

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

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

**Rafaela Martins Sponchiado**

Porto Alegre  
2019



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

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

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

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr. Cássia Virginia Garcia

Porto Alegre  
2019

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

Profa. Dr. Aline Zimmer

Profa. Dr. Patrícia Gomes

Profa. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

#### CIP - Catalogação na Publicação

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

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

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

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

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



## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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





## APRESENTAÇÃO

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

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



## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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





## LISTA DE ABREVIATURAS

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



## SUMÁRIO

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

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





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

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

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

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

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

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

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



---

## 2. OBJETIVOS

---



## 2.1 Objetivo Geral

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

## 2.2 Objetivos Específicos

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



---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

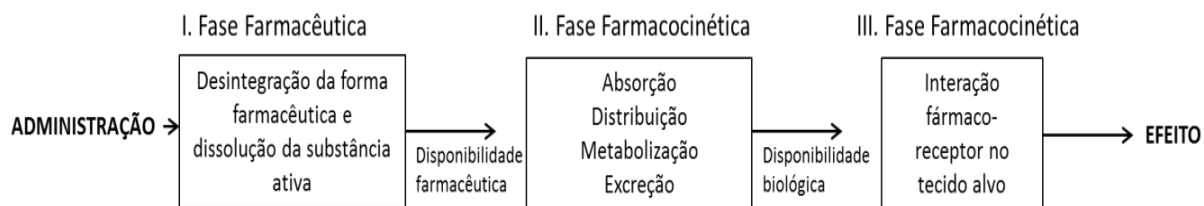


### **3.1 Metabolismo de fármacos**

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

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

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



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

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

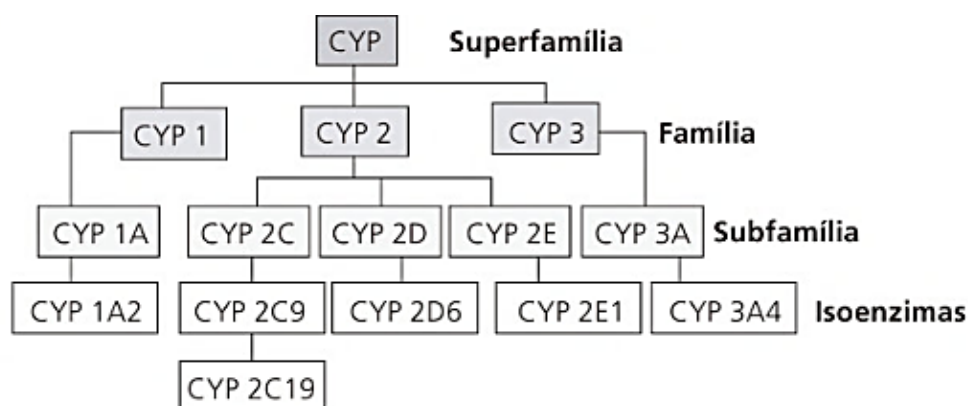
Na fase I, ocorrem reações que aumentam a hidrofiliabilidade dos fármacos pela adição ou exposição de grupos funcionais polares, como grupos hidroxila (-OH), tiol (-SH) ou amina (-NH<sub>2</sub>). Com frequência, esses metabólitos são farmacologicamente inativos e podem ser secretados sem qualquer modificação adicional. Todavia alguns produtos de reações de oxidação e de redução necessitam de modificações adicionais antes de serem excretados. As reações de Fase II, por sua vez, modificam os compostos por meio da ligação de grupos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, criando conjugados mais polares e que são rapidamente excretados pela urina ou nas fezes. Essas reações de conjugação ocorrem independentemente das reações de oxidação/redução e que as enzimas envolvidas nas reações de fase I e II frequentemente competem pelos substratos (LIN e LU, 1997; ISIN e GUENGERICH, 2007).



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

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

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



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

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

número de substratos endógenos e exógenos. A maior parte do metabolismo mediado pelos CYPs é baseado na reação de oxidação-redução, sendo a mono-oxigenação reação básica catalisada por essas enzimas, em que um átomo de oxigênio (derivado do O<sub>2</sub>) é incorporado no substrato, e o outro átomo é reduzido a água com os equivalentes redutores do NADPH (GUENGERICH, 2007).

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

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

O ciclo catalítico básico das enzimas do citocromo P450 envolve diversas etapas, iniciando com a ligação do fármaco ao citocromo P450 oxidado (Fe<sup>3+</sup>). A seguir, o primeiro elétron é transferido à enzima P450 via NADDPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo-P450 redutase, reduzindo o grupo heme ao estado ferroso. Um oxigênio molecular é incorporado ao grupo heme e o segundo elétron é transferido ao átomo de ferro, via NADPH-P450-redutase. A seguir, ocorre a clivagem da ligação O-O e liberação de uma molécula de água. Um complexo FeO<sup>3+</sup> é formado, retirando um átomo de hidrogênio do substrato, seguido de transferência de um átomo de oxigênio ao substrato. Finalmente o produto é liberado e o grupo heme retorna ao estado férrico (FURGE e GUENGERICH, 2006).

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

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

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

### **3.2 Utilização de fungos em processos de biotransformação**

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

Modelos utilizando microrganismos podem constituir uma alternativa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.4 Ambrisentana**

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

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



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

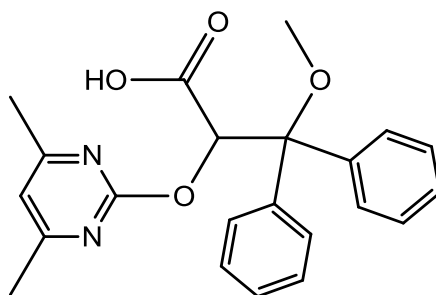
A classificação da doença segundo a OMS tem como objetivo caracterizar o impacto inicial da doença, sua influência nas atividades físicas habituais e servindo também para orientação prognóstica. Assim são classificadas em quatro classes: classe I pacientes que não apresentam sintomas na realização de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

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

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

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

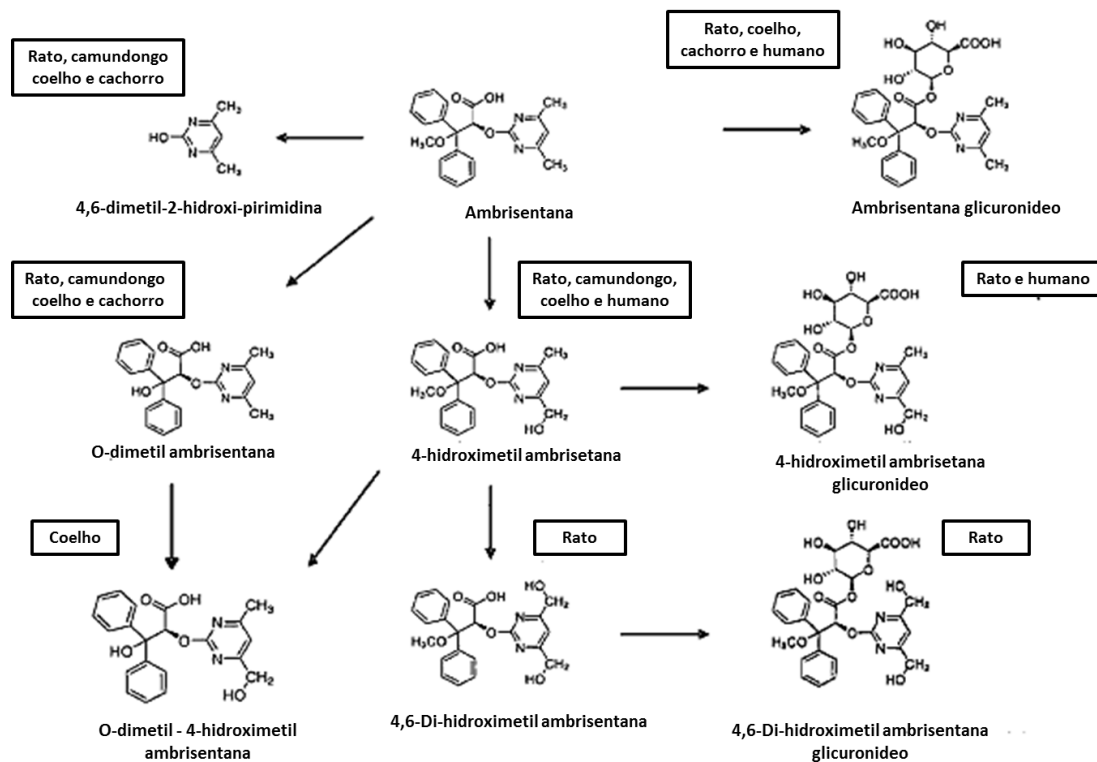
A Ambrisentana, com nome químico (+)-2(S)-(4,6-dimetilpirimidina-2-iloxi)-3-metoxi-3,3- ácido difenilpropionico possui peso molecular de 378,4 gramas/Mol. A estrutura química da ambrisentana está demonstrada na Figura 3 a seguir.



**Figura 3:** Estrutura química da ambrisentana (AMB)

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

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



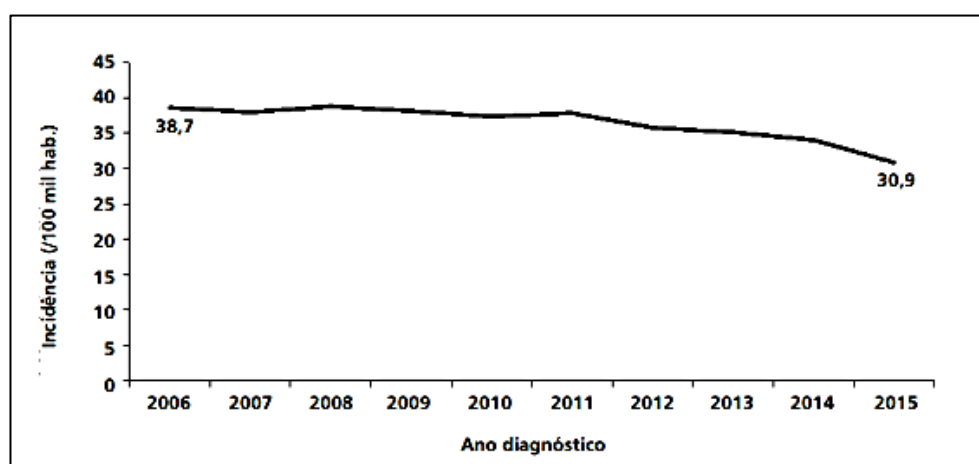
**Figura 4:** Metabólitos da Ambrisentan descritos na literatura identificados em diferentes organismos (Fonte: Melvin *et al.*, 2012).

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

### 3.5 Rifampicina

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

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



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

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

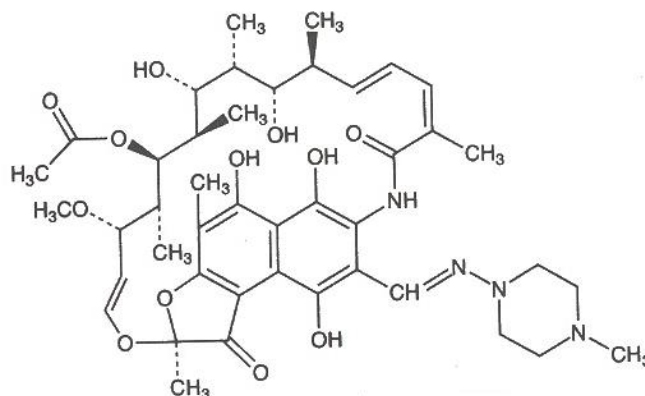
A transmissão direta ocorre pelo ar, quando uma pessoa inala pequenas gotas de saliva, contendo o BK, expelidas por um indivíduo acometido pela TB pulmonar ao falar, tossir ou espirrar. Quando um indivíduo entra em contato com o *M. tuberculosis*, este é fagocitado por macrófagos alveolares e reside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

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

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

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

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

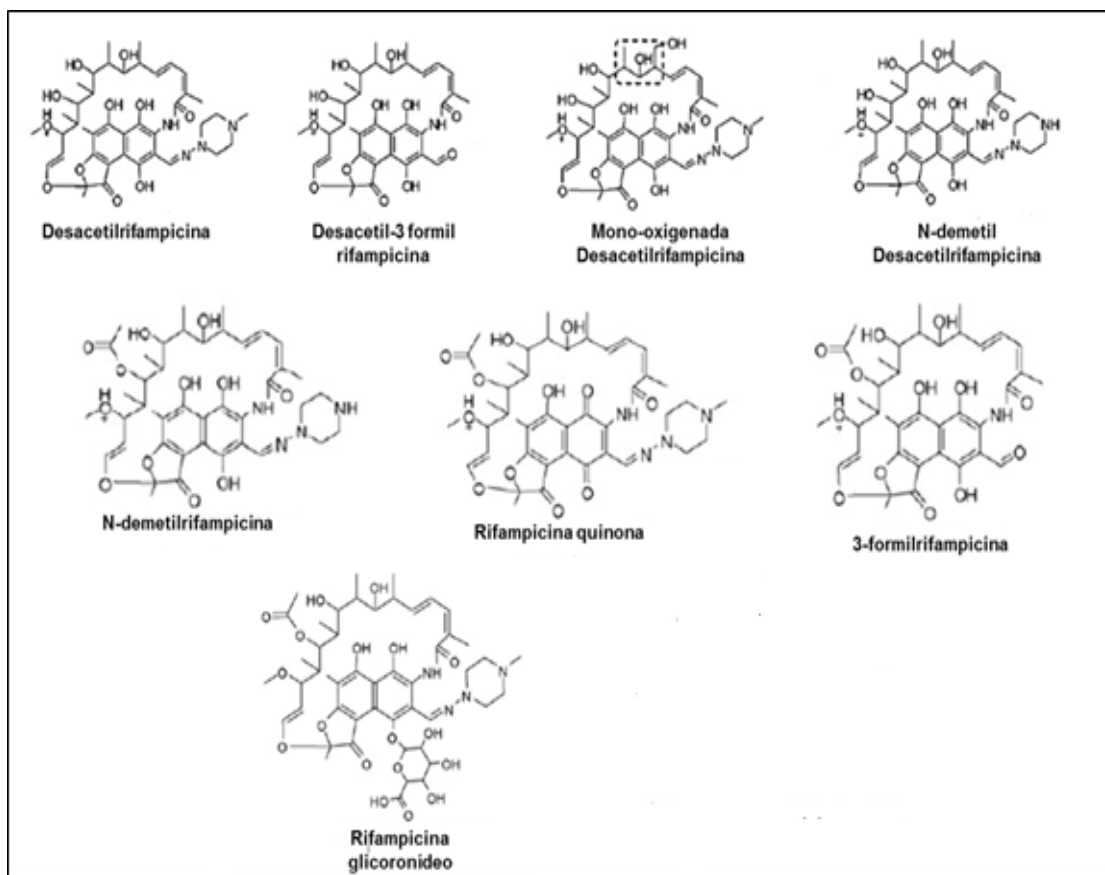


**Figura 6:** Estrutura química da Rifampicina (RIF).

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

A RIF com fórmula molecular  $C_{48}H_{58}N_4O_{12}$ , possui peso molecular de 822,94 gramas/mol. Apresenta-se como um pó cristalino, de cor castanho-avermelhada a vermelho-acastanhada, pouco solúvel em água, álcool e acetona, e solúvel em metanol (FB, 2010).

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



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





---

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

---



## 4.1 Introdução

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

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

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

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

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

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

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

## 4.2 Artigo científico

Publicado no periódico Biomedical Chromatography

### **Microbial transformation of ambrisentan to its glycosides by *Cunninghamella elegans***

Rafaela Sponchiado\*<sup>1</sup>, Julia Medeiros Sorrentino<sup>1</sup>, Natália Olegário<sup>1</sup>, Sendy Sales Oliveira<sup>1</sup>, Leticia Malgarim Cordenonsi<sup>1</sup>, Gustavo Pozza Silveira<sup>2</sup>, Alexandre M. Fuentefria<sup>1</sup>, Andreas S. L. Mendez<sup>1</sup>, Martin Steppe<sup>1</sup>, Cássia V. Garcia<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre-RS, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil.

\*Corresponding author:

Postal address: Avenida Ipiranga 2752, sala 402, CEP 90610-000, Porto Alegre-RS, Brazil. Tel: +55 51 33085214

E-mail address: [rafasponchiado@hotmail.com](mailto:rafasponchiado@hotmail.com) (Rafaela M Sponchiado)

## Abstract

The purpose of this paper is to describe the glycosylation of ambrisentan (AMB) by cultures of *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. AMB is an endothelin receptor antagonist, which is used to treat pulmonary arterial hypertension. Filamentous fungi are morphologically complex and may exhibit different forms depending on species and the nature of the culture medium. Biotransformation study was conducted to investigate the ability of *C. elegans* to metabolize AMB. Parameters were optimized by testing on different culture media and concentrations, pH, drug concentration, static and shaking conditions. Ambrisentan's metabolite, obtained after 240 h of incubation as a result of glycosylation pathway, was separated by HPLC and determined by high-resolution mass spectrometry. The method showed it became linear over 300–1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r = 0.998$ ). Accuracy, precision, robustness, and stability studies agree with international guidelines. Results are consistent in accordance to the principles of green chemistry as the experimental conditions had a low environmental impact, and few solvents use.

**Keywords:** ambrisentan; *Cunninghamella elegans*; biotransformation; glycosylation; mass spectrometry.

## 1. Introduction

Prior to the approval of a new substance for human use, several studies must be performed to prove its efficacy and safety. This includes knowing its target metabolite in the body. Although biotransformation reactions generally lead to their detoxification, sometimes more active substances may be formed than the original compound, or even toxic (Azerad, 1999). Traditionally, drug metabolism studies have relied on the use of animal models. These methods suffer from limitations due to the ethical issues, species variation, and cost of experimental animals. However, *in vitro* and *ex vivo* studies using cell and tissue culture, organ perfusion, and microsomal preparations have been chosen as a complement of animals use (Collins et al., 2001; Sirisilam and Veeresham, 2003).

Biotransformation provides an efficient and environmentally friendly way to produce large-scale metabolites of drugs and is considered an alternative approach to the asymmetric synthesis and conventional *in vivo* and *in vitro* metabolism studies (Pearce and Lushnikova, 2006; Borges et al., 2011). This process is attractive for the synthesis of new drugs, which are required for biological and toxicity tests and analytical standards as well. Biotransformation studies of biologically active compounds through microorganisms, mainly by filamentous fungi, and their possible glycosylated derivatives have been extensively investigated because biotransformation usually shows advantages such as one-step simple reaction and eco-friendly production. *Cunninghamella* is a genus of filamentous fungi that has frequently been proposed for glycosylation reactions and it is a very interesting tool in the production of molecules with improved pharmacological profiles (Mukhopadhyay et al., 2004; Miyakoshi et al., 2010; Lustosa et al., 2010; Shao-Hua et al., 2015).

Ambrisentan (AMB) is a highly selective endothelin-1 type A receptor antagonist which is indicated for the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH) (Casserly and Klinger, 2008). PAH is a chronic progressive disease characterized by an increasing in the pulmonary vascular

resistance of lungs, intimal hyperplasia, and smooth muscle cell hypertrophy (Galié et al., 2005; Barst, 2007): AMB is absorbed with peak concentrations occurring approximately after 2 hours of oral administration in healthy individuals and PAH patients. It is a substrate for P-glycoprotein, being about 99.0% bound to plasma protein. It is primarily eliminated by nonrenal pathways (77%), mostly via glucuronidation. *In vitro* data indicate that the metabolism of AMB is performed by cytochrome P450 (CYP) 3A4 and 2C19 isozymes, as well as by strong inhibitors of P-glycoprotein (Letairis., 2016). They are currently the most frequently prescribed group of drugs for the control of pulmonary arterial hypertension. Until now, there have been no reports in the literature of metabolism studies by fungi filamentous performed with AMB. This approach may contribute to a better understanding of the human metabolism of AMB and to produce new derivatives.

This study aimed to perform the capacity of evaluating of AMB to be metabolized by the fungus *C. elegans* ATCC 9245 as microorganism model. Furthermore, liquid chromatography method was developed and validated for AMB analysis in liquid culture medium.

## **2. Materials And Methods**

### *2.1 Chemicals*

AMB was obtained from BOC Sciences (98%, USA). Dichloromethane was purchased from Dinâmica (Diadema, Brazil) and *N,N*-dimethylformamide bought from Labsynth (Diadema, São Paulo). Methanol and acetonitrile of HPLC grade were purchased from Merck ([New Jersey, USA](#)) and Vetec (São Paulo, Brazil), respectively. Czapek broth Sabouraud dextrose agar was obtained from Kasvi (Paraná, Brazil). Water was purified by a Milli-Q system Millipore (Molsheim, France).



## 2.2 Microorganism

Stock cultures of *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 were cut in discs of 0.5 cm of diameter and maintained on sterile sodium chloride 0.9% (w/v) at 5 °C and transferred every 6 months to maintain viability.

## 2.3 Biotransformation procedures

Spore solutions of *C. elegans* were prepared by growing the fungi for 72 hours at 28 °C in tubes containing a sabouraud dextrose agar. Fungal spore suspension with  $10^8$  spores/mL (2 mL) was inoculated in a 100 mL of Czapek culture medium and cultivated for 72 hours at 28 °C in an orbital shaker (New Brunswick™ Innova® 2300) at 120 rpm. The substrate (200 mg), which was previously solved in *N,N*-dimethylformamide:ethanol (1:1, v/v) was added into each flask to give the final AMB concentration of  $666.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The cultures were incubated at 28 °C, shaking at 120 rpm, for 240 h. Every 48 hours, a 2 mL aliquot of the liquid culture medium was aseptically collected in triplicate and the substances were immediately extracted. Three kinds of controls were conducted simultaneously with the biotransformation procedure. Culture controls consisting of a blank (culture broth). The microorganisms without AMB (positive control: C+), were operated to eliminate the interference possibly brought by the microorganism itself or residues of the fermentation cultures. The substrate controls were prepared by adding AMB to sterile medium and incubated without the microorganism (negative control: C-) to determine whether AMB could chemically degradate or spontaneously be transformed under fermentation conditions.

To determine optimal conditions for biocatalysis, some conditions were optimized: two culture media (potato and czapek-dox broth) were tested at six pH values (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, and 9.0) and four AMB concentrations (50, 130, 260, and  $666.6 \mu\text{g/mL}$ ). Besides, shaken and static conditions were evaluated.

#### *2.4 Extraction procedure and quantitative analysis by Liquid Chromatographic*

All analytes were removed from the Czapek culture medium by liquid-liquid extraction procedure. Aliquots of 2 mL of samples obtained from the biotransformation reaction (BIO), C -, C+, and W were extracted three times with 4 mL of dichloromethane by shaken vigorously. The organic phase (12 mL) was separated and the solvent evaporated to dryness in exhaust hood at room temperature. The resultant residues were dissolved in 2 mL methanol:water (80:20, v/v), filtered and 30  $\mu$ L analyzed by liquid chromatography.

#### *2.5 Quantitative analysis by Liquid Chromatographic*

Liquid chromatographic analyses were conducted in a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AT pump, SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector (254 nm), DGU-20A5 degasser, CBM-20A controller system, and SIL-20A injection valve with 100  $\mu$ L loop. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.) and C8 guard column (4 x 3.0 mm; Phenomenex, USA) were kept at 40 °C. Methanol:water (80:20, v/v), 0.1% trimethylamine and 0.1% formic acid in isocratic mode, at 0.8 mL/min flow rate was chosen as mobile phase.

#### *2.6 Identification of biotransformation products by UHPLC-MS/MS*

A Nexera x2 UHPLC Shimadzu instrument with 6400 Series triple quadruple mass spectrometer system equipped with an electrospray ionization (ESI) source in positive ion mode (ESI+) was used for identification of metabolites of AMB. Substances were separated by reversed-phase UHPLC on a Shim-pack XR-ODS III column (50 mm x 2 mm; particle size 1.6  $\mu$ m). The mobile phase consisted of methanol: water (35:65, v/v) with formic acid 0.1%. The injection volume was 5  $\mu$ L, the solvent flow rate was 0.2 mL/min. Capillary and end plate offset voltages were set at 4500 and 500V, respectively. Solvation gas flow was maintained at 10 L/min with desolvation gas

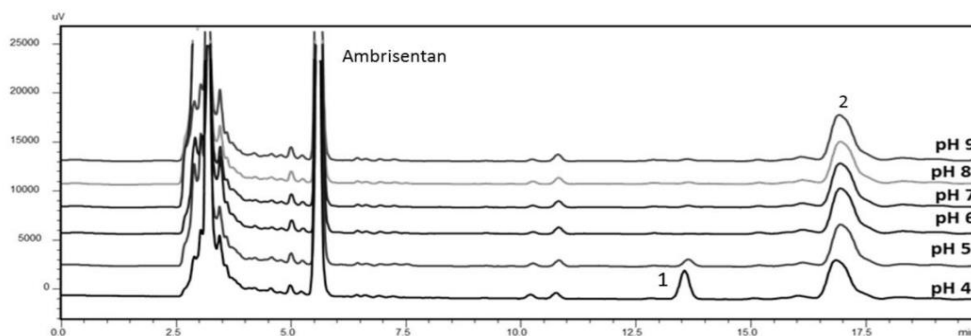
temperature at 200 °C. Mass spectra were recorded by full scan mode ranging 50 to 1200 m/z. After 240 h of experiment, aliquots of BIO, C- , C+, and W were collected, extracted, and analyzed by UHPLC-MS/MS.

### **3. Results**

#### *3.1 Optimization of biotransformation study*

Culture medium was investigated in the present study to check if substances present in each medium would interfere with metabolites identification after extraction. Then, fungal growth was observed at potato broth (infusion of potatoes 200 g/L, glucose 20 g/L, and water, pH 5.0) and Czapek-Dox medium (Sodium nitrate 2.0 g/L, Magnesium Sulphate 0.5 g/L, Potassium Chloride 0.5 g/L, Di Potassium Phosphate 1.0 g/L, Ferrous Sulfate 0.01 g/L and Sucrose 30 g/L, pH 7.0). A high number of interfering signals were observed in the analysis during the liquid chromatography using 100% potato medium or 50% compared to the Czapek medium. In the same way, the formation of the metabolite was not noticed in potato medium being just detected in Czapek which was decisive to choose Czapek medium to run the study.

The effect of the medium-hydrogenionic concentration was investigated to identify the most suitable pH to favor the biotransformation. AMB can degrade in acidic media resulting in side products (Ramiseti and Kuntamukla, 2014). Thus, analyzes were performed in the pH range of 4–9. Results indicated the range optimum pH is 6.0-9.0 to the present biotransformation (Figure 1), once the AMB remains stable. Most fungi tolerate wide variations of pH, however metabolomics-capacity is favored at 5–7 pH-range. Hence, pH 6 was chosen for the study since side products were not noticed and interfered at fungal growth.



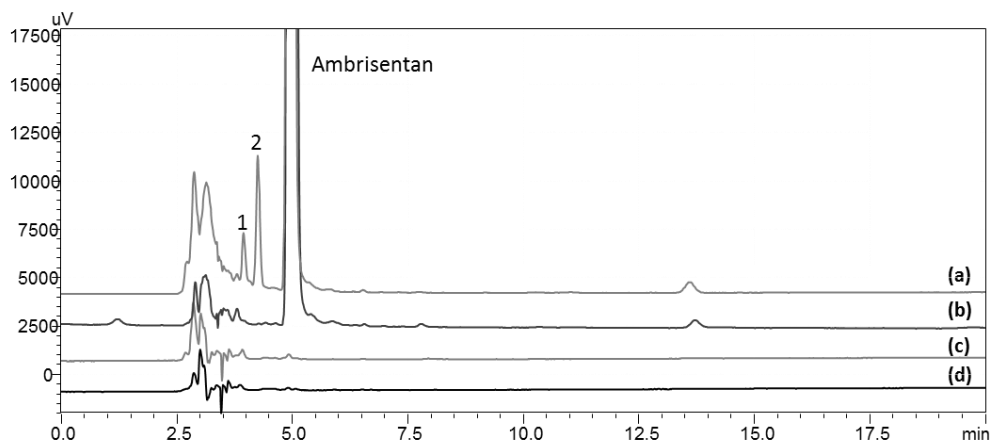
**Figure 1:** Representative chromatograms of drug evaluation stability with broth pH modification.

Static and shaken conditions were evaluated to identify the best condition of metabolite formation. The best condition that was defined for the study was to maintain shaken condition at 120 rpm, for the reason that in this condition metabolites were observed.

### 3.2 Fungal biotransformation study

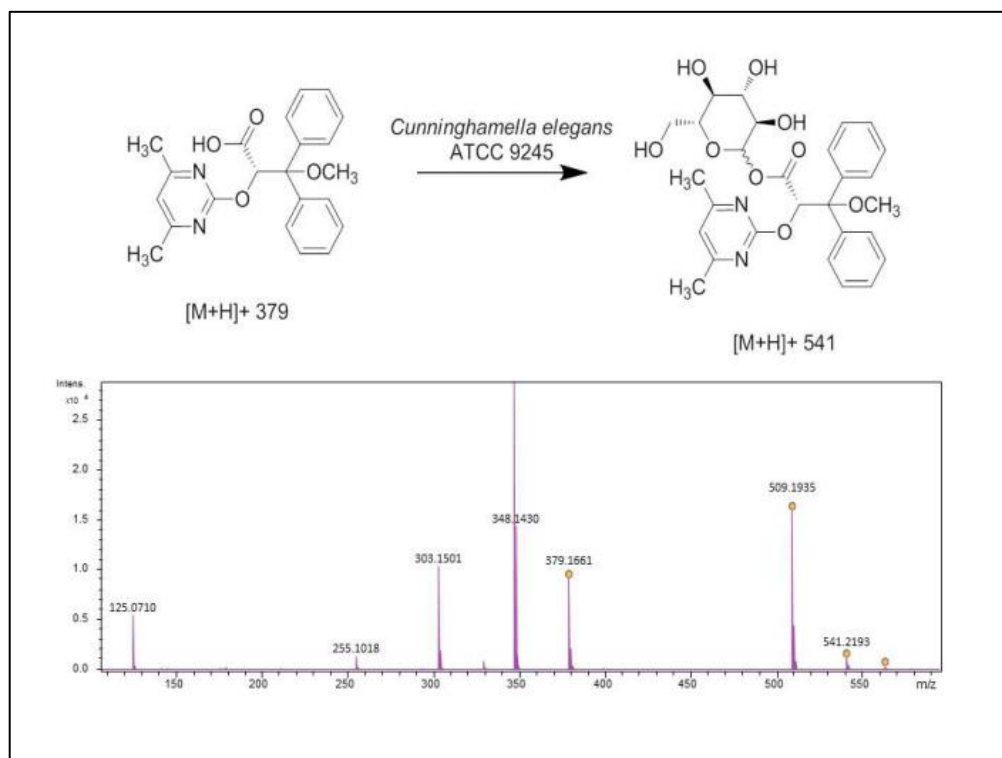
Therefore, the biotransformation of AMB by this fungus was followed by 10 days. Aliquots were collected every 48 h and analyzed by the liquid chromatograph method. After liquid-liquid extraction and analysis, the analyte concentrations were obtained.

The biotransformation process showed to be slow since the formation of the metabolite started after the tenth day of reaction under the conditions optimized. The chromatograms obtained by HPLC analysis showed the production of one metabolite (Figure 2, peak 1). A more polar substance was eluted (4.25 minutes) before than the AMB (4.98 minutes).



**Figure 2:** Chromatogram of the specificity study (a) biotransformation of AMB by *Cunninghamella elegans* after 240 h of incubation; (b) sterile medium plus AMB (c) culture medium in the presence of fungi (d) culture medium.

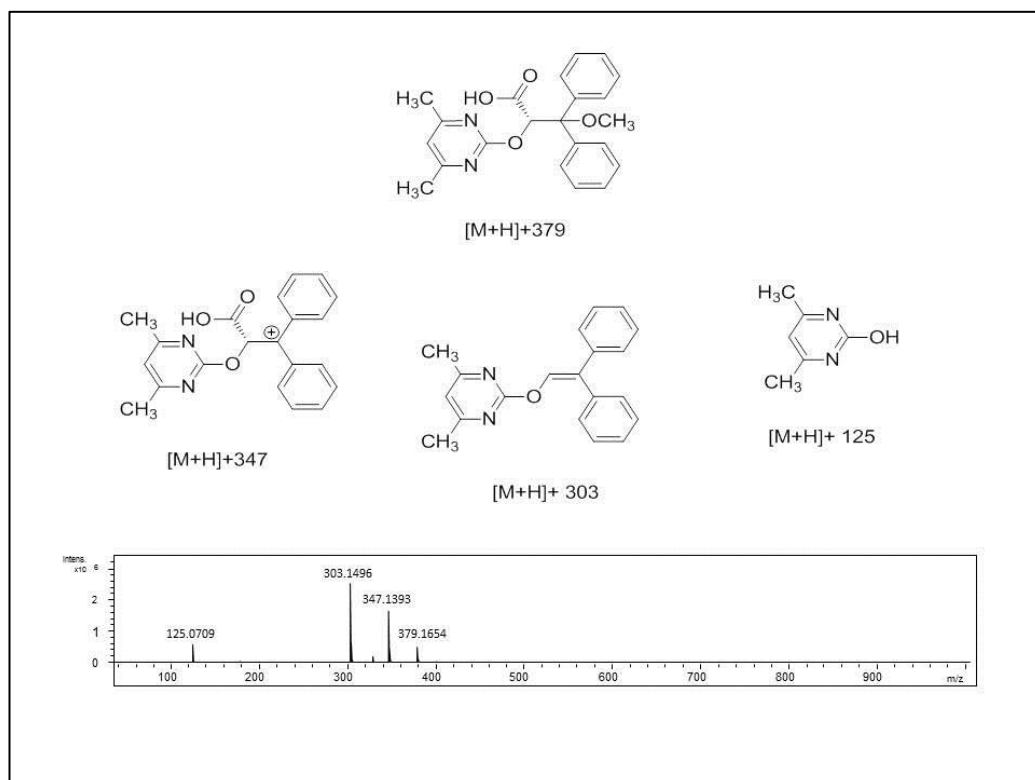
In order to elucidate the structures of metabolites through the mass spectra, the cleavage pathways of AMB were studied first. The metabolites were analyzed by UHPLC-MS. The mass spectrum in positive mode to the new substance presents a molecular ion at MS  $m/z$  541.2193 ( $M^+$ ), corresponding to the  $(M+H)^+$  ion. Considering the mass difference between the standard and the new molecule (162  $m/z$ ) we observed a fragmentation related to glucoside conjugated ( $C_{28}H_{33}N_2O_9$ ) in the molecule of AMB with consequent loss of one hydrogen atom of the drug molecule (Figure 3). These results corroborate with the findings by Lustosa et al (2012), which performed biotransformation by *Cunninghamella echinulata* and identified entacapone glycoside with a mass difference of  $m/z$  162 for the standard structure. These outcomes suggest the incorporation of a glycoside molecule into ambrisentan. The yield was approximately 0.54%, based on peak area normalization. However, it is a preliminary result, on a small scale, since the objective of the study was to follow the biotransformation by fungus in a qualitative aspect.



**Figure 3:** Mass spectrum and structure to the metabolite obtained by the biotransformation of ambrisentan by *C. elegans*.

The identification of AMB was confirmed by comparison of the retention time (Figure 2) and mass spectra with the authentic reference. The compound eluting at 4.98 min was identified as ambrisentan. UHPLC-MS/MS spectra of AMB and proposed fragmentation of their molecular ions are shown in Figure 4. Precursor ion can be observed in the mass spectrum with MS  $m/z$ : 379.1654 ( $M^+$ ) and major fragments there of MS  $m/z$ : 347.1393 and 303.1492. These results are as expected for this molecule (Nirogi et al., 2012).

The analytical method was validated (data not shown).



**Figure 4:** UHPLC-MS/MS spectra of AMB, and the proposed fragmentation patterns of their molecular ions.

#### 4. Discussion

We reported a successful biotransformation of ambrisentan by *C. elegans* ATCC 9245 in this study. This fungus demonstrated its potential to metabolize AMB to metabolite glucoside ambrisentan.

Several studies have demonstrated the ability of fungi *Cunninghamella elegans* to metabolize different classes of drugs and to generate metabolites using mechanisms similar to the reactions that occur via mammalian cytochrome P450 (CYP450) complex (Moody et al, 2002; Pearce and Lushnikova, 2006; Asha and Vidyavathi, 2009).

Filamentous fungi are morphologically complex microorganisms, exhibiting different structural forms throughout their life cycle. Several parameters related to the culture medium affect the fungi morphology during

the process of fermentation, among them: speed of culture medium shaking, amount of oxygen solved, fungi concentration into the medium, pH, temperature, traces of minerals, nitrogen, phosphate, etc. The fungi growth morphology affects nutrient consumption and oxygen uptake rate. This may have a significant effect on the rheology of the fermentation broth altering the biocatalysis performance (Pazouki and Panda, 2000; Papagianni, 2004).

Stirring allowed fungi to grow in pellets which are advantageous for biocatalysis since the medium becomes less viscous and can be easier aerated. Besides, small pellets led to higher oxygen and nutrients diffusion (Pazouki and Panda, 2000; Posch et al., 2013). The optimization of the biocatalysis study is of great importance since many factors can affect the performance of the microorganism. In this way, it is relevant to define the optimum conditions of fermentation to guarantee the maximum performance of the fungus under study.

After several tests, it was defined that the best performance for biocatalysis with *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 was using Czapek-Dox medium with pH adjusted to 6.0, under agitation conditions of 120 rpm at a controlled temperature of 28 °C.

The transformation of ambrisentan by *C. elegans* furnished one major glycosylated derivatives that had not been described in the literature before. The metabolism of AMB is established in humans and animals (Melvin et al., 2012). However, AMB-metabolites produced by *Cunninghamella elegans* are unknown. After 10 days, the biotransformation sample was analyzed and AMB and trace amounts of metabolite were detected. Based on the above results, from HPLC and UHPLC-MS/MS, it was found that the *Cunninghamella elegans* converted AMB to glucoside ambrisentan by hydrolysis. This glycosylation reaction occurs on hydroxyl group, carboxylic acid and free sulfhydryl groups, and is catalyzed by UDP-glycosyltransferase. Glycosylation is a reaction that deserves special attention in this context. This is because microorganisms appear to conjugate D-glucose to glucuronidation sites in mammals, resulting in phase II metabolites (Azerad, 1999). Hydrolysis of a hisperidine, a flavonoid,



and its active metabolite hesperitine by *Cunninghamella elegans* was also reported by Swathi et al. (2012).

The use of a microbial model for biocatalysis of drugs has the advantage of reducing the demand of animals, especially in the early stages of drug development. In addition, it offers a number of advantages over the use of animals in a metabolism study, such as (1) being simple and easy, being able to prepare at a low cost; (2) the possibility of screening a large number of strains; (3) useful in cases where regional and stereospecificity are necessary; (4) maintenance of micro-organism cultures is simpler and cheaper than cultures of cells or tissues or laboratory animals; (5) ease of handling (Asha e Vidyavathi, 2009).

The use of fungi is advantageous since they present a fast growth and because of the easy formation of the multienzymatic system. In addition, biotransformation is considered by synthetic organic chemicals as an economical and competitive technology, in search of new routes of production of chemical and pharmaceutical products (Borges et al., 2007).

*Cunninghamella* is a genus that has frequently been proposed for glycosylation reactions and it is a very interesting tool in the production of molecules with improved pharmacological profiles. It was suggested that the conversion based on microbial specific reactions was useful for the production of new AMB derivatives (Miyakoshi et al., 2010; Lutosa et al., 2012).

Many fungal species may give several types of phase II metabolites (conjugates), including glycoside (Sun et al., 2004; Keum et al., 2009). In general, glucosides were the most commonly found phase II metabolites in fungal xenobiotic metabolism. The glycoside is likely obtained through the action of fungal glucosidases in a direct reaction on a primary or secondary alcohol as the nucleophile (Faber and Faber, 1992). Chemical reactions, such as glycosylation reactions may be difficult, involving various stages of protection and de-protection, considerably reducing efficiency (Mukhopadhyay et al., 2004).

The formation of metabolites in biotransformation processes requires a careful monitoring that must be performed through the execution of analytical

techniques capable of characterizing and measuring the contents of the analyzed analytes. For this, the development of analytical methods with characteristics suitable for each study drug is essential. The analytical method in HPLC analysis was validated. The parameters recommended by official guides were evaluated: specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and stability of the drug (FDA, 2001; EMA, 2011).

## **5. Conclusions**

The biotransformation of ambrisentan by *C. elegans* ATCC 9245 furnished one major glycosylated derivatives that had not been described in the literature before. Microorganisms can be seen as a reliable and efficient alternative to the employment of small animals or synthetic chemistry for obtaining sizable amounts of a number of drug derivatives. It demonstrates the importance and necessity of investment in these studies involving filamentous microorganisms. Thus, the models can be scaled up easily for the preparation of metabolites for structure confirmation by NMR and further pharmacological and toxicological studies. The proposed analytical methodology is sensitive, accurate, precise, and robust for the detection and quantification of AMB in complex matrix, being in accordance with international standards.

## **Acknowledgements**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Microorganism *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 was donated by the Bioconversion laboratory, Goiás Federal University, Goiânia, Brazil.

## References

Asha S., Vidyavathi M. (2009). *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism studies - a review. *Biotechnology Advanced*, 27, 16-29.

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

Barst R. J. (2007). A review of pulmonary arterial hypertension: role of ambrisentan . ***Vascular Health Risk Management***, 3, 11-22.

Borges K. B., Oliveira A. R. M, Barth T., Jabor V. A. P, Pupo M. T., Bonato P. S. (2011). LC–MS–MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 399, 915-925.

Borges K.B., Borges W.D.S., Pupo M.T., Bonato P.S. (2007). Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 669-679.

Casserly B., Klinger J. R. (2008). Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Desing Development Therapy*, 2, 3010-3019.

Collins D.O., Buchanan G.O., Reynolds W.F., Reese P. B. (2001). Biotransformation of squamulosone by *Curvularia lunata* ATCC 12017. *Phytochemistry*, 57, 377-383.

EMA European Medicines Agency. (2011). Guideline on bioanalytical method validation.

Faber, K., Faber, K. (1992). *Biotrasformation in organic chemistry*. (4th ed.). Berlim, Springer-Verlag.

FDA Food and Drug Administration, (2001). Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.

Galié N., Badesch D., Oudiz R., Simonneau G., Mcgoon M. D., Keogh A.M., Olschewski H. J. (2005). Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Journal of American College of Cardiology*, 46, 529-535.

Keum Y.S., Lee Y.H., Kim J.H. (2009). Metabolism of methoxychlor by *Cunninghamella elegans* ATCC36112. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 7931–7.

Letairis: ambrisentan. Foster City, California: Gilead Sciences. <[http://www.gilead.com/~media/files/pdfs/medicines/cardiovascular/letairis/letairis\\_pi.pdf](http://www.gilead.com/~media/files/pdfs/medicines/cardiovascular/letairis/letairis_pi.pdf) , 2015», cited 10 November, 2016.

Lustosa K. R. M. D., Menegatti R., Braga R. C., Lião L. M., Oliveira V. (2012). Microbial  $\beta$ -glycosylation of entacapone by *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 611-613.

Melvin L. S., Ullrich M., Hege H. G., Weymann J., (2012). U.S. Patent 8,217,155 B2.

Miyakoshi S., Azami S., Kuzuyama T. J. (2010). Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 320-321.

Moody J.D., Freeman J.P., Fu P.P., Cerniglia C.E. (2002). Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 30, 1274-1279.

Mukhopadhyay B., Kartha K. P. R., Russell D. A., Field R. A. J. (2004). Streamlined synthesis of per-Oacetylated sugars, glycosyl iodides, or thioglycosides from unprotected reducing sugars. *Organic Chemistry*, 69, 7758-7760.

Nirogi R., Kandikere V., Komarneni P., Aleti R., Padala N., Kalaikadhiban I. (2012). LC-ESI-MS/MS method for quantification of ambrisentan in plasma and application to rat pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 26, 1150–1156.

Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advanced*, 22, 189-259.

Pazouki M., Panda T. (2000). Understanding the morphology of fungi. *Bioprocess Engineering*, 22, 127-143.

Pearce C. M., Lushnikova M. V. J. (2006). Microbiological production of omeprazole metabolites by *Cunninghamella elegans*. *Molecular Catalysis B Enzymatic*, 41, 87-91.

Posch A. E., Herwig C., Spadiut O. (2013). Science-based bioprocess design for filamentous fungi . *Trends in Biotechnology*, 31, 37-44.

Ramisetti N. R., Kuntamukkala R. (2014). LC-MS/MS characterization of forced degradation products of ambrisentan: development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method. *New Journal of Chemistry*, 38, 3050-3061.

Shao-Hua X. U., Chen-Hui D. U., ZHANG J., Bo-Yang Y. U. (2015). Glycosylation and sulfation of emodin by *Gliocladium deliquescens* NRRL 1086. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13, 796-800.

Srisilam K., Veeresham C. (2003). Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. *Biotechnology Advanced*, 21, 3-39.

Sun L., Huang H.H., Liu L., Zhong D.F. (2004). Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. *Applied on Environmental Microbiology*, 70, 2722–2727.

Swathi, D., Bandlapalli, S., Vidyavathi, M. (2010). Biotransformation of hesperidine to hesperitine by *Cunninghamella elegans*. *Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research*, 5, 174-178.



---

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

---





## 5.1 Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

O trabalho está disposto na forma de artigo científico.

## 5.2 Artigo científico

Artigo submetido ao periódico Journal of Pharmaceutical Analysis

### **Rifampicin: biotransformation study using the fungus *Cunninghamella elegans* and monitoring through UHPLC-MS**

Rafaela M. Sponchiado<sup>1\*</sup>. Julia Sorrentino<sup>1</sup>. Leticia M. Cordenonsi<sup>1</sup>. Alexandre M. Fuentefria<sup>1</sup>. Martin Steppe<sup>1</sup>. Andreas Mendez<sup>1</sup>. Cássia V. Garcia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Rafaela Martins Sponchiado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia. Av. Ipiranga, 2752, sala 402. Santana. Porto Alegre/RS, CEP 90610-000, Brazil. Phone number: 55 (51) 3308-5214. E-mail address: [rafasponchiado@hotmail.com](mailto:rafasponchiado@hotmail.com)

## **Abstract**

The fungus *Cunninghamella elegans* was used as a microbial model of mammalian metabolism to biotransform the semisynthetic macrocyclic antibiotic rifampicin (RIF). In 120 h, *C. elegans* transformed the drug into the following two metabolites: rifampicin quinone and novel metabolite. The products of rifampicin formed *in vitro* were monitored by HPLC-PDA, being identified through UHPLC-QTOF/MS. Metabolites were characterized according to their chromatographic profile, mass fragments and UV spectral data. The major metabolic pathways of rifampicin transformed by the fungus were oxidation, demethylation and mono-oxidation. The microbial transformation of RIF showed the potential of *Cunninghamella* species to produce RIF metabolites. This process can be used for a cost effective method for both known and unknown metabolite production.

**Keywords:** biotransformation; metabolite; rifampicin; *Cunninghamella elegans*; UHPLC-MS.

## 1. Introduction

Rifampicin (RIF), a semisynthetic macrocyclic antibiotic, is widely used in the treatment of tuberculosis and staphylococcal infection. RIF acts by binding to the bacterial RNA polymerase which consequently blocks the synthesis of the bacterial RNA messenger [1]. RIF is well absorbed orally being widely distributed in body tissues and fluids. Its metabolism in humans occurs in the liver by the cytochrome P450 resulting in the active metabolite 25-desacetyl rifampicin among other molecules [2,3]. This drug has peculiar pharmacokinetic properties. It is readily absorbed in the gastrointestinal tract and may have this profile modified in the presence of food. It has a high binding rate to plasma proteins and is widely distributed in tissues and body fluids [4].

Microbial transformation has been used as a simple methodology for *in vitro* drug metabolism studies [5]. Biotransformation using microorganisms offers the opportunity to help elucidating biosynthetic pathways, anticipate mammalian metabolism, and toxicity [6]. Additionally, biotransformation reaction technology is considered to be an alternative for the development of sustainable technologies for the production of chemicals and drugs using principles of green chemistry [7]. Biotransformation products can be labelled as 'natural' according to US and European [8].

*Cunninghamella*, a filamentous fungus, is considered one of the most important microorganisms for biotransformation studies since it can catalyze several reactions to various classes of compounds. Studies have demonstrated the ability of this fungus to metabolize a wide variety of drugs by mechanisms which are similar to what is observed during Phase I and II metabolism of mammals [9-12]. *C. elegans* carries at least one gene coding for a CYP enzyme closely related to the CYP51 family. These enzymes produce metabolites in amounts which allow the isolation of the same compounds generated by humans and animals metabolism. Besides, novel *C. elegans* metabolites presenting pharmacological interest also can be isolated [13,14].

The aim of the present work was to evaluate the formation of metabolites of rifampicin using filamentous fungi *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. UHPLC–QTOF/MS was used for analysis and prediction of the chemical structure of the metabolites in the sample.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Chemicals and reagents

RIF (purity  $\geq 95\%$ ) was donated (Pernambuco Federal University, Brazil). Rifampicin quinone (purity  $\geq 99.99\%$ ) United States Pharmacopeia (USP) reference standard was purchased from USP. Dichloromethane was purchased from Dinâmica (Diadema, Brazil) and *N,N*-dimethylformamide from Labsynth (Diadema, São Paulo). Methanol, acetonitrile, and ethanol of HPLC grade were purchased from Merck (New Jersey, USA), Vetec (São Paulo, Brazil), and Panreac (Barcelona, Spanish), respectively. Czapek-Dox broth and sabouraud dextrose agar were obtained from Kasvi (Paraná, Brazil). Water was purified by a Milli-Q system Millipore (Molsheim, France).

### 2.2 Microbial Culture and Biotransformation Conditions

*Cunninghamella elegans* ATCC 9245 was donated by the Bioconversion laboratory, Goiás Federal University, Goiânia, Brazil. Stock cultures were cut in discs of 0.5 cm of diameter and maintained on sterile sodium chloride 0.9% (w/v) at 5 °C.

Spore solutions of *C. elegans* were prepared by growing the fungi for 3 days at 28 °C in tubes containing a sabouraud dextrose agar. 100 mL of a Czapek-Dox liquid medium diluted to 50% (Sodium nitrate 1.0 g L<sup>-1</sup>, Magnesium Sulphate 0.25 g L<sup>-1</sup>, Potassium Chloride 0.25 g L<sup>-1</sup>, Di Potassium Phosphate 0.5 g L<sup>-1</sup>, Ferrous Sulfate 0.005 g L<sup>-1</sup>, and Sucrose 15 g L<sup>-1</sup>, pH 7.0), with 10<sup>16</sup> spores mL<sup>-1</sup> of strain inoculated for 3 days at 28 °C in an orbital shaker (New Brunswick™ Innova® 2300) at 120 rpm. Then, the substrate (250 mg), which

was previously solved in *N,N*-dimethylformamide:ethanol (1:1 v/v) was added into each flask to give the final RIF concentration of 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The cultures were incubated at 28 °C, shaking at 120 rpm, for 120 h. Samples (2 ml) of the liquid culture were periodically (1, 3, 4 and 5 days) withdrawn from each culture and extracted three times successively with dichloromethane (4 mL). Each extract was separately evaporated to dryness in exhaust hood at room temperature. The residues obtained were dissolved in 2 mL acetonitrile:water (1:1), filtered and 25  $\mu\text{L}$  analyzed by liquid chromatography. Control flasks consisted of culture broth without RIF (positive control: C+), only sterile medium with RIF (negative control: C-), and culture broth (blank: W). Control flasks were included in the HPLC analysis.

### *2.3 Instrumentation and HPLC conditions*

For characterization of metabolites, an HPLC method was first developed and validated (data not shown) followed international guidelines. Liquid chromatographic analyses were conducted on a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AT pump, SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector, DGU-20A5 degasser, CBM-20A controller system, and SIL-20A injection valve with 100  $\mu\text{L}$  loop. Phenomenex C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4.6 mm i.d.) and C8 guard column (4 x 3.0 mm; Phenomenex, USA) were kept at 30 °C using a mobile phase consisting of a mixture of ammonium acetate 0.01M, pH 4.0 and acetonitrile (50:50, v/v) at a flow rate of 1.0  $\text{mL min}^{-1}$  with UV detection at 254 nm.

### *2.5 Identification of metabolites: LC-QTOF/MS analysis*

The structural elucidation of the metabolites formed was performed through the UHPLC-QTOF/MS system, UHPLC (Shimadzu-Nexera x2) equipped with a Shin-pack XR ODS III column (2.0 mm x 50 mm, 1.6  $\mu\text{m}$ ) from Shimadzu coupled to the QTOF-MS mass analyzer (Impact II, Bruker

Daltonics). The QTOF-MS system was equipped with an electrospray ionization (ESI) source, operating in positive ionization mode. The mobile phase consisted of acetonitrile and ammonium acetate 0,001M pH 4.0. The operation parameters of ESI were the following: capillary voltage, 4000 V; end plate offset, 500 V; nebulizer pressure, 4 bar (N<sub>2</sub>); drying gas, 0.28 L min<sup>-1</sup> (N<sub>2</sub>); and drying temperature, 200 °C. The QTOF-MS system was operating in broadband collision-induced dissociation (bbCID) acquisition mode and recorded spectra over the range *m/z* 50–1000 with a scan rate of 2 Hz. A QTOF-MS external calibration was performed before each injection with a sodium formate solution. Data treatments were processed with Data Analysis 4.2 Software.

After 120 h of experiment, aliquots of biotransformation medium (drug, fungus, and medium: BIO), C<sup>-</sup>, C<sup>+</sup>, and W were collected, extracted, and analyzed by UHPLC-QTOF/MS.

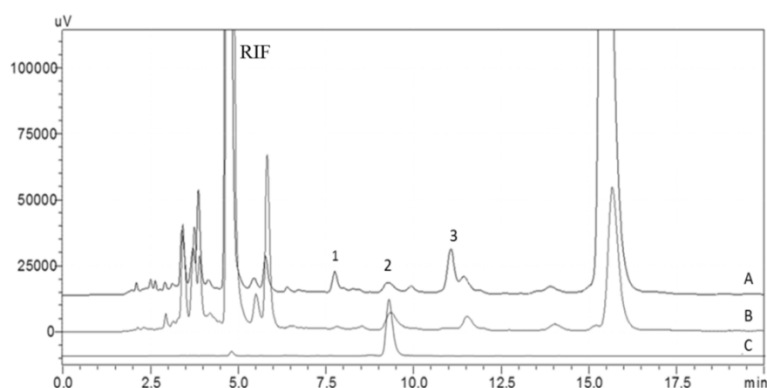
### 3. Results and Discussion

Few information regarding the chromatographic analysis of RIF metabolites *in vivo* and *in vitro* are known. Prasad and Singh (2009) studied the biotransformation of rifampicin *in vitro* (rat liver S9 fraction and microsomes) and *in vivo* (Sprague–Dawley rats). A total of 21 metabolites were identified, among them 3-formylrifamycin, rifampicin quinone and desacetylrifampicin.

A representative HPLC–PDA chromatogram of rifampicin and its metabolites after 120 hours of transformation by *C. elegans* is shown in Fig. 1. The substrate controls showed there were no interference signals with the formed metabolites and the drug. The results of HPLC–PDA analyses indicated that RIF was metabolized in the biotransformation medium. It is possible to observe the RIF standard in 5.0 min, and RIF quinone in 9.5 min (Fig 1, peak 2), which was confirmed by injection RIF quinone standard plus Czapek-Dox medium. Furthermore, in biotransformation medium (Fig 1A)

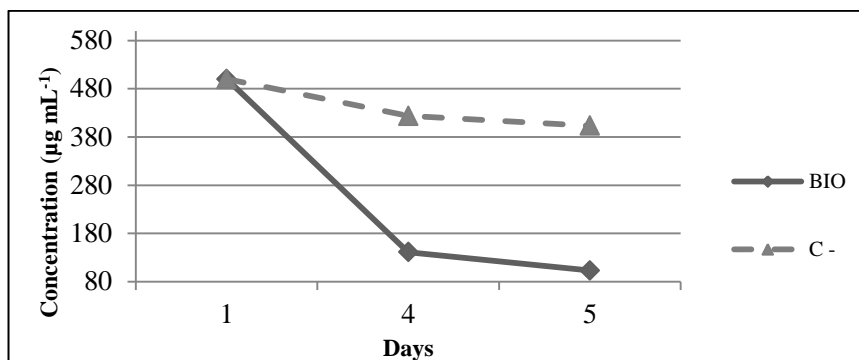


another two peaks were detected, which can be related to possible metabolites (Fig 1; peaks 1 and 3).



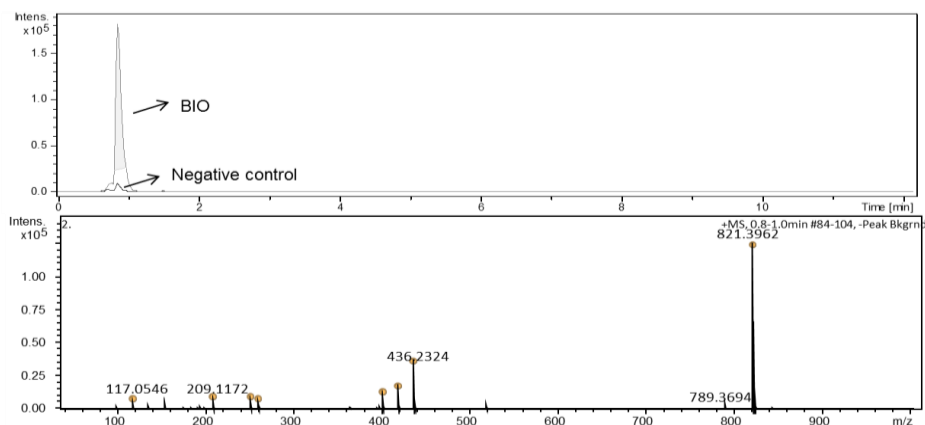
**Figure 1:** Chromatographic profile (HPLC-DAD) of reactional medium after 120h. Chromatographic conditions: isocratic elution by using acetonitrile and buffer (ammonium acetate 0.01 M, pH 4.0) 50:50, flow rate 1.0 mL/min, UV detection at 254 nm, Phenomenex C18 column (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.) and C8 guard column (4 x 3.0 mm; Phenomenex, USA) kept at 30 °C. (A) biotransformation medium, (B) negative control and (C) standard RIF quinone. (1) and (3): possible metabolites. (2): RIF quinone.

After 120 h of incubation, it is possible to observe the reduction of the drug concentration in relation to the negative control, which was submitted to the same extraction process (Fig 2).. This behavior suggests drug consumption due to the action of the fungus and not only a process of drug oxidation caused by the culture medium. In this case, the fungus acts as a catalyst, accelerating the metabolization/degradation of RIF.



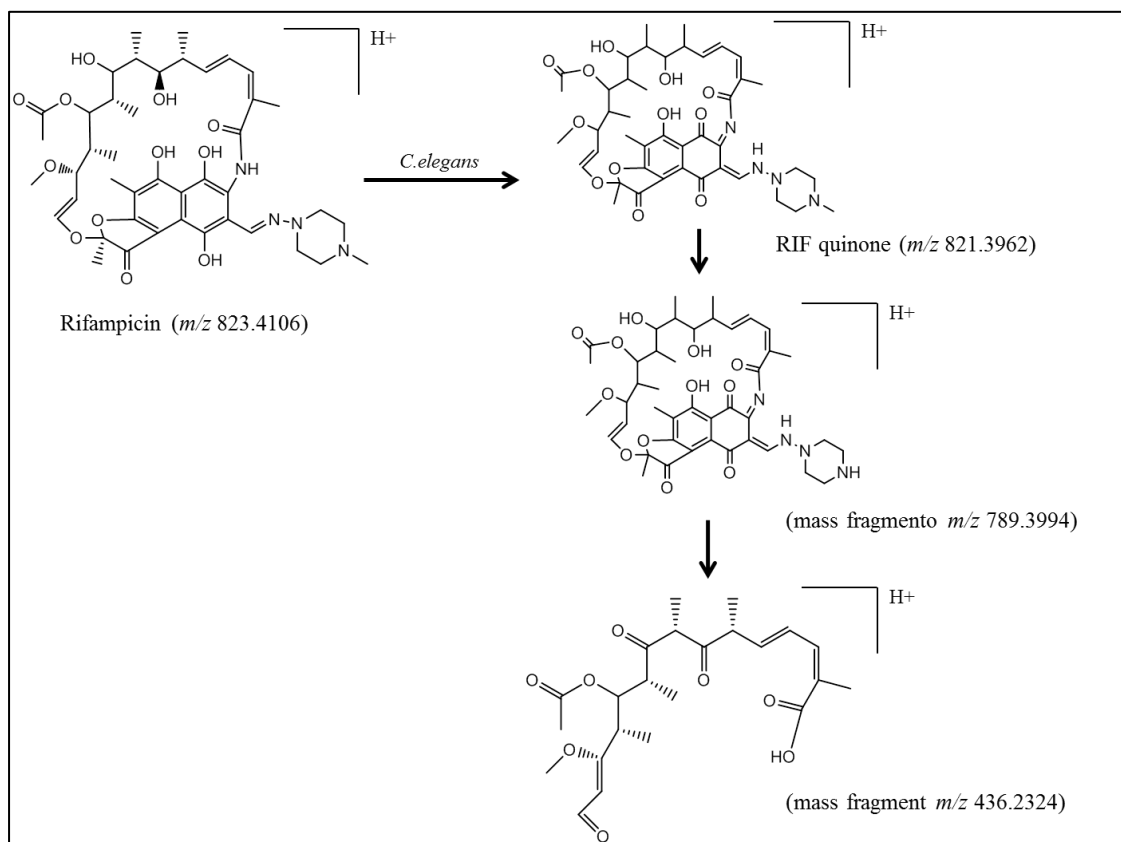
**Figure 2:** Decay representative graph of RIF concentration in 5 days of biotransformation, compared to the negative control in the same conditions.

The modern analytical techniques, in special hyphenated systems like UHPLC-QTOF/MS, are very useful to identify the biotransformation products even without previous treatment for separation of individual metabolites. Here in the present work, the samples were analyzed through UHPLC-QTOF/MS for elucidation of probable metabolites formed. Our analytical results were obtained from well-planned experiments, testing different chromatographic conditions, followed by the choice of better responses from MS conditions. Analyzing the biotransformation medium (BIO) by UHPLC-QTOF/MS it is possible to detect the derivative rifampicin quinone ( $m/z$  821.3962). Mass studies revealed the difference of two hydrogens (2.0157) in the structure, as compared to the drug standard. As illustrated on Fig 3, this metabolite is also detected in the negative control sample, but in a small intensity as compared to biotransformation medium.



**Figure 3:** MS spectra of proposed metabolite, rifampicin quinone, in ESI mode positive and comparative chromatograms of biotransformation medium (BIO) and negative control.

As shown in Fig 4, mass fragmentation of RIF quinone resulted two stable fragments of  $m/z$  789.3694 (N-demethylation) and 436.2324 (loss of aromatic and piperazine rings). Others peaks were detected on zooming the spectra. Literature reports that this metabolite is formed in aqueous solutions favored by neutral and basic conditions, as well as naturally by oxidation. Then, RIF quinone is suggested as a degradation product whose formation is stimulated in the biotransformation medium, thus indicating that the fungus accelerated the formation of the degradation product [15,16]. The degradation of an antibiotic favored by a filamentous fungus, which is found in the environment, is a positive point when the subject is bioremediation.

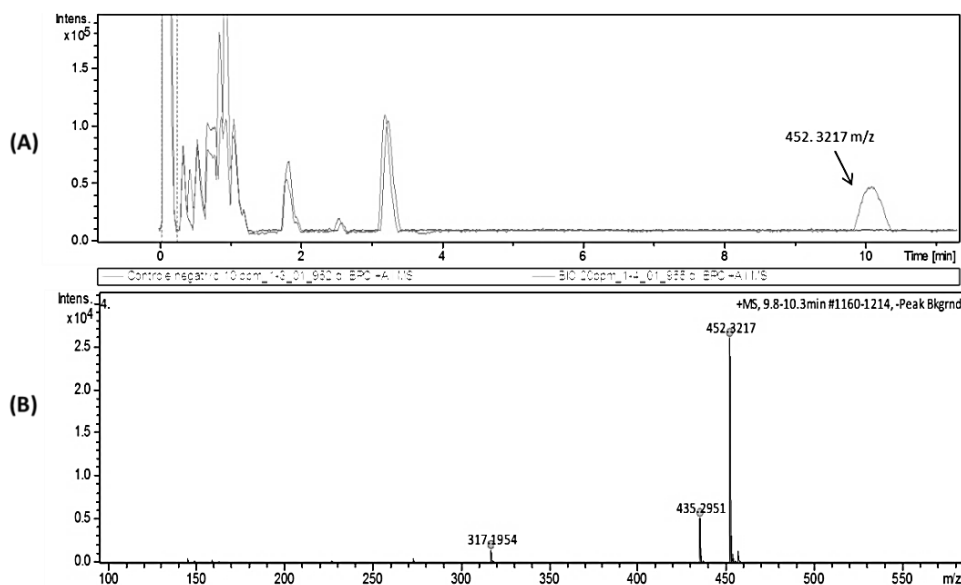


**Figure 4:** Proposed structures of RIF quinone and mass fragments obtained from UHPLC-QTOF/MS in ESI positive ion mode, after 120 hours of the biotransformation.

RIF can be metabolized either by hydrolysis to formylrifampicin or by deacetylation to form desacetyl rifampicin which retains practically all antibacterial activity. It was not possible to identify these known metabolites in the biotransformation medium. Modifications such as culture medium, agitation, substrate (drug) concentration, inoculum or the use of another microorganism may make possible to observe those known molecules described in literature [17,18].

Observing the chromatogram illustrated in the Fig 5 obtained from UHPLC-QTOF/MS analysis, the metabolite eluted at retention time of 10.0 min refers possibly to the peak detected in 11.5 min in HPLC-PDA analysis (Fig 1, peak 3). This product was found only in the biotransformation medium with *C.*

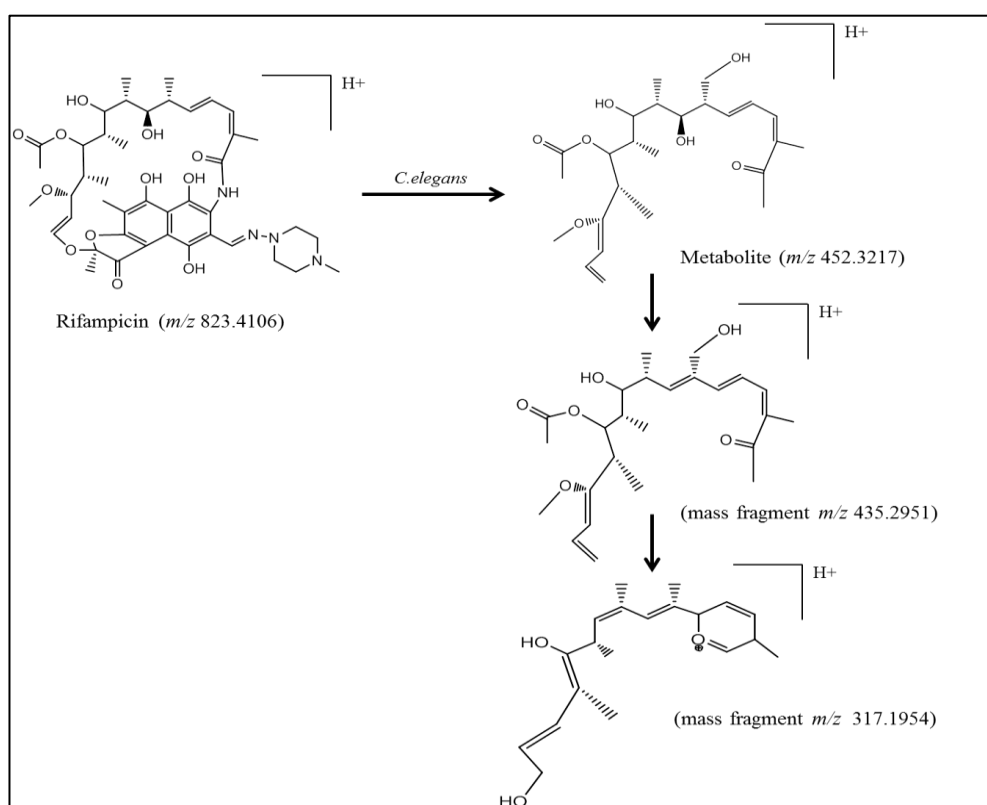
*elegans*. The mass spectrum of this metabolite showed a molecular ion at  $m/z$  452.3217 (Fig.5), with a loss of 370.6622 in reference to the molecular weight of rifampicin.



**Figure 5:** UHPLC-QTOF/MS chromatogram obtained from analysis of biotransformation medium in the study of rifampicin using *Cunninghamella elegans*. Chromatograms of overlapping biotransformation medium and negative control for comparison of the detected peaks (A), and mass spectrum of proposed metabolite ( $m/z$  452.3217) (B).

The proposed molecular formula for this metabolite is  $C_{25}H_{40}O_7$  indicating the loss of eighteen carbons, five oxygen atoms and four nitrogens. It is possible that formation this metabolite occurred through ring cleavage, demethylation and loss of piperazine moiety, being characterized as a mono-oxygenation product of RIF ( $m/z$  452.3217) (Fig 6). For elucidation, our results were evaluated considering the study from Prasad and Singh (2009), which purposes a biotransformation pathway for rifampicin. Mono-oxygenation is mentioned as a way for metabolism and probably is involved to increase the drug polarity. In our case, the acetyl group is maintained intact, even being an important metabolic route, as reported by the same authors. These have mentioned three metabolites formed by desacetylation: desacetyl rifampicin,

desacetyl-3-formylrifampicin, and *N*-demethyl-desacetylrifampicin. From our mass spectra results and possibilities for fragmentation, we have indicated a possible loss of hydroxyl group ( $m/z$  435.2951) and desacetylation with other few modifications ( $m/z$  317.1954) (Fig. 6). This mono-oxygenated RIF metabolite with this purposed chemical structure is a novel compound, being described for the first time in the literature.



**Figure 6:** Proposed chemical structure of RIF metabolite ( $m/z$  452.3217) obtained from biotransformation study with *C. elegans* ATCC 9245.

## Conclusions

In the present study, the microbial transformation of an important antibiotic with *C. elegans* was investigated. The results showed that rifampicin was biotransformed by fungi *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 generating a compound known as rifampicin quinone and another metabolite not yet

reported in the literature. The structural elucidation of all metabolites were done based on mass fragmentation study combined with accurate mass measurements. In this study we observed the great ability of *C. elegans* to metabolize rifampicin demonstrating that this microbial system represents an attractive alternative to the use of mammalian systems or chemical synthesis.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and for granting research fellowships. Rifampicin standard was donated by Professor Myraci Muniz de Albulquerque.

### References

- [1] Y. Zhang, The magic bullets and tuberculosis drug targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45 (2005) 529-564.
- [2] G. Acocella, Clinical pharmacokinetics of rifampicin, *Clin. Pharmacokinet.*, 3 (1978) 108-127.
- [3] Rifampicin, Drugbank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01045>, 2017 (accessed 09 March 2017).
- [4] S.C. Sweetman, *Martindale: The Complete Drug Reference*. 36 ed., Pharmaceutical Press, London, 2009.
- [5] K.B. Borges, W.D.S. Borges, M.T. Pupo, P.S. Bonato, Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77 (2007) 669-674.
- [6] E. Adelin, C. Servy, S. Cortial, H. Lévaïque, J.F. Gallard, M.T. Martin, J. Ouazzani, Biotransformation of natural compounds. Oxido-reduction of Sch-642305 by *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 21 (2011) 2456-2459.
- [7] K.B. Borges, W. de souza Borges, R. Durán-Patrón, M.T Pupo, P.S Bonato, I.G Collado, Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron.*, 20 (2009) 385-397.
- [8] G. Molina, M.R Marostica, G.M Pastore, *Pseudomonas*: A promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 (2013) 1851–1864.

- [9] S. Asha, M. Vidyavathi, *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism studies - a review. *Biotechnol Adv*, 27(2009) 16-29.
- [10] K. Srisailam, V. raj Kumar, C. Veeresham, Predicting drug interaction of Clopidogrel on microbial metabolism of Diclofenac. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 160 (2010) 1508-1516.
- [11] T. Barth, R. Conti, M.T. Puppo, L.T Okano, P.S Bonato, Chiral HPLC analysis of donepezil, 5-O-desmethyl donepezil and 6-O-desmethyl donepezil in culture medium: Application to fungal biotransformation studies. *Anal. Bioanal. Chem*, 404 (2012) 257-266.
- [12] L. Quinn, R. Dempsey, E. Casey, A. Kane, C.D Murphy, Production of drug metabolites by immobilised *Cunninghamella elegans*: from screening to scale up. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 42 (2015) 799-806.
- [13] J.D. Moody, J.P. Freeman, P.P Fu, C.E. Cerniglia, Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. *Drug. Metab. Dispos*, 30 (2002) 1274-1279.
- [14] K. Piska, D. Żelazczyk, M. Jamrozik, E. Pekala, *Cunninghamella* biotransformation-similarities to human drug metabolism and its relevance for the drug discovery process. *Curr. Drug Metab*, 17 (2016) 107-117.
- [15] B. Prasad, S. Singh, In vitro and in vivo investigation of metabolic fate of rifampicin using an optimized sample preparation approach and modern tools of liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 50 (2009) 475-490.
- [16] J. Li, M. Zhu, S. Rajamani, V.N. Uversky, A.L. Fink, Rifampicin inhibits  $\alpha$ -synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem. Biol*, 11 (2004) 1513-1521.
- [17] G.M Sorokoumova, V.V. Vostrikov, A.A Selishcheva, E.A Rogozhkina, T.Y. Kalashnikova, V.I. Shvets, V.I. Golyshevskaya, L.P. Martynova, V.V. Erokhin, Bacteriostatic activity and decomposition products of rifampicin in aqueous solution and liposomal composition. *Pharm. Chem. J*, 42 (2008) 35-38.
- [18] C. Becker, J.B. Dressman, H.E. Junginger, S. Kopp, K.K. Midha, V.P Shah, S. Stavchansky, D.M Barends, Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Rifampicin. *J. Pharm. Sci*, 98 (2009) 2252-2267.



---

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

---



## 6.1 Introdução

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

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

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

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

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

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

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

## 6.2 Artigo científico

Artigo submetido ao periódico Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry.

### **Biotransformation of ambrisentan by *A.niger* and *P. mineoluteum***

Rafaela M. Sponchiado<sup>1\*</sup>. Julia Sorrentino<sup>1</sup>. Leticia M. Cordenonsi<sup>1</sup>. Karina Galle<sup>2</sup>. Andressa Bitencourt<sup>2</sup>. Aleksandro Dallegrave<sup>3</sup>. Alexandre M. Fuentefria<sup>1</sup>. Martin Steppe<sup>1</sup>. Cássia V. Garcia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS Brazil

\*Corresponding author: Rafaela Martins Sponchiado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia. Av. Ipiranga, 2752, sala 402. Santana. Porto Alegre/RS, CEP 90610-000, Brazil. Phone number: 55 (51) 3308-5214. E-mail address: [rafasponchiado@hotmail.com](mailto:rafasponchiado@hotmail.com)

## **Abstract**

The focus of the present study was the *in vitro* biotransformation of ambrisentan (AMB) a selective endothelin type A, receptor antagonist, used for pulmonary arterial hypertension, by two fungal cultures: *Aspergillus niger* ATCC 9029 and *Penicillium mineoluteum* URM 6889. *In vitro* metabolism study was carried out by incubating AMB with fungus and culture medium under controlled conditions for further analysis of metabolites formed, in order to study the formation of metabolites through an alternative method. After incubation of 240 hours with *A. niger*, the drug was metabolized two metabolites, one is known with 3.75 min (M2) retention time and another unknown in 4.37 min retention time (M3) in HPLC-DAD and structures were elucidated by using UHPLC-QTOF/MS. However, when submitted to biotransformation with *P. mineoluteum*, no different signals than those formed in the controls were observed. The fungi *A. niger* could be used to generate mammalian metabolites of AMB on a small scale and can also be used as reference standards for identification and analytical tests of mammalian metabolites of ambrisentan.

**Keywords:** ambrisentan, biotransformation, *Aspergillus niger*, *Penicillium mineoluteum*, metabolites.

## 1. Introduction

Biocatalysis through microorganisms has become an increasingly valuable tool for synthetic chemicals as it is a viable strategy for synthesis of substances with pharmaceutical interest. This technology is ecofriendly, once uses green solvents and mild conditions as room temperature without the need for high pressures and extreme situations, with the subsequent benefits in terms of decreasing costs [1].

Microorganisms are able to metabolize organic molecules producing metabolites often similar to humans. The use of these to predict drug biotransformation is an *in vitro* method that does not require the use of animals. In addition, they can be applied in the production of drugs, in the degradation of pollutants and in the recovery of chemically compromised environments. The use of microorganisms in biotransformation processes can provide the production of existing metabolites or new substances with potential pharmacological activity [2,3].

Biotransformation studies have been shown to be a very efficient field of research in the production of compounds of pharmaceutical interest as well as being a promising alternative model of drug metabolomics studies. Different therapeutic classes of drugs that have metabolism via CYP450 appear as possible candidates for substrates for enzymatic reactions mediated by endophytic fungi [4].

Besides the environmental importance in the degradation of organic matter, *Penicillium* species have a great biotechnological potential, being widely used for the production of enzymes of industrial, environmental, pharmaceutical, food, among others interest. This fungus was selected since it is renowned to transform many organic compounds [5,6].

Furthermore, *Aspergillus niger* is a well-known fungus that has been used for many different biotransformation of organic compounds. *Aspergillus* species, as some other microorganisms, are capable of mimicking human P-450 metabolism of organic compounds [7-10].

Ambrisentan (AMB), chemically known as (2S)-2-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)oxy-3-methoxy-3,3-diphenylpropanoic acid, is used in the treatment of Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) in patients with WHO (World Health Organization) class II or III symptoms. In humans, it undergoes extensive metabolism and accounts for excretion of 3.35% in urine and 36.49% in faeces. Ambrisentan is glucuronidated by several UGT enzymes (UGT1A9S, UGT2B7S and UGT1A3S) to form ambrisentan glucuronide. The drug also undergoes oxidative metabolism, mainly by CYP3A4 and, to a lesser extent, by CYP3A5 and CYP2C19 to form 4-hydroxymethyl ambrisentan, subsequently glucuronidated to 4-hydroxymethyl ambrisentan [11].

The aim of the present work was to evaluate the formation of ambrisentan metabolites by using *Aspergillus niger* ATCC 9029 and *Penicillium mineoluteum* URM 6889. HPLC-PDA and UHPLC-QTOF/MS were used for analysis and prediction of the chemical structure of the proposed metabolites in the study.

## **2. Experiments**

### **2.1 Materials**

AMB was obtained from BOC Sciences (98%, USA). Dichloromethane was purchased from Dinâmica (Diadema, Brazil) and *N,N*-dimethylformamide was bought from Labsynth (Diadema, São Paulo). Methanol and acetonitrile of HPLC grade were purchased from Merck (New Jersey, USA) and Vetec (São Paulo, Brazil), respectively. Czapek broth and Sabouraud dextrose agar were obtained from Kasvi (Paraná, Brazil). Water was purified by a Milli-Q system Millipore (Molsheim, France).



## 2.2 Microbial culture and biotransformation condition

Stock cultures of *Aspergillus niger* ATCC 9029 and *Penicillium mineoluteum* URM 6889 were cut in discs of 0.5 cm of diameter and maintained on sterile sodium chloride 0.9% (w/v) at 5 °C and transferred every 6 months to maintain viability.

Spore solutions of *A. niger* and *P. mineoluteum* were prepared by growing the fungi for 3 and 7 days, respectively, at 28 °C in tubes containing a Sabouraud dextrose agar. 150 mL of a liquid medium with  $10^8$  and  $10^{16}$  spore/mL strain were inoculated in a 100 mL Czapek medium cultivated for 3 and 7 days, respectively, at 28 °C in an orbital shaker (New Brunswick™ Innova® 2300) at 120 rpm. This medium consisted on KNO<sub>3</sub> (2 g/L), KCl (0.5 g/L), FeSO<sub>4</sub> (0.01 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0.5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), yeast extract (5 g/L), glucose (30 g/L) and adjusted to pH 6.0. Then, the substrate (200 mg), which was previously solved in *N,N*-dimethylformamide:ethanol (1:1 v/v) was added into each flask to give the final AMB concentration of 500 µg mL<sup>-1</sup>. The cultures were incubated at 28 °C, shaking at 120 rpm, for 240 h and 360 h, respectively. Every 48 h, a 2 mL aliquot of the liquid culture medium was aseptically collected in triplicate and stored at -5 °C.

After last day of incubation, collected samples that were thawed, filtered and extracted with three equal volumes of dichloromethane. The organic extracts were evaporated to dryness in exhaust hood at room temperature. The residue was dissolved in 2 ml of methanol:water (80:20) for HPLC analysis. In all the experiments, one control flask without fungus (for checking drug stability: C-), one culture control without drug (for checking fungi endogenous metabolites: C+) and blank (only culture medium) was used in the two analytical methods analyzed.

### 2.3 Liquid chromatographic analyses

Liquid chromatographic analyses were conducted in a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AT pump, SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector (254 nm), DGU-20A5 degasser, CBM-20A controller system, and SIL-20A injection valve with 100  $\mu$ L loop. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.) and C8 guard column (4 x 3.0 mm; Phenomenex, USA) were kept at 40 °C. Methanol:water (80:20, v/v), 0.1% trimethylamine and 0.1% formic acid in isocratic mode, at 0.8 mL/min flow rate was chosen as mobile phase.

### 2.4 UHPLC-QTOF/MS analysis

Analysis was carried out using a UHPLC-QTOF-MS system, UHPLC (Shimadzu-Nexera x2) equipped with a Shin-pack XR ODS III column (2.0 mm  $\times$  50 mm, 1.6  $\mu$ m) from Shimadzu thermostated at 40 °C coupled to the QTOF-MS mass analyzer (Impact II, Bruker Daltonics). The QTOF-MS system was equipped with an electrospray ionization (ESI) source, operating in positive ionization mode. The adopted elution gradient mode, the mobile phase consisted of A: acetonitrile (0.1% formic acid) and B: aqueous phase (0.1% formic acid). The elution gradient started at 10% of A maintained for 2 min, increased to 90% in the next 8 min, and kept for 1 min. Then 90% A linearly decreased to 10% in 4 min, kept for 5 min. The flow rate was 0.3 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume was 10  $\mu$ L. The operation parameters of ESI were the following: capillary voltage, 4000 V; end plate offset, 500 V; nebulizer pressure, 4 bar (N<sub>2</sub>); drying gas, 9 L min<sup>-1</sup> (N<sub>2</sub>); and drying temperature, 200 °C. The QTOF-MS system was operating in broadband collision-induced dissociation (bbCID) acquisition mode and recorded spectra over the range  $m/z$  50–1000 with a scan rate of 2 Hz. A QTOF-MS external calibration was performed before each injection with a sodium formate solution. Data treatments were processed with Data Analysis 4.2 Software.

### 3. Results and discussion

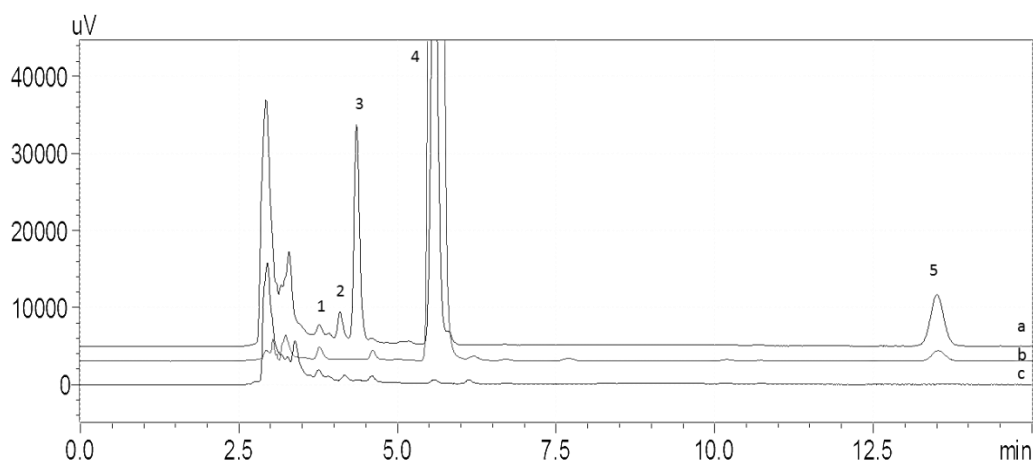
First microbial biotransformation of AMB with *Aspergillus niger* ATCC 9029 and *Penicillium mineolluteum* URM 6889 is being reported here. The study was monitored by HPLC-DAD what gave information about formation of products during the course of the process. In those biotransformation samples where a signal was verified, an UHPLC-QTOF/MS analysis was also performed.

In the chromatograms of culture controls, there was no interference from endogenous or secondary metabolites from *A. niger* and *P. mineollutem* for the analyses of ambrisentan and its metabolites.

The biotransformation reaction of the filamentous fungus *Penicillium mineoluteum* URM 6889 was performed also with duplicate inoculum ( $10^{16}$  spores/mL) to verify if metabolite formation could occur interference with the increase in cell concentration. The experiment was monitored for 15 days (sampling every two days and stored at  $-5^{\circ}\text{C}$ ). After the end of the period, samples were extracted, as described in item 2.2, however no additional signals were observed on HPLC-DAD analysis, only the substrate (AMB) and the same peaks that were formed in the controls. This way, they can be considered degradation products of the drug. In the chromatograms of culture controls, there was no interference from endogenous or secondary metabolites from *P. mineollutem* for the analyses. The fungus under study has the ability to biocatalyst compounds of industrial interest, but under the conditions submitted, there were no signs of possible metabolite. During the study, it was observed difficulty in growing the fungus. For this reason, it was left for 7 days in culture medium until the addition of the drug. However, in a study described in the literature the substrate is added in 48 hours [12].

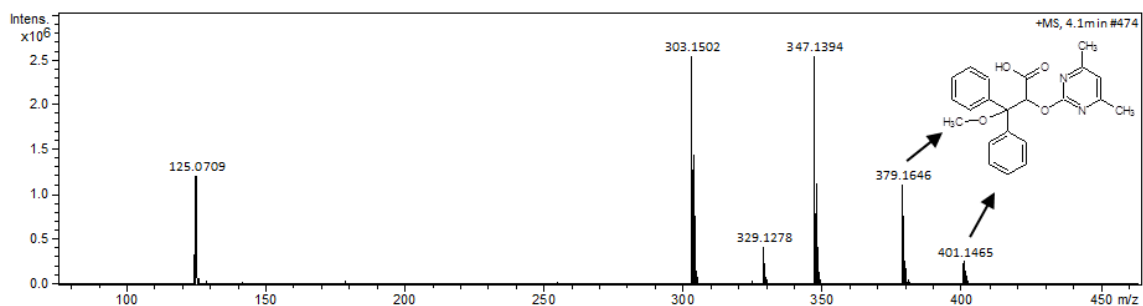
Biotransformation of AMB by means of *A. niger* ATCC 9029 culture after 12 days led to formation of two more polar compounds (3.75 and 4.37 min retention time), which were not present in the controls (Fig 1). In the chromatograms of culture controls, no interference from *A. niger* for the analyses was observed and no significant decrease in negative control of AMB

was observed. The presence of peaks 1 and 5 (Fig 1) in both negative control and biotransformation chromatograms suggest that of the drug is undergoing some form of degradation in culture medium after 12 days of incubation. However, the presence of peaks 2 and 3 were detected only in the biotransformation chromatogram, indicating the formation of two metabolites more polar than AMB (peak 4), being that this characteristic is observed in metabolites because they are more easily eliminated from the organism. The structures of two metabolites (M2 and M3) were identified and proposed by UHPLC-QTOF/MS and were deduced by comparing their spectroscopic data with the AMB molecule, and other related metabolites reported earlier [11,13].

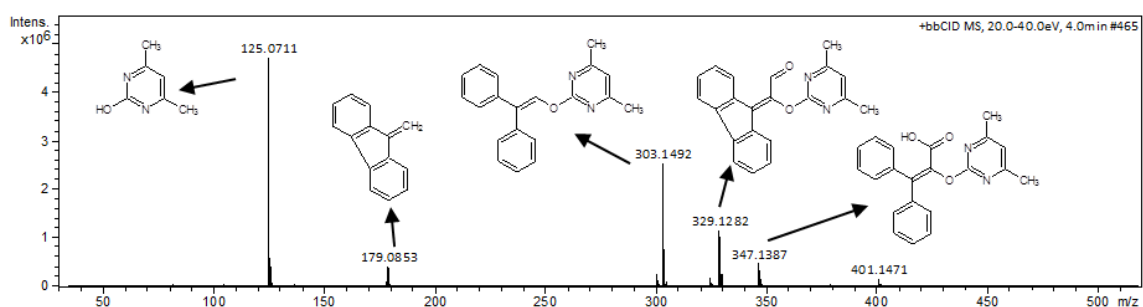


**Figure 1:** Representative LC-DAD chromatograms obtained from the analysis of biotransformation study by *A.niger* fungi. (a) Biotransformation medium; (b) negative control and (c) blank. Peak numbers correspond to the suggested chemical compounds. (1 and 5) degradation product; (2 and 3) metabolite; (4) ambrisentan standard.

Through the use of UHPLC-QTOF/MS it was possible to identify of the AMB and two possible metabolites. In Figure 2 and 3 it is probable to visualize the chromatograms, mass spectrum (MS and MS/MS) and the proposed structures of the AMB fragments.

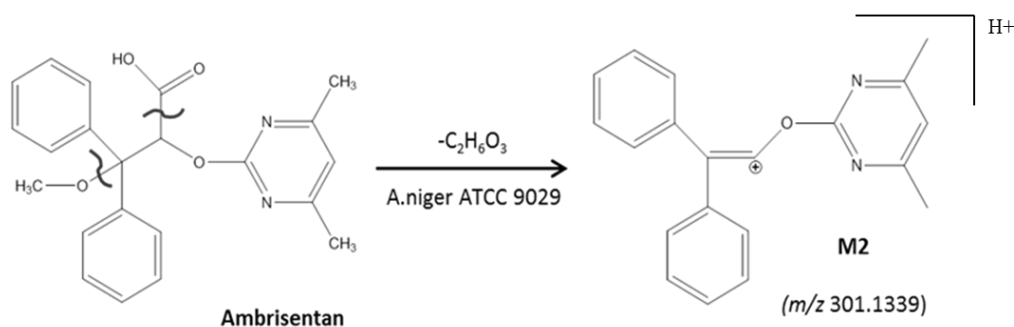


**Figure 2.** Mass spectrum of the AMB ( $m/z$  379.1646 protonated and  $m/z$  401.1465 sodium adduct), mass accuracy (err ppm), isotopic profile (mSigma: values below 50 are accepted) and ring double bond equivalents (rdb).



**Figure 3.** MS/MS of the AMB, mass accuracy (err ppm), isotopic profile (mSigma: values below 50 are accepted) and ring double bond equivalents (rdb) of the AMB fragments.

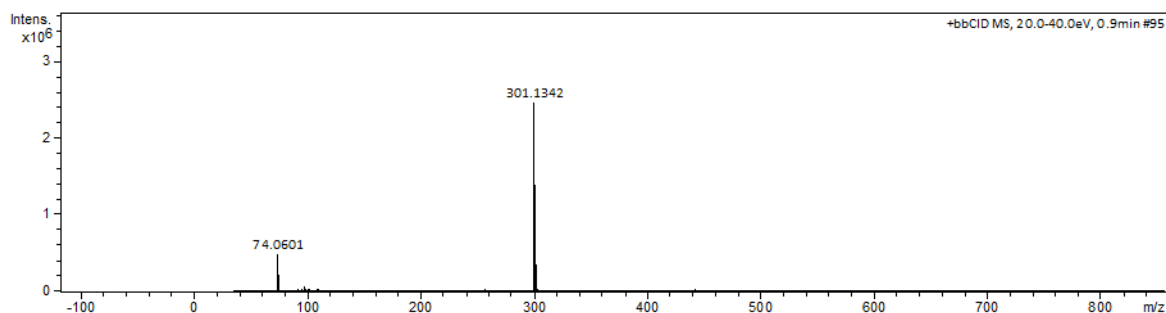
In the biotransformation medium it was possible to identify two metabolites (M2 and M3). These two signals appear only in biotransformation medium. With a 1.3 ppm error in mass accuracy, the suggested molecular formula for M2 is  $C_{20}H_{17}N_2O^+$  (Fig 4).



	Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
[AMB+H]	379.1646	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	379.1652	1.7	7.1	12.5	even	ok
M2	301.1339	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O	301.1335	-1.3	8.1	13.5	even	ok

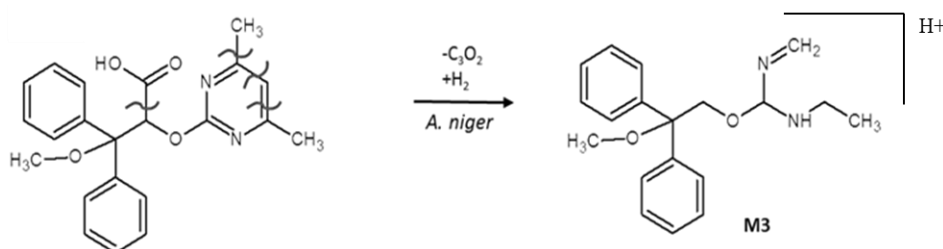
**Figure 4:** Proposed metabolic profile formation of M2 from AMB by *A.niger* ATCC 9029, mass accuracy (err ppm), isotopic profile (mSigma: values below 50 are accepted) and ring double bond equivalents (rdb).

Probably M2 was obtained as result of decarboxylation and loss of methoxy functional group of AMB molecule (Fig 4). The M2 presents a unit of RDB (ring double bond equivalents) more than the AMB, this justifies the additional double bond in the proposed chemical structure for the M2 (Fig 4). In Figure 5 it is possible to visualize the mass spectrum (MS/MS) of the M2. This proposed molecule is also mentioned in the works of Indian researchers [11,14], which proposed the same molecular mass in mass spectroscopy as a fragment of ambrisentan, while in our study the fungus was able to biotransform AMB in this product under mild environmental conditions.



**Figure 5.** MS/MS of the  $m/z$  301.1339 (M2) for biotransformation medium, signal  $m/z$  74.0601 is noise).

The 1.1 ppm error for protonated ion and 0.8 ppm error for sodium adduct ion, in mass accuracy, suggests the molecular formula for M3 is  $C_{19}H_{24}N_2O_2$  (Fig 6). Probably M3 was obtained as result of opening of the 4,6-dimethylpyrimidine moiety and decarboxylation of AMB molecule (Fig 6). An indication of this ring opening is in the formation of the sodium adduct. According to Krueve et al. (2013) [15] it is possible the formation of sodium adducts between the oxygen and nitrogen atoms.

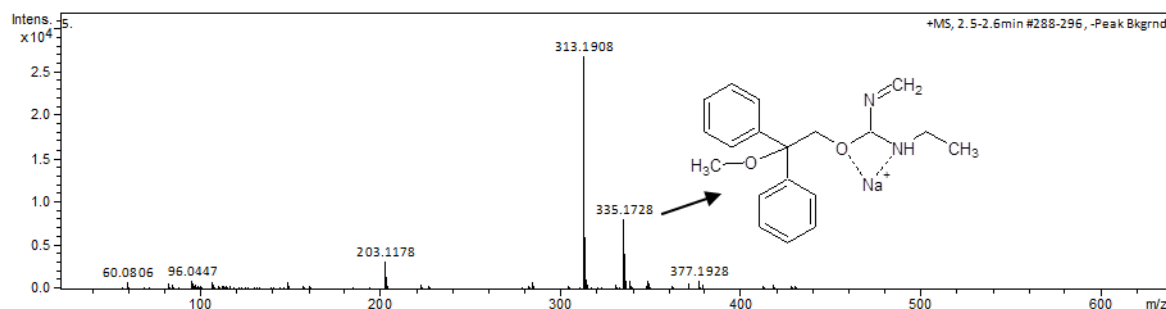


	Meas. $m/z$	Ion Formula	$m/z$	err [ppm]	$mSigma$	rdb	$e^-$ Conf	N-Rule
[AMB+H]	379.1646	$C_{22}H_{23}N_2O_4$	379.1652	1.7	7.1	12.5	even	ok
[M3+H]	313.1907	$C_{19}H_{25}N_2O_2$	313.1911	1.1	1.6	8.5	even	ok
[M3+Na]	335.1727	$C_{19}H_{24}N_2NaO_2$	335.173	0.8	22	8.5	even	ok
Fragment	203.1178	$C_{12}H_{15}N_2O$	203.1179	0.6	18.6	6.5	even	ok

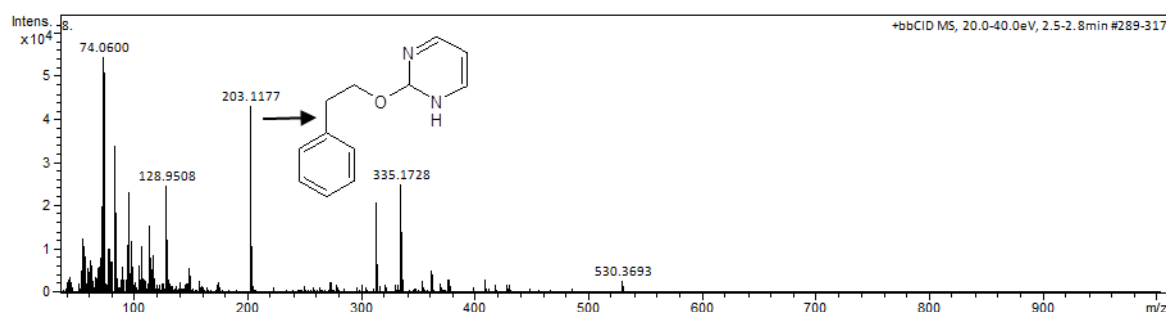
**Figure 6.** Proposed metabolic profile formation of M3 from AMB by *A.niger* ATCC 9029, mass accuracy (err ppm), isotopic profile ( $mSigma$ : values below 50 are accepted) and ring double bond equivalents (rdb).

In Figure 7, it is demonstrated a proposition of the structure of the adduct formed, as well as it is proposed a structure for the fragment of the M3 (Fig 8), resulting from a rearrangement in fragmentation. This metabolite is not

described in studies of forced degradation and characterization of metabolites *in vitro* or *in vivo*.



**Figure 7.** Mass spectrum of the  $m/z$  313.1909 (M3) for biotransformation medium.



**Figure 8.** MS/MS of the  $m/z$  313.1909 (M3) for biotransformation medium.

Through this study is interesting to note the possibility to produce new metabolites, not described in literature yet, when this drug is submitted under these conditions with fungi. The use of microorganisms in a metabolism study was intensified from the 70's when the Microbial Model of Animal Metabolism was proposed by Smith and Rosazza (1983) [16]. Thereafter, both bacteria and fungi are used to mimic the metabolism of xenobiotics in mammals.

The use of filamentous fungi for reactions catalysis is a promising strategy for the large scale production of metabolites from a variety of drugs. Through the optimization of biotransformation conditions such as: use of higher substrate concentration and consequently increase of culture medium and cell concentration, it is possible to obtain higher yields of the metabolites, may be



cheaper, faster and more cost-effective compared to the use of animals, cell culture or mammalian enzymatic systems [3].

Hussain et al. (2016) [17] conducted a study with the objective of evaluating the biotransformation by *A. niger* ATCC 10549 fungus of the anabolic-androgenic drug methenolone enanthate, which resulted in the identification of 3 known and 3 new metabolites. In the same way, Sutherland et al (2011) [18] carried out a study with the purpose of evaluating the biotransformation of two structures quinazoline and phthalazine are found in various pharmaceuticals and dyes by *A. niger* NRRL-599 fungus, which resulted in the formation of two metabolites from quinazoline (2-quinazolinone and 2,4-quinazolinedione) and one from phthalazine (1-phthalazinone).

*Aspergillus* species, as some other microorganisms, are capable of mimicking human CYP450 metabolism of organic compounds. Thus, it plays an important role in drug safety and efficacy studies using a green biomethod.

Biotransformation can be understood as the use of biological systems for the synthesis of chemical compounds through biotechnological methodologies [19]. As a model of biotransformation system, the use of microorganism metabolism allows modifications of functional groups of biologically active compounds that would generally only be possible through conventional chemical reactions. Thus, the biotransformation studies are applied in different areas such as biodegradation studies of pollutants in the recovery of chemically compromised environments, synthesis of chemical structures with pharmaceutical potential, and pharmacological studies of new drugs [4,20,21].

#### **4. Conclusions**

In this paper, *A. niger* ATCC 9029 and *P. mineoluteum* were applied to the biotransformation of ambrisentan. In summary, biotransformation of AMB by *A. niger* ATCC 9029 was performed and two metabolites were identified by a reliable and sensitive UHPLC-QTOF/MS method. The proposed structures have been reported for the first time when applied to a biocatalysis study with

filamentous fungi. Fungal biotransformation by *Aspergillus niger* is an efficient and green way to obtain the proposed metabolites, considering that it employed non-pathogenic soil microorganism and water as solvent for culture media. Therefore, fungal transformation is a good alternative, since other semi and synthetic methods use toxic and pollutant reagents and solvents. However, when the *P.mineoluuteum* fungus was used under optimized study conditions, it was not possible to observe the formation of signs of possible metabolites.

### **Acknowledgements**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Microorganism *Aspergillus niger* ATCC 9029 was donated by Valério R. Aquino, unit of microbiology of Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

### **References**

- [1] Ray L, Bera D. Biotransformation in Food Processing. Conventional and Advanced Food Processing Technologies, 2014; 387-410.
- [2] Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. Trends in biotechnol, 2007; 25: 66-73.
- [3] Asha S, Vidyavathi M. *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism studies - a review. Biotechnol. Adv. 2009; 27: 16-29.
- [4] Borges KB, De Souza Borges W, Durán-Patrón R, Pupo MT, Bonato PS, Collado IG. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. Tetrahedron: Asymmetry. 2009; 20: 385-397.
- [5] Xin XL, Wang Y, Fan GJ, Chen, L, Sun CP. Biotransformation of capsaicin by *Penicillium janthinellum* AS 3.510. Phytochem. Lett. 2017; 19: 210-4.

- [6] Huang LH, Li J, Xu G, Zhang XH, Wang YG, Yin YL, Liu HM. Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with *Penicillium griseopurpureum* Smith and *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. *Steroids*, 2010; 75: 1039-46.
- [7] Miyazawa M, Ando H, Okuno Y, Araki H. Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger*, as biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym*. 2004; 27: 91-5.
- [8] Lamb DC, Waterman MR, Zhao B. Streptomyces cytochromes P450: applications in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013; 9:1279-94.
- [9] Song Y, Li J, Yan S, Lin H, Li J, Wu J, Chen, G. Biotransformation of 20 (R)-panaxatriol by *Aspergillus niger* AS 3.739. *Phytochem. Lett*. 2017; 19: 89-93.
- [10] Severiano ME, Simão MR, Ramos HP, Parreira RL, Arakawa NS, Said S, Veneziani RC. Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013; 21: 5870-5.
- [11] Rani PJ, Vishnuvardhan C, Nimbalkar RD, Garg P, Satheeshkumar N. Metabolite characterization of ambrisentan, in in vitro and in vivo matrices by UHPLC/QTOF/MS/MS: Detection of glutathione conjugate of epoxide metabolite evidenced by in vitro GSH trapping assay. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; 155: 320-8.
- [12] Tai YN, Xu M, Ren JN, Dong M, Yang ZY, Pan SY, Fan G. Optimisation of  $\alpha$ -terpineol production by limonene biotransformation using *Penicillium digitatum* DSM 62840. *Asian J Agric Food Sci*. 2016; 96: 954-61.
- [13] Sponchiado R, Sorrentino JM, Olegário N, Oliveira SS, Cordenonsi, LM, Silveira GP, Steppe M, Fuentesfria A, Garcia C. Microbial transformation of ambrisentan to its glycosides by *Cunninghamella elegans*. *Biomed Chromatogr*. 2019.
- [14] Ramisetti NR, Kuntamukkala R. LC-MS/MS characterization of forced degradation products of ambrisentan: development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method. *New J Chem*. 2014; 38: 3050-61.
- [15] Krueve A, Kaupmees K, Liigand J, Oss M, Leito I. Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *Int. J. Mass Spectrom*, 2013; 48: 695-702.

- [16] Smith RV, Rosazza JP. Microbial models of mammalian metabolism. *J Nat Prod.* 1983; 46: 79-91.
- [17] Hussain Z, Dastagir N, Hussain S, Jabeen A, Zafar S, Malik R, Choudhary MI. *Aspergillus niger*-mediated biotransformation of methenolone enanthate, and immunomodulatory activity of its transformed products. *Steroids.* 2016; 112: 68-73.
- [18] Sutherland JB, Heinze TM, Schnackenberg LK, Freeman JP, Williams A J. Biotransformation of quinazoline and phthalazine by *Aspergillus niger*. *J. Biosci. Bioeng.* 2011; 111: 333-5.
- [19] Costa EMD, Pimenta FC, Luz WC, Oliveira VD. Selection of filamentous fungi of the, *Beauveria* genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. *Braz. J. Microbiol.*, 2008; 39: 405-8.
- [20] Sakaki T, Shinkyō R, Takita T, Ohta M, Inouye K. Biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 401: 91-8.
- [21] SHERAFATMAND M, NG HY. Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresour Technol.* 2015; 195: 122-130.

---

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

---



## 7.1 Introdução

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

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

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

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

## 7.2 Artigo científico

### **Biotransformation of rifampicin by *Aspergillus niger* and antimicrobial activity of proposed metabolites**

Rafaela M. Sponchiado<sup>1\*</sup>. Julia Sorrentino<sup>1</sup>. Leticia M. Cordenonsi<sup>1</sup>. Alexandre M. Fuentefria<sup>1</sup>. Alex Dallegrave<sup>2</sup> Martin Steppe<sup>1</sup>. Andreas Mendez<sup>1</sup>. Bruna Maria Saorin Puton<sup>3</sup>. Rogério Luis Cansian<sup>3</sup>; Cássia V. Garcia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS Brazil.

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Rafaela Martins Sponchiado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia. Av. Ipiranga, 2752, sala 402. Santana. Porto Alegre/RS, CEP 90610-000, Brazil. Phone number: 55 (51) 3308-5214. E-mail address: [rafasponchiado@hotmail.com](mailto:rafasponchiado@hotmail.com)



## **Abstract**

Drug biotransformation studies appear as an alternative to pharmacological investigations of metabolites, development of new drug candidates with reduced investment and most efficient production. The objective of this study was to evaluate the capacity of biotransformation of Rifampicin (RIF) by the filamentous fungus *Aspergillus niger* ATCC 9029. After incubation for 312 h, the drug was metabolized to two molecules: an isomer (m/z 455) and the rifampicin quinone (m/z 821). The monitoring of metabolites formation was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the characterization done by UHPLC-QTOF/MS. In vitro antimicrobial activity of the proposed metabolites was evaluated against *S.aureus* microorganisms, resulting in loss of inhibitory activity when compared to the standards, with MIC of 7.5 µg/mL. These results contribute to increase the knowledge of the enzymatic system of the fungus *Aspergillus niger*.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, biotransformation, rifampicin, metabolites, antimicrobial activity.

## 1. Introduction

Biotransformation had been an exciting area of research for decades, and enzymes from various sources, that is, microorganisms, animal, and plant cells, have been employed for carrying out reactions at chemically inaccessible positions of organic compounds (ZAFAR et al., 2012). Cell suspension cultures of plants have also been efficiently employed for the biotransformation of organic compounds (SUTHERLAND et al., 2011).

The biotransformation process provides a number of advantages over chemical synthesis. Therefore, biotransformation is a useful method for production of novel compounds; enhancement in the productivity of a desired compound; overcoming the problems associated with chemical analysis; leading to basic information to elucidate the biosynthetic pathway (SURESH et al., 2006). Microbial factories pose advantages such as rapid growth, low cost, is an ecologically viable technique, convenient genetic manipulations, and with optimization of the method can production high level on products biotransformation, through a process known as “green chemistry” (SRISILAM; VEERESHAM, 2003; SURA et al., 2015).

Filamentous fungi are also considered promising as new biocatalysts, especially when they involve chiral compounds, since many authors report stereoselective reactions mediated by these microorganisms. These chemo-, and stereoselective processes are very important in the synthesis of various chemicals and pharmaceuticals (BORGES et al., 2009).

Fungi the genus *Aspergillus*, are capable of mimicking P450 reactions, providing possible products of the metabolism, which is important in the assessment of its efficacy and safety for the development of new drugs (LAMB et al., 2013).

Rifampicin (RIF) is a bactericidal semisynthetic antibiotic derived from rifamycin. It acts by stable binding to RNA polymerase, blocking the synthesis of messenger RNA from mycobacteria. RIF, combined with other antimicrobials, is considered a fundamental drug in the tuberculosis treatment

regimen, and resistance to this drug requires more extensive pharmacological therapy (BANG et al., 2006).

Considering the previous significant antimicrobial activities, the present study has been undertaken to obtain rifampicin metabolites through microbial biotransformation by *Aspergillus niger* and to evaluate the possible antimicrobial activities of its biotransformation proposed metabolites.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Chemicals*

RIF (purity  $\geq$  95%) was donated (Pernambuco Federal University, Brazil). Dichloromethane was purchase from Dinâmica (Diadema, Brazil) and *N,N*-dimethylformamide bought from Labsynth (Diadema, São Paulo). Methanol, acetonitrile, and ethanol of HPLC grade were purchased from Merck (New Jersey, USA), Vetec (São Paulo, Brazil), and Panreac (Barcelona, Spanish), respectively. Czapek-Dox broth and sabouraud dextrose agar were obtained from Kasvi (Paraná, Brazil). Water was purified by a Milli-Q system Millipore (Molsheim, France). Luria Bertani (LB) medium obtained from Kasvi (Paraná, Brazil).

### *2.2 Microorganism*

*Aspergillus niger* ATCC 9029 was donated of Departamento of Microbiology of Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Stock cultures were cut in discs of 0.5 cm of diameter and maintained on sterile sodium chloride 0.9% (w/v) at 5 °C and transferred every 6 months to maintain viability. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was stored at -80 °C in 1% glycerol and maintained on Luria Bertani medium and transferred every 6 months to maintain viability.

### 2.3 Biotransformation conditions and extractions of metabolites

Spore solutions of *A. niger* were prepared by growing the fungi for 3 days at 28 °C in tubes containing a Sabouraud dextrose agar. 100 mL of a Czapek-Dox liquid medium (Sodium nitrate 2.0 g L<sup>-1</sup>, Magnesium Sulphate 0.5 g L<sup>-1</sup>, Potassium Chloride 0.5 g L<sup>-1</sup>, Di Potassium Phosphate 1.0 g L<sup>-1</sup>, Ferrous Sulfate 0.01 g L<sup>-1</sup>, and Sucrose 30 g L<sup>-1</sup>, pH 7.0), with 10<sup>8</sup> spores mL<sup>-1</sup> of strain inoculated for 3 days at 28 °C in an orbital shaker (New Brunswick™ Innova® 2300) at 120 rpm. Then, the substrate (250 mg), which was previously solved in *N,N*-dimethylformamide:ethanol (1:1 v/v) was added into each flask to give the final RIF concentration of 500 µg mL<sup>-1</sup>. The cultures were incubated at 28 °C, shaking at 120 rpm, for 312 h. Samples (2 mL) of the liquid culture were periodically withdrawn from each culture and frozen at -5 °C. The end of the experiment the samples were thawed and extracted three times successively with dichloromethane (4 mL). Each extract was separately evaporated to dryness in exhaust hood at room temperature. The residues obtained were dissolved in 2 mL acetonitrile:water (1:1), filtered and 25 µL analyzed by liquid chromatography. Control flasks consisted of culture broth without RIF (positive control: C+), only sterile medium with RIF (negative control: C-), and culture broth (blank: B). Control flasks were included in the HPLC and UHPLC-QTOF/MS analysis.

### 2.4 HPLC conditions

HPLC method was first development and the specificity was evaluated against this complex matrix (*A. niger*), since in other studies our method had already been validated according to international guidelines (data not shown). Liquid chromatographic analyses were conducted in a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AT pump, SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector, DGU-20A5 degasser, CBM-20A controller

system, and SIL-20A injection valve with 100  $\mu$ L loop. Phenomenex C18 column (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.) and C8 guard column (4 x 3.0 mm; Phenomenex, USA) were kept at 30 °C using a mobile phase consisting of a mixture of ammonium acetate 0.01M, pH 4.0 and acetonitrile (50:50, v/v) at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> with UV detection at 254 nm.

### 2.5 LC-QTOF/MS analysis

The structural elucidation of the metabolites formed was performed through the UHPLC-QTOF/MS system, UHPLC (Shimadzu-Nexera x2) equipped with a Shin-pack XR ODS III column (2.0 mm x 50 mm, 1.6  $\mu$ m) from Shimadzu coupled to the QTOF-MS mass analyzer (Impact II, Bruker Daltonics). The QTOF-MS system was equipped with an electrospray ionization (ESI) source, operating in positive ionization mode. The mobile phase consisted of acetonitrile and ammonium acetate 0,001M pH 4.0. The operation parameters of ESI were the following: capillary voltage, 4000 V; end plate offset, 500 V; nebulizer pressure, 4 bar (N<sub>2</sub>); drying gas, 0.28 L min<sup>-1</sup> (N<sub>2</sub>); and drying temperature, 200 °C. The QTOF-MS system was operating in broadband collision-induced dissociation (bbCID) acquisition mode and recorded spectra over the range  $m/z$  50–1000 with a scan rate of 2 Hz. A QTOF-MS external calibration was performed before each injection with a sodium formate solution. Data treatments were processed with Data Analysis 4.2 Software.

### 2.5 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration evaluation was first performed on the crude sample (BIO: RIF plus metabolites) in order to evaluate if there was a decrease in the minimum inhibitory concentration. The protocol used was based on the broth microdilution method which is recommended by CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) adapted by the laboratory which did the experiment (CLSI, 2012; OSTROSKY et al., 2008).

Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtained from the American Type Culture Collection, was selected. The choice of this microorganism was due to the fact that it is recommended by official guides for conducting a microbiological study by agar diffusion to verify the potency/activity of antibiotics (BRASIL, 2010).

The microorganisms, *S. aureus*, was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 1% glycerol and maintained on Luria Bertani (LB - 10 g/L of tryptone, 5 g/L de yeast extract 5 g/L of NaCl). They were subcultured in Petri dishes prior to use for purity check. The strains were previously grown in LB medium for 24 h at  $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a bacteriological stove (J. PROLAB JP 101). After this period the bacterial suspension corresponded to approximately  $10^8$  cells/mL.

The test consisted of serial microdilutions of standard RIF with LB broth in 96-well ELISA microplates until the concentrations of 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.065, 0.03125, 0.015625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in triplicate. The concentrations evaluated for the test sample started at 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and serial microdilutions were performed up to a concentration of 0.014648  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , performed in triplicate.

Then, 10  $\mu\text{l}$  of bacteria were then inoculated, read (0 h) in ELISA microplate reader (Bio Tek Instruments EL 800) and incubated for 24 h at  $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a bacteriological stoven. After this period the microplate was read (24 h) in ELISA microplate reader and the difference in turbidity density caused by microbial growth after 24 h was determined. MIC was defined as the lowest concentration in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , capable of inhibiting microbial growth. As controls the culture medium and the culture medium were evaluated with the bacterium in order to monitor the growth/turbidity.

### **3. Results and Discussions**

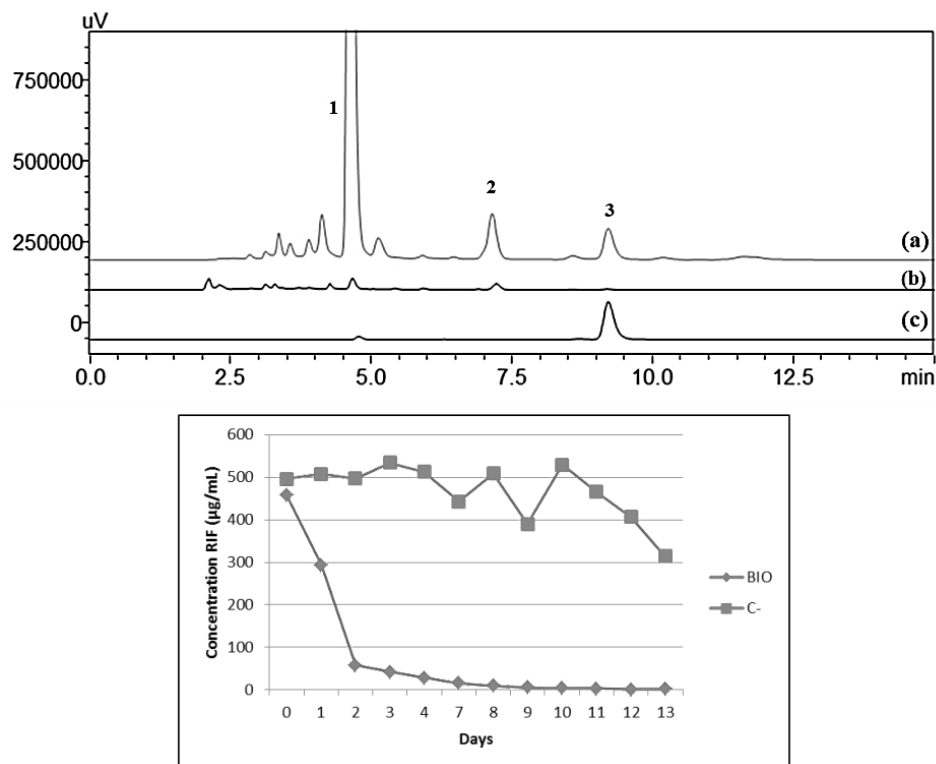
First microbial biotransformation of rifampicin with *Aspergillus niger* is being reported here. This microorganism is a well-known filamentous fungus, used in numerous biotechnological processes for biochemical transformations of organic compounds, being considered an alternative

method to mimic the metabolites found in mammals considered economically viable. The fungus *Aspergillus niger* has already been used in some drug biotransformations with promising results (SUTHERLAND et al., 2011; SEVERIANO et al., 2013; ARUDA et al., 2017). The study reported by Hussain et al (2016), the fungus *Aspergillus niger* biotransformed of methenolone enanthate in three new, and three known metabolites, demonstrating that the fungus under study has great capacity of transformation organic compounds.

### 3.1 High performance liquid chromatography of metabolites (HPLC)

After 312 h of the biotransformation process, the verification of the presence of metabolites and Rifampicin in samples was done using HPLC-PDA. The solvent system used was effective to separate RIF from the formed signals, demonstrating the specificity of the method (Fig 1). According to Figure 1 it is possible to visualize the drastic reduction of the area of the drug signal in relation to the negative control submitted to the same extraction process, thus representing RIF is consumed by the *A. niger* fungus.

Some more polar signals were detected in the chromatographic analysis of the biotransformation medium, and may be considered possible metabolites, but rifampicin may be metabolized in compounds that are not detected by the chromatographic method with diode array detector (PDA). Therefore, UHPLC-QTOF/MS analysis was performed with the purpose of identifying and elucidating possible metabolites that are being formed due to a great reduction of the concentration of rifampicin in the reaction medium.



**Figure 1:** Representative HPLC-DAD chromatograms obtained from the analysis of biotransformation study. (a) negative control; (b) biotransformation medium; (c) RIF quinone standard. Peak numbers correspond to chemical compounds. (1) rifampicin; (2) degradation product; (3) RIF quinone. Graph representative of consumption of RIF in 13 days of biotransformation study compared with the negative control in the same conditions.

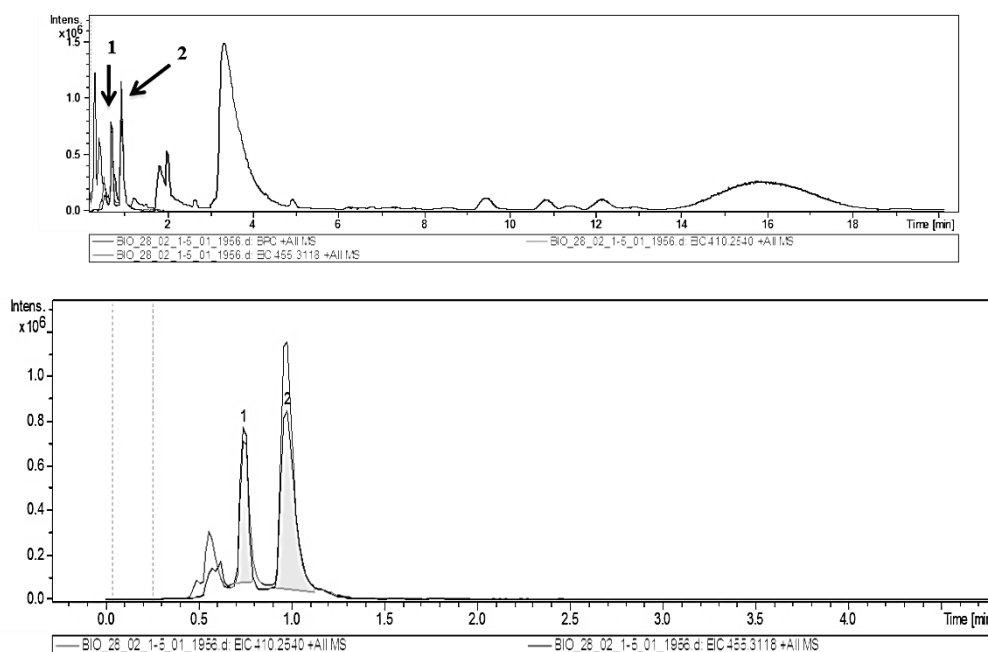
### 3.2 Identification and characterization of rifampicin metabolites by UHPLC-QTOF/MS

Due to the high sensitivity, selectivity and resolution, UHPLC-QTOF/MS has become a predominant technique in bioassay and pharmacokinetic studies in the identification of metabolites (HOLME et al., 2011). Therefore it is the method of choice to propose RIF metabolites formed through the biotransformation study with *A.niger*.

The compounds eluted at 0.7 (M1) and 1.0 min (M2) in UHPLC-QTOF/MS (peaks 1 and 2, Fig 2) were only observed in the biotransformation medium. They have more polar characteristics than the RIF (3.8 min) (Fig 2), in

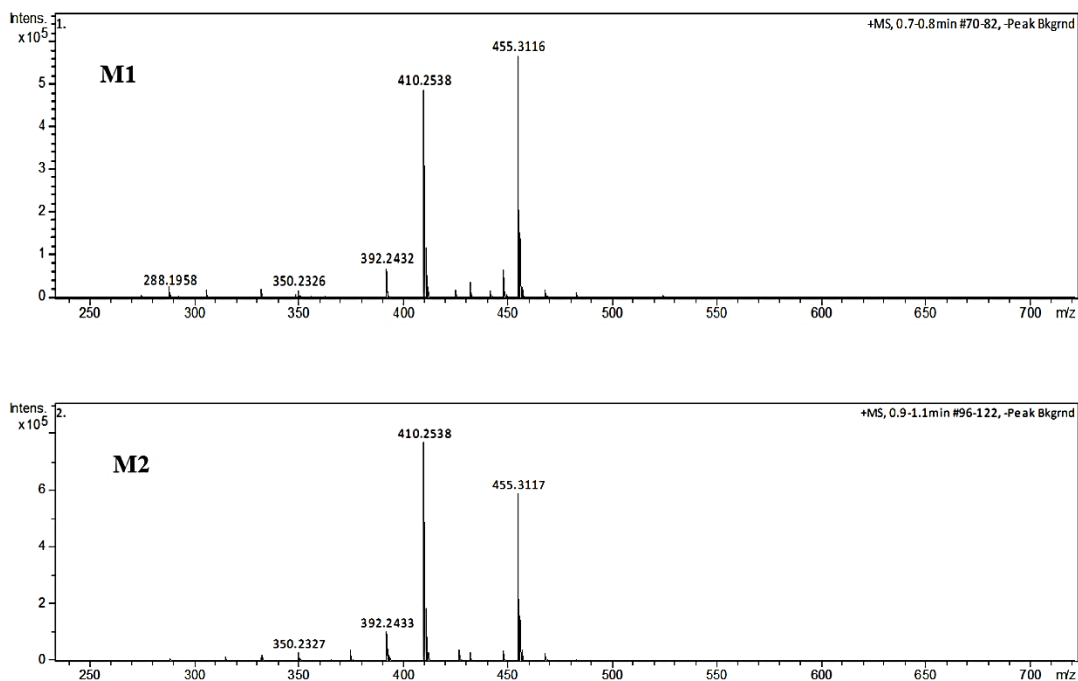


accordance to metabolites properties, since these become molecules with such peculiarity to facilitate elimination by the organism.



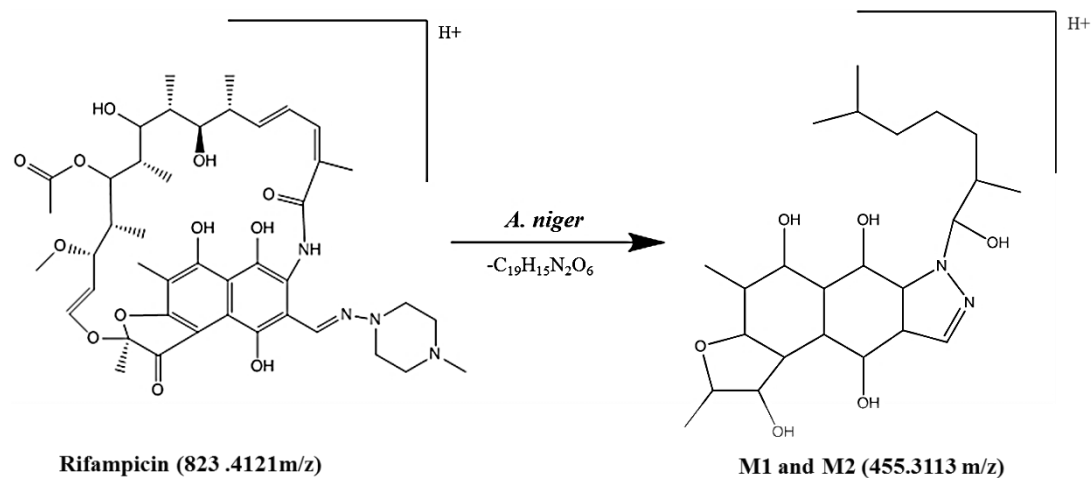
**Figure 2:** Representative chromatograms of the metabolites M1 and M2 formed in the RIF biotransformation medium with *A.niger* fungus. The chromatogram below is a enlargement (zoom) of the observer signals from above.

The M1 and M2 mass spectra showed  $[M+H]^+$  ions at  $m/z$  455.3116 for both signals, therefore they have identical molecular formula of  $C_{24}H_{43}N_2O_6$ , in ESI positive mode. Their MS/MS spectra showed the same fragmentations, indicating that they have the same structure, characteristic of isomers (Fig 3).



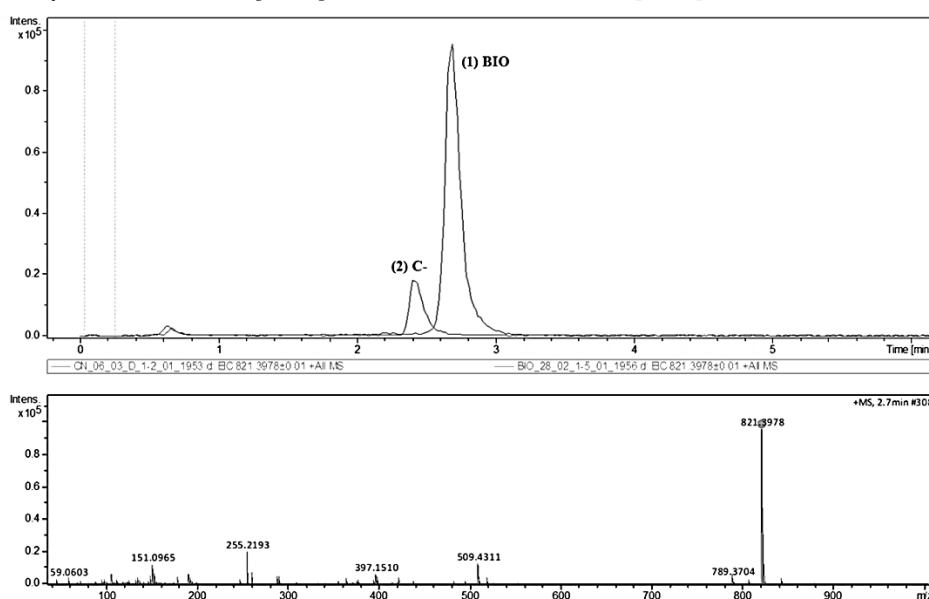
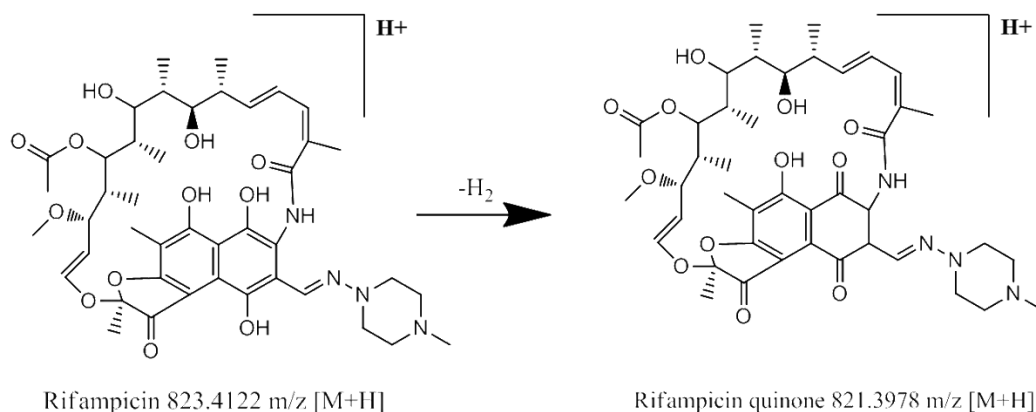
**Figure 3:** Mass spectrum of the RIF metabolite with  $m/z$  455.3116 (M1 and M2) for biotransformation medium.

Structures of compound were deduced by comparing their spectroscopic data with and related metabolites reported earlier (PRASAD; SINGH, 2009). Probably M1 and M2 were obtained as result of loss of the piperazine ring and the saturated aliphatic moiety, cleavage on the ketone ring and hydroxylation. This metabolite is considered phase I reactions of the metabolism, in this way the molecule becomes more polar and consequently easier to be eliminated by the urine (Fig 4).



**Figure 4:** Proposed chemical structure for metabolite M1 and M2, identified from MS analysis of biotransformation with fungi *A.niger* ATCC 9029.

Another metabolite (M3) was identified as rifampicin quinone by comparison of reports from the literature and analyzes of this same drug with another fungus carried out by our research group (PRASAD; SINGH, 2009). This product is formed through an oxidation reaction of the RIF, occurring the loss of two hydrogen molecules when compared with the drug standard. The formation of M3 was intense in biotransformation medium when compared to the negative control (Fig 5), in this way it is probable that the fungus acts as a catalyst in the reaction of degradation of the drug.



**Figure 5:** Chemical structure of RIF quinone (M3) and mass spectrum ( $m/z$  821.3978) in biotransformation medium.

### 3.3 *In vitro* antimicrobial activity of metabolite

Rifampicin is a complex molecule macrolide antibiotic, obtained commercially through the fermentation of *Streptomyces mediterranei* (ATCC 13685). RIF and proposed metabolites were evaluated for their antimicrobial effect using the broth microdilution method recommended by the official organ, which is considered a practical and fast method (MARTIN et al, 2005).

In order to evaluate if there would be an increase in the antimicrobial activity of the metabolites formed in the biotransformation medium, rifampicin was first quantified by the method developed and validated by HPLC (data not

shown) in the biotransformation medium, and then dilutions were performed in the same concentration as the standard to verify if there would be a decrease in MIC with the presence of the metabolite. Controls of the broth sterility with inoculum and only the broth were also performed.

When the standard was evaluated against the bacteria, the MIC was 4.0 µg/mL. When the experiment was carried out with the biotransformation sample the MIC increased to 7.5 µg/mL. With these results, the isolation of the metabolites was not performed, as the antimicrobial activity decreased. The decrease in pharmacological activity after drug metabolism in human organism is usually expected, as they make molecules more polar and consequently more easily eliminated.

These results are interesting in studies on bioremediation, which is a process that explores the metabolic properties of organisms to degrade contaminants and recover chemically compromised environments (ILYINA et al., 2003; SHERAFATMAND; NG, 2015). In this way, an area contaminated with the antibiotic under study, which may come from industries or the post-consumer society, can be treated through filamentous fungi, specifically *A. niger*, which live part or all of their life cycle in the interior of plants without causing apparent damage to the host, protecting the plant through the production of alkaloids, enzymes, antibiotics under stress conditions (AZEVEDO, 1999; AZEVEDO et al., 2000).

*A. niger* fungus is widely used in bioremediation of sites containing polycyclic aromatic hydrocarbons, heavy metals, pesticides, and textile dye effluents. It oxidizes indole to 3-hydroxyindole, later cleaving both benzo and pyrrole rings (KAMATH; VAIDYANATHAN, 1990). Corroborating with reports in the literature on the use of *A. niger* in the treatment of wastewater and have shown wide application in recent years (Chao et al., 2019). Bioremediation is a cost effective and nature friendly biotechnology that is powered by microbial enzymes.

#### 4. Conclusions

In this paper, rifampicin was transformed to isomer metabolites and rifampicin quinone metabolite by *A.niger* ATCC 9029. These metabolites M1 and M2 were firstly reported in literature and could be used as reference in further study on mammalian metabolism of RIF. The proposed metabolites did not present a reduction of the minimum inhibitory concentration against the bacteria studied. The present study contributes to increase the knowledge of the enzymatic system of the fungus *Aspergillus niger* and describes in an unprecedented way the ability they present in biotransforming rifampicin. To the best of our knowledge, our results provided a new biotechnological method for the microbial production of compounds from Rifampicin reported for the first time in this study.

#### Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Microorganism *Aspergillus niger* ATCC 9029 was donated by Valério R. Aquino, unit of microbiology of Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Rifampicin was donated by Professor Myraci Muniz de Albulquerque.

#### References

ARRUDA, C.; EUGÊNIO, D. D. S.; MOREIRA, M. R.; SÍMARO, G. V.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G.; AMBRÓSIO, S. R. Biotransformation of (-)-cubebin by *Aspergillus* spp. into (-)-hinokinin and (-)-parabenzlactone, and their evaluation against oral pathogenic bacteria. **Natural product research**, p. 1-14, 2017.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Virus**, v. 5000, n. 130000, p. 3-8, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O. DE ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

BANG, D.; ANDERSEN, A. B.; THOMSEN, V. O. Rapid Genotypic Detection of Rifampin-and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Directly in Clinical Specimens. **Journal of clinical microbiology**. v. 44, n. 7, p. 2605–2608, 2006.

BORGES, K. B., DE SOUZA BORGES, W., DURÁN-PATRÓN, R., PUPO, M. T., BONATO, P. S., COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 4, p. 385-397, 2009.  
BRASIL, M. S. Farmacopéia brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 546, 2010.

CHAO, Z.; YIN-HUA, S.; DE-XIN, D.; GUANG-YUE, L.; YUE-TING, C.; NAN, H.; HUI, Z.; ZHONG-RAN, D.; FENG, L.; JING, S.; YONG-DONG, W. Aspergillus niger changes the chemical form of uranium to decrease its biotoxicity, restricts its movement in plant and increase the growth of Syngonium podophyllum. **Chemosphere**, 2019.

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, CLSI document M07-A9, 2012.

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

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

ILYINA, A.; CASTILLO SANCHEZ, M. I.; VILLARREAL SANCHEZ, J. A.; RAMIREZ ESQUIVEL, G.; CANDELAS RAMIREZ, J. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. **Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya**, v. 2, p. 88-91, 2003.

KAMATH, A. V.; VAIDYANATHAN, C. S. New pathway for the biodegradation of indole in Aspergillus niger. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 275-280, 1990.

LAMB D.C.; WATERMAN M.R.; ZHAO, B. *Streptomyces* cytochromes P450: applications in drug metabolism. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 9, n. 1, p. 1279-1294, 2013.

MARTIN, A.; MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; DA SILVA TELLES, M. A.; SIMBOLI, N.; CHACON, L. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 8, p. 901-906, 2005.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

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

SEVERIANO, M. E.; SIMÃO, M. R.; RAMOS, H. P.; PARREIRA, R. L.; ARAKAWA, N. S.; SAID, S.; VENEZIANI, R. C. Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 18, p. 5870-5875, 2013.

SHERAFATMAND, M.; NG, H. Y. Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Bioresource technology**, v. 195, p. 122-130, 2015.

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

SURA M B, ANKIREDDY, M, PONNAPALLI M.G. Biotransformation of agallochaexcoerin A by *Aspergillus flavus*. **Natural Product Research**, v. 29, p. 838-841, 2015.

SURESH, B.; RITU, T.; RAVISHANKAR, G.A. Biotransformations as Applicable to Food Sciences and Nutrition. **Food Biotechnology**, 2 ed., v. 8, New York, 2006.

SUTHERLAND, J. B.; HEINZE, T. M.; SCHNACKENBERG, L. K.; FREEMAN, J. P.; WILLIAMS, A. J. Biotransformation of quinazoline and phthalazine by *Aspergillus niger*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 333-335, 2011.



ZAFAR, S.; YOUSUF, S.; KAYANI, H. A.; SAIFULLAH, S.; KHAN, S.; AL-MAJID, A. M.; CHOUDHARY, M. I. Biotransformation of oral contraceptive ethynodiol diacetate with microbial and plant cell cultures. **Chemistry Central Journal**, v. 6, p. 109, 2012.



---

## **8. DISCUSSÃO GERAL**

---



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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





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

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

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







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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DRUGBANK. AMBRISANTAN. Disponível em:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

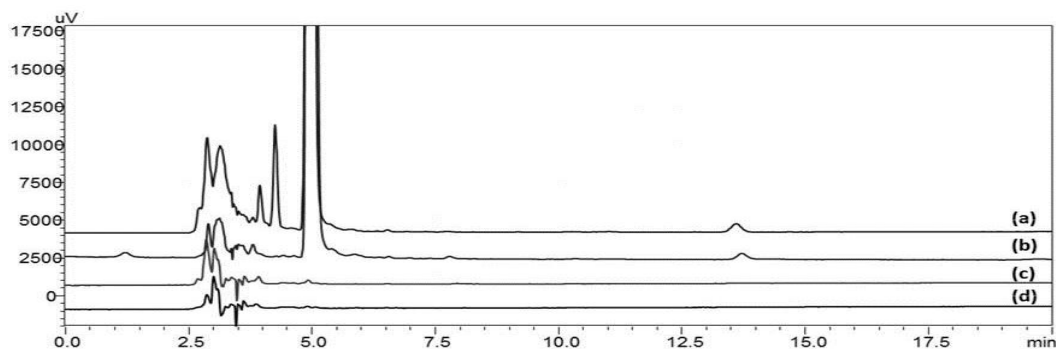
XIN, X. L., WANG, Y., FAN, G. J., CHEN, L., SUN, C. P. Biotransformation of capsaicin by *Penicillium janthinellum* AS 3.510. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 210-214, 2017.

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





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



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

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

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

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

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

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

RSD (%); Recovery (µg/mL)

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

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

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

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

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

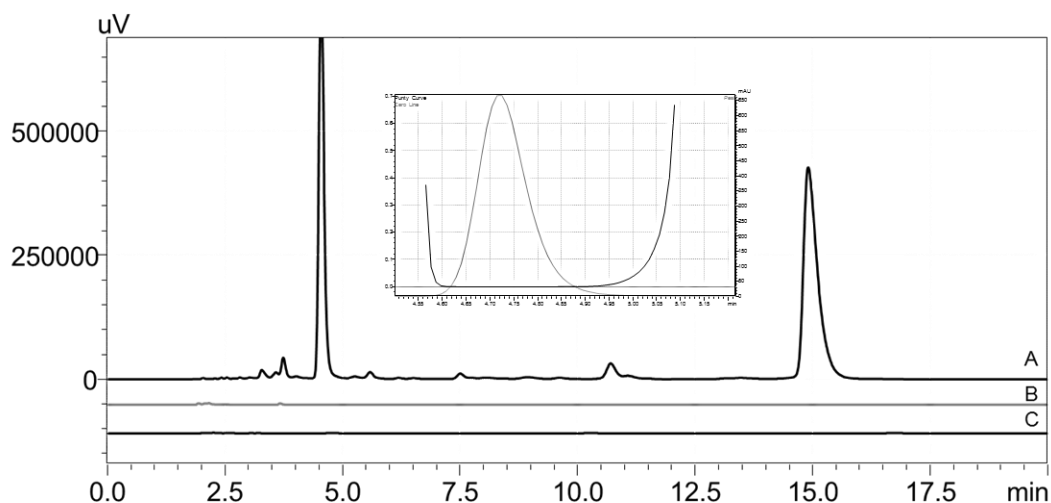
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), Precisão (DPR %), Exatidão (% recuperação).

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

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

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

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



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

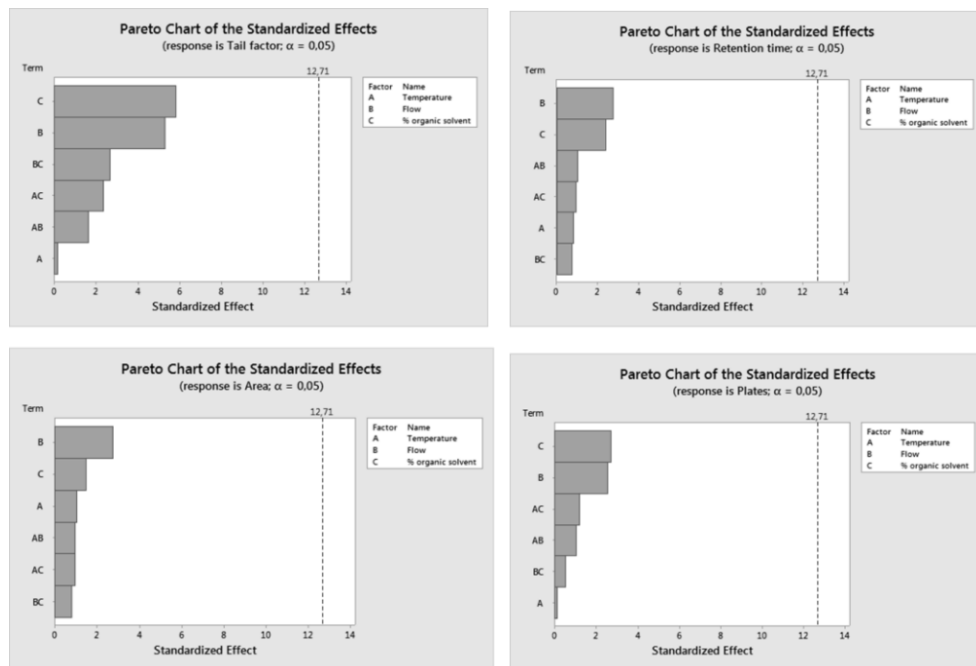


**Tabela 4:** Precisão e exatidão do método para quantificação da RIF em meio de cultura Czapek.

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

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

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



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