação das características do substrato, não causando degradação.

No quinto ensaio, à incubação foi realizada a 29°C, 250 rpm e PDSM I enriquecido com 25% de dextrose. O peso do extrato bruto foi de 1948 mg, sendo observado um acréscimo no rendimento em relação à incubação realizada 29°C, 250 rpm e PDSM Padrão (figura 30). Este aumento pode ser devido a maior biomassa formada, provavelmente por ter um maior suprimento de fonte de energia (dextrose), o que possibilita maior número e viabilidade das células. Por serem organismos heterotróficos, os fungos filamentosos utilizam compostos orgânicos como fontes de carbono e de energia, sendo que os mais empregados são os açúcares, seguidos de proteínas. Tal fato pode ser evidenciado no maior peso obtido na fração cetônica deste ensaio (1244 mg), como ilustrado na figura 31.

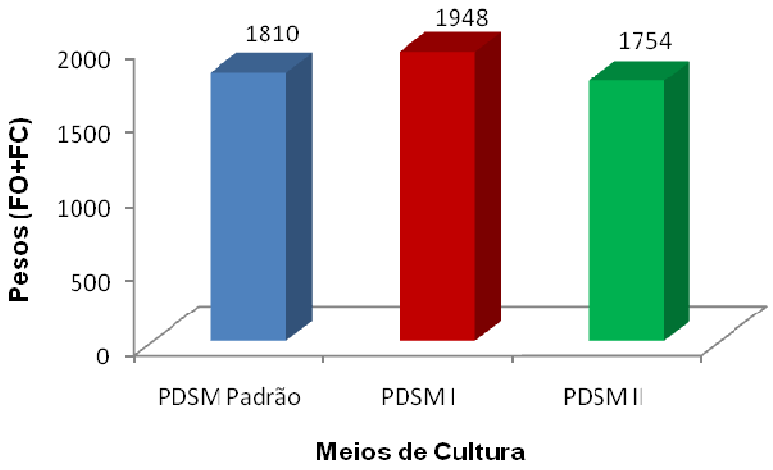


Figura 30: Gráfico comparando os pesos dos extratos brutos das incubações realizadas com temperatura de 29°C velocidade de agitação 250 rpm nos meios PDSM Padrão e PDSM enriquecidos.

No sexto ensaio, a bioconversão da zidovudina pela *C. echinulata* ATCC 9244 foi realizado a 29°C, 250 rpm e PDSM II enriquecido com 25% de lecitina de soja. O rendimento do extrato bruto foi de 1754 mg, evidenciando um rendimento pouco menor em relação à incubação realizada 29°C, 250 rpm e PDSM Padrão como pode ser visualizado na figura 30. A lecitina de soja pode eventualmente induzir algumas enzimas com atividade monoxigenase (AZERAD, 1999). Foi observado, neste experimento, que a diferença dos rendimentos das frações obtidas na incubação com PDSM Padrão e PDSM II não foi relevante, sendo o peso da fração AcOEt do último pouco maior que o do primeiro (figura 31).

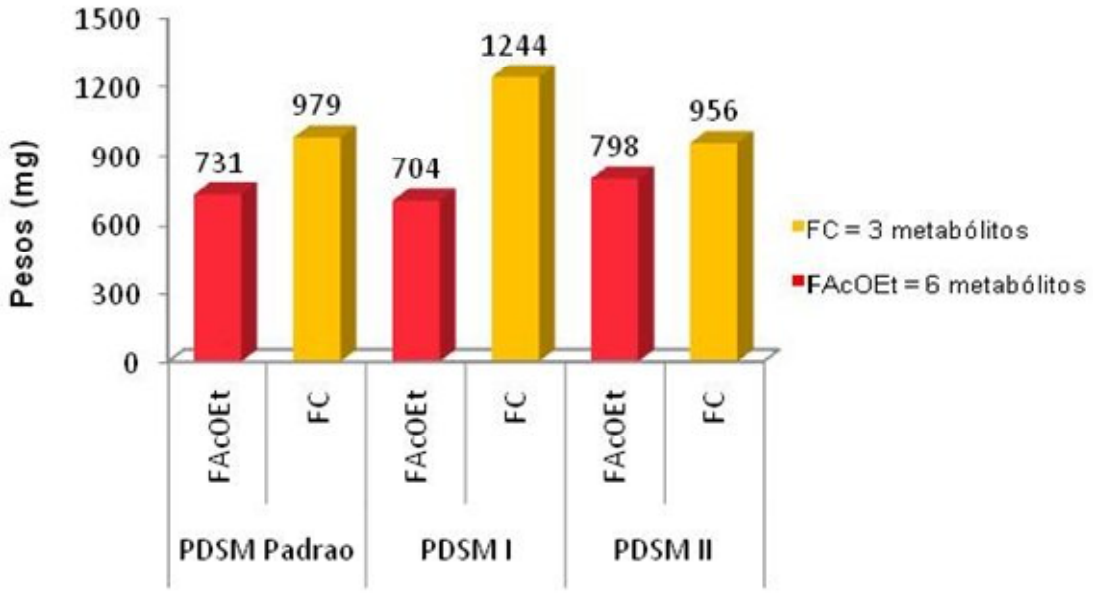


Figura 31: Gráfico comparando os pesos dos extratos das frações AcOEt e frações cetônicas das incubações realizadas com temperatura de 29°C velocidade de agitação 250 rpm nos meios PDSM e PDSM enriquecidos.

Assim ao comparar a quantidade dos extratos obtidos nas incubações realizadas com as mesmas condições reacionais de temperatura de incubação e velocidade de agitação, pode-se concluir que o meio PDSM Padrão é adequado para a realização das reações de bioconversão, pois é menos oneroso e proporciona rendimentos semelhantes aos dos meios enriquecidos. Apesar de o PDSM I ter demonstrado maior quantidade da fração cetônica, os metabólitos foram detectados principalmente nas frações orgânicas, cujas quantidades não sofreram diferença significativa nas incubações. De acordo com SCHMITZ e colaboradores o meio suplementado teve os mesmos resultados, em relação ao crescimento e oxidação da terfenadina, que o meio padrão utilizado (SCHMITZ et al., 2000).

4.1.6 Variação do pH

Diferentes valores de pH de crescimento dos microrganismos podem ser observados durante a incubação e estar relacionados ao transporte e solubilização dos nutrientes, as reações enzimáticas e/ou a fenômenos de superfície. A composição do meio pode afetar o pH inicial e a velocidade de variação deste valor durante o crescimento dos fungos. Altas concentrações de fosfatos são requeridos para se alcançar pH estáveis, sobretudo quando se deseja medir a atividade biológica como crescimento e atividade enzimática (AZERAD, 1999).

O pH do meio antes da inoculação da *C. echinulata* ATCC 9244 foi 6,0. Após 65 horas de incubação com *C. echinulata* ATCC 9244, o pH medido foi 5,5, mostrando pequena variação em relação ao pH só do meio PDSM. Os valores de pH nos ensaios realizados durante os cinco dias de incubação estão relacionados na tabela 9.

Tabela 9: Variação do pH nos seis ensaios realizados pela bioconversão da zidovudina pela *C.echinulata* ATCC 9244.

MEIO	VARIAÇÃO DO pH					
	1° ENSAIO	2° ENSAIO	3° ENSAIO	4° ENSIAO	5° ENSAIO	6° ENSAIO
Agar Batata	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
PDSM	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
PDSM + cepa após 65hrs	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
PDSM + AZT 24h	5,0	5,0	5,5	5,0	5,5	5,0
PDSM + AZT + cepa 24hrs	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
PDSM + AZT 48hrs	5,0	5,0	5,5	5,0	5,0	5,0
PDSM + AZT + cepa 48hrs	4,0	4,5	4,5	4,0	4,5	4,5
PDSM + AZT 72hrs	5,0	5,5	5,5	5,0	5,0	5,0
PDSM + AZT + cepa 72hrs	4,0	4,0	4,0	4,0	4,5	4,5
PDSM + AZT 96hrs	5,0	5,5	5,5	5,0	5,0	5,0
PDSM + AZT + cepa 96hrs	4,5	4,5	4,5	4,5	5,0	4,5
PDSM + AZT 120hrs	5,0	5,0	5,5	5,0	5,0	5,0
PDSM + AZT + cepa 120hrs	4,5	5,0	5,0	5,5	5,5	5,0

O pH manteve-se entre 4,0 a 5,5 durante todos os processos de bioconversão. Houve uma queda do pH de 5,5 para 5,0 após adição do substrato zidovudina ao meio PDSM com a cepa *C. echinulata* ATCC 9244 durante o processo de bioconversão, provavelmente devido ao caráter ácido fraco da zidovudina. Além disso, a variação do pH nos meios de cultura durante os tempos reacionais é devido ao metabolismo próprio do fungo bem como aos produtos formados pelos mesmos. Esta variação foi semelhante nos diferentes ensaios, mostrando uma queda do pH de

72-96 horas, seguida de um aumento em 120 horas, como pode ser observado na figura 32.

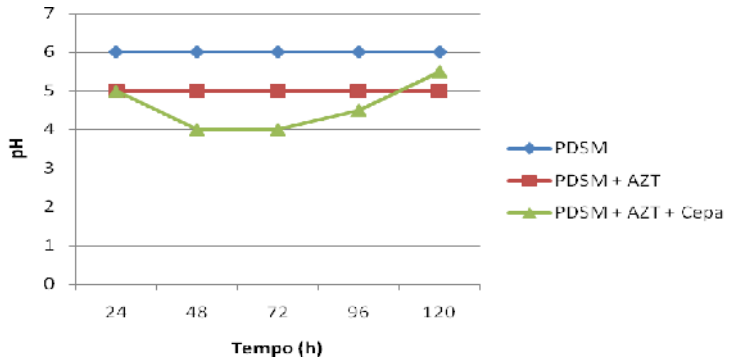


Figura 32: Variação do pH nos seis ensaios realizados na bioconversão da zidovudina por *C. echinulata* ATCC 9244.

Os parâmetros que podem interferir nas reações de bioconversão avaliados neste trabalho estão descritos de forma resumida na tabela 10.

Tabela 10: Variação dos parâmetros que podem influenciar no rendimênto das frações AcOEt e cetônicas obtidas via bioconversão da zidovudina.

PARÂMETROS	**1° ENSAIO**	**2° ENSAIO**	**3° ENSAIO**	**4° ENSAIO**	**5° ENSAIO**	**6° ENSAIO**
VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (rpm)	200	200	250	250	250	250
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	27°C	29°C	27°C	29°C	29°C	29°C
MEIO REACIONAL	PDSM Padrão	PDSM Padrão	PDSM Padrão	PDSM Padrão	PDSM I	PDSM II
VARIAÇÃO DO pH	4,0-5,0	4,0-5,0	4,0-5,5	4,0-5,5	4,5-5,5	4,5-5,5
PESO (mg) FAcOEt	241	293	429	731	665	784
PESO (mg) FC	481	588	691	979	1283	970
RENDIMENTO (mg) EXTRTO BRUTO (FAcOEt + FC)	722	881	1120	1810	1948	1754

4.2 MONITORAMENTO DOS METABÓLITOS FORMADOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A metodologia analítica empregada possui um papel de extrema importância no monitoramento de todo processo de bioconversão. Apesar da sensibilidade e eficácia das técnicas utilizadas, o monitoramento adequado dessas reações trata-se de um desafio devido a variedade das modificações alcançadas pelos fungos filamentosos, principalmente quando se deseja conhecer os derivados formados.

Os trabalhos de bioconversão disponíveis na literatura descrevem a utilização de vários métodos para o monitoramento das reações, dentre eles a CCD (HOLLAND et al., 1999; ZHAN et al., 2002). O método de CCD foi selecionado para acompanhar as reações de bioconversão, por ser de fácil compreensão e execução, possibilitar separações em breve espaço de tempo, versatilidade, reprodutibilidade e baixo custo. Na obtenção das melhores condições de separação dos metabólitos formados, quatro fases móveis foram ensaiadas para padronização da metodologia: AcOEt, AcOEt/MeOH 70:30, AcOEt/MeOH 90:10 e AcOEt/MeOH 95:05.

AcOEt, como fase móvel, proporcionou boa separação dos diferentes metabólitos formados, contudo, os produtos eluídos apresentaram valores de Rf muito próximos. Para que as manchas dos derivados ficassem mais afastadas, adicionou-se MeOH ao AcOEt em três diferentes proporções, pois este solvente é mais polar e miscível em AcOEt.

Apesar da fase móvel AcOEt/MeOH 70:30 promover um aumento nos valores de Rf dos compostos formados, ela não foi capaz de executar boa separação, sendo necessário diminuir a quantidade de metanol para testar uma nova fase móvel.

Ao diminuir a quantidade de MeOH de trinta para dez (AcOEt/MeOH 90:10) observou-se boa separação e maior diferença nos valores de Rf dos produtos. Na tentativa de aprimorar o processo de separação, diminuição adicional da proporção de metanol de dez para cinco foi realizada. A fase móvel AcOEt/MeOH 95:05, por levar a uma melhor separação em relação ao acetato de etila puro nas placas cromatográficas e melhores valores de Rf em reação ao AcOEt/MeOH 90:10, foi a fase móvel de escolha.

A formação dos metabólitos pela bioconversão da zidovudina foi avaliada por CCD, visualizados em luz UV 254 nm e 365 nm e reveladas com vapores de iodo. Para verificar a possível produção de interferentes foram realizados os seguintes controles: análise do padrão zidovudina em MeOH, do meio reacional, do sobrenadante de incubação do meio com a *C. echinulata* ATCC 9244, representando os brancos da reação.

Estes controles realizados em todas as seis incubações estão sintetizados em uma cromatoplaca apresentada na figura 33. Pode ser observada uma mancha referente a solução padrão do substrato com fator de retenção (Rf=0,8) e nenhuma mancha nas alíquotas dos brancos, indicando que não houve detecção de produtos do meio, nem de interação do microrganismo com o meio reacional.

Figura 33: Cromatoplaca representando o padrão do substrato, os meios de incubação e o meio PDSM Padrão com o microrganismo. Condições cromatográficas: Fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 nm.

Nos ensaios realizados, foram formados os mesmos derivados, que sofreram variação nas quantidades formadas devido as diferentes condições reacionais empregadas. A revelação das cromatoplacas indicou a formação de sete manchas nas frações AcOEt indicadas pelas setas vermelhas e quatro manchas nas frações cetônicas indicadas pelas setas pretas, que estão ilustradas na figura 34 e os valores de Rf referentes estão demonstrados na tabela 11.

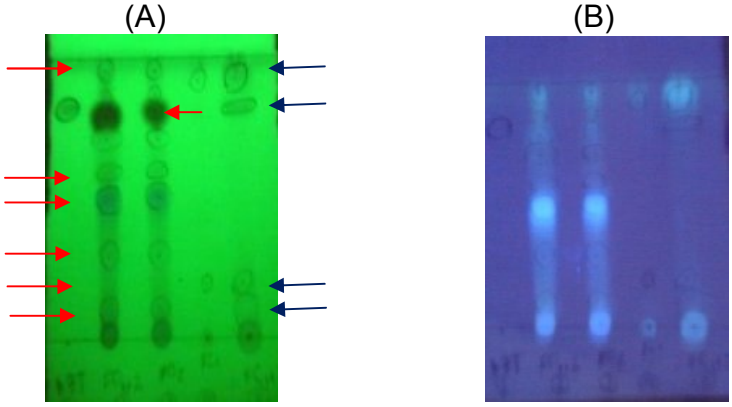


Figura 34: Placas obtidas pela análise por CCD das frações AcOEt e cetônica produzidas no 1º e 2º ensaios. Condições cromatográficas: Fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm, (A) e (B) respectivamente.

Tabela 11: Fator de retenção e intensidade das manchas da zidovudina e derivados presentes nas frações AcOEt e cetônica. Resultados correspondentes às análises de CCD. Condições cromatográficas: Fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm.

PRODUTO	Rf FAcOEt	INTENSIDADE	Rf FC	INTENSIDADE
AZT	0,8	+++	0,8	+
Derivado 1	0,15	+	0,15	+
Derivado 2	-	-	0,20	+
Derivado 3	0,36	+	-	-
Derivado 4	0,53	++	-	-
Derivado 5	0,69	+	-	-
Derivado 6	0,75	+	-	-
Derivado 7	0,85	+	0,85	++

Legenda: Quantidade relativa: + mancha fraca, ++ mancha moderada, +++ mancha intensa, - ausente.

4.3 PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS

4.3.1 Cromatografia de Adsorção em Coluna de Vidro sob Vácuo

Após análise das frações por CCD, estas foram purificadas por cromatografia em coluna de vidro no intuito de separar os produtos formados nos extratos orgânicos obtidos. A separação dos componentes foi evidenciada pela análise por CCD dos tubos coletados, cujos componentes estão descritos em função de seus valores de Rf na tabela 12.

Tabela 12: Fatores de retenção das manchas reveladas na análise por cromatografia em camada delgada das frações coletados na coluna. Condições cromatográficas: coluna de vidro 26,5x2, fase estacionária sílica gel 60 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) e fase móvel AcOEt/MeOH 95:5; CCD: fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm.

TUBOS	**Rf DAS MANCHAS**			**REVELADOR**
AZT	0,8	-	-	UV, Iodo
2	-	-	-	UV, Iodo
4	0,85	-	-	UV, Iodo
6	0,85	0,8	-	UV, Iodo
8	0,8	0,75	-	UV, Iodo
10	0,8	0,75	0,69	UV, Iodo
12	0,8	0,75	0,69	UV, Iodo
14	0,69	0,53	-	UV, Iodo
16	0,53	0,36	-	UV, Iodo
18	0,36	-	-	UV, Iodo
20	-	-	-	UV, Iodo

A CCD evidenciou uma separação relativa, mas não adequada, dos derivados formados. Mais ainda, os produtos puros foram obtidos em quantidade insuficiente para a realização dos ensaios posteriores. Assim, todas as frações obtidas (coluna e ensaios posteriores) foram reunidas e seguiu-se a purificação por recristalização.

4.3.2 Recristalização

A recristalização também foi monitorada por CCD. A figura 35 ilustra os produtos solúveis em metanol durante o procedimento de recristalização do LaBioCon 66.

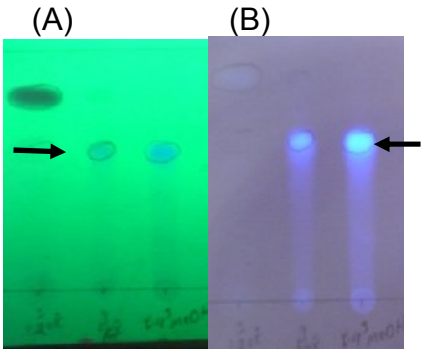


Figura 35: Monitoramento do processo de purificação por recristalização, mostrando análises da porção metanólica da recristalização. Condições cromatográficas: fase estacionária sílica Alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm, (A) e (B) respectivamente.

O produto LaBioCon 64 foi obtido em pequena quantidade, não sendo portanto identificado. Os LaBioCon 65 e 66, correspondentes ao Derivados 3 e 4, respectivamente, foram enviados para análise espectroscópica para elucidação de suas estruturas químicas. A análise por CCD do derivado 4 puro está representada na figura 36.

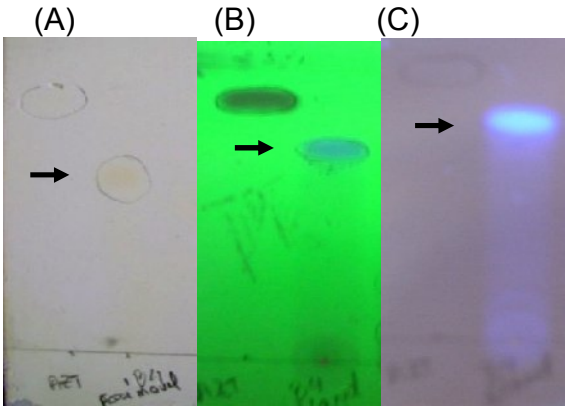


Figura 36: Cromatoplaca de análise da zidovudina e LaBioCon 66 após recristalização. Condições cromatográficas: fase estacionária sílica alugram Sil G/UV, fase móvel AcOEt/MeOH 95:5, revelada em atmosfera de iodo (A) e visualizada em UV 254 e 365 nm, (B) e (C) respectivamente.

4.4 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA ZIDOVUDINA E LaBioCon 65 E LaBioCon 66

4.4.1 Zidovudina

A zidovudina foi caracterizada por EI e RMN ^{13}C e ^{1}H para avaliação do seu grau de pureza e para comparação com os espectros dos derivados funcionalizados. Os dados obtidos foram comparados e confirmados com os da literatura (KRUSZEWSKA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2003).

As freqüências características do espectro de IV (infra-vermelho) da zidovudina são 3462,97 cm^{-1} referente a hidroxila (OH), 1685,79 cm^{-1} atribuído ao estiramento da carbonila (C=O) e um estiramento referente ao grupo azido (C-N=N=N) localizada em 2116,97 cm^{-1} (figura 37 e tabela 13).

Nos espectros de RMN, foram obtidos sinais característicos correspondentes a sua estrutura. Os deslocamentos químicos (δ) e seus carbonos ou

hidrogênios correspondentes estão demonstrados na representação fiel das análises, visualizadas nas figuras 38, 39, 40, 41 e 42 e tabelas.

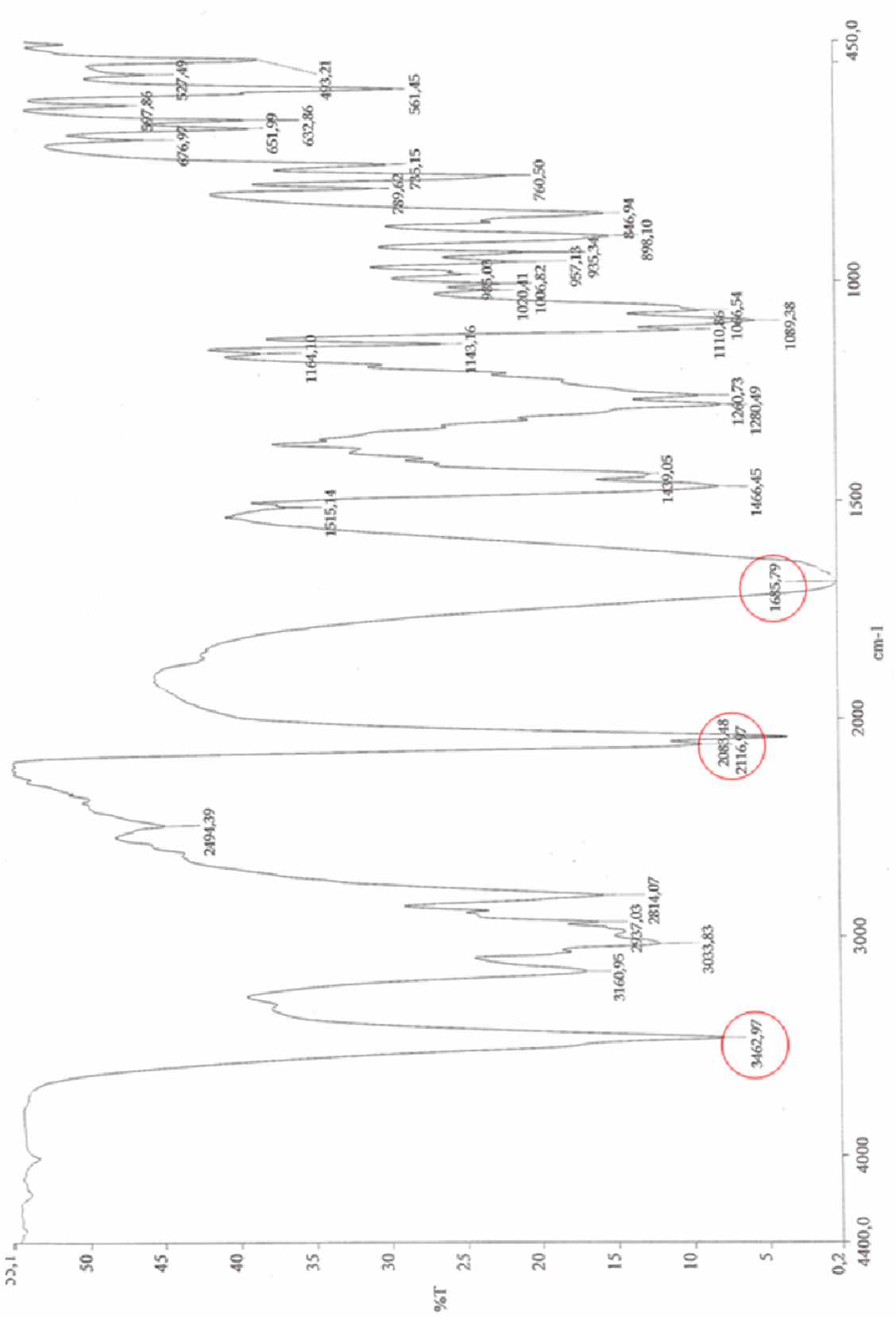


Figura 37: Espectro de IV da zidovudina.

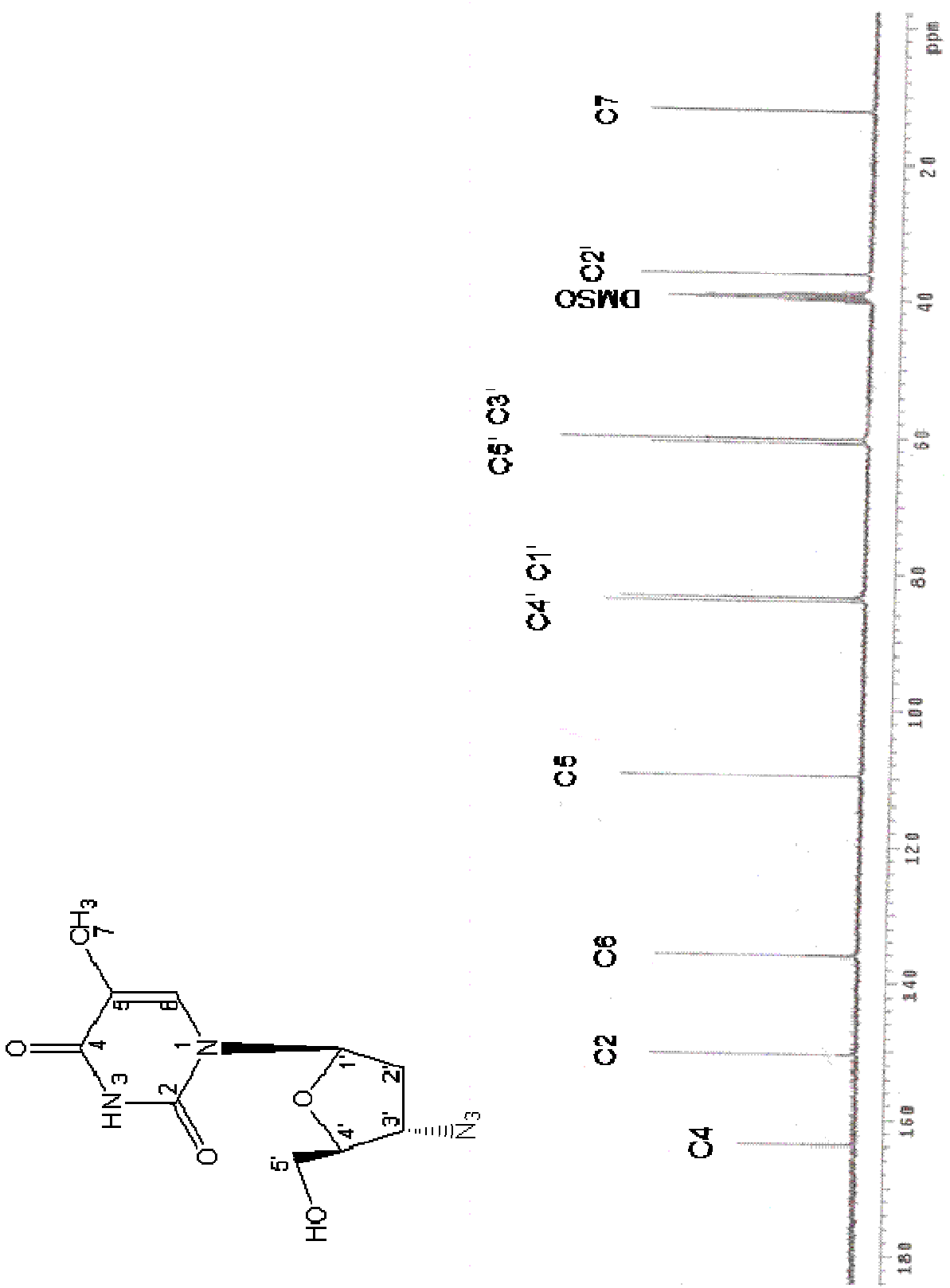


Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C da zidovudina.

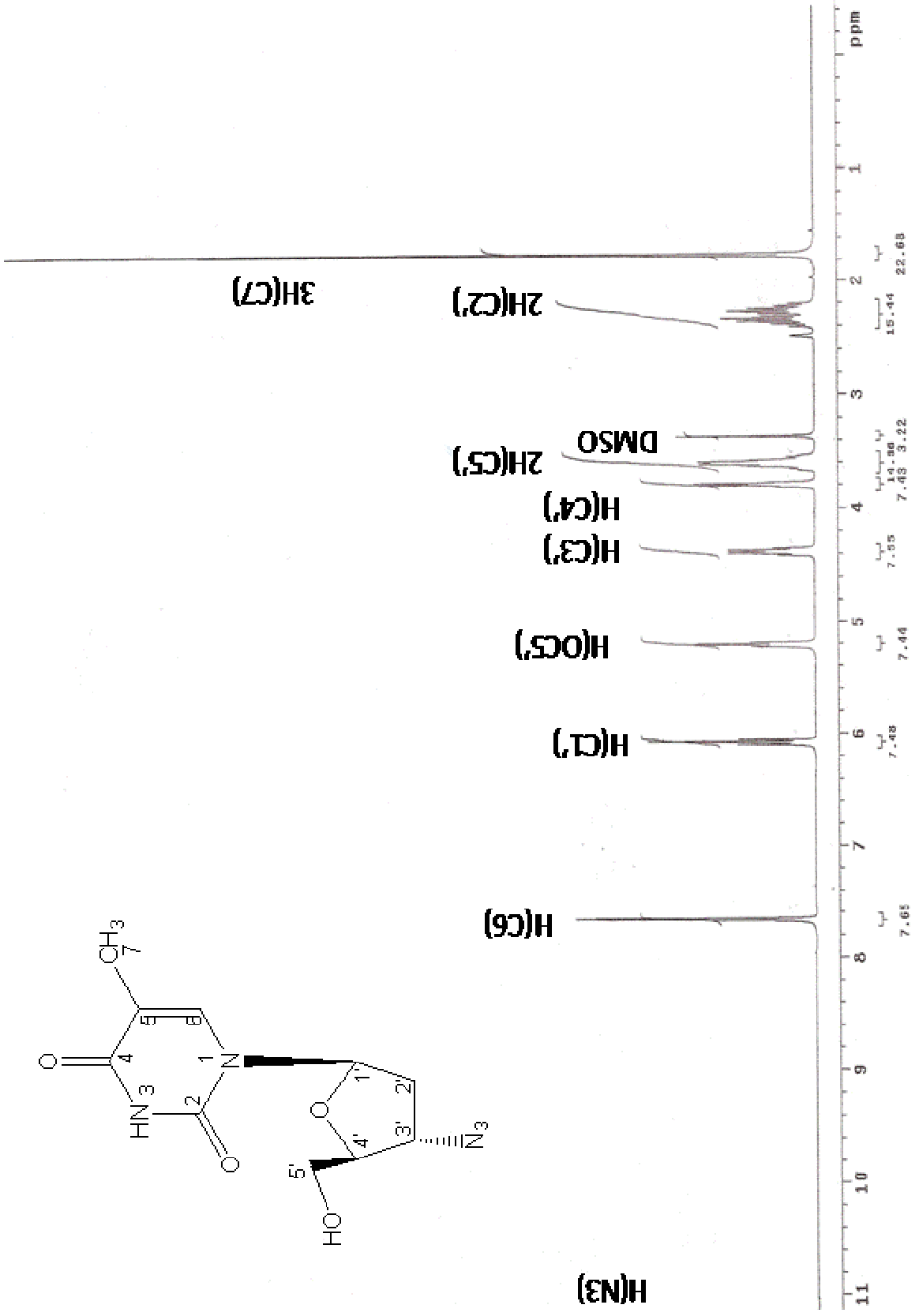


Figura 39: Espectro de RMN ^{1}H da zidovudina.

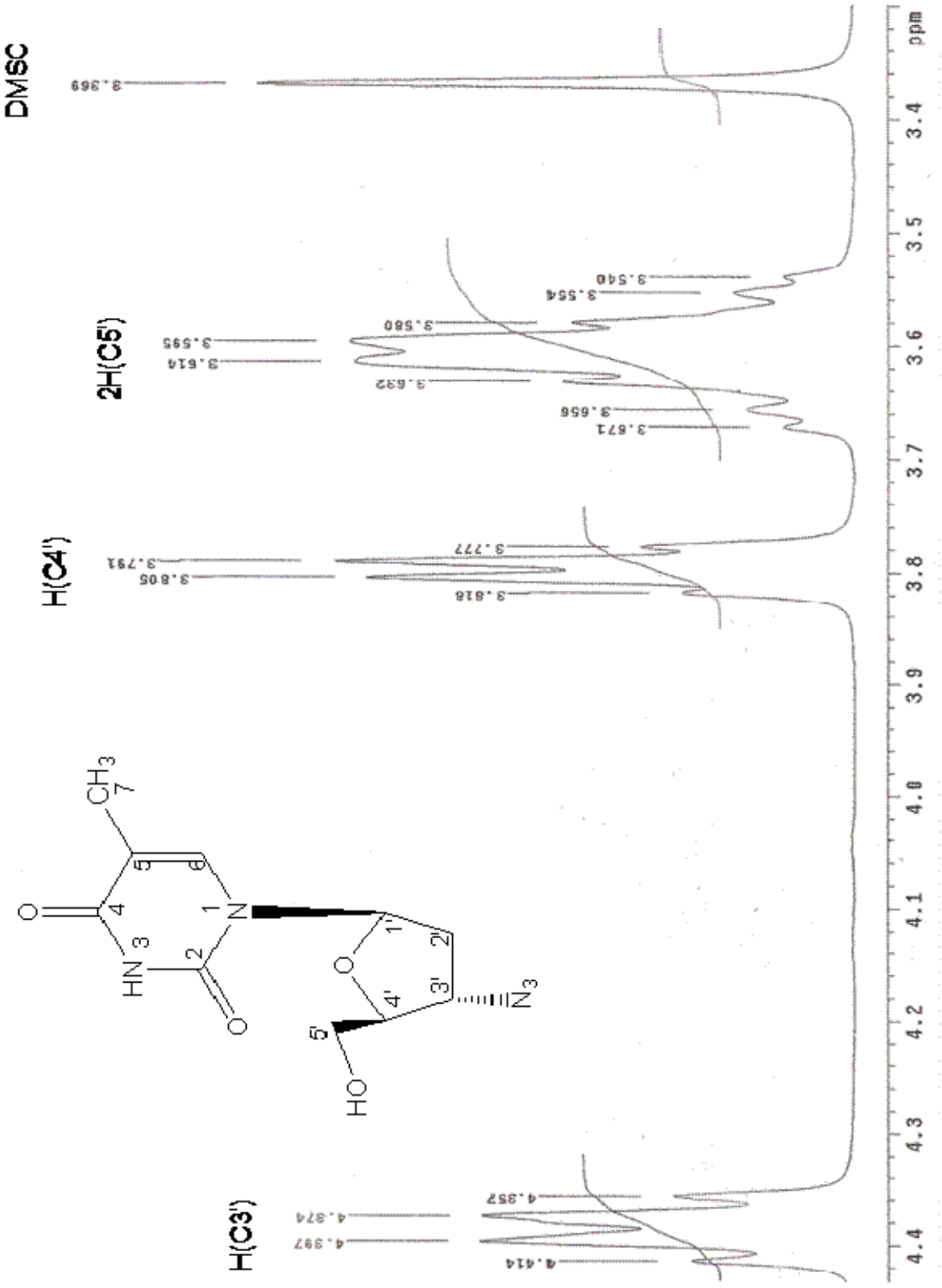


Figura 40: Expansão do espectro de RMN ^{1}H da zidovudina, de 4,40 a 3,30 ppm.

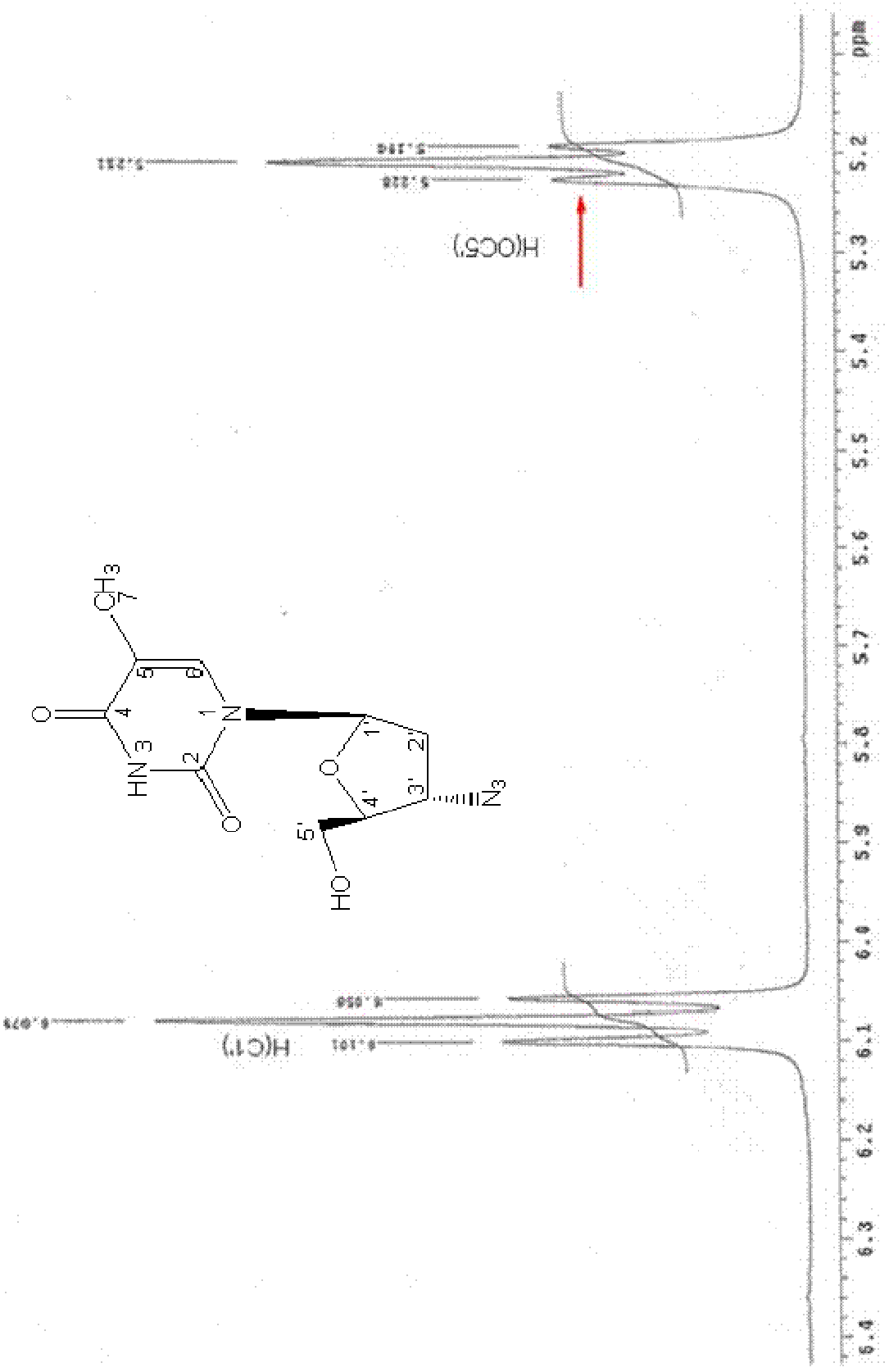


Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^{1}H da zidovudina, de 6,40 a 5,10 ppm.

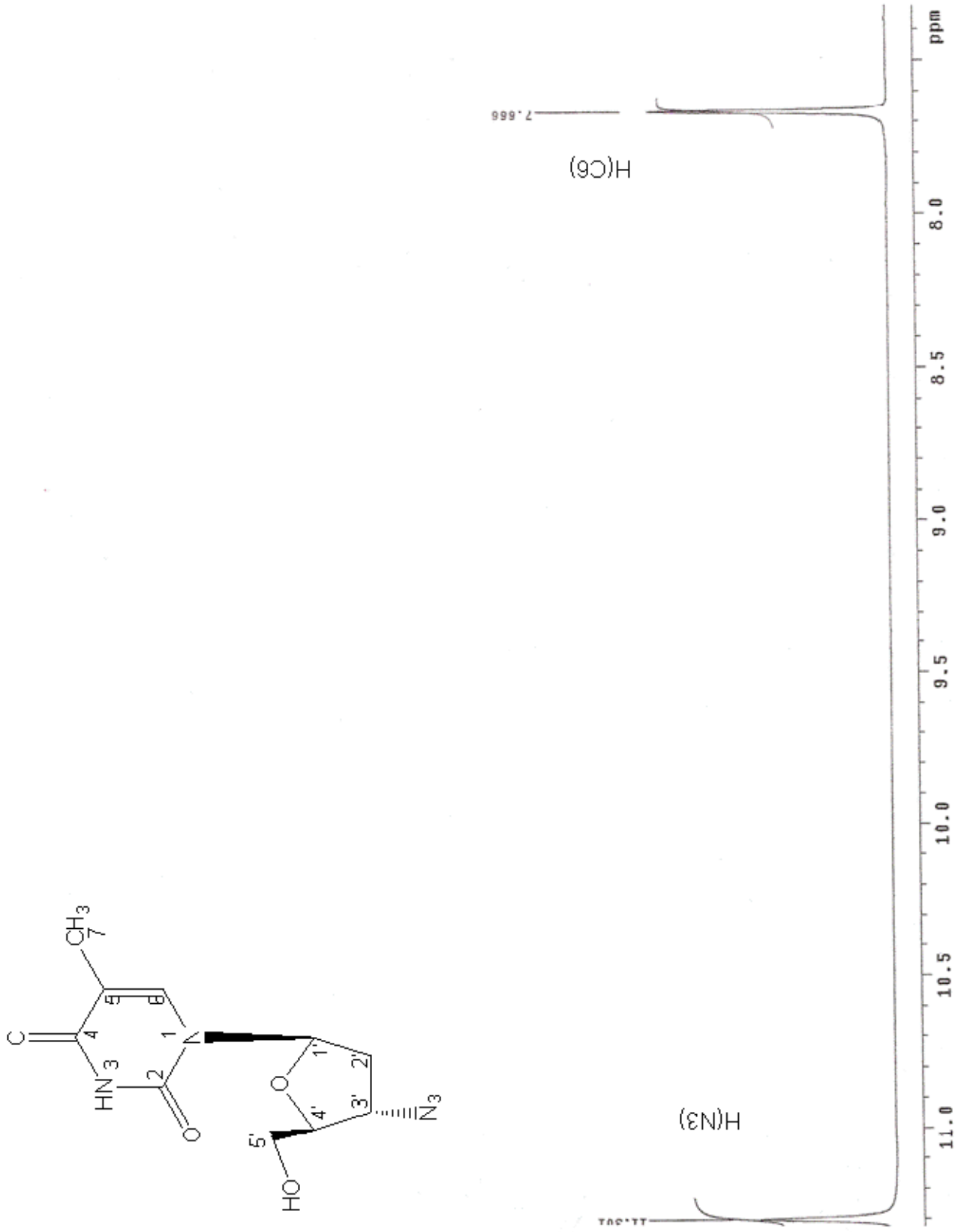


Figura 42**:** Expansão do espectro de RMN ^{1}H da zidovudina, de 11,30 a 7,30 ppm.

4.4.2 LaBioCon 65

O espectro de IV do LaBioCon 66 está representado na figura 43 e tabela 13. A diferença notável entre o espectro deste derivado e o da zidovudina é a redução na intensidade da freqüência característica do grupamento azido, em 2116,97 cm^{-1}. Pode-se sugerir que houve alguma modificação neste grupo funcional após a biotransformação.

Apesar do rendimento obtido (10mg), as análises de RMN ^{13}C e ^{1}H do LaBioCon 65 não foram conclusivas. Até o momento, ainda estão sendo realizadas análises para elucidar a sua estrutura.

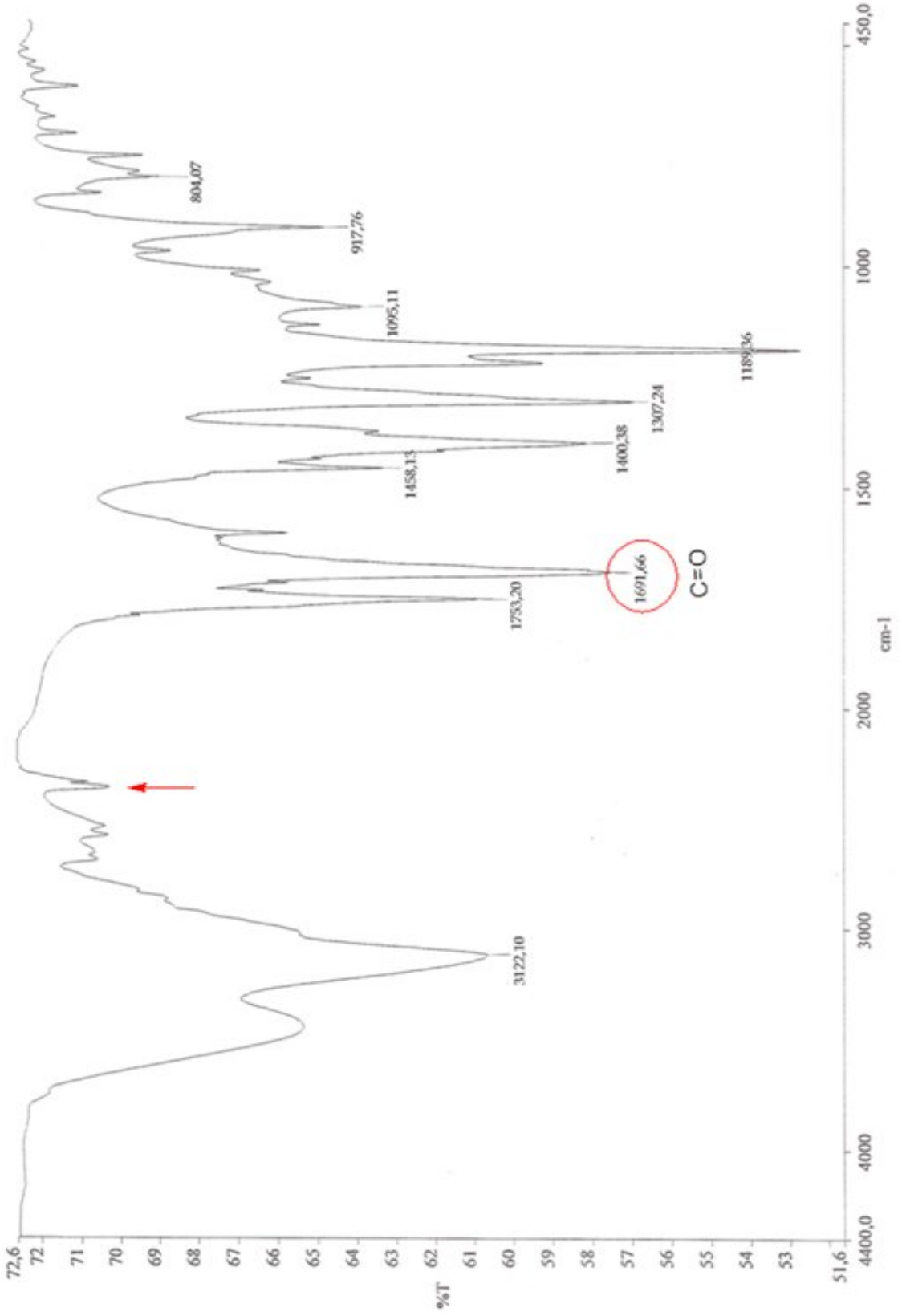


Figura 43: Espectro de IV do LaBioCon 65.

4.4.3 LaBioCon 66

O espectro de IV do LaBioCon 66 (figura 44) mostrou uma banda em 1667,21 cm^{-1} atribuído ao estiramento da carbonila e uma banda referente ao grupo azido localizada em 2108,69 cm^{-1}, comprovando que não houve modificação nestas sub-unidades estruturais. Foi observado neste espectro uma banda forte em 3400,64 cm^{-1}. Esta banda, presente na região das hidroxilas, sugere que houve um aumento de grupos –OH neste produto de biotransformação, comparado a zidovudina. A tabela 13 compara as bandas características obtidas pela análise por IV da zidovudina, LaBioCon 65 e LaBioCon 66.

Tabela 13: Freqüência (υ) das bandas características observadas no espectro de IV da zidovudina, LaBioCon 65 e LaBioCon 66.

GRUPOS FUNCIONAIS	υ (cm^{-1}) AZT	υ (cm^{-1}) LaBioCon 65	υ (cm^{-1}) LaBioCon 66
OH	3.462,97	-	3.400,64
C=O	1.685,79	1.691,66	1.667,21
C-N=N=N	2.116,97	-	2.108,69

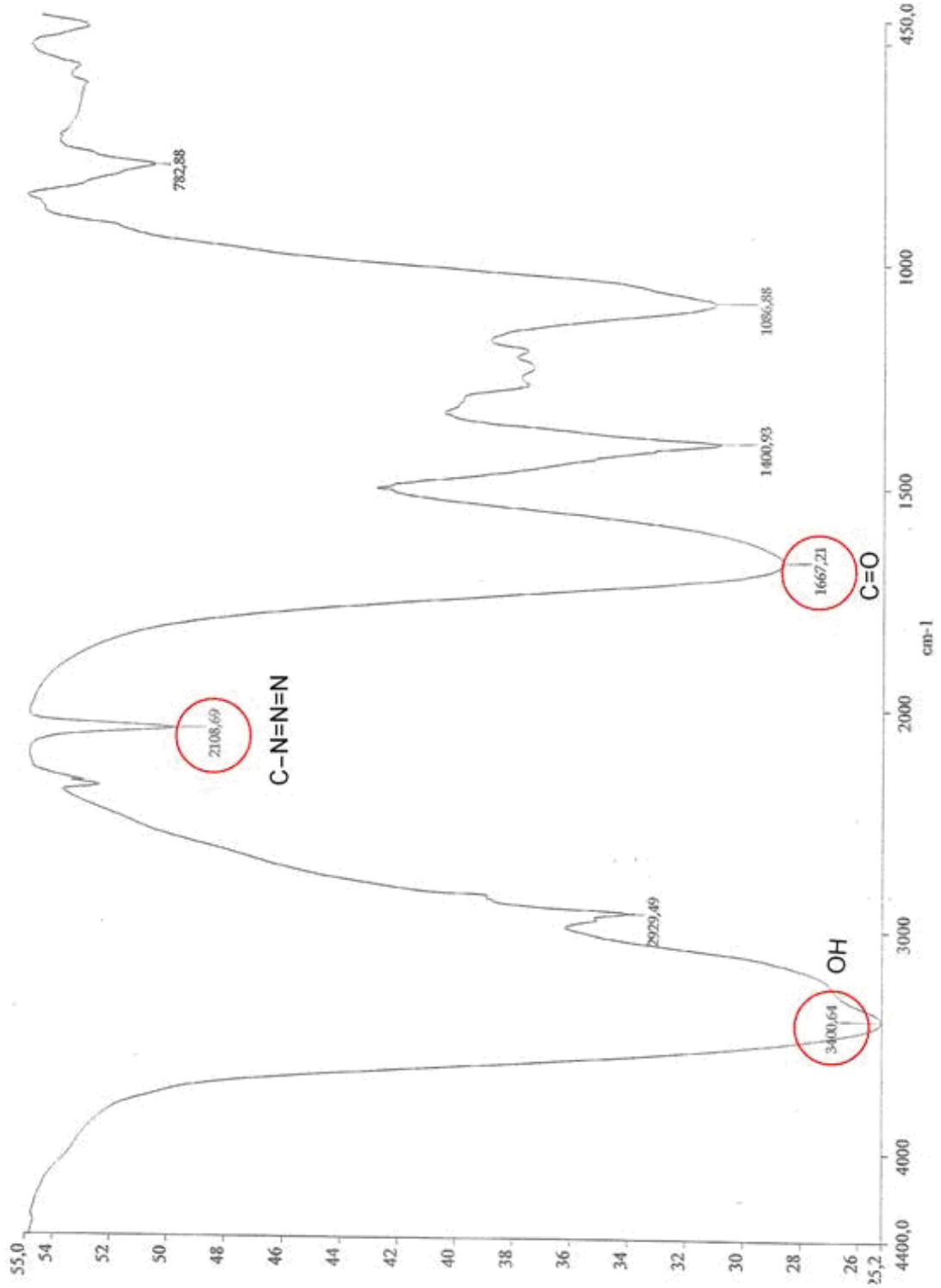


Figura 44: Espectro de IV do LabioCon 66.

O espectro de RMN ^{13}C mostrou que os deslocamentos químicos apresentados na análise da zidovudina e do LaBioCon 66 correspondentes aos carbonos da timina são quase idênticos. Foram observados sinais em 150,4 ppm; 163,8 ppm; 109,5 ppm; 136,2 ppm e 12,2 ppm referentes aos C2, C4, C5, C6 e C7, respectivamente. Os carbonos do anel desoxiribose também apareceram no espectro do metabólito em deslocamentos semelhantes aos observados para a zidovudina. Seus sinais foram 83,3 ppm; 36,2 ppm; 60,2 ppm; 84,0 ppm e 60,8 ppm para C1', C2', C3', C4' e C5', respectivamente. No entanto, a análise de RMN ^{13}C do derivado mostrou cinco sinais de carbono adicionais, com deslocamentos químicos não observados no espectro do substrato. Estes carbonos apresentaram sinais similares aos da β-D-ribopiranose. Estes sinais são 96,6 ppm; 72,5 ppm; 76,7 ppm; 69,6 ppm e 63,0 ppm para os C1", C2", C3", C4" e C5", respectivamente (tabela 14). O espectro pode ser visualizado na figura 45.

Tabela 14: Sinais evidenciados no espectro de RMN^{13} C da zidovudina e LaBioCon 66: δ_{13C} (75 MHZ, DMSO).

NÚMERO DO ÁTOMO	ZIDOVUDINA	LaBioCon 66
C2	150,4	150,4
C4	163,7	163,7
C5	109,5	109,5
C6	136,1	136,1
C7	12,2	12,2
C1’	83,3	83,3
C2’	36,2	36,2
C3’	60,2	60,2
C4’	84,0	84,0
C5’	60,8	60,8
C1’’	-	96,6
C2’’	-	72,5
C3’’	-	76,7
C4’’	-	69,6
C5’’	-	63,0

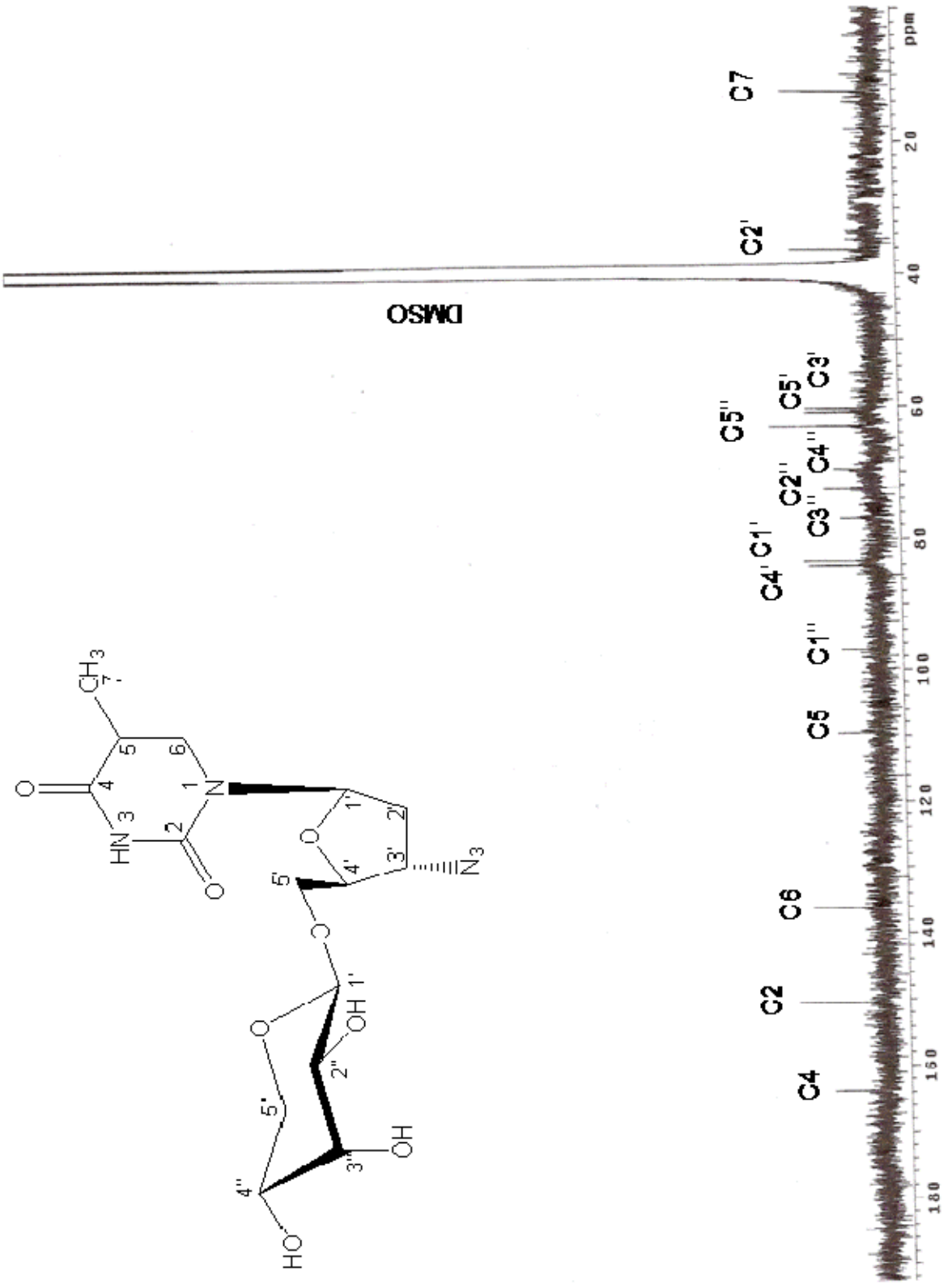


Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C LaBioCon 66.

O espectro de RMN ^{1}H do LaBioCon 66 foi similar ao da zidovudina, exceto pelos sinais adicionais de hidrogênios de anel de carboidrato. Dentre estes sinais, temos os correspondentes aos hidrogênios anoméricos, observados como um dubleto com 4,80 ppm, com uma constante de acoplamento J = 6,8 Hz. Este valor para J confirma a configuração β para a D-ribopiranose. O sinal do hidrogênio ligado ao C1" também foi evidenciado em 5,29 ppm. Os sinais dos outros hidrogênios da β-D-ribopiranose foram observados na região entre 4,0 e 3,0 ppm, porém não muito definidos, pois os hidrogênios ligados ao C4' e C5' do anel da desoxiribose também aparecem nesta região, além do solvente DMSO. O tripleto característico do hidrogênio da hidroxila ligada ao C5' com sinal em 5,20 ppm presente no espectro da zidovudina não apareceu no espectro do metabólito, confirmando que a β-D-ribopiranose foi adicionada ao substrato nesta posição. Os picos correspondentes ao restante dos hidrogênios dos anéis da zidovudina apareceram de forma semelhante nos dois espectros. O espectro evidenciou tripleto em 6,00 ppm (J = 6,3 Hz), dubleto em 4,40 ppm (J = 5,1 Hz), multipleto em 3,80 ppm, multipleto em 3,60 ppm e multipleto em 2,2-2,4, sinais correspondentes aos hidrogênios da desoxiribose. Os hidrogênios do grupo metil, o hidrogênio ligado ao nitrogênio e ao C6 apareceram em 1,76 ppm, 11,26 ppm e 7,68 ppm, respectivamente. Estes sinais demonstram que não houve nenhuma modificação adicional na molécula.

A tabela 15 compara os sinais obtidos e nas figuras 46, 47 e 48 pode-se visualizar os espectros do LaBioCon 66.

Tabela 15: Sinais evidenciados no espectro de RMN^{1}H da zidovudina e LaBioCon 66: δ_{1H} (300 MHZ, DMSO).

NÚMERO DO ÁTOMO	ZIDOVUDINA			LaBioCon 66		
	(ppm)/n°H	Multiplicidade	J(Hz)	(ppm)/n°H	Multiplicidade	J(Hz)
H(N3)	11,30/1H	s	-	11,26/1H	s	-
H(C6)	7,66/1H	s	-	7,68/1H	s	-
H(C7)	1,76/3H	s	-	1,76/3H	s	-
H(C1')	6,07/1H	t	6,3	6,07/1H	t	6,3
H(C2')	2,2-2,4/2H	m	-	2,2-2,4/2H	m	-
H(C3')	4,39/1H	m	5,1	4,40/1H	m	5,1
H(C4')	3,80/1H	m	-	3,79/1H	m	-
H(C5')	3,60/2H	m	-	3,60/2H	m	-
H(OC5')	5,20/1H	t	5,1	-	-	-
H(C1'')	-	-	-	5,29/1H	s	-
H(C2'')	-	-	-	3,59/1H	s	-
H(C3'')	-	-	-	3,57/1H	s	-
H(C4'')	-	-	-	3,77/1H	s	-
H(C5'')	-	-	-	3,73/1H	s	-
H(OH)	-	-	-	4,86/3H	d	6,8

Legenda: J-constante de acoplamento, s-singleto, d-dubleto, t-tripleto, m-multipleto.

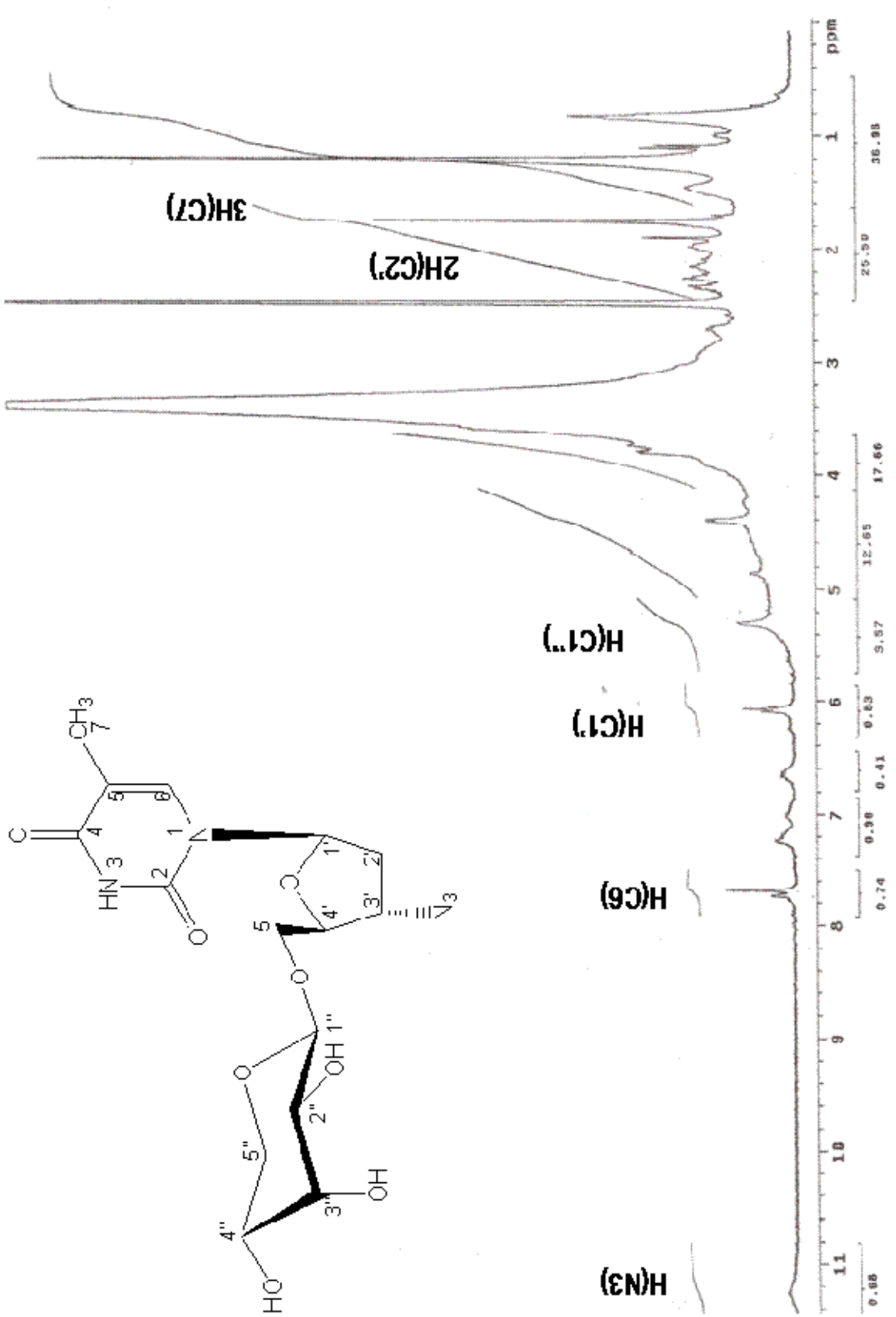


Figura 46: Espectro de RMN ^{1}H do LaBioCon 66.

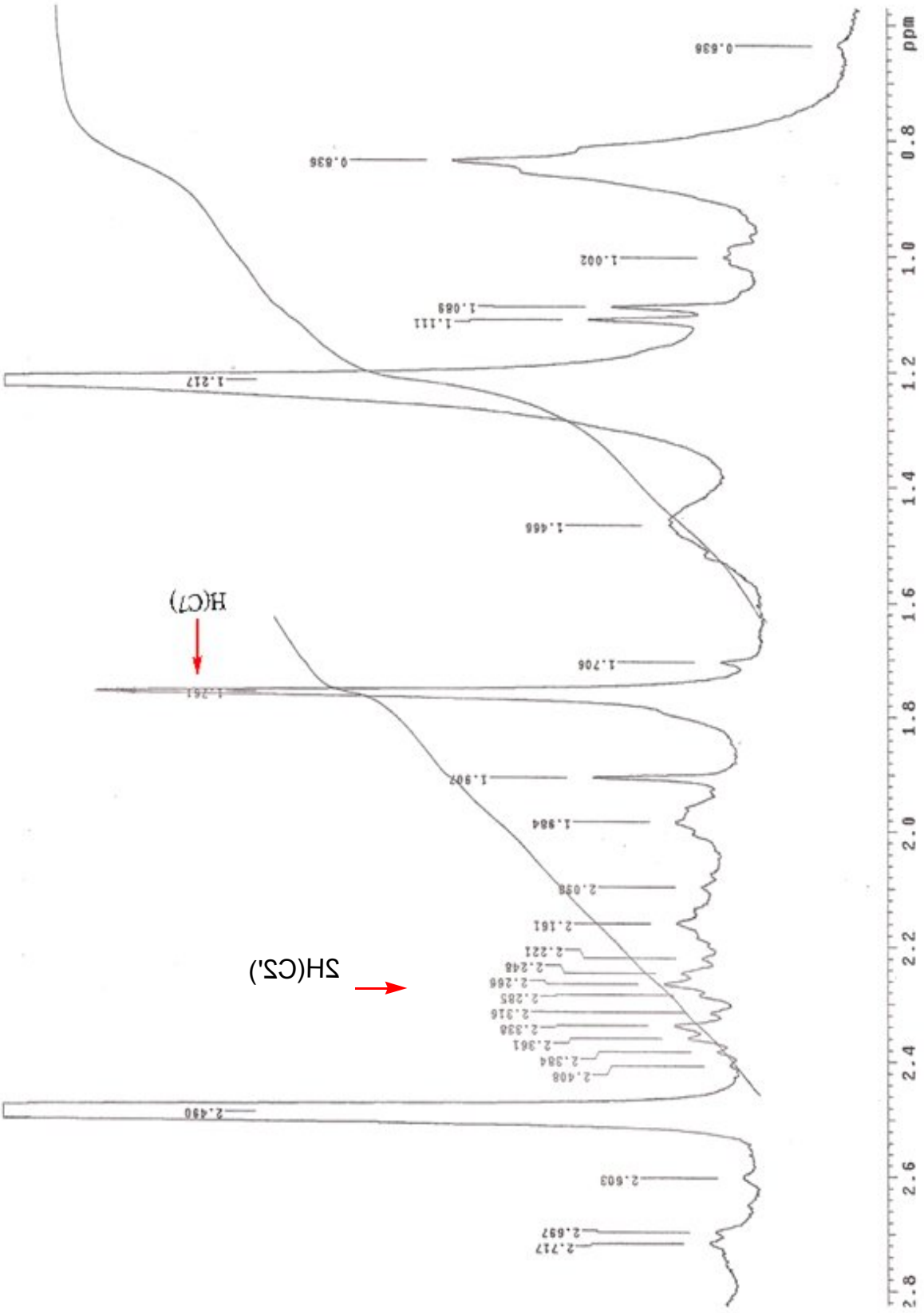


Figura 47: Expansão do espectro de RMN ^{1}H do LaBioCon 66, de 0,50 a 2,80.

. ppm.

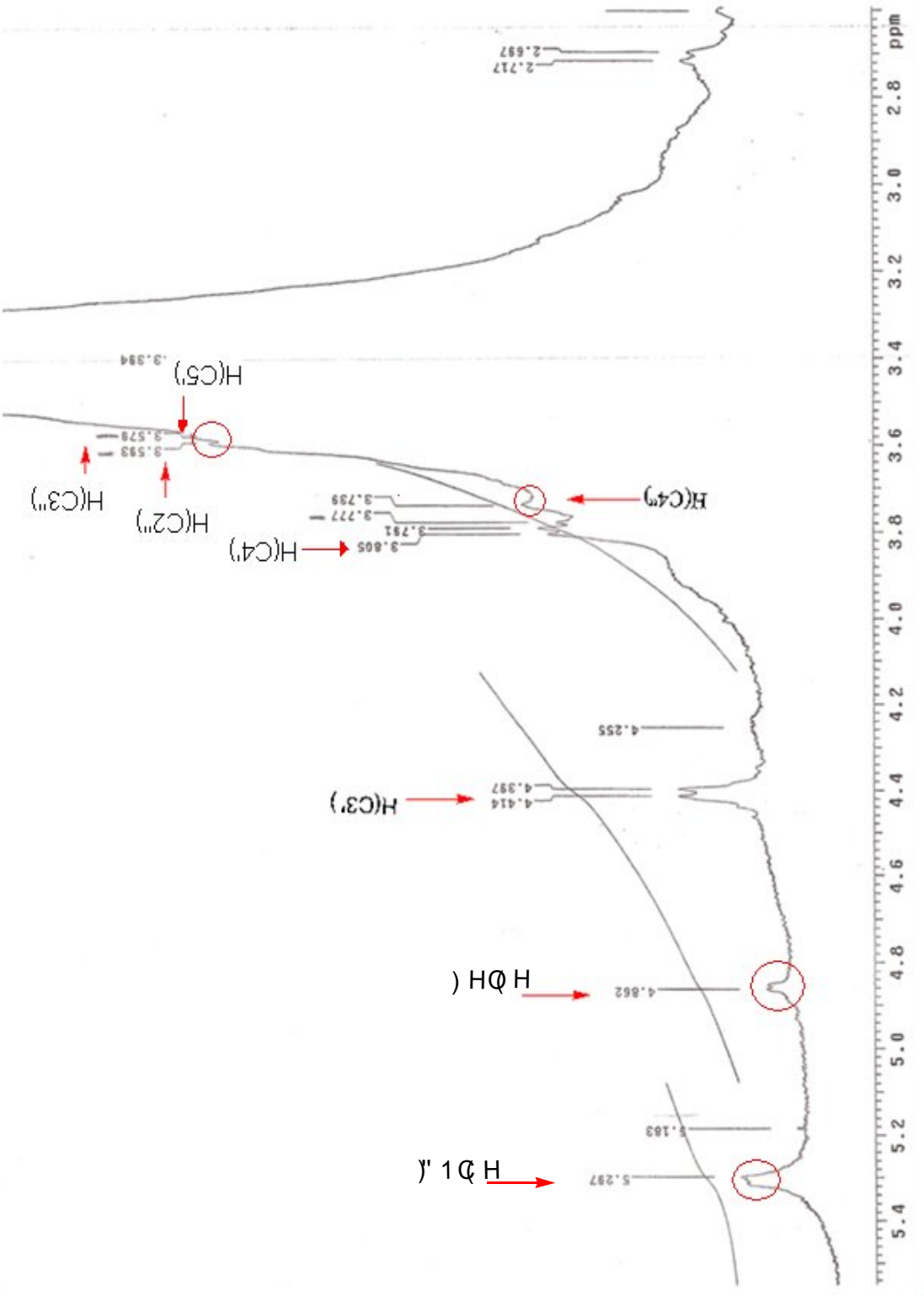


Figura 48: Expansão do espectro de RMN ^{1}H do LaBioCon 66, de 2,60 a 5,40 ppm.

A interpretação dos espectros permitiu a identificação do LaBioCon 66 como um derivado funcionalizado pelo carboidrato β-D-ribopiranose da zidovudina. Este composto foi formado a partir da bioconversão por *C. echinulata* ATCC 9244 (figura 49).

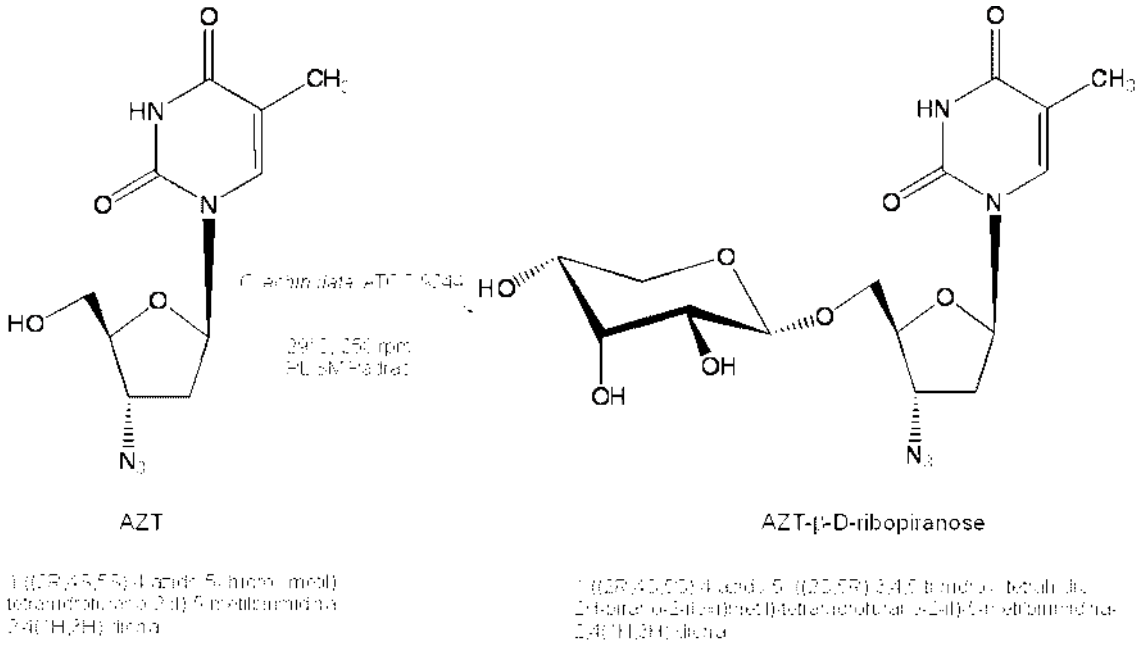


Figura 49: Estrutura química do LabioCon 66 obtido a partir da bioconversão da zidovudina por *C.echinulata* ATCC 9244 e suas respectivas nomenclaturas IUPAC.

A conjugação com β-D-ribopiranose ocorreu na mesma posição que a glicuronidação em mamíferos, rota metabólica de 30-40% da zidovudina administrada (VEAL e BACK, 1995). Tal fato demonstra o paralelismo entre as reações de detoxificação de xenobióticos em microrganismos e mamíferos também na fase II do metabolismo, com a diferença do composto conjugado em cada modelo (AZERAD, 1999). A obtenção de metabólitos de fase II, dentre eles os funcionalizados por carboidratos, principalmente pela glicose, tem sido conseguida em reações biocatalisadas por microrganismos (IBRAHIM et al., 1997).

A química de nucleosídeos, visando principalmente o desenvolvimento de novas substâncias de aplicação terapêutica, tem experimentado grande avanço recentemente. Este processo está alavancado e orientado pela busca por novos agentes anti-retrovirais. Neste sentido, como os grupos hidroxilas das posições 3' e 5' dos ribonucleosídeos são indispensáveis para o crescimento da cadeia de DNA, pois atuam como ponto de ligação para a formação da ligação química entre os nucleosídeos, modificações nestes grupos têm sido os alvos mais freqüentes na busca de novos análogos de nucleosídeos (SOARES et al., 2001). Como a funcionalização ocorrida no LaBioCon 66 foi na hidroxila 5', este derivado obtido por transformação microbiana a partir da zidovudina pode representar um importante novo candidato a fármaco.

Mais ainda, reações de conjugação com a β-D-ribopiranose ainda não foram observadas empregando *Cunninghamella* spp. O desenvolvimento deste tipo de reação é um ramo relativamente recente e ainda em desenvolvimento pelos pesquisadores da área, o que ressalta a importância do produto obtido LaBioCon 66.

5 CONCLUSÕES

- A bioconversão da zidovudina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 mostrou-se promissora para a produção de derivados funcionalizados deste substrato, sendo visualizados sete novos produtos, dos quais três foram purificados e um teve sua estrutura química elucidada.

- Os parâmetros analisados interferem no rendimento da reação de bioconversão deste substrato, sendo possível determinar as melhores condições reacionais, dentre as ensaiadas, que foram: interrupção da incubação em 120 horas, temperatura de 29°C, velocidade de agitação 250 rpm, meio de cultura PDSM Padrão e pH 4,0 a 5,5.

- A recristalização demonstrou ser uma metodologia mais adequada para a purificação dos metabólitos formados.

- Dentre os produtos purificados, o LaBioCon 66 foi identificado como um derivado da zidovudina, funcionalizado pelo carboidrato β-D-ribopiranose.

6 PERSPECTIVAS

- Purificação e caracterização estrutural dos demais metabólitos observados.

- Identificação dos parâmetros reaçionais para maior rendimento de cada um dos metabólitos.

- Ensaios de atividades biológicas para o LabioCon 66.

- Produção em escala preparativa (5g) para ensaios farmacocinéticos e toxicológicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, A. M. et al. The synthesis of buprenorphine intermediates by regioselective microbial *N*- and *O*-demethylation reactions using *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384. *Enzyme and Microbial Technology*, Liverpool, v. 33, p. 743-748, 2003.

ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review. *Current Medicinal Chemistry*, Mississippi, v. 6, p. 359-374, 1999.

ALEXANDRE, V. et al. Microbial models of animal drug metabolism In: Microbial preparation of human hydroxylated metabolites of irbesartan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, p.173-179, 2004.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 206, p. 303-314, 2003.

AZERAD, R. Application of biocatalysts in organic synthesis. *Bulletín Socíeté de Chímíe.* Paris, v. 132, p. 17-51, 1995.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology.* (Biotransformation), ed. K. Faber, T. Shaper, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, v. 63, p. 169-218, 1999.

BALINT, G. A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacology Therapy,* v. 89, p. 17-27, 2001.

BAREIRO E. J.; FRAGA C. A. M. Noções básicas do metabolismo de fármacos. *Química Nova*, v. 19, p. 641-650, 1996.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. As bases moleculares da ação dos fármacos. *Química Medicinal.* Artmed Editora, Porto Alegre, 2001.

BASTOS, Denise Z. L. Biotransformação por fungos do ácido betulínico e derivados. Tese (Doutorado). Curitiba, p. 117, 2005.

BEACH, J. Warren. Chemotherapeutic agents for human immunodeficiency virus infection mechanism of action, pharmacokinetics, metabolism, and adverse reactions. *Clinical Therapeutics,* v. 20, n. 1, p. 2-25, 1998.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokinetics receptor as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and desease. *Annual Review Immunology,* v. 17, p. 657-700, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia anti-retroviral em gestantes 2002\2003. Brasília, Ministério da Saúde, 2002.

BRINK, H. J. M. et al. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology,* v. 23, p. 1-17, 1998.

CÁNOVAS, M. et al. Factors affecting the biotransformation of trimethylammonium compounds into l-carnitina by *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal,* v. 26, p. 145-154, 2005.

CARDO, D. M. et al. A case-control study of HIV seroconversion in health care workers after percutaneous exposure. Centers for Diseases Control and Prevention Needle stick Surveillance Group. *New England Journal of Medicine* v. 337, p. 1485-90, 1997.

CARDUS, G. J. et al. Microbial Desrancemisation of *N*-(-hydroxy-1-phenylethyl) Benzamide. *Tetrahedron: Asymmetry,* v. 15, p. 239-243, 2004.

CARNEIRO, E. O.; et al. Microbial models of animal metabolism: application to a study of the metabolism of LASSBio 873. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, p. 392-392, 2005.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* v. 19, p. 324-333, 1997.

CHARNEY, W.; HERZOG, H. L. *Microbial transformations of steroids - A handbook.* New York, Academic Press, 1967.

CHEN, H. -C.; LIU, T. -M. Inoculums effects on the production of γ-linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme and Microbial Technology,* vol 1. n. 21, p. 137-142, 1997.

CIRILO, Hérica Núbia Cardoso. Bioconversão de derivados nacilidrazônicos sintetizados a partir do safrol. 2006. 139 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2006.

COSTA, Eula Maria de Meio Barcelos. *Obtenção de metabólitos de flavonóides por biotransformação microbiana.* 2004. 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2004.

CUTRIGHT, T. J. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and kinetics using *Cunninghamella echinulata var*. *elegans. International Biodeterioration and biodegradation,* Akron, p. 397-408, 1995.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotecnologia: manual de microbiologia industrial*. 3° ed. Zaragoza: Editorial Acribia S. A. 1993. 413p.

DE OLIVEIRA, B. H. Obtenção de novos fármacos através da biotransformação de produtos naturais. *In: Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna famacognosia*. 1. ed. Itajaí, Editora Univali, 2007

DOMS, R. W. Viral entry denied. *New England Journal of Medicine.* v. 351, n. 8, p. 743-744, 2004.

EAGLING, V. A. et al. The metabolism of zidovudine by human liver microsomes *in vitro*: formation of 3´-amino-3´-deoxythimidine. *Biochemical Pharmacology*, Liverpool, v.48, n.2, p. 267-276, 1994.

EGGER, M. et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *The Lancet,* v. 360, p.119-29, Issue 9327, 2002.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 3º edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997.

FABER, K. *Biotransformation in organic chemistry*. Germany, Springer-Verlang, p. 420, 2000.

FDA - Food and Drug Administration. Code of Federal Regulation. Washington: Office of the Federal Register, pt. 436, capo 1, p. 232-263, 830-851, 1995.

FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S.; PINHEIRO, H. M. Influence of some operational parameters on the bioconversion of sitosterol with immobilized whole cells in organic medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 5, p. 307-310, 1998.

FERNANDEZ_LUCAS, J. et al. Synthesis of 2'-deoxyibosylnucleosides using new 2'-deoxyribosultrasferase microorganism producers. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 40, p. 1147-1155, 2006.

FERRIS, J. P.; et al. Monooxygenase activity in *Cunninghamella bainieri*: evidence for a fungal system similar to liver microssomes. *Arches Biochemistry Biophysical,* v.156, p. 97-103, 1973.

FOSTER, B. C. et al. Propranolol metabolism by *Cunninghamella echinulata*. *Xenobiótica,* v. 19, n. 5, p. 539-546, 1989.

FOSTER, B. C.; LITSTER, D. L.; ZAMECNIK, J. The biotransformation of tranylcypromine by *Cunninghamella echinulata*. *Can Journal of Microbiology*, v. 37, p. 791-795, 1991.

FREITAG, D. G. et al. Stereoselective metabolism of *rac*-mexiletine by the fungus *Cunninghamella echinulata* yields the major human metabolites hydroxymethylmexiletine and *p*-hydroxymexiletine. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Alberta, v. 25, n. 6. p. 685-692, 1997.

FURTADO, M. R. et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *New England Journal of Medicine*, v. 340, n. 21, p. 1614-1622, 1999.

GALLO, R. C.; MONTAGNIER, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *New England Journal of Medicine*, v. 349, p. 2283, 2003.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GLAZER, A.; NIKALDO, H. Microbial biotechnology fundaments of applied microbiology. 2. ed. New York: W. H. Freeman & Co. p. 660, 1995.

GOREMAKER, S. L. et aI. Effect of combination therapy including protease inhibitors on mortality among children and adolescences infield with HIV-l. *New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 1522-1528, 2001.

GREENE, W. C.; PETERLIN, B. M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medical,* v. 8, p. 673-680, 2002.

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

GUENGERICH, F. P. Human cytochrome P450 enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Cytochrome P450: structure mechanism and biochemistry. 2. ed. New York: Plenum Press, 1995. Chapter 14.

HADDAD, M. et al. Patient support and education for promoting adherence to highly active anti-retroviral therapy for HIV/AIDS. *Cochrane Review*. The Cochrane Library. Oxford: Up dare Software, 2002.

HAN, J. X., et al. A. Microbial metabolism of artemisinin by *Mucor polymorphosporus* and *Aspergillus niger. Journal of Natural Products*, v. 65, p. 1693-1695, 2002.

HANSON, J.R. The microbiological transformation of diterpenoids. *Natural Products Reports*. v. 8, p. 139-151, 1992.

HAUER, B.; ROBERTS, S. M. Biocatalyses and biotransformation. Probing the potential usefulness and the mechanisms of action of some novel biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 8, p. 103-105, 2004.

HOLLAND, H. L.; MORRIS, T. A; NAVA, P. J.; ZABIC, M. A new paradigm for biohydroxylation by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *Tetrahedron*, v.55, p. 74417460, 1999.

HORWITZ, J. P.; CHUA, J.; NOEL, M.; Nucleosides. the monomesylates of 1-(2-9-deoxy-β-D-lyxofuranosyl) thymidine. *Journal Organization of Chemistry,* v. 29, p. 2076, 1964.

HSIEH, H. –J.; GIRIDHAR, R.; WU, W. –T. Regioselective formation of kojic acid-7-*O*-alpha-D-glucopyranoside by whole cells of mutated *Xanthomonas campestris*. *Enzyme and Microbiology Technology*, v.40, p.324-328, 2007.

HUANG, L. et al. Intensive care of patients with HIV Infection. *New England Journal of Medicine,* v. 355, p, 173, 2006.

IBRAHIM, A. R. S. Glucose-conjugation of the flavones of *Psiadia arabica* by *Cunninghamella elegans. Phytochemistry*, v.46, p.1193-1195. 1997.

JEZEQUEL, S. G. Microbial models of mammalian metabolism: uses and misuses (clarification of some misconceptions). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 5, p. 371-377, 1998.

KAMBLE, A L.; SONI, P.; BANERJEE, U. C. Biocatalyzes synthesis of 5(-)-1-(1'-naphthyl) ethanol by a novel isolate of *Candida Viswanathii. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 35, p. 1-6, 2005.

KATZUNG, G. Bertram. *Farmacologia Básica e Clínica.* Editora Guanabara, 9 ed. 2005.

KILBY, M. J.; ERON, J. J. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. New *England Journal of Medicine,* v. 348, n. 22, p. 2228-2238, 2003.

KIM, Y. H., et al. Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaenii* PYR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, p.275-285, 2005.

KOSSEN, N. W. F. The morphology of filamentous fungi. *A. V. Biochemistry Engineering Biotechnology*, v. 70, p. 1-33, 2000.

KRUSZEWSKA, H. et al. Spectroscopic identification of AZT derivate obtained from biotransformation of AZT by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Molecular Structure*, 651-653, p. 645-650, 2003.

LACROIX, I.; AZERAD, R. Microbial biotransformations of a synthetic immunomodulating agent, HR325. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 5, p. 1369-1380, 1997.

LACROIX, Isabelle. *Contribution à l`étude des modèles microbiens du métabolisme animal. Application au métabolisme de RU27987 et HR325*. (Doctorat). Pharmacie, Universite Rene Descartes de Paris, Paris, 1997. 156 p.

LEVSEN, K. et al. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A,* v. 106, p. 55-72, 2005.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. P. Chemocatalyses and biocatalyses (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organization Process Research Development*, v. 3, n. 10, p. 572-580, 2006.

LI, W. et al. Biotransformation of phenol by *Panax ginseng* root and cell cultures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.35, p.117-121, 2005.

MANOSROI, J. CHISTI, Y. MANOSROI, A. Biotransformation of cortexolone to hydrocortisone by molds using a rapid color-development assay. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, n. 5, p. 479-483, (Russia), 2006.

MESPLET, N. et al. Simultaneous quantitation of nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by short-end injection capillary electrochromatography on a β-cyclodextrin-bonded silica stationary phase. *Journal of Chromatography A,* v. 927, n. 24, p. 161-168, 2001.

MIYAZAWA, M. et al. Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger,* as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 27, n. 2, p. 91-95, 2004.

MOCK, P. A. et al. Maternal viral load and timing of mother to child HIV transmission, Bangkok, Thailand. *Aids*, v. 13, p. 407-414, 1999.

MOLINARI, F. et al. Enantioselective oxidation of (*RS*)-2-phenyl-1-propanol to (*S*)-2-phenylpropanoic acid with *Gluconobacter oxydans*: simplex optimization of the biotransformation. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 10, p. 3003-3009, 1999.

MONTANER, S. et al. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine and zidovudine for HIV-infected patients. *IAMA,* v. 279, n.12, p. 930-937, 1998.

MONTELLANO, O. P. R; CORREIA, M. A Cytochrome P450: PAHO. Building blocks: proceedings of the consultations on standards of care for persons living with HIV/Aids in the Americas. *Pan American Health Organization*, 1995.

MOODLEY, D. et al. Pharmacokinetics and antiretroviral activity of lamivudine alone or when co administered with zidovudine in HIV-infected pregnant women and their offspring. *Journal of Infection Dis.,* v. 178, p. 1327-1333, 1998.

MOORE, D. et al. Simultaneous quantitation of the 5'-triphosphate metabolites of zidovudine, lamivudine, and stavudine in peripheral mononuclear blood cells of HIV infected patients by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal American Shoe Mass Spectrum.,* v. 11, p. 1134-1143, 2000.

NING, L. et al. Biotransformation of triptolide by *Cunninghamella blakesleana*. *Tetrahedron*, v. 59, p. 4209-4213, 2003.

NUNES, Elaine Sousa; CARNEIRO, Emmanuel de Oliveira; DE OLIVEIRA, Valéria.Bioconversão da zidovudina: avaliação dos parâmetros temperatura e velocidade de agitação. *XV Semana Científica Farmacêutica.* Universidade Federal de Goiás (Goiânia), 2007.

OKUNO, Y.; MIYAZAWA, M. Biotransformation of nobiletin by *Aspergillus niger* and the antimutagenic activity of a metabolite, 4'-hydroxy-5,6,7,8,3'pentamethoxyflavone. *Journal of Natural Products,* v. 67, p.1876-1878, 2004.

OMURA, T. Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 266, p. 690-698, 1999.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial Processes. *Biotechnology Advances,* v. 22, p.189-259, 2004.

PARANG, K.; WIEBE, L. I.; KNAUS, E. E. Pharmacokinetics and tissue distribution of (±)-3'- azido-2',3'-dideoxy-5'-*0*-(2-bromomyristoyl) thymidine, a prodrug of 3'-azido-2'-3'-dideoxythymidine (AZT) in mice. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, v. 50 p. 989-996, 1998.

PAZINI, F. Preparação de derivados funcionalizados do novo protótipo de fármaco neuroativo LASSBio 581 por bioconversão. 2006. 170 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C. Microbiological Transformations of Steroids. In. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. Contribution from the Research Laboratories of the Upjohn Compan*y. Journal American Chemistry Society,* v. 74, p. 5933-5936, 1952.

PHIMISTER, E. G. Search of a better HIV vaccine – the heat is on. *New England of Journal of Medicine Clinical Implications of Basic Research.* v. 348, p. 643, 2003.

RASOR, J. P.; VOSS, E. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical. industry. *Applied Catalysis A: General,* v. 221, p. 145-158, 2001.

RIDDLER, S. A. et al. Class-sparing regimens for Initial treatment of HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*. v. 358, p. 2095, 2008.

RIOS, D. P., *et al*. Preparação de derivados de zidovudina e estavudina por biotransformações microbianas. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento*, v. 2, p. 183 -186, 2005.

RUSHMORE, T. H. et al. Bioreactor systems in drug metabolism: synthesis of cytochrome P450 - Generated metabolites. *Metabolic Engineering.* v. 2, p. 115-125, 2000.

SCHMITZ, G. et al. Regioselective oxidation of terfenadine with *Cunninghamella blakesleeana*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 313-324, 2000.

SCHÜGERL, K.; GERLACH, S. R.; SIEDENBER, D. Influence of process parameter on the morphology and enzyme production of *Aspergilli.* Advised *Biochemistry Engineering Biotechnology*, v. 60, p. 195-266, 1998.

SCHWARTZ, H. et al. Microbial oxidation of ebastine. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 44, p. 731-735, 1996.

SIMON, V. A.; THIAM, M. D.; LIPFORD, L. C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus-suppressing drugs by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.,* v. 913, p. 447-453, 2001.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J.P. Microbial models of mammalian metabolism: aromatic hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* v. 161, n. 2, p. 551-558, 1974.

SMITH, R. V., ROSAZZA, J. P. Microbial systems for study of the biotransformation of Drugs. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 17, p. 785-814, 1975.

SMITH, R V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. *Journal of Natural Products*, v. 46, n. 1, p. 79-91, 1983.

SOARES, M. C.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F. Estratégias para a síntese de desoxinucluosídeos. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 11-34, 2001.

SONO, M. et al. Heme-containing oxygenases. *Chemical Reviews*, v. 96, n. 7, 1996.

SOUSA J.; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n.1, 2004.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 366-372, 2003.

STOUDT, T. H. The microbiological transformation of steroids. In: *Advanced Applied Microbiology,* 2.ed. 1960.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, E.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 548-556, 2002.

TAYLOR, B S. et al. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *New England Journal of Medicine,* v. 358, n. 15, p. 1590, 2008.

URLACHER, V. B.; SCHMID, R. D. Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformation. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, p. 156-161, 2006.

VEAL, G..; BACK, D. Metabolism of zidovudine. *Genetic Pharmacology* v. 26, n. 7, p. 1469 1475, 1995.

VECHT, B. S.; LIFSHITZ, S. E. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*, v. 9, n. 2, p. 63-68, 1991.

VÉZINA, C. Biotransformaciones. In: BU'LOCK, J.; KHISTIANSEN, B. Biotecnologia: manual de microbiologia industrial. 3. ed. Zaragoza: Editorial Arabia S. A. 1993, v. 351, n. 8, p. 743-744, 2004.

VIAZZO, P.; AlPHANO, V; FURSTOSS, R. Microbiological Transformations 34: Enantioselective hydrolysis of a key-lactone involved in the synthesis of the antidepressant milnacipran®. *Tetrahedron letters*, v. 37, n. 26, p. 4519-4522, 1996.

WEISS, R. A. The human immunodeficiency virus: biology, immunology, and therapy. *New England Journal of Medicine Book Review*, p. 347-772, 2002.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L.; FOYE, W. Drug metabolism. In: Principles or medicinal chemistry. Ed. Lippincott, Philadelphia, W.E.W., 2001. Wilkins Publishers 5. ed, p. 174-233.

XIAO-CHI, M. A.; ZHENG, J.; GUO, D. N. Microbial transformation of three bufadienolides by *Penicillium aurantigriseum* and its application for metabolite identification in rat. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 48, p. 42-50, 2007.

ZHAN, J. et al. Microbial transformation of artemisinin by *Cunninghamella echinulata* and *Aspergillus niger*. *Tetrahedron Letters*, v. 43, p. 4519-4521, 2002.

ZHANG, O. et al. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, p. 221-226, 1996.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo