



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Avaliação de modelos químicos e microbiológicos para o estudo de (bio)transformações do antibiótico monensina A

Bruno Alves Rocha

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Avaliação de modelos químicos e microbiológicos para o estudo de (bio)transformações do antibiótico monensina A

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área: **Química**

Orientado: Bruno Alves Rocha

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marilda das Dores Assis

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Bruno Alves

Avaliação de modelos químicos e microbiológicos para o estudo de (bio)transformações do antibiótico monensina A. Ribeirão Preto, 2014.

141 p. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientadora: Assis, Marilda das Dores.

1. Monensina A. 2. Metabolismo *in vitro*. 3. Metaloporfirinas. 4. Catalisador de Jacobsen. 5. Biotransformação. 6. Citocromo P450.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Rocha, Bruno Alves

Título: Avaliação de modelos químicos e microbiológicos para o estudo de (bio)transformações do antibiótico monensina A

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta tese:

À minha amada Mãe, que sempre me ensinou os princípios básicos da vida, o amor e o respeito. E, sobretudo aceitou minha ausência, sempre me incentivando a seguir meus próprios caminhos.

À família Rocha que me fez sentir acolhido com palavras que tornaram-me mais forte diante das dificuldades.

Aos meus tantos amigos, que tornaram irmãos ao longo da minha jornada e foram sempre um ombro nesta longa caminhada até este momento tão esperado e desejado por mim.

Aos meus atuais Orientadores, Prof.^a Marilda e Prof. Anderson, bem como aos meus ex-orientadores, supervisores e professores. Sou abençoado por ter tido tantos bons exemplos. Serei eternamente grato a cada um de vocês que auxiliou na minha formação.

À minha amada Paula, desde o início, eu ainda não encontrei as palavras certas para descrever o quanto você é essencial para minha vida. Muito obrigado pela sabedoria das suas palavras: "Calma meu amor... tudo vai dar certo". Você é pessoa com quem eu quero dividir todas as minhas conquistas e sonhos. Agradeço a Deus o privilégio de ter você, uma pessoa tão única, que sabe ser ao mesmo tempo tão forte e meiga, independente e carente, inteligente e aprendiz, amiga e mulher.... Te amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser uma luz sempre presente em minha vida, por me proporcionar um caminho regado de sucesso e conquistas.

A minha mãe pelo apoio e sacrifício, por aceitar minha ausência, ser minha maior fonte de inspiração e dona das maiores ensinamentos que eu poderia aprender... Devo tudo que sou a você.

Aos Professores, Marilda das Dores Assis e Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, por terem me aceitado, pela orientação, confiança, amizade e por contribuir para minha formação tanto profissional quanto pessoal, que significa muito para mim, além dos ensinamentos que só os grandes mestres são capazes de dar e ao qual levarei sempre iluminando minha jornada daqui para frente. Tenham minha eterna gratidão por tantos ensinamentos e por serem um espelho e um exemplo a ser seguido por mim ao longo de minha vida.

A todos os amigos e ex-membros do "LABMETS". Cada um de vocês, de certa forma, contribuiu bastante para o meu crescimento pessoal e profissional, obrigado pela amizade e colaboração.

Aos Professores Luiz Alberto Beraldo de Moraes e Norberto Peporine Lopes por cederem o espaço de seus laboratórios para análises envolvendo espectrometria de massas bem como na contribuição para o entendimento da técnica e elucidção estrutural dos metabólitos obtidos. Agradecimento especial à aluna de doutorado Ana Paula Ferranti Peti, que me auxiliou durante todo o trabalho envolvendo LC-MS e LC-MS/MS bem como ao Químico e técnico José Carlos Tomaz pelas análises espectrométricas em ESI-Qq-TOF.

Às Profas. Hosana Deboni, Mônica T. Pupo e Niege A. J. C Furtado por cederem os fungos utilizados.

Ao Professor Daniel J. Dorta e seu orientado, Murilo Pazin pelos testes de avaliação de toxicidade em mitocôndrias e a Pesquisadora, chefe do laboratório

P, D e I da Apis Flora Ind. LTDA, Dra. Andresa Berreta pelos ensaios de atividades antibacterianas.

Aos colaboradores internacionais, Dr. Stanislav Pospisil (Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic) e ao Prof. Paul J. Gates (School of Chemistry, University of Bristol).

Aos meus amigos, atuais professores, Bruno L. Batista e Jairo L. Rodrigues, irmãos desde os tempos de graduação. Saiba que eu tenho em vocês inspiração e admiração.

Aos meus amigos e (ex) moradores da república TFM: incansáveis foram às vezes que me deram apoio e conselhos.

Aos meus amigos e aos colaboradores dos tempos de Apis Flora Ind. Com. Os dois anos ao lado de vocês (e todo este tempo ainda depois de colaborações e amizade) foi muito enriquecedor, pelo conhecimento transmitido e pela amizade. Em especial aos meus compadres Felipe Galeti e Leandro Ricordi, grandes "irmãos" na minha caminhada, muito obrigado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (2011/05800-0) e também pelos auxílios financeiros do mesmo e das agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos os funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Em especial a todos da secretária e seção de pós-graduação pela atenção e dedicação nas minhas constantes dúvidas.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado!

Reflexão

"As oportunidades são únicas. Já ancorado na Antártica, ouvi ruídos que pareciam de fritura. Pensei: Será que até aqui existem chineses fritando pastéis? Eram cristais de água doce congelada que faziam aquele som quando entravam em contato com a água salgada. O efeito visual era belíssimo. Pensei em fotografar, mas falei pra mim mesmo - Calma você terá muito tempo para isso... Nos 637 dias que seguiram o fenômeno não se repetiu. As oportunidades são únicas."

Amyr Klink

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver"

Amyr Klink

RESUMO

ROCHA, B. A. **Avaliação de modelos químicos e microbiológicos para o estudo de (bio)transformações do antibiótico monensina A.** 2014. 141 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Neste trabalho foram investigados sistemas modelos do citocromo P450 para o estudo do metabolismo da monensina A empregando três estratégias de abordagem: a) utilização de metaloporfirinas e complexos salen como catalisadores para a oxidação da monensina A por diferentes oxidantes e meios reacionais; b) utilização de fungos de diferentes cepas para estudos de biotransformação deste antibiótico e c) emprego de microssomas de fígado de ratos e humanos para o estudo do metabolismo *in vitro* da monensina A. Os produtos obtidos nestes três sistemas foram comparados com os metabólitos formados em estudos *in vivo* relatados na literatura. Os resultados obtidos com os sistemas envolvendo os catalisadores mostraram que a formação dos produtos é dependente da escolha do meio reacional e do oxidante empregado. Os estudos de biotransformação da monensina A empregando microssomas de fígado e os fungos *Aspergillus awamori*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium oxysporum*, M61, *Mucor rouxii* e *Penicillium brevicompactum* mostraram que estes sistemas são viáveis nos processos de biotransformação deste fármaco nas condições empregadas. Os produtos obtidos nas reações e/ou meios de cultura com os diferentes sistemas foram identificados por espectrometria de massas sequencial e também por comparação com padrões obtidos anteriormente. Foram obtidos três principais metabólitos: (i) 3-O-desmetil-monensina A, (ii) 12-hidroxi-monensina A e (iii) 12-hidroxi-3-O-desmetil-monensina A, os quais coincidem com os principais metabólitos obtidos em estudos *in vivo*. Assim, os resultados mostraram que os modelos estudados podem ser usados para prever o metabolismo da monensina A. Os metabólitos 3-O-desmetil-monensina A e 12-hidroxi-monensina A puderam ser produzidos e isolados dos sistemas catalíticos envolvendo a metaloporfirina e o catalisador de Jacobsen. Os ensaios biológicos de atividade tóxica em mitocôndrias, bem como a atividade antimicrobiana da monensina A e de seus metabólitos 3-O-desmetil-monensina A e 12-hidroxi-monensina A mostraram que estes metabólitos possuem menor ou nenhuma atividade nos parâmetros biológicos testados quando comparados à monensina A. Assim, pode-se inferir que o metabolismo da monensina A corresponde a uma via de detoxicação clássica, através da qual as moléculas produzidas são mais polares, dificultando o transporte de complexos catiônicos através das membranas, diminuindo suas propriedades biológicas e facilitando a sua eliminação.

Palavras-chave: Monensina A. Metabolismo *in vitro*. Metaloporfirinas. Catalisador de Jacobsen. Biotransformação. Citocromo P450.

ABSTRACT

ROCHA, B. A. **Evaluation of microbiological and chemical models for the study of (bio)transformations of the antibiotic monensin A.** 2014. 141 f. Thesis (Ph.D., Doctorate) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

This study used model systems to investigate monensin A metabolism. More specifically, this work employed three strategies: (i) use of biomimetic systems, involving metalloporphyrins and salen complexes, to catalyze monensin A oxidation by different oxidants in distinct reaction media; (ii) application of different fungal strains to conduct biotransformation studies of this antibiotic; and (iii) use of rat and human liver microsomes as a cytochrome P450 model to monitor the *in vitro* metabolism of monensin A and compare the products with the metabolites generated in *in vivo* studies reported in the literature. Studies involving chemical catalysts showed that product formation depended on the choice of reaction medium and oxidant. Monensin A biotransformation studies employing fungi revealed that *Aspergillus awamori*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium oxysporum*, Marine M61, *Mucor rouxii*, and *Penicillium brevicompactum* successfully biotransformed the drug under the employed conditions. Liver microsomes also effectively transformed the target compound. Spectrometric analysis of the evaluated models attested to the formation of three main metabolites: (i) 3-O-demethyl monensin A, (ii) 12-hydroxy monensin A, and (iii) 12-hydroxy-3-O-demethyl-monensin A as the main monensin A derivatives. The products were identified by tandem mass spectrometry as well as by comparison with standards obtained in other studies. Taken together, the results demonstrated that the models studied herein could help to predict monensin A metabolism—they produced the main metabolites obtained in *in vivo* studies. Toxicity tests performed on mitochondria and antimicrobial assays revealed that the metabolites 3-O-demethyl-monensin A and 12-hydroxy-monensin A isolated from the reactions that employed chemical catalysts were less active or inactive as compared with monensin A. Therefore, it was possible to infer that monensin A metabolism is a classical detoxification pathway that generates polar molecules. The transport of such cationic molecules through the membrane is more difficult, decreasing their biological properties and facilitating their elimination.

Keywords: Monensin A. *In vitro* metabolism. Metalloporphyrin. Jacobsen Catalyst. Biotransformation. Cytochrome P450.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos principais ionóforos poliéteres empregados para o tratamento da coccidiose.....	4
Figura 2. Estrutura quasi-cíclica da monensina A complexada com o íon sódio.	5
Figura 3. Principais reações químicas realizadas pelas enzimas da citocromo P450 (ORTIZ-MONTELLANO, 2010).	7
Figura 4. Enzima do citocromo P450 destacando seu sítio ativo, a ferro(III)protoporfirina IX (SIMÕES et al., 2013).	8
Figura 5. Ciclo catalítico comum das enzimas da citocromo P450 (DENISOV et al., 2005).	9
Figura 6. Correlação entre os sistemas biomiméticos, métodos <i>in vitro</i> e métodos <i>in vivo</i> para os estudos de metabolismo de xenobióticos (adaptado de Lohman; Karst, 2008).	12
Figura 7. A - Ferro(III)protoporfirina IX, grupo prostético do citocromo P450; B - Cloreto de [5, 10, 15, 20- <i>tetraquis</i> (2,6-diclorofenil) porfirina Ferro III] - Fe(TDCPP)Cl; C - Cloreto de [5, 10, 15, 20- <i>tetraquis</i> (2,6-pentafluorofenil) porfirina Ferro III] - Fe(TFPP)Cl, sendo B e C porfirinas de 2ª geração.....	13
Figura 8. Estrutura química do catalisador de Jacobsen (complexo salen).....	14
Figura 9. Exemplos de oxidação de fármacos catalisados por sistemas metaloporfirínicos e catalisador de Jacobsen.....	17
Figura 10. Exemplos de oxidação de produtos naturais catalisados por sistemas metaloporfirínicos e catalisador de Jacobsen.....	18
Figura 11. Exemplos de biotransformação de fármacos por fungos.	21
Figura 12. Exemplos de biotransformação de produtos naturais por fungos.	22
Figura 13. Exemplos de estudos de metabolismo <i>in vitro</i> de fármacos e produtos naturais empregando microssomas de fígado.....	24

Figura 14. Esquema ilustrativo das etapas de biotransformação empregando fungos.	35
Figura 15. Cromatograma e espectros de massas da MonA e MonB obtido a partir da análise do padrão de monensina A.	46
Figura 16. Foto das placas de CCDC resultantes das análises das misturas reacionais de oxidação da monensina A nas diferentes condições descritas no Quadro 1.	48
Figura 17. Curva analítica referente à análise da monensina A por LC-MS (condições descritas no item 3.3.5).	49
Figura 18. Gráfico da comparação das porcentagens de conversão da monensina A em todas as condições reacionais testadas.	50
Figura 19. Perfis cromatográficos das reações 5, 6, 13, 14, 21 e 22 – reações com maior porcentagem de oxidação da MonA (condições reacionais estabelecidas no Quadro 3) (eixo da abscissa em min).	54
Figura 20. Perfil cromatográfico do sistema reacional 5, em escala analítica e em escala preparativa. Destacando os dois metabólitos isolados posteriormente por CCDP (eixo das abscissa em min).	55
Figura 21. Cromatograma obtido na análise por LC-MS da cultura do fungo <i>Cunninghamella echinulata</i> var. <i>elegans</i> ATCC 8688A incubado com a monensina A, mostrando os metabólitos formados. Cromatograma do Dia 0 – dia 8 = Meio de Czapek com MonA incubada com os fungos; Controle = MonA incubada apenas com meio Czapek; Branco = fungos incubadas em Czapek sem Mon.A. Na análise do branco, o pico principal do cromatograma tem m/z 659, não correlacionado com produtos de biotransformação nem como metabólito secundário do fungo (eixo da abscissa em min).	58
Figura 22. Cromatograma obtido na análise por LC-MS da cultura do fungo <i>Cunninghamella elegans</i> NRRL 1393 ATCC 10028B incubado com a monensina A, mostrando os metabólitos formados. Cromatograma do Dia 0 – dia 8 = Meio de	

Czapek com MonA incubada com os fungos; Controle = MonA incubada apenas com meio Czapek; Branco = fungos incubadas em Czapek sem MonA. Na análise do branco, o pico principal do cromatograma tem m/z 659, não correlacionado com produtos de biotransformação nem como metabólito secundário do fungo.59

Figura 23. Perfil cromatográfico da reação de biotransformação empregando o fungo *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B – Transposição da escala analítica para escala ampliada, destacando os metabólitos elucidados neste estudo (eixo da abscissa em min).....61

Figura 24. Cromatogramas típicos obtidos nas análises das reações de oxidação da monensina A empregando metaloporfirina e biotransformação empregando fungo (eixo da abscissa em min).....62

Figura 25. Rotas de fragmentação propostas para a monensina A sodiada, mostrando os principais íons produtos formados nas análises por ESI-EM/EM (monensina A ($R=CH_3$) e monensina B ($R=H$)) (Adaptado de Lopes et al. (2002a; 2002b)).....65

Figura 26. Espectro de massas dos íons produtos da monensina A.....68

Figura 27. Espectro de massas dos íons produtos do metabólito 1 (m/z 679).....69

Figura 28. Espectro de massas dos íons produtos do metabólito 2 (m/z 709).....70

Figura 29. Espectro de massas dos íons produtos do metabólito 3 (m/z 695).....71

Figura 30. Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto E.....73

Figura 31. Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto m/z 303.....75

Figura 32. Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto L.....76

- Figura 33.** Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto de m/z 441, íon chave para detecção da posição da –OH nos metabólitos 2 e 3.77
- Figura 34.** Estrutura química da monensina A e dos metabólitos obtidos; Metabólito 1 (m/z 679, 3-*O*-desmetil-monensina A), metabólito 2 (m/z 709, 12-hidroxi-monensina A e metabólito 3 (m/z 695, 3-*O*-desmetil-12-hidroxi-monensina A).....78
- Figura 35.** Monensina A e seus metabólitos encontrados em sistemas *in vivo* (NEBBIA et al., 1999). Em destaque os metabólitos 1, 2 e 3 que também foram descritos neste trabalho.79
- Figura 36.** Perfis cromatográficos obtidos nos estudos de biotransformação da monensina A pelo fungo *C. echinulata* bem como no modelo biomimético (sistema reacional 21) em comparação com o padrão do metabólito 1 descrito por Pospisil e colaboradores (1986) (eixo da abscissa em min).....81
- Figura 37.** Perfis cromatográficos obtidos nos estudos de biotransformação da monensina A pelo fungo *C. echinulata* bem como no modelo biomimético (sistema 21) em comparação com o padrão do metabólito 2 descrito por Sousa-Junior e colaboradores (2013) (eixo da abscissa em min).....82
- Figura 38.** Perfis cromatográficos obtidos nos estudos de biotransformação da monensina A pelo fungo *C. echinulata* bem como no modelo biomimético (Reação 21) em comparação com o estudo de oxidação do metabólito 2 pelo sistema biomimético descrito por Sousa-Junior et al. (2013) (eixo da abscissa em min).....83
- Figura 39.** Perfis cromatográficos obtidos a partir das injeções de soluções metanólicas do padrão de MonA logo após preparo e após 20 dias em temperatura de 4°C, mostrando as formação de 4 principais produtos de degradação (eixo da abscissa em min).84
- Figura 40.** Espectros de massas dos íons produtos dos produtos de degradação de m/z 707 (t_R 16,5 min- metil-éster-monensina A) e m/z 721 (t_R 18,5 min - metil-éster-monensina somado com um cetil).....85

- Figura 41.** Estrutura dos principais íons fragmentos observados nos estudos de fragmentação dos produtos de degradação de m/z 707 (t_R 16,5 min- Metil-éster-monensina A, PD1) e m/z 721 (t_R 18,5 min- metil-éster-monensina somado com um cetil, PD2).....86
- Figura 42.** Estruturas químicas propostas para os produtos de degradação da monensina A.86
- Figura 43.** Cromatogramas (LC-ESI-MS/MS – modo de aquisição MRM) da MonA, MonB, metabólito 1, metabólito 2 e metabólito 3 obtidos no estudo de metabolismo *in vitro* com microssomas de fígado de ratos (eixo da abscissa em min).88
- Figura 44.** Cromatogramas (LC-ESI-MS/MS – modo de aquisição MRM) da MonA, MonB, metabólito 1, metabólito 2 e metabólito 3 obtidos no estudo de metabolismo *in vitro* com microssomas de fígado de humanos (eixo da abscissa em min).....88
- Figura 45.** Perfil cromatográfico das reações de (bio)transformações da monensina A nos 3 modelos empregados: Microssomas (de fígado de humanos), microbiológico (fungo *Cunninghamella echinulata*) e biomimético (metaloporfirina - reação 21) (eixo da abscissa em min).89
- Figura 46.** Avaliação da monensina A e do metabólito 1 e 2 (1 μ M) sobre a dissipação do potencial da membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (1 mg de proteína.mL⁻¹). Os pontos representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle (ausência do composto). * Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).92
- Figura 47.** Avaliação da monensina A e dos metabólitos 1 e 2 (1 μ M) sobre o inchamento mitocondrial de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (1 mg proteína.mL⁻¹). Os pontos representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle (ausência do composto). * Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).....92

Figura 48. Avaliação da monensina A e dos metabólitos 1 e 2 (1 μM) sobre a produção de espécies reativas do oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (1 mg de proteína. mL^{-1}) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle (ausência do composto). * Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).93

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista de reagentes e solventes utilizados nos estudos de (bio)transformação da monensina A.28
- Tabela 2.** Identificação dos picos cromatográficos observados nas análises das reações de (bio)transformação da monensina A.....63
- Tabela 3.** Fórmula, massa observada, massa calculada, erro das análises da MonA e seus metabólitos empregando a espectrometria de massas de alta resolução.66
- Tabela 4.** Identificação dos íons fragmentos observados nos espectros dos íons produtos para monensina A e os metabólitos obtidos.....67
- Tabela 5.** Valores dos efeitos causados pela monensina A e os seus metabólitos 1 e 2 na concentração de 1 μM , nos parâmetros respiratórios, tendo como substrato glutamato + malato.....91
- Tabela 6.** Concentração Bactericida Mínima da monensina A, metabólito 1 e metabólito 2 e controles (DMSO, Cloranfenicol) contra as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, e contra bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Resultados expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
ADP/O	Razão de ADP por molécula de Oxigênio
ANSA	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	Adenosina trifosfato
CCCP	Cianeto de carbonila cloro fenilhidrazona
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CYP450	Citocromo P450
DCE	1, 2-Dicloroetano
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ácido Etilenoglicol bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'- tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	Ionização por eletrospray
ESI-MS/MS	Ionização por eletrospray acoplada a espectrometria de massa em sequência
Qq-TOF	Espectrometria de massas com analisador de massa híbrido (quadropolo/tempo de voo)
Fe(TDCPP)Cl	Cloreto de [5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (2,6-diclorofenilporfirina) ferro III]
Fe(TFPP)Cl	Cloreto de [5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (pentafluorofenilporfirina) ferro III]
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
HEPEs	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
LC	Cromatografia líquida
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida com ionização por eletrospray e analisador de massas em sequência
LC-MS	Cromatografia líquida com ionização por eletrospray
LC-MS/MS	Cromatografia líquida com analisador de massas em sequência
<i>m/z</i>	Razão massa carga

<i>m</i> -CPBA	Ácido 3-cloro-peroxibenzoico
MeOH	Metanol
MnTFPP	Cloreto de [5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (pentafluorofenil)porfirina manganês III]
MonA	Monensina A
MonB	Monensina B
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) (forma reduzida)
PDA	“Potato Dextrose Agar”
RCR	Razão de Controle Respiratório
R-R Jacobsen	Cloreto de [(<i>R,R</i>)-(-)N,N'-bis(3,5-di- <i>terc</i> -butilsalicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III]
S-S Jacobsen	Cloreto de (<i>S,S</i>)-(-)N,N'-bis(3,5-di- <i>terc</i> -butilsalicilideno)-1,2-diaminociclo-hexil manganês III
<i>t</i> -BOOH	<i>terc</i> -butilidroperóxido
<i>t</i> _R	Tempo de retenção
u	Unidade de massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Monensina A, um antibiótico ionóforo natural	2
1.2. Aspectos gerais do metabolismo de xenobióticos e as enzimas da citocromo P450	6
1.3. Emprego de modelos in vitro para o estudo de metabolismo	10
1.4. Emprego de metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen como modelos biomiméticos da citocromo P450	12
1.5. Emprego de fungos nos processos de biotransformação	19
1.6. Estudos de metabolismo in vitro empregando microsomas hepático	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivos gerais	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Materiais: Reagentes e Solventes	28
3.2. Equipamentos.....	30
3.3. Métodos	31
3.3.1. Inserção de Ferro (III) nas porfirinas $H_2(TFPP)Cl$	31
3.3.2. Estudos da oxidação da monensina A empregando catalisadores químicos.....	31
3.3.3. Estudos de biotransformação da monensina A empregando fungos	33
3.3.3.1. Fungos utilizados.....	33
3.3.3.2. Transformações Microbianas da monensina A empregando fungos	33
3.3.4. Análise dos produtos de (bio)transformação da monensina A por cromatografia em camada delgada comparativa	35
3.3.5. Análise da monensina A e dos produtos de reação por LC-MS e MS/MS.....	36
3.3.6. Estudo do metabolismo in vitro da monensina A empregando microsomas hepático de ratos.....	37

3.3.7. Estudo do metabolismo in vitro da monensina A empregando microsomas hepático de humanos	38
3.3.8. Avaliação da toxicidade da Monensina A e seus metabólitos utilizando modelo mitocondrial	39
3.3.8.1. Respiração mitocondrial	40
3.3.8.2. Potencial de membrana mitocondrial.....	41
3.3.8.3. Inchamento mitocondrial.....	41
3.3.8.4. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio.....	42
3.3.9. Avaliação da atividade antibacteriana da monensina A e seus metabólitos	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Desenvolvimento do método cromatográfico para análise da monensina A e seus produtos de (bio)transformação	45
4.2. Estudos catalíticos de oxidação da monensina A empregando a Fe(TFPP)Cl e o Catalisador de Jacobsen	47
4.3. Estudos de biotransformação da monensina A empregando fungos.....	56
4.4. Elucidação estrutural dos produtos obtidos por espectrometria de massas em sequência	62
4.5. Confirmação dos metabólitos elucidados	80
4.6. Produtos de degradação da monensina A.....	83
4.7. Estudo do metabolismo in vitro da monensina A empregando microsomas de fígados de ratos e humanos	87
4.8. Avaliação da toxicidade da monensina A e metabólitos utilizando o modelo mitocondrial	89
4.9. Avaliação da atividade antibacteriana da monensina A e seus metabólitos ..	94
5. CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Monensina A, um antibiótico ionóforo natural

A história dos antibióticos ionóforos iniciou-se em 1951 quando dois destes compostos, nigericina e lasalocida, foram isolados como produtos da fermentação de diferentes espécies de actinomicetos do gênero *Streptomyces* sp. Desde então, foram descritos mais de 50 micro-organismos com a capacidade de produção destes compostos, sendo que mais de 120 estruturas desta classe de metabólitos já foram relatadas (BERGER et al., 1951; DUTTON; BANKS; COOPER, 1995; HUCZYNSKI, 2012; RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013; WESTLEY, 1982). O termo ionóforo foi utilizado pela primeira vez em 1967, em referência à capacidade destas moléculas orgânicas de ligar-se à forma catiônica de alguns metais e formarem complexos lipossolúveis, o que facilita o transporte dos íons através das membranas celulares (HANEY; HOEHN, 1967; HUCZYNSKI, 2012; MOLLENHAUER; MORRÉ; ROWE, 1990; PRESSMAN, 1976; RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013).

Os ionóforos poliéteres são moléculas lipossolúveis, geralmente sintetizadas por micro-organismos, para transportar íons através da bicamada lipídica da membrana celular. Os ionóforos contêm diversos átomos de oxigênio espaçados através da molécula, os quais criam uma cavidade capaz de entrapar um cátion (**Figura 1** e **Figura 2**) (HUCZYNSKI, 2012; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013; PRESSMAN, 1976; RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013)). As suas propriedades químicas e biológicas estão relacionadas com a sua capacidade de formarem complexos macrocíclicos eletricamente neutros com cátions mono- e divalentes, através da coordenação via átomos de oxigênio funcionais internos (pares de elétrons não ligantes dos oxigênios dos anéis tetraidrofurano e tetraidropirano) mantendo, assim, uma superfície exterior lipofílica (substituintes metil e etil) (**Figura 2**) (HANEY; HOEHN, 1967; HUCZYNSKI, 2012; PRESSMAN, 1976; RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013).

Para sobreviver, as bactérias mantêm, em condições normais, elevadas concentrações de Mg^{2+} e K^+ dentro da célula enquanto, seletivamente, excluem Na^+ e Ca^{2+} . As propriedades antimicrobianas dos ionóforos são resultado desta

habilidade em transportar cátions através das membranas celulares, perturbando o gradiente natural de íons (principalmente o aumento de Na⁺ e diminuição de K⁺) e, finalmente, causando a morte celular (HUCZYNSKI et al., 2012; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013; WESTLEY, 1982).

Atualmente esta classe de antibióticos vem sendo empregado diariamente na medicina veterinária, como aditivo alimentar, promotor de crescimento para ruminantes e principalmente como coccidiostático para aves (HUCZYNSKI et al., 2012; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013; WESTLEY, 1982). Coccidiose é uma doença entérica causada por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Eimeria*, que pode levar a mudanças patológicas nas células epiteliais do trato digestivo das aves, mudanças estas que variam desde a destruição deste tecido até tecidos subjacentes. Esta infecção acarreta um grande impacto econômico sobre o mercado de carnes, devido ao aumento nas taxas de mortalidade animal e redução nas taxas de ganho de peso (ELLIOT; MACCAGHEY., 1998; LI et al., 2005). Mesmo durante uma infecção branda, as perdas de peso por deficiência alimentar e diminuição da produção de ovos resultam em prejuízos econômicos ao produtor (LI et al., 2005).

Mundialmente são investidos milhões de dólares na prevenção e controle da coccidiose (DING et al., 2005). Calcula-se que os gastos no mundo, incluindo os prejuízos zootécnicos e a utilização de medicamentos com fins curativos e preventivos, sejam de 800 milhões a 3 bilhões de dólares por ano (ALLEN; FETTERER, 2002). Hoje, existe no mercado um grande número de fármacos disponíveis para o tratamento e prevenção da coccidiose, sendo que o tratamento utilizando antibióticos ionóforos tem demonstrado ser o mais eficiente no combate e controle desta parasitose. Os principais membros desta classe de antibióticos ionóforos são a salinomicina, narasina, lasalocida, valinomicina, maduramicina e principalmente a monensina A (**Figura 1**) (LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013).

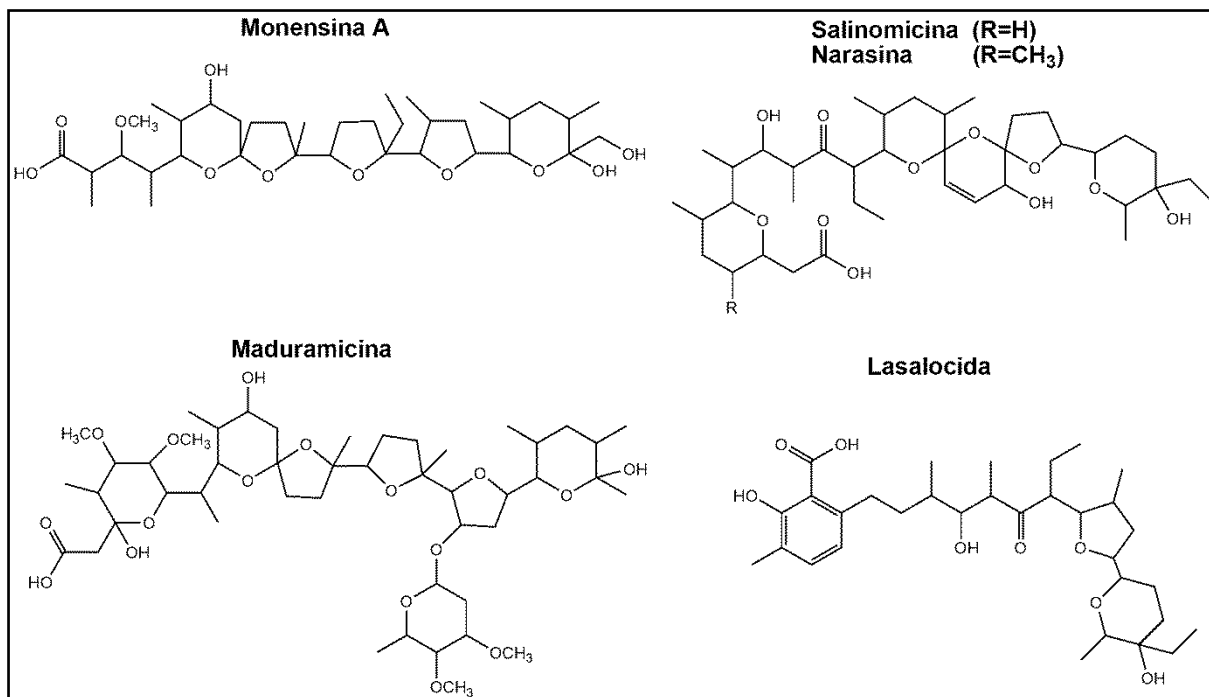


Figura 1. Estruturas químicas dos principais ionóforos poliéteres empregados para o tratamento da coccidiose.

Monensina A (MonA) (**Figura 1** e **Figura 2**) é o principal representante da classe de antibióticos ionóforos poliéter de origem natural, isolados de cepas de actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Foi descoberto por Agtarap et al. (1967) como um metabólito formado na biossíntese da actinobactéria *Streptomyces cinnamonensis*. Da mesma forma que os outros antibióticos ionofóros, suas propriedades químicas e biológicas estão relacionadas com a sua capacidade de formar complexos com cátions, principalmente o sódio (**Figura 2**), e transportar o complexo formado através das membranas das células, modificando assim o gradiente químico normal de concentração Na^+/K^+ e, dessa forma, causando a morte celular (HUCZYNSKI, 2012; HUCZYNSKI et al., 2008, 2011; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013).

Desde sua descoberta, a MonA tem sido um interessante tema de pesquisas científicas devido a seu amplo espectro de atividades biológicas, que englobam as suas atividades antibacterianas contra bactérias Gram-positivas, atividades antiparasitárias, antimaláricas, antivirais e, recentemente, os relatos sobre suas atividades citotóxicas sobre células tumorais. Essas propriedades biológicas são a base para aplicação deste composto e seus derivados nos campos de pesquisa pela busca por novos produtos farmacêuticos (ADOVELANDE; SCHRÉVEL, 1996;

HUCZYNSKI, 2012; JOHNSON; SPEAR, 1982; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013; PAL; GALLO; SARNGADHARAN, 1988; SUROLIA; PACHAURI; GHOSH, 2012).

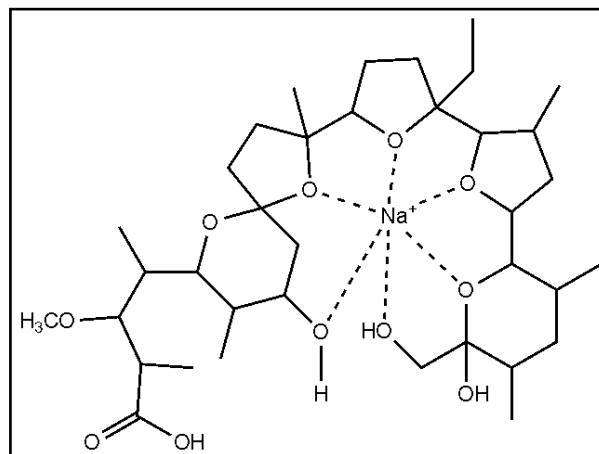


Figura 2. Estrutura quasi-cíclica da monensina A complexada com o íon sódio.

A MonA é segura e eficaz quando usada nas dosagens recomendadas, mas é necessário levar em conta que, devido a sua estreita janela terapêutica, vários casos de envenenamentos acidentais têm sido descritos na literatura envolvendo animais (HENRI et al., 2008) e também seres humanos (CALDEIRA et al., 2001; KOUYOUMDJIAN et al., 2001; SOUZA et al., 2005). Outro aspecto importante, são os relatos recentes da presença de níveis significativos de resíduos de MonA em carne de frango e ovos (ROSÉN, 2001; ROKKA; PELTONEN, 2006; MOLONEY; CLARKE e O'MAHONY, 2012) levando a possibilidade de interação com outros fármacos, uma vez que a MonA é metabolizada pelas enzimas da família 3A da citocromo P450 (CYP450), o que pode resultar em problemas a saúde humana, tais como a resistência a antibióticos e intoxicações (NEBBIA et al., 1999, 2001).

Além disso, pesquisas recentes sobre o uso da MonA na terapia de combate ao câncer têm despertado a atenção por estudos envolvendo o uso deste fármaco em seres humanos (HUCZYNSKI, 2012; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013). Sendo assim, para se conhecer as ações da MonA e seus metabólitos nos organismos, bem como os riscos de toxicidade associados a estes compostos, faz-se necessário a utilização de modelos que simulem o metabolismo deste composto e levem à compreensão acerca do seu mecanismo de ação, toxicidade e farmacocinética em seres humanos.

1.2. Aspectos gerais do metabolismo de xenobióticos e as enzimas da citocromo P450

O metabolismo é definido basicamente como modificações estruturais que os xenobióticos sofrem por sistemas enzimáticos, principalmente, pelas enzimas da CYP450 presentes no retículo endoplasmático das células, que conduzem a formação de substâncias relativamente mais polares, as quais são mais facilmente excretadas do organismo (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

A CYP450 é uma família muito ampla e diversificada de hemeoproteínas, classificadas como mono-oxigenases. As mono-oxigenases estão relacionadas com a biotransformação de xenobióticos em produtos mais polares, tornando-os mais facilmente excretados pelos organismos. Algumas das reações em que a CYP450 participa são modificações químicas chave no metabolismo de lipídeos, na biossíntese de corticosteroides e na desintoxicação de fármacos e xenobióticos (FASAN, 2012; SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013).

Todas as enzimas da CYP450 descritas até o momento são hemeoproteínas que contém uma ferro-porfirina como grupo prostético, o qual é entrapado dentro das cadeias de polipeptídeos da proteína, com um sítio de ligação bem definido que confere acessibilidade específica ao substrato (ORTIZ DE MONTELLANO, 2010; RITTLE; GREEN, 2010). Dentre as principais reações catalisadas pela CYP450 podemos destacar as epoxidações, *N*- *S*- e *O*-desalquilações, *N*-oxidações, sulfoxidações, desalogações e hidroxilações (**Figura 3**).

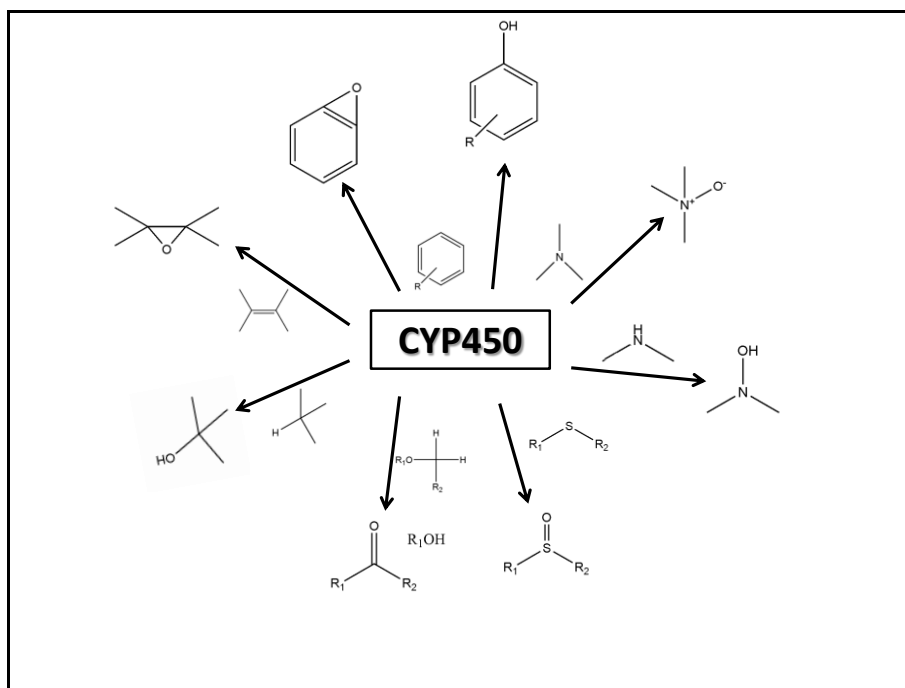


Figura 3. Principais reações químicas realizadas pelas enzimas da citocromo P450 (ORTIZ DE MONTELLANO, 2010).

O sítio ativo das enzimas da CYP450 contém a ferroprotoporfirina IX (**Figura 4**) situada em uma cavidade hidrofóbica na proteína. A quinta posição de coordenação do metal está ocupada por um átomo de enxofre de uma cisteína residual, responsável pela ligação do sítio ativo da enzima e o sexto sítio de coordenação está ligado a uma molécula de água, sendo este o sítio responsável pela ativação do oxigênio molecular (ORTIZ DE MONTELLANO, 2010; RITTLE; GREEN, 2010).

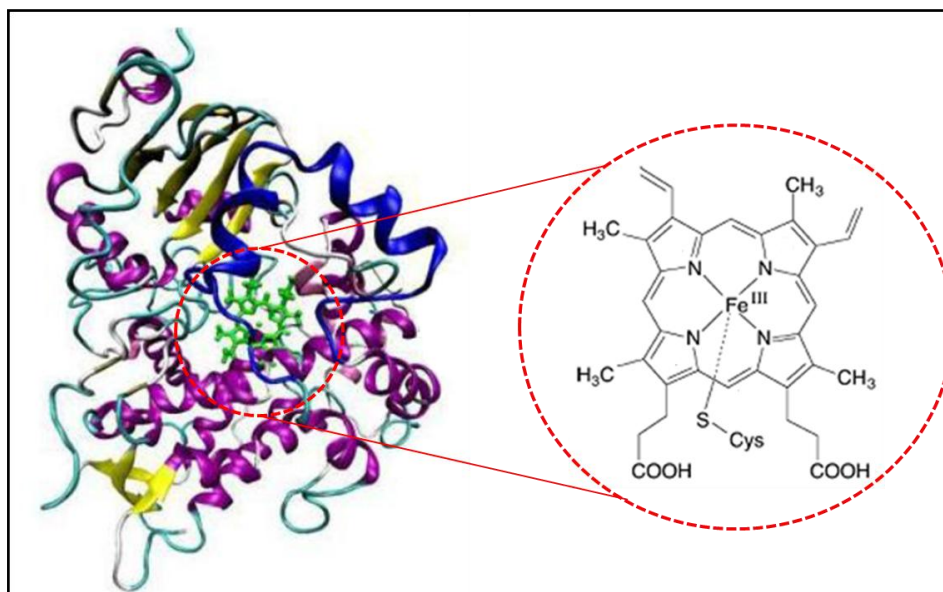
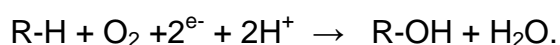


Figura 4. Enzima do citocromo P450 destacando seu sítio ativo, a ferro(III)protoporfirina IX (SIMÕES et al., 2013).

Apesar da diversidade de substratos que podem ser oxidados e dos diversos tipos de reações catalisadas pelas enzimas da CYP450, estas possuem um ciclo catalítico comum (**Figura 5**). *In vivo*, o CYP450 catalisa a transferência de um átomo de oxigênio molecular para o substrato e o segundo átomo de oxigênio é reduzido à água por equivalentes redutores fornecidos por NADPH ou NADH (DENISOV et al., 2005; FASAN, 2012). O ciclo catalítico da enzima é representado, de forma geral pela equação:



De maneira geral, o ciclo catalítico da CYP450 é dividido em cinco principais etapas (**Figura 5**) (DENISOV et al., 2005): 1) Ligação do substrato e redução do ferro do estado férrico (Fe^{III}) a ferroso (Fe^{II}); 2) Ligação do oxigênio molecular ao ferro da ferro(II)protoporfirina IX; 3) Clivagem do oxigênio molecular (ativação); 4) Oxidação do substrato e 5) Liberação do produto oxidado.

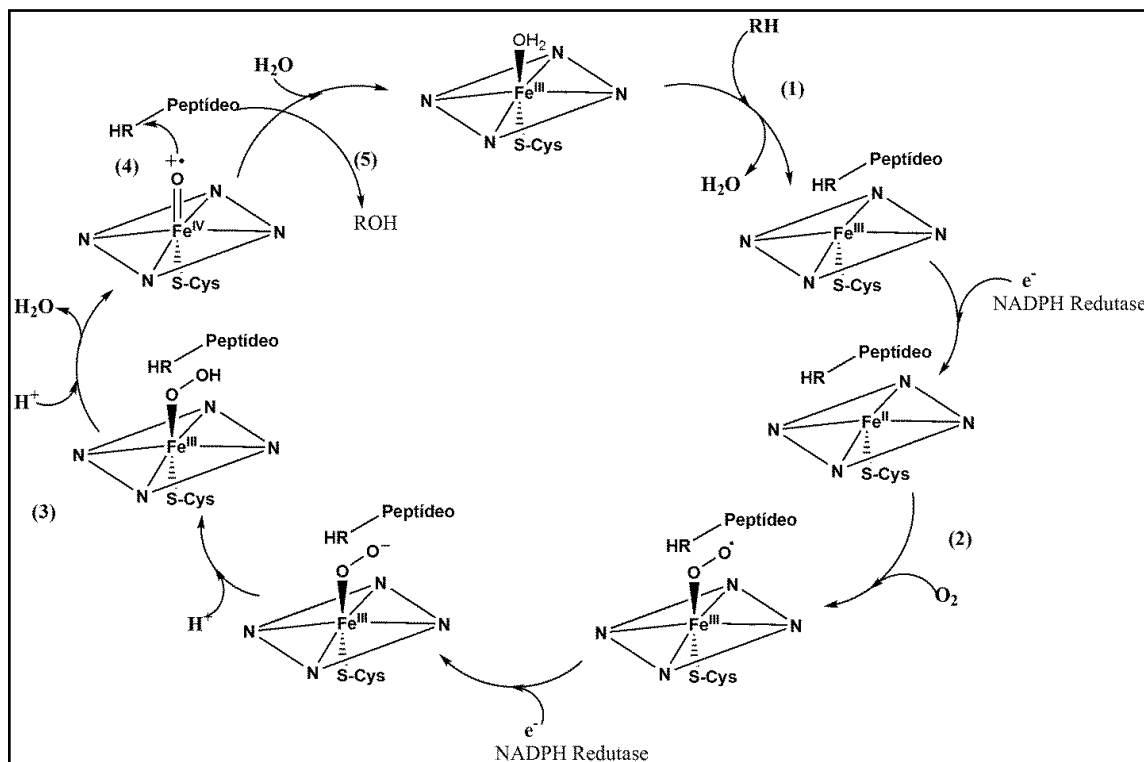


Figura 5. Ciclo catalítico comum das enzimas da citocromo P450 (DENISOV et al., 2005).

A etapa 1 é iniciada com o íon ferro (III) do grupamento prostético em estado de spin baixo com seu sexto ponto de coordenação ligado a uma molécula de água. A aproximação do substrato desloca a molécula de água seguida pela redução, que consome NADPH, ao estado de oxidação ferroso (Fe^{II}).

Na etapa 2, ocorre a ligação do oxigênio em estado triplete com o ferro, formando o radical $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}-\text{O}^{\bullet})$. Este é o último intermediário relativamente estável do ciclo. A próxima transferência de elétrons (etapa 2) para o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}-\text{O}^{\bullet})$ é a etapa limitante do ciclo e leva à formação de um complexo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}-\text{O})^{-}$ superóxido. Este complexo é protonado, dando origem ao complexo hidróperóxido $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}-\text{OH})$. A decomposição deste intermediário por clivagem heterolítica da ligação O-O origina $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})\text{P}^{+\bullet}$ ou $\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})\text{P}$, principal espécie responsável pela oxidação dos substratos (etapa 3). A este intermediário de alta valência é atribuída à oxidação *in vivo* dos xenobióticos, assim como a catálise envolvendo a hidroxilação de hidrocarbonetos, a epoxidação de alcenos, a oxidação de heteroátomos e ainda a clivagem de ligações C-C. Entretanto, o intermediário férrico hidróperóxido também pode ser responsável por outras reações do CYP450, como por exemplo, a epoxidação de alcenos e a

deformilação de aldeídos. Na última etapa o complexo $(\text{Por})\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ ou $[(\text{Por}^{\bullet})\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^+$ reage com o substrato, formando o produto oxidado e liberando uma molécula de água (etapas 4 e 5).

A nomenclatura dada as enzimas da CYP450 é baseada em dados genéticos, sendo dividida em família, subfamília e isoforma, conforme a similaridade da sequência de aminoácidos, a qual, em uma dada família, é pelo menos 40 % idêntica, e a sequência dentro de uma subfamília é mais 55 % idêntica. As enzimas têm em comum uma estrutura terciária global, apresentando uma alta conservação da região central, apesar de possuir similaridades menores que 20 % em sua sequência de aminoácidos nas diferentes famílias de P450 (DENISOV et al., 2005; MAC LEOD, 2008). Apesar da estrutura terciária ser altamente conservada, há diversidade estrutural suficiente para permitir a ligação de substratos de tamanhos significativamente diferentes para diferentes CYP450, e com vários graus de especificidade. Algumas CYP450 são altamente régio- e estereo seletivos na oxidação dos diferentes substratos, enquanto outra, tais como o CYP450 3A do fígado humano, metaboliza cerca de 70 % de todos os fármacos (DENISOV et al., 2005; MAC LEOD, 2008).

Das 57 isoformas de CYP450 descritas em humanos, a função de 12 permanece desconhecida, outras 15 (CYP450 1A1, CYP450 1A2, CYP450 2A6, CYP450 2A13, CYP450 2B6, CYP450 2C8, CYP450 2C9, CYP450 2C18, CYP450 2C19, CYP450 2D6, CYP450 2E1, CYP450 2F1, CYP450 3A4, CYP450 3A5 e CYP450 3A7) são responsáveis pelo metabolismo de xenóbioticos, e pertencem às famílias CYP450 1, CYP450 2 e CYP450 3 (DENISOV et al., 2005).

1.3. Emprego de modelos *in vitro* para o estudo de metabolismo

No campo de pesquisa que envolve a descoberta de novos medicamentos e produtos farmacêuticos, pesquisadores enfrentam um paradoxo: avaliar a segurança de compostos ativos e, ao mesmo tempo, minimizar o número de animais empregados nos estudos experimentais (LAMBERT et al., 2005). Atualmente, o emprego de animais na pesquisa científica é um tema polêmico, uma vez que tem crescido o número de entidades protetoras que exercem pressão sobre as autoridades governamentais para

que estas adotem medidas que proíbam, ou ao menos restrinjam, o uso de animais em experimentos no meio científico (FITZPATRICK, 2003).

Estudos envolvendo metabolismo de fármacos constituem uma importante e necessária etapa para avaliação da sua segurança e eficácia (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; PUPO et al., 2008). Embora estes estudos empreguem o uso de sistemas *in vivo*, infelizmente tais métodos possuem algumas limitações, por exemplo, o custo dos experimentos com animais, questões éticas e variações intraespécies. Além disso, devido à toxicidade de alguns fármacos, a quantidade administrada é pequena, dificultando o isolamento dos metabólitos formados *in vivo*. Portanto, é mais conveniente utilizar modelos alternativos nos estudos do perfil metabólico de fármacos que possibilitem a obtenção de diferentes metabólitos em quantidades suficientes para caracterização química, ensaios farmacológicos e toxicológicos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; LOHMANN; KARST, 2008).

Paralelamente aos estudos de metabolismo *in vivo*, têm sido usados modelos *in vitro* que permitem prever ou simular o perfil metabólico de fármacos e outros substratos, além de favorecer a obtenção de metabólitos que não são facilmente obtidos por vias convencionais de síntese orgânica. Geralmente técnicas *in vivo* utilizam animais de pequeno porte, sendo que plasma, urina ou outras matrizes biológicas destes animais são estudados para a identificação dos metabólitos formados. Os estudos *in vitro* são utilizados para complementar os estudos *in vivo*, sendo utilizados órgãos perfundidos, tecidos, cultura de células, preparações microssomais, entre outros (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; BERNADOU; MEUNIER, 2004; PEKALA; KUBOWICZ; LAZEWASKA, 2012). Uma regra que se aplica a todos os sistemas *in vitro* e biomiméticos é que a complexidade está relacionada diretamente, e a praticidade inversamente, à transferabilidade para uma situação *in vivo*, como mostrado na **Figura 6**.

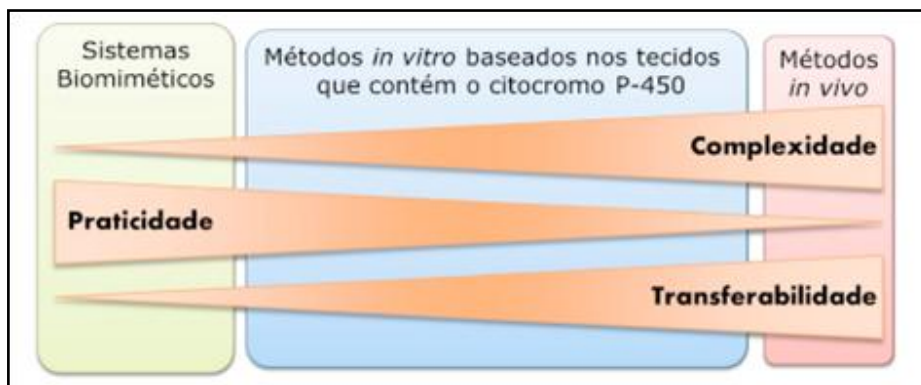


Figura 6. Correlação entre os sistemas biomiméticos, métodos *in vitro* e métodos *in vivo* para os estudos de metabolismo de xenobióticos (adaptado de LOHMANN; KARST, 2008).

Modelos *in vitro* oferecem outras vantagens importantes quando comparados aos modelos *in vivo*: necessitam de pequenas quantidades do fármaco ou substância ativa em estudo, os experimentos são relativamente simples e rápidos de executar, podem fornecer informações científicas valiosas em estágios iniciais de desenvolvimento de um novo fármaco e teste de eficácia, a um custo relativamente razoável. Modelos *in vitro* constituem uma simplificação de um organismo animal mais complexo, portanto, modelos *in vivo* e *in vitro* devem ser empregados de forma a fornecer informações complementares um ao outro, explorando sempre as vantagens que cada um oferece.

1.4. Emprego de metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen como modelos biomiméticos da citocromo P450

Vários modelos têm sido empregados no decorrer dos anos com o intuito de desenvolver sistemas práticos capazes de reproduzir as reações catalisadas por enzimas. Como discutido no item anterior (1.3), os métodos variam de experimentos diretos com animais ao uso de enzimas isoladas (LOHMANN; KARST, 2008; MANSUY, 2011). Além dos muitos problemas associados ao uso dessas técnicas *in vivo* e *in vitro* os estudos com animais são dispendiosos e devido à grande complexidade do CYP450, torna-se difícil isolar suas isoformas (MANSUY, 2011; MEUNIER, 2000). Assim, no decorrer das últimas décadas, vários grupos de pesquisa têm buscado o desenvolvimento de modelos sintéticos das enzimas da CYP450, visando elucidar os

mecanismos de ação destas no metabolismo de xenobióticos, especialmente fármacos, buscando conhecimento que permita desenvolver, no laboratório, a complexa química processada por estas enzimas (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; LOHMANN; KARST, 2008; MANSUY, 2011).

Além de permitirem uma melhor compreensão dos fenômenos *in vivo*, modelos biomiméticos das CYP450 visam também desenvolver sistemas catalíticos régio- e estereoespecíficos para a produção de fármacos e outras aplicações na química fina (MANSUY, 2011; SIMÕES et al., 2009, 2013). A catálise biomimética tem como objetivo atingir a eficiência e seletividade de enzimas, como as mono-oxigenases, através do uso de compostos de baixo peso molecular que desenvolvam a química do sítio ativo destas enzimas (BERKESSEL 2006; DOS SANTOS, 2011).

Até o presente momento, o modelo biomimético mais bem sucedido do CYP450 são as metaloporfirinas, análogas à ferroprotoporfirina IX, grupo prostético desta classe de enzimas (**Figura 7**). As metaloporfirinas, em presença de doadores de oxigênio, são capazes de mimetizar oxidações e promover oxigenações de maneira similar às reações de fase 1 realizadas pelas enzimas da CYP450 (MANSUY, 2011; SIMÕES et al., 2009, 2013).

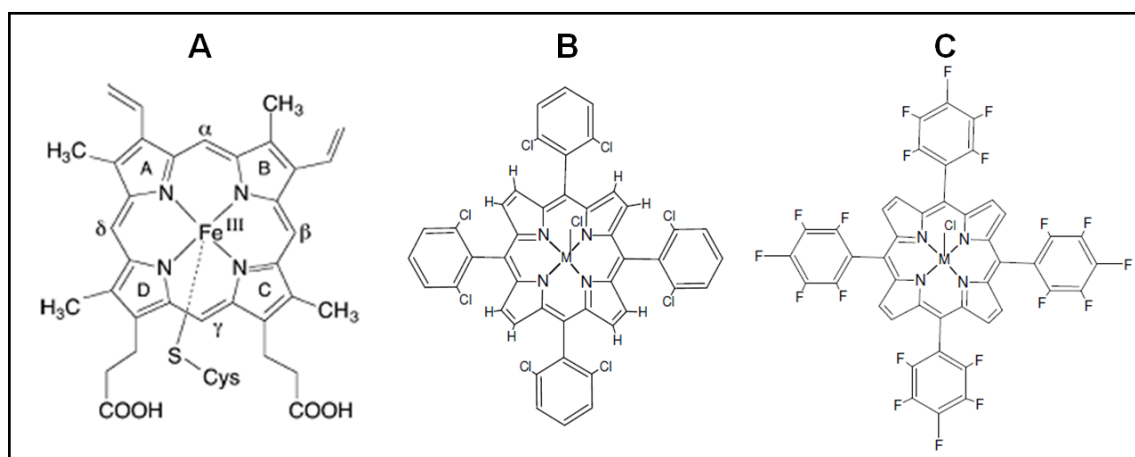


Figura 7. A - Ferro(III)protoporfirina IX, grupo prostético do citocromo P450; B - Cloreto de [5, 10, 15, 20-*tetraquis*(2,6-diclorofenil) porfirina Ferro III] - Fe(TDCPP)Cl; C - Cloreto de [5, 10, 15, 20-*tetraquis*(2,6-pentafluorofenil) porfirina Ferro III] - Fe(TFPP)Cl, sendo B e C porfirinas de 2ª geração.

Estudos de oxidação de fármacos catalisados por sistemas metaloporfirínicos têm mostrado que, apesar das limitações destes modelos, geralmente os mesmos

metabólitos observados *in vivo* são produzidos *in vitro*, auxiliando assim no entendimento do metabolismo dos mesmos pelas enzimas da CYP450. Entretanto, outros produtos de oxidação desconhecidos do sistema natural também são observados, o que abre possibilidade de investigação da ação terapêutica e/ou toxicológica destes compostos (DA-SILVA et al., 2011; FARIA; MAC LEOD; ASSIS, 2008; MEUNIER, 2000; MEUNIER; BERNADOU, 2000; MAC LEOD, 2008; MAC LEOD et al., 2008; MANSUY, 2011; SIMÕES et al., 2009, 2013).

Apesar dos catalisadores metaloporfíricos serem os modelos biomiméticos mais fiéis da CYP450, estes apresentam algumas desvantagens que inviabilizam sua utilização em larga escala: (i) são de difícil síntese e purificação, o que aumenta consideravelmente seu custo e (ii) embora apresentem alta atividade catalítica, não atingem níveis necessários para sua utilização industrial (MAC LEOD, 2008). Devido a essas desvantagens, as metaloporfirinas têm sido mais empregadas como sistemas modelo, uma vez que o alto custo destes compostos restringem a sua aplicação em pesquisas científicas laboratoriais (MAC LEOD, 2008).

Visando superar as limitações dos sistemas metaloporfíricos, um grande esforço tem sido realizado no sentido de se desenvolver sistemas com ligantes simples, de fácil síntese e baixo custo, capazes de mimetizar os complexos metaloporfíricos. Dentre esses sistemas destacam-se os complexos salen e dentre eles o catalisador de Jacobsen (**Figura 8**).

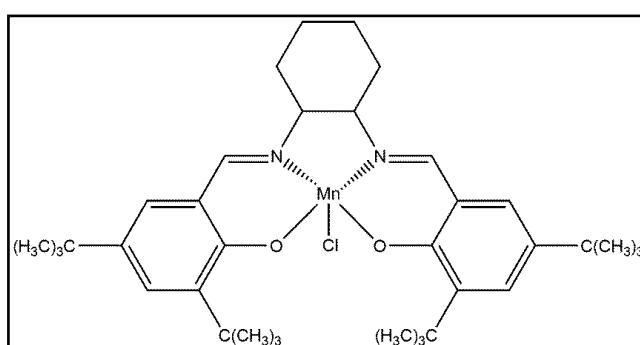


Figura 8. Estrutura química do catalisador de Jacobsen (complexo salen).

Na década de 1990, Jacobsen e Katsuki sintetizaram um complexo manganês salen quiral, contendo grupos *tert*-butil nas posições 3, 3', 5, 5' e um substituinte cicloexano nos carbonos C1 e C2, o qual ficou conhecido como catalisador de Jacobsen (**Figura 8**). Este catalisador foi avaliado comercialmente como o reagente

do ano de 1994 e até hoje é considerado um catalisador eficiente para oxidações enantiosseletivas (HOLBACH; WECK, 2006).

A principal vantagem dos complexos salen com relação aos catalisadores metaloporfirínicos é a facilidade e versatilidade de sua síntese. Assim como os catalisadores metaloporfirínicos, os complexos salen, de acordo com a natureza do centro metálico e do ligante escolhido, podem catalisar diversas reações, tais como: epoxidação de alcenos e hidroxilação de alcanos, oxidação de álcoois e derivados fenólicos, *N*- e *O*-desalquilação, entre outras (BOTTCHEER et al., 1996; GUPTA; SUTAR, 2008; MAC LEOD et al., 2007, 2008, 2009, 2010; NIEHUES et al., 2012).

Inicialmente, os modelos biomiméticos empregando metaloporfirinas e complexos Salen, foram aplicados com sucesso para o estudo de fármacos sintéticos, por exemplo, (**Figura 9**) carbamazepina (FARIA; MAC LEOD; ASSIS, 2008; DA-SILVA et al., 2011), primidona (MAC LEOD et al., 2008), fluoxetina (MAC LEOD et al., 2007), albendazol (MAURIN et al., 2003), diclofenaco (NEVES et al., 2012) e praziquantel (MELO et al., 2005). Recentemente estes modelos tem sido utilizados para a compreensão do metabolismo de fase 1 de produtos naturais (**Figura 10**) com bons rendimentos na oxidações de compostos, tais como lapachol (NIEHUES et al., 2012; PIRES et al., 2011), piplartina (SCHAAB et al., 2010), grandisina (FERREIRA et al., 2012), cafeína (NEVES et al., 2011), derivados do ácido clorogênico (SANTOS et al., 2005, 2008) e ácido caurenóico (FERNANDES, 2013). Estudos *in vitro* com enzimas da CYP450 e análises *in vivo* confirmaram a presença dos mesmos metabólitos obtidos nos modelos *in vitro* empregando estes catalisadores, mostrando assim a validade destes modelos químicos.

Os catalisadores biomiméticos exibem vantagens sobre os métodos *in vitro* comumente utilizados (LOHMANN; KARST, 2008; MEUNIER; BERNADOU, 2000), como por exemplo a possibilidade de produção de quantidades isoláveis dos metabólitos, com grau de pureza suficiente para permitir a sua caracterização estrutural, bem como para realização de ensaios farmacológicos e toxicológicos, dessa forma, reduzindo o número de animais necessários nestes estudos (MEUNIER; BERNADOU, 2000).

Além do mais, os modelos biomiméticos proporcionam maior simplicidade de execução dos experimentos bem como da análise dos produtos, uma vez que há um número muito menor de interferentes no meio reacional; possibilitam o emprego de maiores concentrações de substrato visando a detecção de metabólitos minoritários;

apresentam maior robustez conferida pela utilização de suportes e/ou catalisadores modificados e reduzem o número de experimentos *in vivo*, possibilitando a obtenção de resultados confiáveis em escalas de tempo consideravelmente menores (MANSUY, 2011; MEUNIER; BERNADOU, 2000; MEUNIER; DE VISSER; SASON 2004; SIMÕES et al., 2009, 2013).

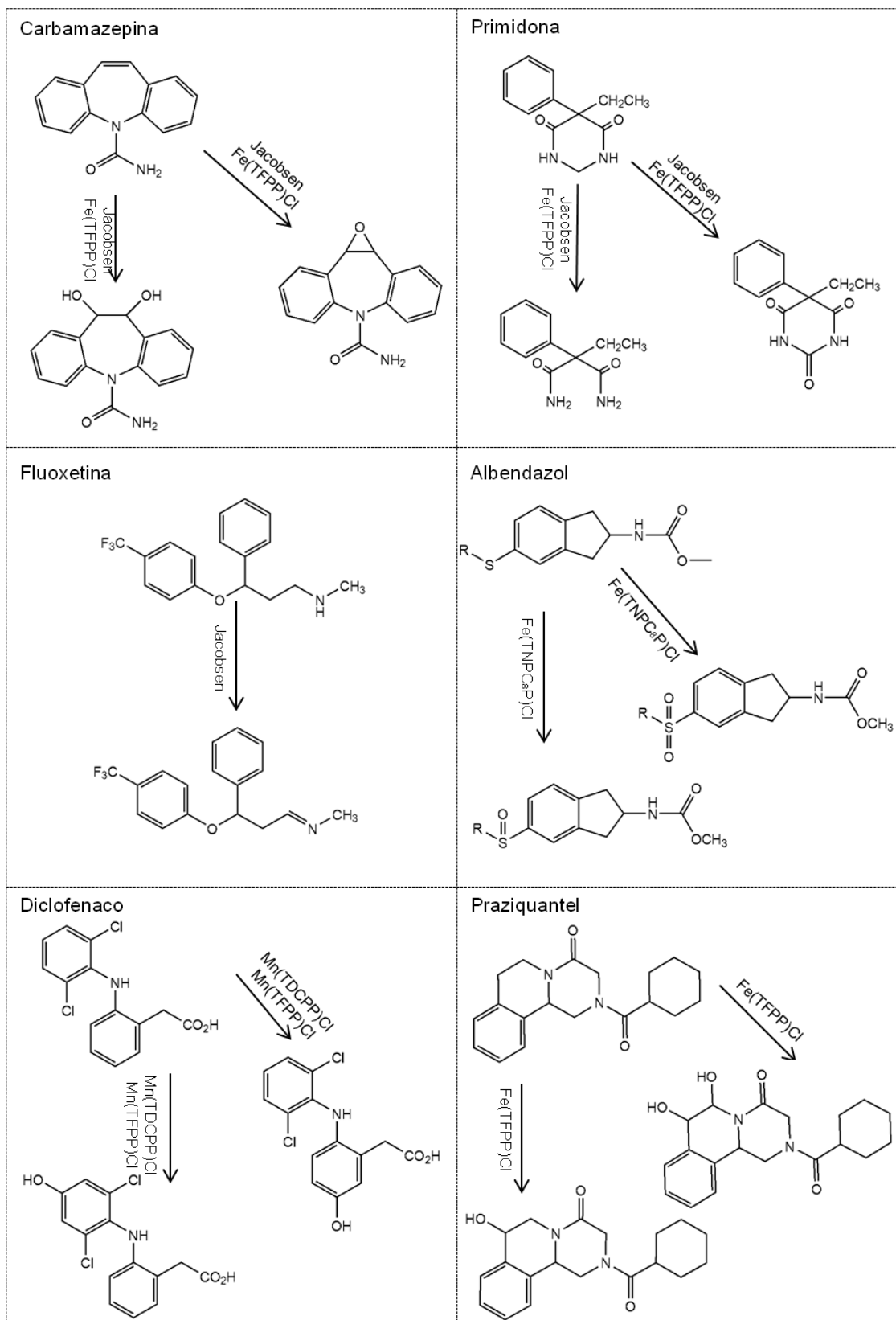


Figura 9. Exemplos de oxidação de fármacos catalisados por sistemas metaloporfirínicos e catalisador de Jacobsen (referências descritas no texto).

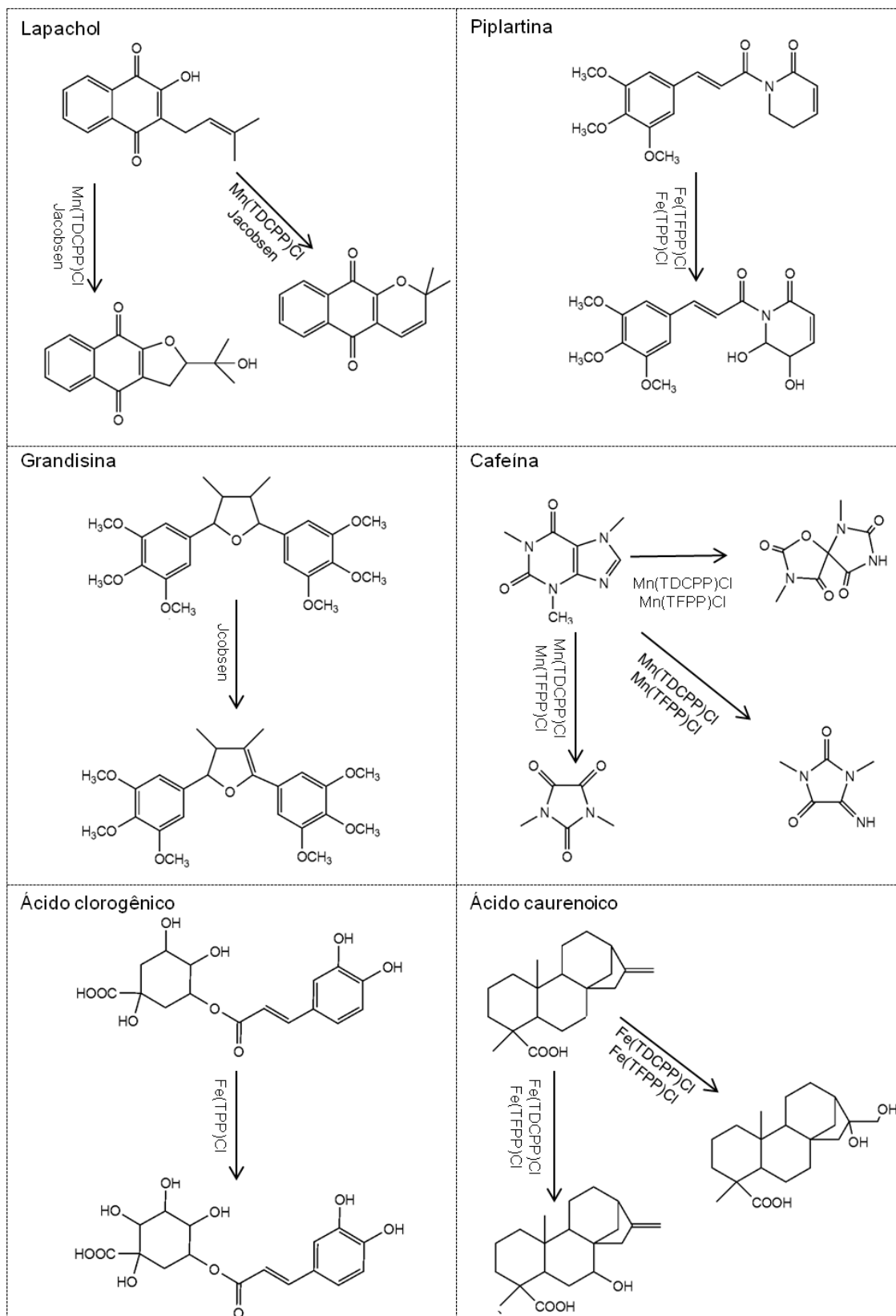


Figura 10. Exemplos de oxidação de produtos naturais catalisados por sistemas metaloporfíricos e catalisador de Jacobsen (referências descritas no texto).

1.5. Emprego de fungos nos processos de biotransformação

Biotransformações são conversões químicas catalisadas por enzimas sobre substratos não naturais. Essas reações podem ainda ser denominadas de metabolizações (FABER, 2004, 2011) e constituem uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente na obtenção de moléculas quirais por sínteses assimétricas. Os procedimentos mais utilizados são realizados com células totais de micro-organismos cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados (FABER, 2004, 2011).

A biotransformação empregando fungos tem sido amplamente utilizada para modificar substratos orgânicos, porque é considerada uma tecnologia econômica e ecologicamente viável (FABER, 2011; PUPO et al., 2008). Além disso, os fungos são uma ferramenta útil para modificação estrutural de compostos bioativos e xenobióticos (LIU; YU, 2010; PUPO et al., 2008). Estudos envolvendo fungos mostram que é possível adicionar grupos específicos em certas posições da molécula de interesse o que seria difícil de realizar pelos métodos convencionais de síntese orgânica (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; BORGES, K. et al., 2009; BORGES, W. et al., 2009; FABER, 2011; PUPO et al., 2008).

A utilização de fungos como modelos para metabolização de xenobióticos segue o conceito de que os fungos são organismos eucariotos e o aparato enzimático assemelha-se com o dos mamíferos (ABOURASHED; CLARK; HUFFORD, 1999; PALUDO et al., 2013). Várias espécies de fungos biotransformam os substratos nos mesmos metabólitos observados no metabolismo de humanos, provendo informações importantes sobre a biotransformação de fármacos e candidatos a fármacos. Além disso, os metabólitos formados podem ser isolados em maior escala o que auxilia no entendimento sobre sua toxicologia e farmacologia (PALUDO et al., 2013; PUPO et al., 2008).

O processo de biotransformação por fungos pode envolver as seguintes enzimas (FABER, 2004, 2011): oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Além do mais, alguns fungos podem metabolizar régio- e estereoseletivamente uma grande variedade de fármacos (**Figura 11**), por exemplo, hidroxizina (FORTES et al., 2013), albendazol (HILARIO et al., 2012), ibuprofeno (BORGES et al., 2010), risperidona (BOCATO et al., 2012), donepezila (BARTH et

al., 2012) e midodrina (BARTH et al., 2013) e também podem ser empregados em estudos de biotransformação de produtos naturais (**Figura 12**), tais como, tagitinina C (ROCHA et al., 2012), β -lapachona (PALUDO et al., 2013), piplartina (SILVA-JUNIOR, 2013), ácido-pimaradienóico (SEVERIANO et al., 2013), chalcona (JANECZKO; GLADKOWSKI; KOSTREWA-SUSLOW, 2013) e artemisinina (PARSHIKOV; NETRUSOV; SUTHERLAND, 2012) em metabólitos que se assemelham às reações que ocorrem em sistemas enzimáticos de mamíferos.

Dentre os fungos, as espécies do gênero *Cunninghamella* possuem propriedades específicas que fazem desta classe de micro-organismos o mais importante em estudos de metabolismo de xenobióticos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009). O gênero *Cunninghamella* tem enzimas que são semelhantes às enzimas envolvidas no processo de detoxificação de mamíferos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009). De fato, existem evidências de que o gênero *Cunninghamella* pode prever as vias metabólicas dos medicamentos no organismo dos mamíferos de maneira mais eficiente do que outros micro-organismos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

Uma vez que é impraticável e inviável o isolamento de metabólitos de animais em estudos *in vivo*, o emprego de fungos em estudos de biotransformação pode auxiliar na produção de quantidades maiores dos metabólitos formados, tanto os majoritários quanto os minoritários, em quantidades suficientes para a verificação de suas atividades biológicas. Além disso, quando a metabolização realizada pelos micro-organismos promove reações similares ao sistema enzimático humano, os estudos podem ajudar compreender melhor os caminhos metabólicos dos compostos testados. Esta estratégia pode evitar os problemas frequentes relacionados com a síntese química, tais como o uso de solventes tóxicos, baixo rendimento e condições (pH e temperatura) drásticas de reação (BORGES, K. et al., 2009; BORGES, W. et al., 2009; FABER, 2011; PUPO et al., 2008).

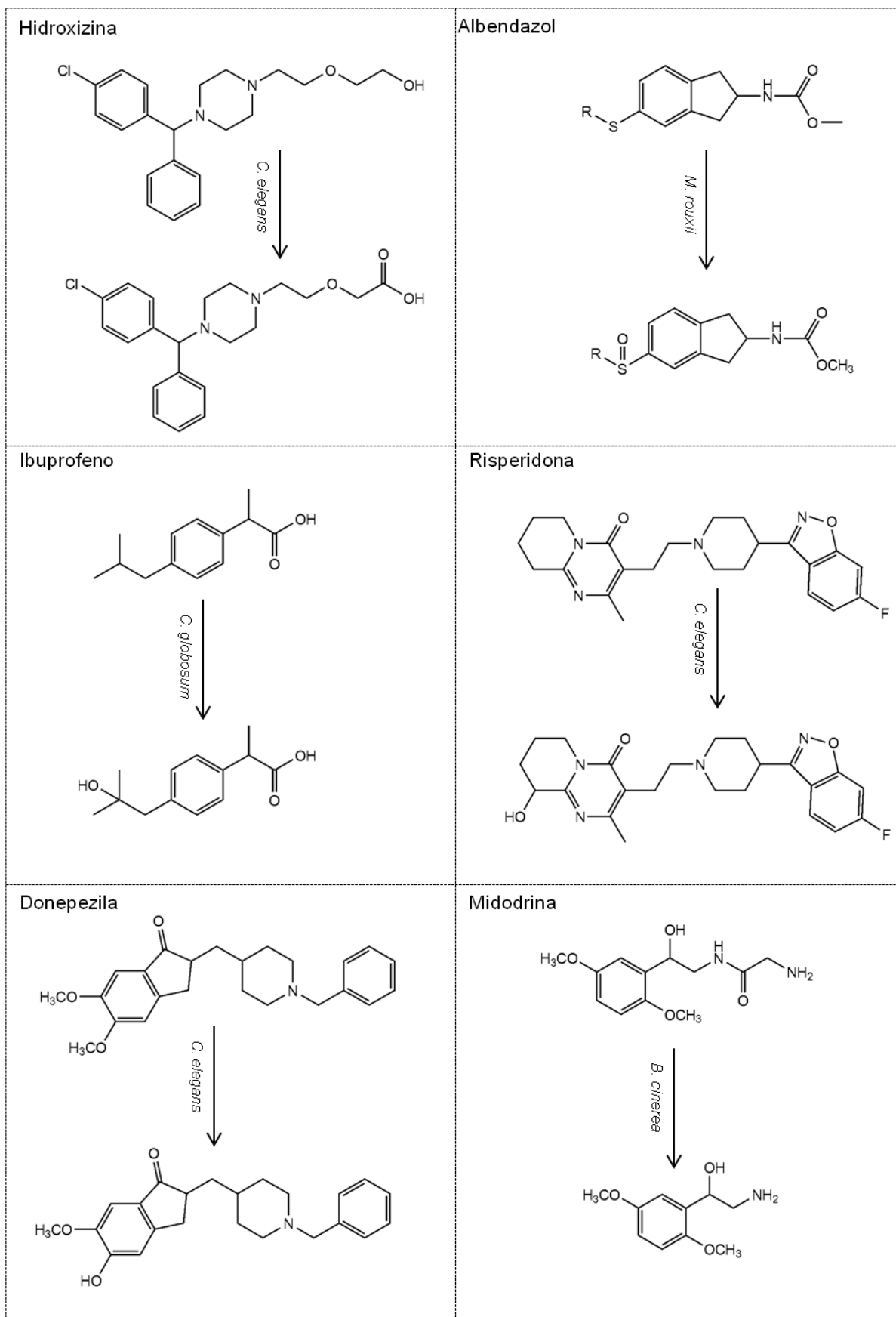


Figura 11. Exemplos de biotransformação de fármacos por fungos (referências descritas no texto).

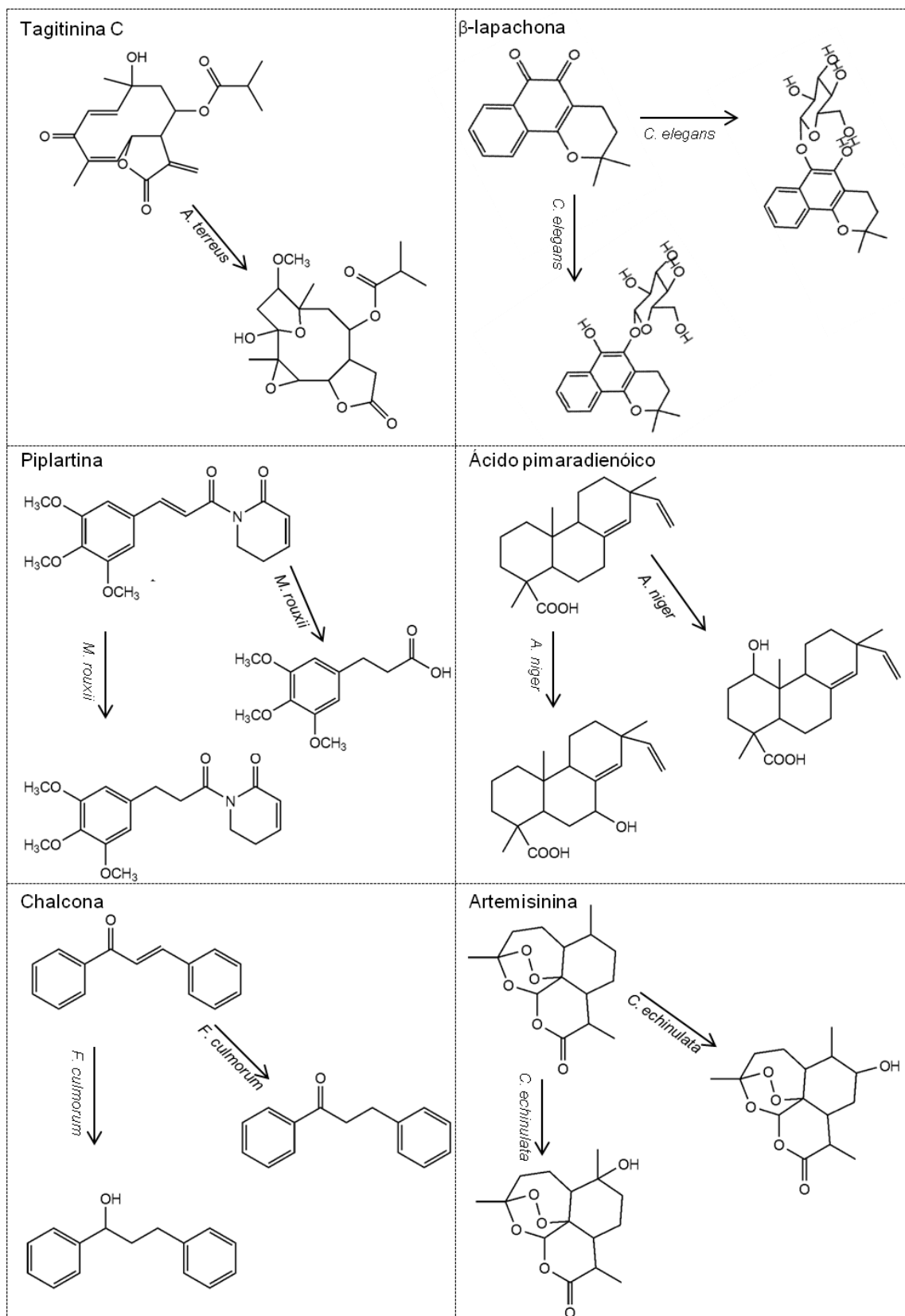


Figura 12. Exemplos de biotransformação de produtos naturais por fungos (referências descritas no texto).

1.6. Estudos de metabolismo *in vitro* empregando microsomas hepático

Outra importante alternativa para os estudos preliminares de metabolismo de fármacos e candidatos inclui modelos experimentais derivados de fígado. Estes modelos representam uma estratégia eficaz para estimar as vias metabólicas de fármacos em seres humanos e outros animais, sendo importante na determinação qualitativa dos metabólitos e no fornecimento de informações sobre a estabilidade metabólica do candidato a fármaco (ASHA; VIDYAVATHI, 2010; LI, 2001, 2004). As últimas décadas têm testemunhado o desenvolvimento de vários modelos *in vitro* baseado em fígado de ratos e humanos, principalmente microsomas hepático, o modelo mais comumente utilizado em estudos *in vitro* de metabolismo (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

Microsomas hepático são vesículas do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, ricas em enzimas da CYP450, e são obtidos por centrifugação diferencial. Este modelo oferece muitas vantagens, tais como: preço acessível, reprodutibilidade, simplicidade e fácil armazenamento, além da possibilidade de avaliação da variação do metabolismo inter-individual (ASHA; VIDYAVATHI, 2010; WU et al., 2012). Além disso, são os mais fiéis e bem definidos modelos *in vitro* utilizados para pesquisa envolvendo o metabolismo de fármacos (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Alguns exemplos do emprego desta técnica em estudos de metabolismo *in vitro* de fármacos e produtos naturais, conforme pode ser visto na **Figura 13**, são: a grandisina (MESSIANO et al., 2013), o ácido caurenóico (FERNANDES, 2013), a piplartina (MARQUES, 2013), a ranolazina (SIMÕES; BARTH; BONATO, 2013), a rosiglitazona (CALIXTO et al., 2011) e a acridina (PIGATTO et al., 2012).

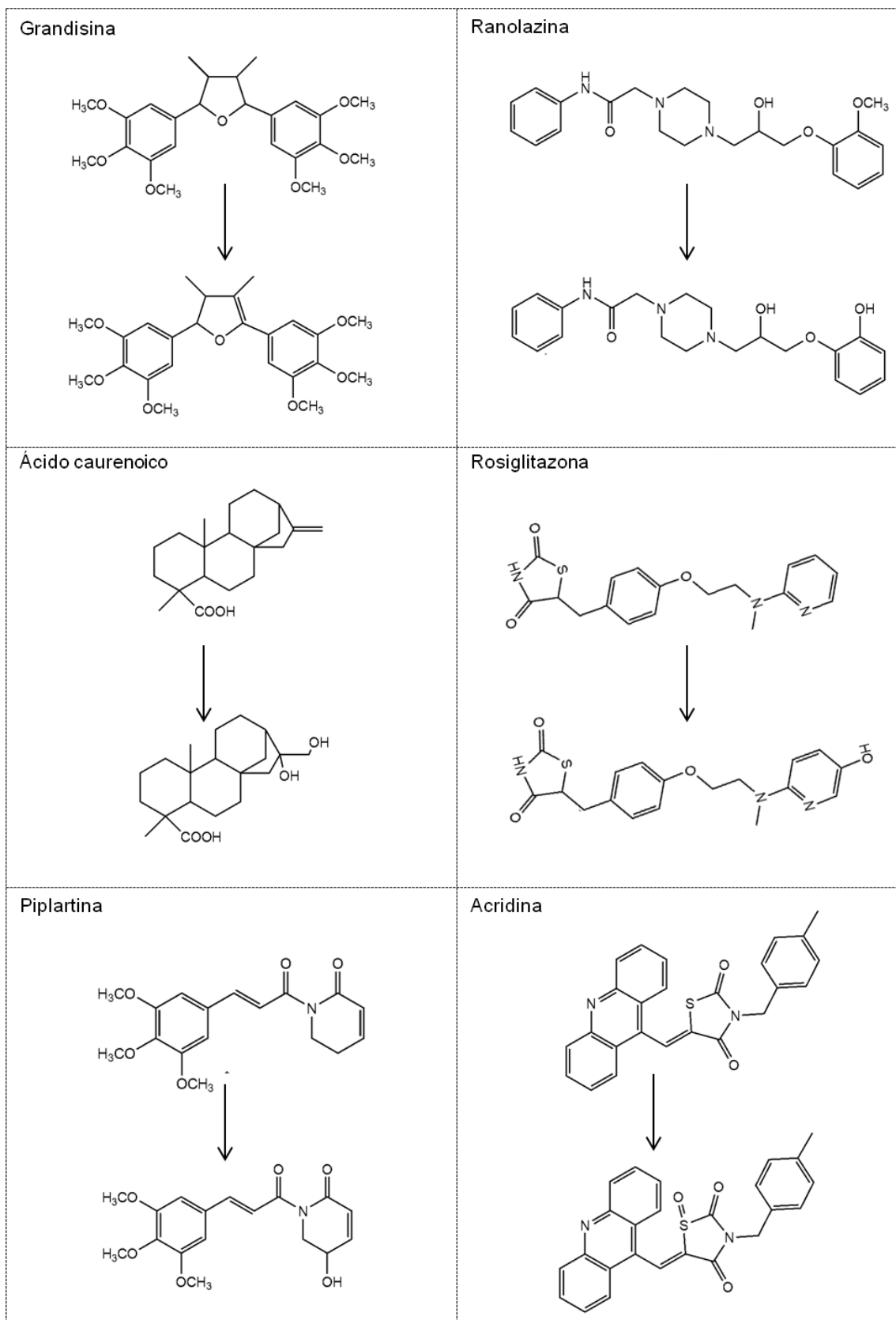


Figura 13. Exemplos de estudos de metabolismo *in vitro* de fármacos e produtos naturais empregando microssomas de fígado (referências descritas no texto).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o metabolismo *in vitro* e biomimético do antibiótico ionóforo poliéter monensina A utilizando diferentes sistemas modelos das enzimas citocromo P450.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a utilização de catalisadores químicos, metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen, como modelos biomiméticos das enzimas citocromo P450 na oxidação da monensina A, empregando diferentes oxidantes e meios reacionais, visando a produção de quantidades isoláveis dos metabólitos deste poliéter para estudos posteriores.
- Avaliar a capacidade de fungos, de diferentes coleções, em biotransformar a monensina A.
- Adicionalmente, estudar o metabolismo *in vitro* da monensina A empregando microsossomas hepático de ratos e humanos.
- Desenvolver métodos cromatográficos e espectrométricos para identificação e elucidação dos compostos formados no metabolismo da monensina A empregando os diferentes sistemas modelos.
- Comparar os produtos obtidos nos sistemas modelos com os dados da literatura sobre metabólitos formados pelo metabolismo da monensina A em sistemas *in vivo*.
- Avaliar as propriedades toxico-biológicas da monensina A e seus metabólitos isolados em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos
- Avaliar as atividades antimicrobianas da monensina A e seus metabólitos isolados.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais: Reagentes e Solventes

A **Tabela 1** contém a lista de reagentes e solventes empregados nos experimentos para os estudos dos modelos da CYP450 na oxidação da MonA.

Tabela 1. Lista de reagentes e solventes utilizados nos estudos de (bio)transformação da monensina A.

Produto	Marca	Origem
Monensina A	Sigma-Aldrich [®]	St. Louis, EUA
*Porfirina base livre - TDCPP	Mid-Century [®]	Posen, EUA
**Porfirina base livre - TFPP	Mid-Century [®]	Posen, EUA
***Catalisadores de Jacobsen	AcrosOrganics [®]	New Jersey, EUA
Ácido metacloroperbenzóico (<i>m</i> -CPBA)	AcrosOrganics [®]	New Jersey, EUA
<i>tert</i> -butilidroperóxido (<i>t</i> -BOOH)	AcrosOrganics [®]	New Jersey, EUA
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	Fluka [®]	São Paulo, Brasil
****Iodobenzeno diacetato	Sigma-Aldrich [®]	Steinheim, Alemanha
N,N-dimetilformamida	Vetec [®]	Rio de Janeiro, Brasil
Diclorometano (Grau HPLC)	J.T. Baker [®]	Phillipsburg, EUA
Clorofórmio (Grau HPLC)	J.T. Baker [®]	Phillipsburg, EUA
Metanol (Grau HPLC)	Panreac [®]	Barcelona, Espanha
Acetonitrila (Grau HPLC)	Panreac [®]	Barcelona, Espanha
Diclorometano (Grau PA)	Synth [®]	Diadema, Brasil
Clorofórmio (Grau PA)	Synth [®]	Diadema, Brasil
Ácido fórmico	Synth [®]	Diadema, Brasil
Potato dextrose ágar	Acumedia [®]	Lansing, EUA
Triptona	Acumedia [®]	Lansing, EUA
Dextrose	Acumedia [®]	Lansing, EUA
Extrato de levedura	Acumedia [®]	Lansing, EUA

Continua

Conclusão

Produto	Marca	Origem
Sacarose	Acumedia [®]	Lansing, EUA
Extrato de malte	Acumedia [®]	Lansing, EUA
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck [®]	Darmstadt, Alemanha
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck [®]	Darmstadt, Alemanha
KCl	Merck [®]	Darmstadt, Alemanha
Na ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Merck [®]	Darmstadt, Alemanha
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Merck	Darmstadt, Alemanha
Fosfato monossódico monoidratado	Merck [®]	Darmstadt, Alemanha
Fosfato dissódico diidratado	Merck [®]	Darmstadt, Alemanha
Hepes	Sigma-aldrich [®]	St. Louis, EUA
Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato	Sigma-aldrich [®]	St. Louis, EUA
Glicose-6-fosfato	Sigma-aldrich [®]	St. Louis, EUA
Glicose-6-fosfato desidrogenase	Sigma-aldrich [®]	St. Louis, EUA
Kit de dosagem proteínas	Labtest [®]	Brasil

* [5,10,15,20-*tetraquis*(pentafluorofenil) porfirina] - H₂(TFPP)Cl.

**5,10,15,20-*tetraquis*(2,6-diclorofenil) porfirina - H₂(TDCPP)Cl.

*** Catalisadores de Jacobsen utilizados foram: (R,R)-Jacobsen e (S,S)-Jacobsen.

**** Iodosilbenzeno (PhIO), foi sintetizado de acordo com método descrito por SHAREFKIN; SALTZMANN, (1973). Essa síntese é realizada pela hidrólise do iodobenzenodiacetato e sua pureza foi determinada por titulação iodométrica.

A descrição detalhada dos materiais utilizados nas avaliações das atividades biológicas e tóxicas da MonA e seus metabólitos estão nos itens 3.3.8 e 3.3.9.

3.2. Equipamentos

Para desenvolvimento e otimização do método de análise dos produtos nos estudos de (bio)transformação da MonA utilizando diferentes modelos foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS/MS) Triplo Quadrupolo Varian[®] (Califórnia, EUA), modelo 1200L acoplado com auto-injetor ProStar modelo 410 Varian e equipado com fonte de ionização por ESI (do inglês “*Electrospray Source Ionization*”). O software utilizado para aquisição de dados foi o Varian MS Workstation. A coluna analítica utilizada nas análises foi uma Xterra MS/C18 da marca Waters[®] (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) (Milford, EUA).

Os espectros de fragmentação da MonA e dos produtos de sua oxidação ou biotransformação obtidos foram obtidos no espectrômetro de massas, micrOTOF Q II - ESI-Qq-TOF da Bruker[®] (Daltonics, Billerica, EUA), equipado com analisador de massas híbrido, triplo quadrupolo e tempo de voo. As amostras foram diretamente introduzidas no equipamento empregando uma bomba de infusão (Cole Palmer).

Os equipamentos utilizados para cultivo e biotransformação empregando fungos foram: estufa de incubação bacteriológica modelo SL 101, marca Solab (Piracicaba, SP, Brasil) e uma autoclave vertical Phoenix modelo AV 75 (Araraquara, SP, Brasil). Empregou-se também capela de fluxo laminar vertical, modelo PCR T2 Echo, Pachane (Piracicaba, SP, Brasil), e mesa agitadora (tipo “shaker”) com controle de temperatura da marca CIENTEC, modelo CT-712RN (Piracicaba, SP, Brasil).

No preparo dos microssomas foi utilizado um homogenizador tipo “potter” modelo MA 181 (Marconi[®], Piracicaba, Brasil). Nas etapas de centrifugação foram utilizadas a centrífuga Hitachi CF16RXII, Himac compact (Toquio, Japão) e ultracentrífuga Beckman[®] XL-70 (Carls, EUA). Para dosagem de proteínas foi utilizado o espectrofotômetro da Agilent[®] 8453 (Waldbroon, Alemanha). Para a incubação das amostras foi utilizado um banho metabólico, modelo SL 157, Solab[®] (Piracicaba, SP, Brasil). Para obtenção dos microssomas hepático foram utilizados seis ratos machos da raça Wistar, pesando aproximadamente 200 g, fornecidos pelo biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Protocolo CEUA nº 11.1.323.53.8).

Durante os experimentos também foram utilizados outros aparelhos como: agitador do tipo Vibrax IKA[®] - VXR (Staufen, Alemanha), balança analítica Marte

modelo As1000 (São Paulo, Brasil), balança analítica Metler Toledo modelo AG 245 (Suíça), banho ultrassom Unique, modelo Ultracleaner 4050 (Piracicaba, SP, Brasil), agitador de tubos Phoenix AP56 (Araraquara, SP, Brasil), micropipetas (Eppendorf) e pHmetro Gehaka modelo PG1800 (Diadema, SP, Brasil), diversas cubas cromatográficas e placas para cromatografia em camada delgada (20 x 20 cm, 0,1 mm, sílica-gel 60F254, Merck[®], Darmstadt, Alemanha).

A lista de equipamentos utilizados nas avaliações das atividades biológicas e tóxicas da MonA e seus metabólitos está apresentada no item 3.3.8 e 3.3.9.

3.3. Métodos

3.3.1. Inserção de Ferro (III) nas porfirinas H₂(TFPP)Cl

A porfirina base livre foi metalada conforme metodologia descrita na literatura por Adler e colaboradores (1970), com algumas modificações. Este estudo foi previamente desenvolvido em nosso laboratório pela Dra. Jocy Santamalvina dos Santos (SANTOS, 2012). A metaloporfirina foi caracterizada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível.

3.3.2. Estudos da oxidação da monensina A empregando catalisadores químicos

As reações empregando os catalisadores sintéticos como modelos biomiméticos na oxidação da MonA foram realizadas em frasco do tipo eppendorf (2 mL), sob agitação mecânica (agitador orbital do tipo Vibrax) a temperatura ambiente. As reações foram realizadas em atmosfera de ar durante 24 h. As proporções utilizadas para catalisador (Fe(TFPP) ou R,R-Jacobsen) / oxidante / substrato foi de 1:20:20, sendo utilizado as concentrações molares de 0,3 mM : 6 mM : 6 mM respectivamente, em volume reacional de 0,5 mL. Verificou-se também a influência da variação do meio reacional (DCM, DCE, ACN e MeOH) e do oxidante (*m*-CPBA,

PhIO, *t*-BOOH e H₂O₂). As reações foram analisadas por CCDC (item 3.3.4) e LC-ESI-MS (item 3.3.5). As reações controle foram realizadas na ausência de catalisador sob condições idênticas às reações catalíticas e não foram detectados o aparecimento de produtos.

O **Quadro 1** mostra todas as variações nas condições empregadas nas reações de oxidação da MonA e as denominações recebidas para discussão dos resultados.

Reação	Meio	Catalisador	Oxidante	Reação	Meio	Catalisador	Oxidante
1	DCM	Jacobsen	<i>m</i> -CPBA	17	ACN	Jacobsen	<i>m</i> -CPBA
2			PhIO	18			PhIO
3			H ₂ O ₂	19			H ₂ O ₂
4			<i>t</i> -BOOH	20			<i>t</i> -BOOH
5	DCM	Fe(TFPP)	<i>m</i> -CPBA	21	ACN	Fe(TFPP)	<i>m</i> -CPBA
6			PhIO	22			PhIO
7			H ₂ O ₂	23			H ₂ O ₂
8			<i>t</i> -BOOH	24			<i>t</i> -BOOH
9	DCE	Jacobsen	<i>m</i> -CPBA	25	MeOH	Jacobsen	<i>m</i> -CPBA
10			PhIO	26			PhIO
11			H ₂ O ₂	27			H ₂ O ₂
12			<i>t</i> -BOOH	28			<i>t</i> -BOOH
13	DCE	Fe(TFPP)	<i>m</i> -CPBA	29	MeOH	Fe(TFPP)	<i>m</i> -CPBA
14			PhIO	30			PhIO
15			H ₂ O ₂	31			H ₂ O ₂
16			<i>t</i> -BOOH	32			<i>t</i> -BOOH

Quadro 1. Legenda para as reações realizadas – a razão molar para catalisador / oxidante / substrato foi de 1 : 20 : 20, sendo utilizadas as concentrações molares de 0,3 mM : 6 mM : 6 mM em volume final de 0,5 mL.

Os catalisadores Mn(TFPP) e S,S-Jacobsen também foram avaliados mas não se verificou diferenças qualitativas significativas nos resultados, por isso não foram discutidos, dando-se ênfase somente aos dados referentes às reações descritas no **Quadro 1**.

3.3.3. Estudos de biotransformação da monensina A empregando fungos

3.3.3.1. Fungos utilizados

Os fungos endofíticos empregados: *Penicillium crustosum* isolado de *Viguiera robusta*, *Papulaspora immersa* Hotson, *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason e *Fusarium oxysporum* isolados de *Smallanthus sonchifolius* e *Glomerella cingulata* isolado de *Viguiera arenaria* foram cedidos pela Prof^a. Dr^a. Mônica Tallarico Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). O fungo *Mucor rouxii* (NRRL 1894) foi cedido pela Prof^a. Dr^a. Nieve Araçari Jacometi Furtado da FCFRP-USP. O fungo, *Aspergillus awamori* foi cedido pela Prof^a. Dr^a. Maria Jose Vieira Fonseca, também da FCFRP-USP. Foram utilizados ainda fungos endofíticos isolados de algas marinhas: o *Penicillium brevicompactum* isolado da alga *Bostrychia radicans* e fungo M61 isolado de algas do manguezal, que ainda se encontra sem identificação, estes cedidos pela Prof^a. Dr^a. Hosana Debonsi, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Os fungos *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B foram adquiridos da “American Type Culture Collection” (ATCC[®], Universidade Boulevard, Manassas, EUA).

Os fungos utilizados nestes experimentos são mantidos em sílica gel (6-12 mesh, grau 40, dessecada), a 4°C ou pelo repique em tubos slants ou placas de Petri contendo meio PDA (do inglês, *Potato Dextrose Agar*), ou ainda pelo repique em tubos contendo glicerina:água (80:20, v/v) a 4°C. A cada seis meses os fungos são repicados para o mesmo meio, de maneira estéril em capela de fluxo laminar. Este procedimento garante nutrientes e viabilidade para a sobrevivência dos fungos.

3.3.3.2. Transformações Microbianas da monensina A empregando fungos

Os experimentos de biotransformação foram realizados conforme procedimentos previamente descritos em nosso grupo de pesquisa (BARTH et al., 2012; BOCATO et al., 2012; CARRAO et al., 2011; HILARIO et al., 2012). Os fungos utilizados (seção 3.3.3.1) foram repicados em placas de Petri contendo o meio de

cultura PDA (39 g.L^{-1}) e incubados a 30°C por tempo suficiente para que houvesse crescimento uniforme sobre toda placa (Etapa de crescimento). Em seguida, após o crescimento uniforme dos fungos sobre o meio de cultura PDA, três discos de 0,5 cm de diâmetro deste meio foram retirados com o auxílio do “*Transfer Tube*” e inoculados assepticamente em cerca de 20 mL de meio pré-fermentativo de malte (extrato de malte 10 g.L^{-1} , dextrose 10 g.L^{-1} , triptona 5 g.L^{-1} e extrato de levedura 3 g.L^{-1}). Este meio foi colocado sob agitação de 100 rpm, a uma temperatura de 30°C , por 5 dias, para o crescimento dos fungos e ganho de massa (etapa pré fermentativa). As massas miceliais formadas foram transferidas assepticamente para 30 mL de meio fermentativo de Czapek modificado (2,5% de sacarose; 0,2% de NaNO_3 ; 0,1% de K_2HPO_4 ; 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% de KCl e 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e o pH foi corrigido para 5,0 com uma solução de HCl 1 mol.L^{-1} . Após 48 h, adicionou o substrato previamente dissolvido em DMF (3 mg em 300 μL). A incubação a 30°C e 120 rpm foi realizada por 8 dias, sendo que a cada 24 horas foi coletada uma alíquota de 2 mL do meio de cultura, assepticamente, e armazenado a -20°C até o momento da análise (Etapa de biotransformação). A **Figura 14** ilustra as etapas deste estudo.

Paralelamente aos estudos de biotransformação foram realizados controles contendo: 1) somente o meio de cultura e a MonA; 2) somente o meio de cultura com fungo sem a presença da MonA, com adição de 300 μL de DMF.

As alíquotas de 2 mL do meio de biotransformação foram centrifugadas à 1000 rpm por 5 min (180 g). Posteriormente, 1 mL da fase superior foi transferida para um tubo cônico e a extração foi realizada empregando 3 mL de CHCl_3 , sob agitação, durante 15 min a 1000 rpm, empregando a agitador orbital Vibrax VXR®. Após esta etapa, uma alíquota de 2 mL da fase orgânica foi coletada e transferida para outro tubo, onde foi evaporada sob fluxo de ar comprimido. O resíduo foi dissolvido na fase móvel e analisada nos sistemas cromatográficos descritos nos itens 3.3.4. e 3.3.5.

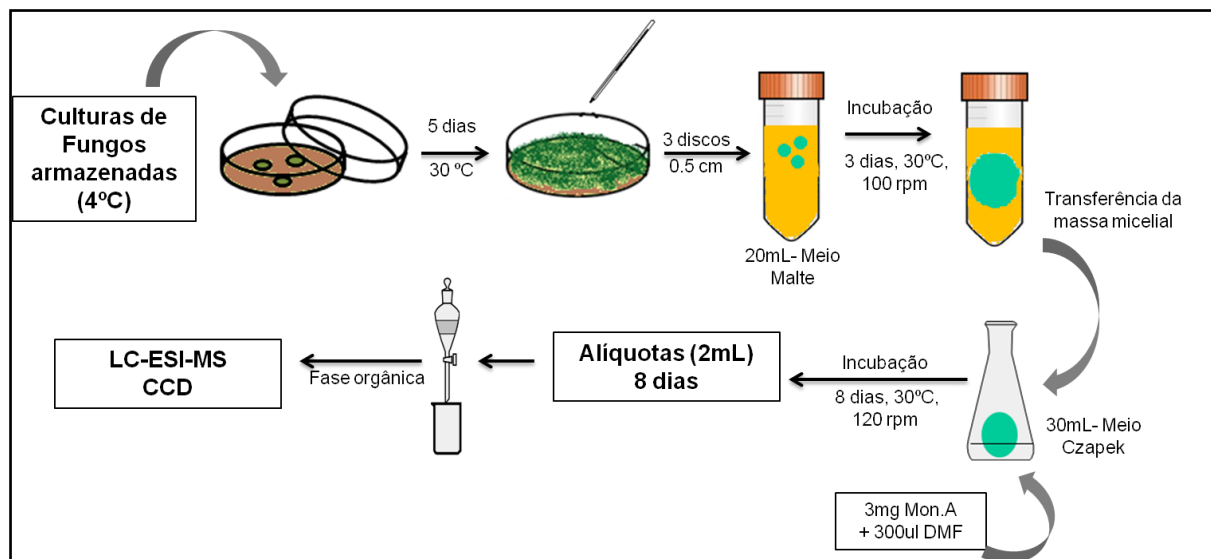


Figura 14. Esquema ilustrativo das etapas de biotransformação empregando fungos.

3.3.4. Análise dos produtos de (bio)transformação da monensina A por cromatografia em camada delgada comparativa

Para análise e visualização dos produtos oriundos das reações biomiméticas da MonA foram aplicados cerca de 30 μL da mistura reacional diretamente nas placas de CCDC (0,1 mm de espessura com sílica gel (5-25 μm) GF₂₅₄ como fase estacionária) utilizando uma mistura binária de CHCl_3 :MeOH na proporção de 93:7 (v/v) como eluente. Para os estudos envolvendo fungos, após a extração líquido-líquido do meio de biotransformação e secagem, o resíduo resultante foi ressuscitado em CHCl_3 e aplicado nas placas de CCDC conforme descrito anteriormente para as reações biomiméticas.

Após eluição, as placas foram reveladas por nebulização de uma solução de vanilina-sulfúrica (1% em etanol), seguida de aquecimento, até o aparecimento das manchas correspondentes ao substrato e os produtos das reações.

3.3.5. Análise da monensina A e dos produtos de reação por LC-MS e MS/MS

As análises foram realizadas em sistemas de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, com analisador do tipo triplo quadrupolo e ionização por eletrospray, operando no modo positivo. As análises cromatográficas foram acompanhadas pela injeção de 10 μL de amostra na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As análises foram realizadas utilizando uma coluna analítica Xterra[®] C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 μm) com o seguinte gradiente de fase móvel (MeOH:H₂O): 0,1 min 70 % MeOH, 20,0 min 98 % MeOH, 21,0 min 30 % MeOH, 30,0 min 70 % MeOH. As condições do espectrômetro de massas foram: tensão do capilar de 3,2 kV, tensão do cone 40 V, temperatura da fonte 40°C e temperatura do gás de dessolvatação (N₂) de 350 °C.

A taxa de conversão da MonA foi calculada pela comparação das áreas do padrão nas diferentes concentrações com a da curva analítica cujo intervalo foi de 10 - 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta curva analítica foi empregada somente para quantificação da conversão nos estudos envolvendo os catalisadores químicos, uma vez que a análise era feita de modo direto, envolvendo somente uma etapa de diluição.

Nos estudos de biotransformação envolvendo fungos uma nova curva analítica foi construída para quantificação da conversão da MonA. Para isto foi utilizado o meio de cultura líquido Czapek fortificado com o padrão de MonA, que posteriormente foi extraída empregando a extração líquido-líquido conforme item 3.3.3.3.

Os espectros de fragmentação dos produtos foram obtidos usando espectrômetro de massas micrOTOF Q II - ESI-Qq-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) operando em modo positivo, equipado com analisador de massas híbrido, triplo quadrupolo e tempo de voo. As amostras foram diretamente introduzidas no equipamento empregando uma bomba de infusão (Cole Palmer), sob fluxo de 300 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. A temperatura do capilar e a tensão do cone foram mantidas em 250 °C e 4,0 kV, respectivamente. Os íons foram extraídos da fonte de ionização usando um potencial de cone entre 5 e 30 kV. Nitrogênio foi usado como gás secagem e de nebulização. Nas análises por MS/MS, o gás argônio (energia 5-80 eV) foi empregado como gás de colisão.

3.3.6. Estudo do metabolismo *in vitro* da monensina A empregando microsomas hepático de ratos

Um “pool” de microsomas hepático de ratos machos (Wistar) na concentração protéica de 20 mg.mL^{-1} (número de catálogo 452511) obtido da BD Gentest[®] (Woburn, MA) e usados durante todo o estudo.

O estudo do metabolismo empregando os microsomas hepáticos foi realizado adicionando cerca de $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ de MonA no meio de incubação (contendo $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteína microsomal), em tubos de vidro de 10 mL. Inicialmente, $20 \mu\text{L}$ da solução metanólica do substrato foi adicionado ao tubo. Posteriormente, foram adicionados $250 \mu\text{L}$ da solução de incubação contendo NADP^+ ($0,25 \text{ mM}$), glicose-6-fosfato (5 mM) e glicose-6-fosfato desidrogenase ($0,5 \text{ unidades.mL}^{-1}$), resultando em uma concentração no meio de incubação de $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ de MonA.

Sendo o cofator um reagente importante nos estudos de metabolismo *in vitro*, trabalhou-se com excesso do mesmo para que não houvesse depleção de cofator durante os experimentos. O meio microsomal foi pré-incubado na presença do substrato e do sistema de incubação NADPH, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 5 min. Após este período, adicionou-se solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4 para obter um volume final de $1000 \mu\text{L}$. Finalmente, a fração microsomal do fígado de rato foi acrescentada e o procedimento de metabolismo *in vitro* foi iniciado. A incubação foi realizada sob agitação a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. Após este tempo de incubação, a reação foi encerrada adicionando 4 mL de CHCl_3 .

Esta mistura foi então agitada por 10 min em agitador orbital Vibrax VXR[®] e posteriormente centrifugada por 5 min a 4000 rpm. Posteriormente, 3 mL da fase orgânica foram coletados e evaporados sob ar comprimido. O resíduo resultante da extração foi resuspendido na fase móvel e injetado no sistema cromatográfico descrito no item 3.3.5. Controles foram realizados sem a adição do sistema de regeneração de NADPH e sem a presença de microsomas. A diferença entre os valores obtidos com e sem NADPH foi considerada a taxa de metabolismo da MonA que sofreu oxidação pelas enzimas do CYP450.

3.3.7. Estudo do metabolismo *in vitro* da monensina A empregando microssomas hepático de humanos

Um “pool” de microssomas hepático de humanos (50 doadores de ambos os sexos) na concentração protéica de 20 mg.mL⁻¹ (número de catálogo 452156), Solução A de regeneração do NADPH (número de catálogo 451220) e solução de regeneração B (número de catálogo 451200), e solução tampão fosfato 0,5 mol.L⁻¹, pH 7,4 foram obtidos da BD Gentest[®] (Woburn, MA) e usados durante todo o estudo.

O estudo do metabolismo *in vitro* empregando microssomas de fígados de humanos foi realizado adicionando cerca de 1,4 mmol.L⁻¹ (1,0 mg.mL⁻¹) de MonA no meio de incubação (contendo 1,5 mg.mL⁻¹ de proteína microssomal de fígado de humano) em tubos de vidro de 10 mL. Inicialmente, 20 µL da solução do substrato foi adicionada ao tubo, de maneira que a concentração final da MonA no meio reacional fosse de 1,0 mg.mL⁻¹. Em seguida, adicionou-se à solução tampão fosfato 0,5 mol.L⁻¹, pH 7,4 (concentração final de 100 mmol.L⁻¹) e água purificada em quantidade suficiente para obter o volume final de 250 µL de meio de incubação. Posteriormente, foi adicionado a solução A de regeneração do sistema NADPH e a solução B de regeneração.

O sistema NADPH é um fator importante nos estudos de metabolismo *in vitro*. Dessa forma, novamente a concentração deste cofator foi empregada em excesso para não haver depleção deste durante os experimentos. O meio microssomal, então, foi pré-incubado em banho-metabólico na presença do substrato e do sistema de incubação NADPH, a 37 °C, durante 5 min. Finalmente, a fração microssomal do fígado humano foi acrescentada, dando início ao procedimento de metabolismo *in vitro*. A incubação foi realizada sob agitação a 37 °C. Após 60 min de incubação, a reação foi encerrada adicionando 1 mL de CHCl₃. Esta mistura foi então agitada por 10 min em agitador orbital Vibrax VXR[®] e então centrifugada por 5 min a 4000 rpm. Posteriormente 750 µL da fase orgânica foi coletada e evaporada. O resíduo resultante foi resuspendido na fase móvel e injetado no sistema cromatográfico. Controles foram realizados sem a adição do sistema de regeneração de NADPH e sem a presença de microssomas. A diferença entre os valores obtidos com e sem NADPH foi considerado a porcentagem de MonA que sofreu metabolismo pelas enzimas do CYP450 de humanos. Este procedimento foi adaptado do guia para ensaio com microssomas humanos da BD Gentest[®].

3.3.8. Avaliação da toxicidade da Monensina A e seus metabólitos utilizando modelo mitocondrial

Os ensaios de avaliação da toxicidade da MonA e os metabólitos isolados utilizando mitocôndrias isoladas de hepatócitos foi realizados sob supervisão do Prof. Daniel Junqueira Dorta da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) e seu aluno de doutorado Murilo Pazin (FCFRP-USP).

Os reagentes, rotenona, cianeto de carbonila clorofenilidrazona (CCCP), succinato, glutamato, malato, 5'-difosfato de adenosina (ADP), safranina-o, ácido etilenoglicol *bis* (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra acético (EGTA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co (Saint Louis, EUA). A 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) e Calcium Green 5N foram adquiridos da Molecular Probe (Salem, USA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, preparados em água purificada pelo sistema Milli-Q.

Para a extração e isolamento das mitocôndrias foram utilizados ratos Wistar, pesando aproximadamente 200 g e mantidos sob condições adequadas no Biotério Central da Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto, sendo ração e água servidos "ad libitum". Para experimentação os animais tiveram uma ambientação mínima de 48 horas e todos os protocolos foram aprovados pela "Comissão de Ética no Uso de Animais" do campus da USP-Ribeirão Preto sob o Protocolo: 12.1.227.53.0.

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial como segue: após a eutanásia dos animais, os fígados foram removidos e cortados em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mmol.L⁻¹, EGTA 1 mmol.L⁻¹ e HEPES-KOH 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, a cerca 4 °C e posteriormente homogeneizado três vezes por 15 segundos com intervalos de 1 min em homogeneizador do tipo "potter". A suspensão foi centrifugada à 770 g por 5 min e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9.800 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão com 10 mL de meio contendo sacarose 250 mmol.L⁻¹, EGTA 0,3 mmol.L⁻¹ e HEPES-KOH 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2 e centrifugado à 4500 g por 15 min. O sedimento mitocondrial final foi suspenso com 1 mL de meio contendo sacarose 250 mmol.L⁻¹ e HEPES-KOH 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2 e utilizado por um período de 3 horas (PEDERSEN et al., 1978). A proteína mitocondrial foi determinada pela reação com o Biureto.

As soluções estoques da MonA (0,01, 0,1 e 1 μM) e seus metabólitos foram preparados em DMSO. Para todos os testes o mesmo volume de DMSO utilizado nos experimentos foi adicionado aos controles e nenhum efeito foi observado.

3.3.8.1. Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi monitorado polarograficamente em um oxígrafo equipado com um eletrodo tipo Clark (Gilson Medical Electronics, Middleton USA) (CHANCE; WILLIANS, 1956). O eletrodo de Clark é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata por meio de uma ponte de KCl saturada (preparada através da dissolução de 17,5 g de sal anidro em 100 mL de água deionizada a 25 °C) e cobertos por uma membrana de teflon. Com a aplicação de uma tensão de polarização de 700 mV o eletrólito é ionizado e inicia-se o fluxo de corrente através de uma série de reações eletroquímicas. Dentro de uma determinada faixa de polarização o fluxo de elétrons, ou seja, a corrente elétrica gerada é proporcional à concentração de oxigênio (BRACHT; ISHII-IWAMOTO; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, 2003).

Este tipo de sensor por eletrodo foi inicialmente desenvolvido por Clark, em 1956, para medir oxigênio em amostras de sangue. Como resultado, por muitas vezes é referido como o eletrodo de Clark.

As mitocôndrias (1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína) foram incubadas em 1,5 mL do meio reacional padrão juntamente com as concentrações dos compostos (0,01, 0,1 e 1 μM). A respiração de estado 3 foi iniciada com 400 nmols de ADP (CAIN; SKILLETER, 1987). O meio padrão reacional é constituído de sacarose 125 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl 65 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES-KOH 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e EGTA 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e é suplementado com glutamato e malato (5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) como substrato oxidável do complexo I. As velocidades de consumo de oxigênio foram expressas em $\text{ng}\cdot\text{átomo}^{-1}$ de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, na ausência (Controle) e na presença dos compostos testados.

3.3.8.2. Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) monitorando-se as alterações na fluorescência da Safranina-o, um corante catiônico fluorescente, que se distribui eletroforeticamente na matriz em resposta a carga negativa da membrana mitocondrial interna (LEMASTERS et al., 1987), usando-se como comprimentos de onda de excitação 495 nm e de emissão 586 nm. As mitocôndrias ($1,0 \text{ mg proteína.mL}^{-1}$) foram incubadas no meio padrão de reação contendo sacarose 125 mmol.L^{-1} , KCl 65 mmol.L^{-1} , HEPES-KOH 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2 acrescido de rotenona $2,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ e safranina-O $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, em volume final de 2 mL e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol.L^{-1} . Após a formação do potencial de membrana adicionou-se diferentes concentrações dos compostos no intuito de avaliar cineticamente o seu efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial. No final do período de incubação o potencial de membrana foi totalmente desfeito utilizando $5 \text{ }\mu\text{L}$ de CCCP $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. A diminuição do potencial de membrana observada pelo influxo eletrogênico de cátions, causado pela ação da substância testada ou pelo controle positivo (CCCP), correlaciona-se linearmente com o aumento da intensidade de fluorescência do corante na medida em que ele é liberado das mitocôndrias (AKERMAN; WIKSTROM, 1976).

3.3.8.3. Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi monitorado pela diminuição da absorvância aparente da suspensão de mitocôndrias ($0,4 \text{ mg proteína.mL}^{-1}$), incubadas em 1,5 mL do meio padrão de reação contendo sacarose 125 mmol.L^{-1} , KCl 65 mmol.L^{-1} , HEPES-KOH 10 mmol.L^{-1} acrescido de rotenona $2,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, succinato 5 mmol.L^{-1} e CaCl_2 $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, em 540 nm, usando-se um espectrofotômetro (DU-70, Beckman - EUA). O inchamento mitocondrial é acompanhado da diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, da diminuição proporcional na absorvância (LEMASTERS et al., 1987). Juntamente ao meio e às mitocôndrias foram adicionadas as diversas

concentrações dos compostos para analisar se estes interferem no inchamento mitocondrial.

O processo denominado de inchamento mitocondrial é observado na amostra levada ao espectrofotômetro, acompanhando se a diminuição da turbidez aparente em um comprimento de onda específico. Isto ocorre porque a matriz inchada possui um índice de refração menor que a forma condensada, tornando-se perceptível as modificações na organização estrutural. Uma vez que a penetração de água ou solutos acompanhados de água, promove o distanciamento de elementos estruturais, promovido por um rearranjo estrutural de sistemas macromoleculares, este fenômeno pode ser acompanhado na sua velocidade ou na sua extensão, quando mantidas sob condições constantes (ZORATTI; SZABO, 1995).

3.3.8.4. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio foi monitorada espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi, Japão) utilizando a sonda fluorescente H₂DCF-DA nos comprimentos de onda de 503 nm para excitação e 529 nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg proteína.mL⁻¹) foram incubadas em meio padrão de reação contendo sacarose 125 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹, Hepes-KOH 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2 acrescido de rotenona 2,5 µmol.L⁻¹ e H₂DCFDA 2 µmol.L⁻¹ e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol.L⁻¹. Foi realizado controle negativo (basal), positivo induzido por *t*-BOOH 300 µmol.L⁻¹ e tratamentos utilizando as diferentes concentrações dos compostos.

O DCFDA é uma molécula que atravessa facilmente as membranas biológicas e é hidrolisado por esterases, liberando o composto não fluorescente DCFH. Porém, este em presença de EROs, é rapidamente oxidado e transformado em DCF, que apresenta alto rendimento quântico de fluorescência quando excitado em 503 nm. Sendo assim, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à produção de EROs pelas mitocôndrias (CATHCART; SCHWIERS; AMES, 1983).

3.3.9. Avaliação da atividade antibacteriana da monensina A e seus metabólitos

Os ensaios de avaliação da atividade antibacteriana da MonA e dos metabólitos isolados foram realizados sob supervisão da Pesquisadora Andresa Aparecida Berretta e Silva, responsável pelo laboratório P, D & I da Apis Flora Ind. Com.

Os bioensaios foram realizados com as cepas das seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27,853 e *Escherichia coli* ATCC 25922, que foram adquiridas a partir da “American Type Culture Collection”. Aproximadamente 5×10^5 microrganismos.mL⁻¹ foram incubados em caldo Muller-Hinton em placas de 96 poços que contêm as amostras testadas. Os compostos (MonA, metabólito 1 e metabólito 2) foram dissolvidos em DMSO e foram diluídos em série para se obter as seguintes concentrações finais: 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 µg.mL⁻¹. As placas então foram incubadas a 37 °C e os ensaios realizados em triplicata. A morte celular foi determinada através de um método colorimétrico MTT, descrito por Andrews (2001). As soluções de DMSO e cloranfenicol foram utilizadas como controles do experimento.

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do método cromatográfico para análise da monensina A e seus produtos de (bio)transformação

O desenvolvimento de métodos analíticos adequados é essencial para os estudos de metabolismo *in vitro*. As técnicas analíticas mais utilizadas são cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa, estas duas últimas acopladas à espectrometria de massas. O desenvolvimento das técnicas em sequência (MS/MS ou MSⁿ) tornaram estas metodologias ainda mais adequadas, por serem mais sensíveis, extremamente seletivas e rápidas no que concerne à elucidação dos metabólitos formados (ASHA; VIDYAVATHY 2009).

Independentemente do modelo utilizado para o estudo do metabolismo, a identificação dos metabólitos desempenha um papel chave no processo. Por conseguinte, o desenvolvimento de novas tecnologias rápidas, capazes de levar precisamente à elucidação desses metabólitos, tornou-se essencial para estes estudos. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas combina as vantagens de ambas as técnicas, isto é, a elevada seletividade e eficiência na separação cromatográfica e aumento adicional da seletividade da espectrometria de massas (MAURIN et al., 2003). Além disso, informações estruturais necessárias para os estudos de metabolismo e elucidação estrutural destes metabólitos podem ser obtidos por espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo (MS/MS) ou íon-trap (MSⁿ) (MAURIN et al., 2003).

Vários métodos analíticos foram publicados para a determinação da MonA. Dentre eles, destacam-se os métodos que incluem CCD e técnicas mais sensíveis e seletivas usando LC-MS, uma vez que os ionóforos não possuem grupos cromóforos e a derivatização se torna geralmente necessária para análise por espectrofotometria UV-Vis. Além disso, os ionóforos não são bons candidatos para cromatografia gasosa devido ao seu elevado peso molecular e sua baixa volatilidade (DUSI; GAMBA, 1999). Para o desenvolvimento deste estudo, foram escolhidos a CCDC e também a técnica hifenada, LC-MS, devido aos problemas anteriormente relatados na literatura referente a estrutura química da MonA, e a facilidade do

emprego de técnicas hífenadas em estudos de metabolismo, principalmente no que concerne a posterior identificação dos metabólitos.

A disponibilidade comercial dos metabólitos formados *in vivo* é importante para o desenvolvimento de um método analítico adequado para separação do fármaco e seus metabólitos. Dada a ausência de padrões dos metabólitos da MonA disponíveis comercialmente, a estratégia utilizada neste trabalho foi adaptar outros métodos de análise disponíveis na literatura. Para tanto, avaliou-se um método de LC em fase reversa, empregando eluição por gradiente em que o fármaco possui um tempo de retenção em torno de 20 minutos (**Figura 15**). A maioria dos metabólitos conhecidos da MonA são mais polares que este ionóforo (NEBBIA et al., 1999, 2001), ou seja, exibem tempo de retenção menor nas condições onde são empregadas cromatografia em fase reversa, tornando este método adequado para investigação da formação dos possíveis metabólitos ou produtos de oxidação.

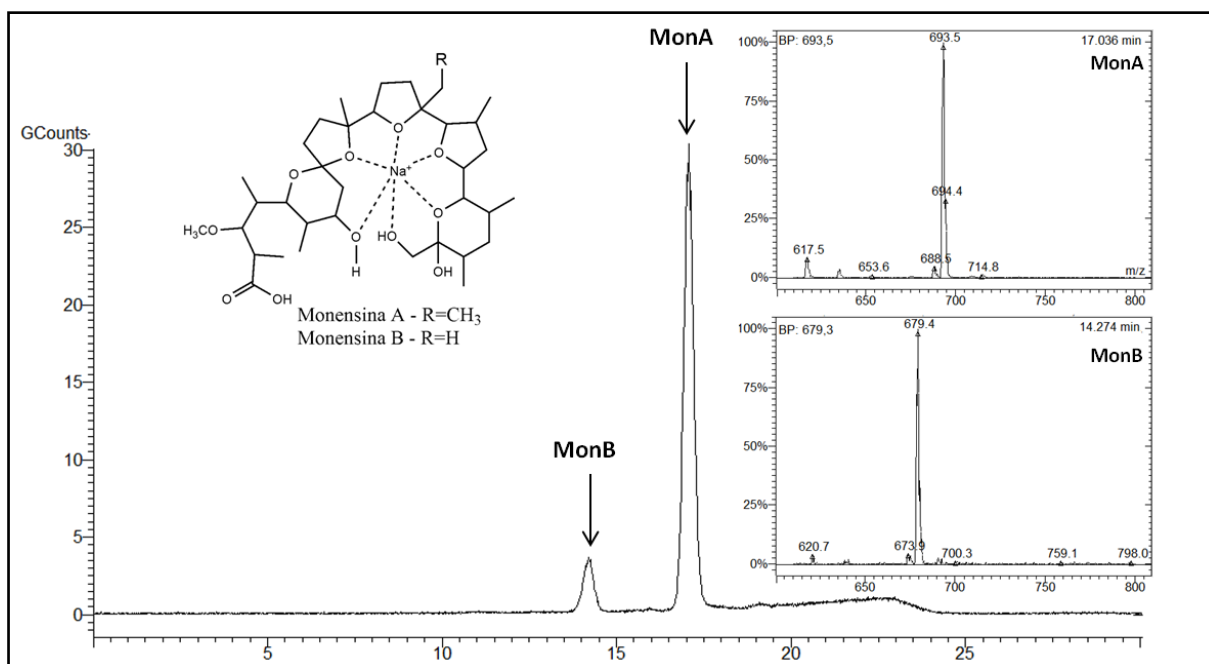


Figura 15. Cromatograma e espectros de massas da MonA e MonB obtido a partir da análise do padrão de monensina A.

4.2. Estudos catalíticos de oxidação da monensina A empregando a Fe(TFPP)Cl e o Catalisador de Jacobsen

As reações de oxidação da MonA foram realizadas na presença do catalisador *R,R*-Jacobsen ou da ferroporfirina de segunda geração, a Fe(TFPP)Cl, variando os oxidantes (*m*-CPBA, PhIO, H₂O₂ e *t*-BOOH) e meios reacionais (DCM, DCE, MeOH e ACN), visando a obtenção dos principais metabólitos formados nos sistemas *in vivo* e garantindo, assim, a validade do modelo testado e a possibilidade de obtenção de quantidades isoláveis desses metabólitos para posteriores estudos toxicológicos e farmacológicos.

Primeiramente, as análises dos produtos de reação foram realizadas em CCD, aplicando-se 30 µL da mistura reacional diretamente nas placas. Aplicou-se também, para comparação, as misturas reacionais do branco, controle e o padrão da MonA. Nesta etapa testaram-se diversas fases móveis, com intuito de encontrar uma condição cromatográfica eficiente na separação dos produtos e do substrato. A melhor condição de análise foi obtida conforme a metodologia descrita no item 3.4.4.

A **Figura 16** mostra os resultados obtidos nas placas de CCD após revelação com vanilina sulfúrica. Nestas análises podem ser visualizadas as manchas correspondentes à MonA e ainda os produtos resultantes das 32 reações realizadas. Pode-se verificar que os produtos obtidos nestas reações são similares. No entanto, as concentrações relativas desses produtos são diferentes, ou seja, são dependentes das condições reacionais testadas (variação do catalisador, oxidante e meio reacional empregado).

Pode-se observar também que os produtos resultantes das reações de oxidação da MonA são na sua maioria mais polares que o substrato, uma vez que eluem com fator de retardamento menor no eluente utilizado do que o substrato, de maneira esperada em análises cromatográficas que empregam fase estacionária normal, sílica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

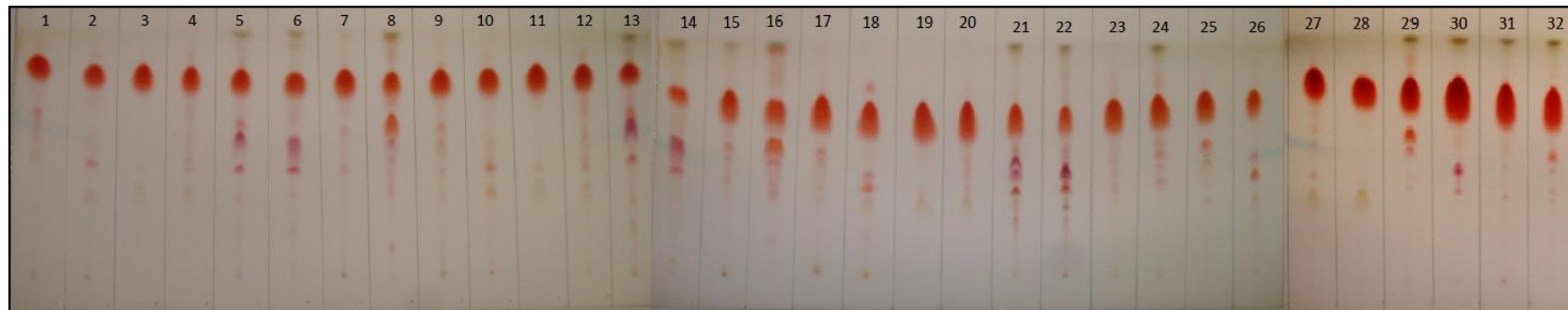


Figura 16. Foto das placas de CCDC resultantes das análises das misturas reacionais de oxidação da monensina A nas diferentes condições descritas no Quadro 1.

*Mancha de maior intensidade: monensina A.

Manchas roxas e manchas rosas de intensidade menor que da monensina A: produtos das reações.

Visando a posterior identificação dos produtos bem como a quantificação da porcentagem de oxidação da MonA nestes sistemas, as misturas reacionais também foram analisadas por LC-MS. Para quantificação da porcentagem de oxidação da MonA foi feita uma curva analítica (**Figura 17**). Os resultados destas análises são mostrados no **Quadro 3** e **Figura 18**.

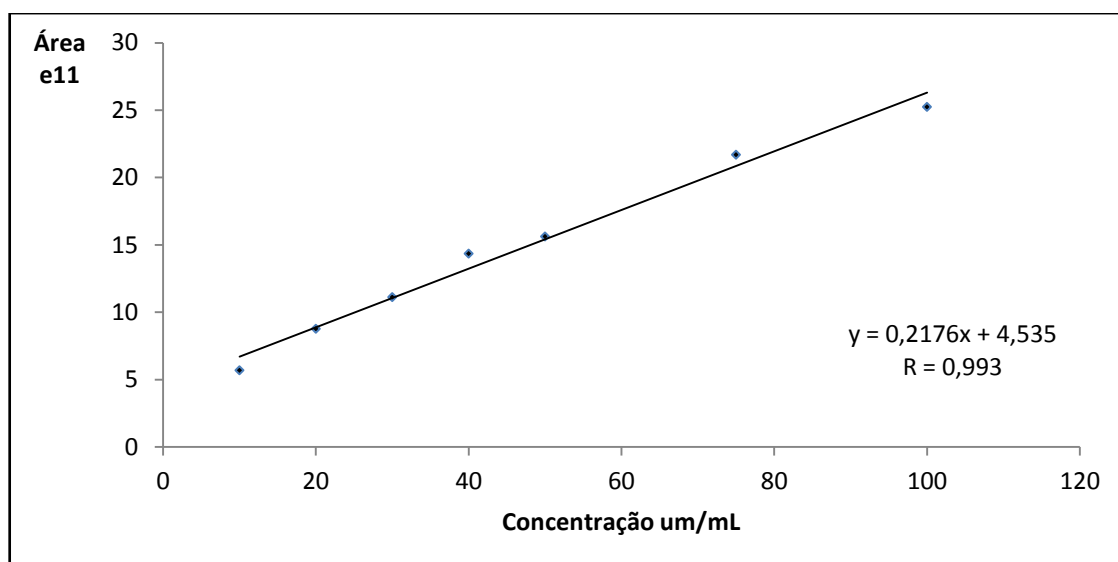


Figura 17. Curva analítica referente à análise da monensina A por LC-MS (condições descritas no item 3.3.5).

	Reação	%	Reação	%	Reação	%	Reação	%	Ox ¹
Jacobson	1	26	9	26	17	18	25	17	<i>m</i> -CPBA
	2	36	10	36	18	35	26	34	PhIO
	3	14	11	18	19	14	27	1	H ₂ O ₂
	4	27	12	27	20	18	28	11	<i>t</i> -BuOOH
Fe(TFPF)	5	57	13	36	21	39	29	23	<i>m</i> -CPBA
	6	49	14	61	22	62	30	15	PhIO
	7	36	15	18	23	19	31	2	H ₂ O ₂
	8	44	16	44	24	18	32	21	<i>t</i> -BOOH
	DCM		DCE		ACN		MeOH		

¹Ox: Oxidantes

Quadro 3. Conversão da monensina A (em porcentagem) nos diferentes sistemas catalíticos estudados.

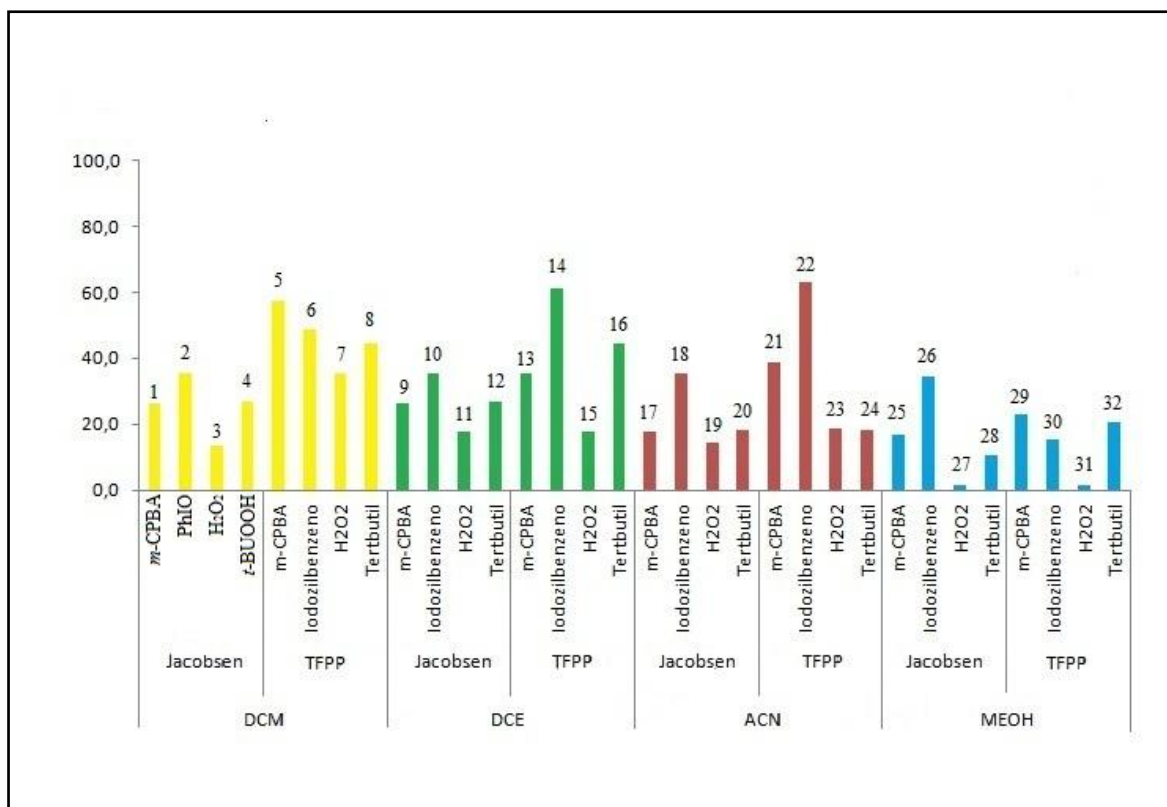


Figura 18. Gráfico da comparação das porcentagens de conversão da monensina A em todas as condições reacionais testadas.

Como mostra a **Figura 17** e o **Quadro 3**, a atividade catalítica dos sistemas é dependente do oxidante empregado, sendo os sistemas 22 (Fe(TFPP) / PhIO / CH₃CN) e 14 (Fe(TFPP) / PhIO / DCE) os mais eficientes, com cerca de 60% de conversão e o sistema 5 (Fe(TFPP) / *m*-CPBA / DCM) com cerca de 57% de conversão.

O PhIO, apesar de tóxico e da dificuldade de sua preparação, foi um dos doadores de oxigênio escolhido neste trabalho porque é considerado um oxidante padrão simples, que contém apenas um átomo de oxigênio, o qual geralmente leva à formação de espécies catalíticas metal-oxo de alta valência, que favorecem a formação de produtos, como constatado no **Quadro 3** (BAHRAMIAN et al., 2006; FARIA; MAC LEOD; ASSIS, 2008; GROVES, 2006; MANSUY, 2011).

É amplamente aceito que o intermediário ferro-oxo de alta valência, Fe^{IV}(O)P⁺, é a principal espécie ativa na hidroxilação de alcanos por PhIO catalisada por metaloporfirinas. A etapa seguinte do mecanismo neste caso envolve a abstração de um átomo de hidrogênio do substrato pelo Fe^{IV}(O)P⁺, formando assim

um substrato radical engaiolado e o complexo Fe^{IV}-hidróxido. A seguir ocorre a recombinação do OH com o substrato radical, gerando o produto hidroxilado. Este mecanismo é conhecido como o modelo de recombinação de oxigênio, ou “*oxygen rebound*” (GROVES, 2000). A literatura relata que oxidações biomiméticas de alcanos por metaloporfirinas realizadas em solventes menos polares (DCM e DCE), ocorrem de fato através do mecanismo de recombinação de oxigênio, levando à formação predominante de álcool (ASSIS et al., 1995; GROVES; NEMO; MYERS, 1979; TRAYLOR; DOLPHIN; TRAYLOR, 1998).

Numa análise geral da **Figura 18** e do **Quadro 3**, verifica-se que outro oxidante eficiente em oxidar a MonA é o *m*-CPBA (sistema reacional 5). Quando este oxidante é utilizado em sistemas com ferroporfirinas é possível a ocorrência de dois mecanismos para a ativação do oxigênio: 1) um mecanismo envolve a clivagem homolítica da ligação O-O do peróxido, o que conduz à formação de intermediários menos reativos tais como Fe^{IV}(OH)P, bem como radical RO[•], favorecendo, assim, a ocorrência de mecanismos radicalares; 2) o outro envolve a espécie metal-oxo produzida após a clivagem heterolítica da ligação O-O, com formação da espécie reativa oxoferril porfirina π-cátion radical, Fe^{IV}(O)P^{•+}, responsável pela oxidação. Este intermediário é favorecido pelos substituintes retiradores de elétrons do grupo fenila do *m*-CPBA, resultando em maiores rendimentos de oxidação da MonA. As altas porcentagens de conversão observadas com os sistemas FeTFPP/*m*-CPBA indicam que este oxidante está agindo via clivagem heterolítica da ligação O-O. Outro fator que indica a participação da espécie Fe^{IV}(O)P^{•+} é a alteração da cor inicial da solução de marron para verde o que é característica desta espécie intermediária (MAC LEOD, 2008; MEUNIER, 2000; MEUNIER; BERNADOU, 2000; MEUNIER; DE VISSER; SASON, 2004; NAM et al., 2000a, 2000b; SANTOS et al., 2011). O *m*-CPBA é frequentemente preferido em relação a outros peroxiácidos porque é um sólido com facilidade de armazenamento e estocagem.

Da mesma forma que observado para a ferroporfirina, quando utilizamos o catalisador de Jacobsen, os oxidantes *m*-CPBA e PhIO foram os mais eficientes em oxidar o substrato. PhIO geralmente leva à formação do intermediário catalítico Mn^V(O)-salen, mais eficiente e seletivo em transferir o oxigênio para o substrato (FARIA, 2010; MAC LEOD, 2008; MAC LEOD et al., 2008). Quando utiliza hidroperóxidos e perácidos é possível a ocorrência de dois mecanismos, assim como para a metaloporfirina, para a ativação do oxigênio. Com a clivagem homolítica

da ligação O-O ocorre a formação de RO[•] e do intermediário pouco reativo, Mn^{IV}(O)salen, como espécie ativa, resultando em baixo rendimento das reações. Como resultado da clivagem heterolítica da ligação O-O, há formação da espécie ativa Mn^V(O)salen, que é responsável pela ativação do oxigênio, resultando em maiores rendimentos de produtos oxidados. A clivagem heterolítica da ligação O-O é favorecida pela protonação do O terminal e pela polarização desta ligação, condição favorecida pelo substituinte acila do *m*-CPBA, retirador de elétrons (FARIA, 2010; FARIA; MAC LEOD; ASSIS, 2008; MAC LEOD, 2008).

As reações utilizando H₂O₂ como oxidante levaram, em geral, a conversões satisfatórias da MonA, mas não foram tão eficientes quanto os sistemas reacionais empregando PhIO e *m*-CPBA, fato que pode ser explicado pela dismutação catalisada do H₂O₂ na presença de complexos metálicos (DOS SANTOS et al., 2011; MEUNIER, 2000). Um rendimento considerável com H₂O₂ foi conseguido usando DCM como meio reacional (sistema reacional 7). Do ponto de vista de aplicação, H₂O₂ apresenta diversas vantagens como oxidante, como baixo custo e geração de água como único subproduto da reação. Por estes motivos, este oxidante é considerado um oxidante limpo e de potencial aplicação em reações de oxidação catalisadas por metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen. Entretanto, a atividade catalítica é limitada devido à tendência do H₂O₂ sofrer dismutação catalisada, similarmente ao que ocorre na presença da enzima catalase (FARIA, 2010; GROVES, 2006; MANSUY, 2011). Este oxidante também pode coordenar ao metal central da porfirina e sofrer uma cisão homolítica da ligação O-O do peróxido, que leva a formação de radicais RO[•] e de intermediários poucos reativos, Mn ou Fe^{IV}(OH)P, os quais resultam em baixo rendimento de oxidação (FARIA, 2010; GROVES, 2006; MAC LEOD, 2008; NAM; RYU; SONG, 2004).

Contrariamente, ao *m*-CPBA, o *t*-BOOH ao coordenar com metal central do catalisador de Jacobsen, tende a sofrer cisão homolítica da ligação O-O, formando radicais RO[•] e intermediários pouco reativos, como o salen Mn^{IV}-OH, conduzindo a menores rendimentos de oxidação (FARIA, 2010; MAC LEOD, 2008) como observado nas reações empregando este oxidante (**Quadro 3**).

De maneira geral, foram obtidos maiores % de conversão da MonA nas reações realizadas na presença da FeTFPP, para todos os solventes e oxidantes empregados. O intermediário Fe^{IV}(O)P^{•+} é provavelmente a espécie catalíticas predominante nos diferentes sistemas catalíticos estudados, e pode explicar os altos

rendimentos observados com este catalisador quando comparado ao catalisador de Jacobsen (**Quadro 3** e **Figura 18**). No caso do catalisador de Jacobsen, a formação da espécie oxo-manganil, é geralmente favorecida pela presença de um 5º ligante (ligante axial) ao manganês, o qual estabiliza o íon Mn^V , agindo como co-catalisador (GROVES, 2006). No caso das reações de oxidação da MonA mostradas neste trabalho, não foram utilizados co-catalisadores, portanto, nestes casos, o intermediário catalítico provável é o Mn^{IV} -OH, menos eficiente e, portanto, levando aos menores rendimentos observados com este catalisador (GROVES, 2006).

Os resultados presentes no **Quadro 3** e na **Figura 18**, mostram que o solvente empregado como meio reacional também influenciou nas porcentagens de oxidação da MonA. De maneira geral quando se utilizou MeOH como meio reacional a eficiência dos catalisadores foi menor que a observada nos demais solventes, para todos os sistemas catalíticos. O metanol poder atuar como um substrato da reação, competindo assim com a MonA pela espécie catalítica responsável pela transferência do átomo de oxigênio, levando à formação de produtos não desejados e diminuindo a oxidação da MonA.

Em ACN, foram obtidos altas porcentagens de conversão da MonA (63 %, sistema 22, Quadro 3). ACN possui maior habilidade em estabilizar o alto estado de oxidação do intermediários reativos, provavelmente por ter alto valor de capacidade doadora (DN14,1). Este solvente também foi considerado o mais eficiente em diversos sistemas catalíticos da literatura empregando complexos de salen como catalisadores (BAHRAMIAN et al., 2005, 2006; MAC LEOD et al., 2007; MIRKHANI et al., 2006). Outro fator que influencia as porcentagens de conversão do substrato é a viscosidade do solvente. A maior viscosidade dos solventes clorados DCM e DCE favorece o momento “*in cage*” sobre o momento “*out cage*” da MonA com a metaloporfirina (SMITH; IAMAMOTO; VINHADO, 2006). No entanto, quando se usou o catalisador de Jacobsen nas oxidações da MonA, o efeito não foi intensamente observado.

As análises dos produtos de oxidação da MonA por LC-MS, **Figura 19**, mostram a formação principal de 5 produtos principais, supostamente, dois provenientes da hidroxilação (m/z 709), um como resultado da epoxidação (m/z 707), um formado por uma desmetilação (m/z 679) e outro por desmetilação e hidroxilação (m/z 695); sendo que a formação dos produtos foi dependente do oxidante e meio reacional utilizado como discutido anteriormente. A elucidação

estrutural dos possíveis produtos formados será discutida posteriormente no item 4.4.

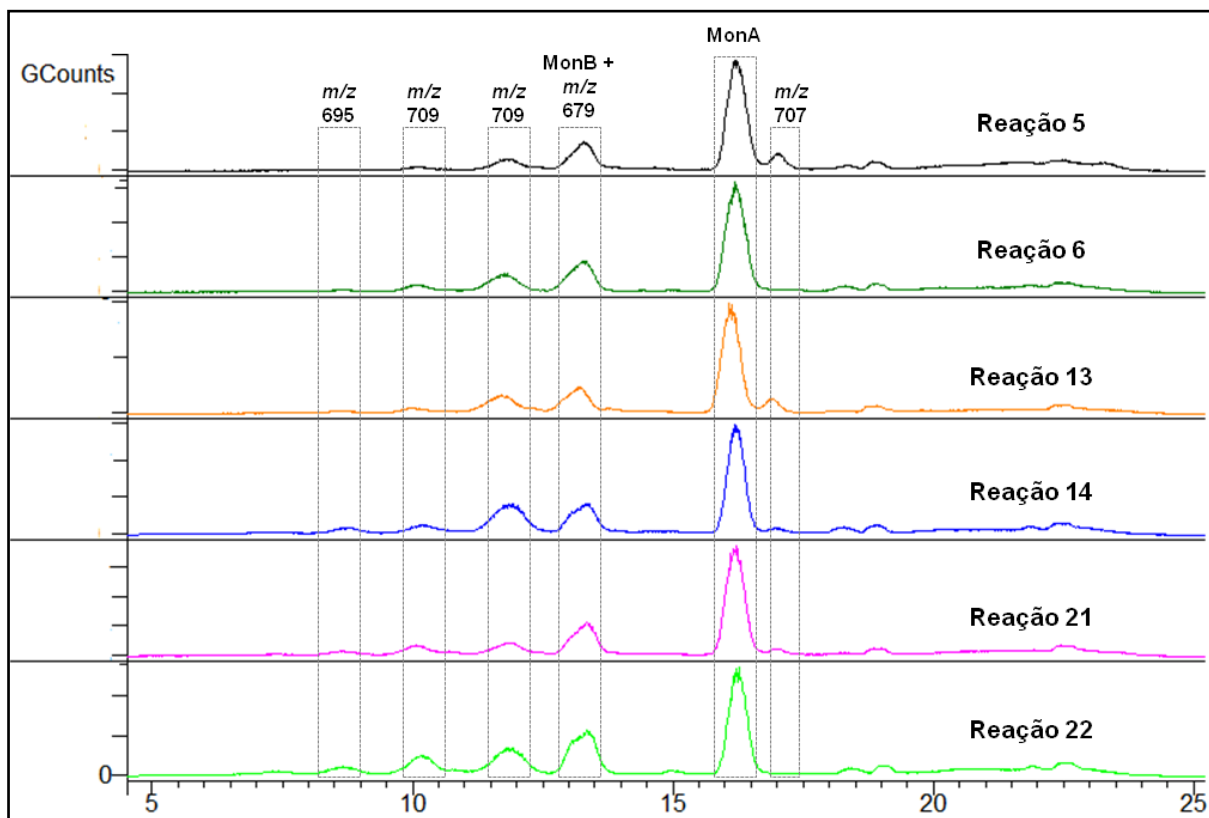


Figura 19. Perfis cromatográficos das reações 5, 6, 13, 14, 21 e 22 – reações com maior porcentagem de oxidação da MonA (condições reacionais estabelecidas no Quadro 3) (eixo da abscissa em min).

Com intuito de isolar os produtos de oxidação da MonA, uma das reações catalíticas foi repetida em escala preparativa. Inicialmente foi realizada para verificar se a mudança das condições para escala preparativa iria influenciar na formação dos produtos. A reação de oxidação em escala preparativa foi realizada em tubo de Falcon (50 mL), sob agitação mecânica (Vibrax VXR) à temperatura ambiente durante 24 h. A proporção utilizadas de 1:20:20 foi alcançada pela adição de 0,3 mM : 6 mM : 6 mM (FeTFPP : *m*-CPBA : MonA) em 25 mL de meio reacional (DCM). Decorrido o tempo da reação (24h) a mistura reacional foi seca e o resíduo resuspendido em fase móvel (MeOH:H₂O) e submetido à análise por LC-MS, para verificar a reprodutibilidade da transposição do screening para escala preparativa, como é mostrado na **Figura 20**.

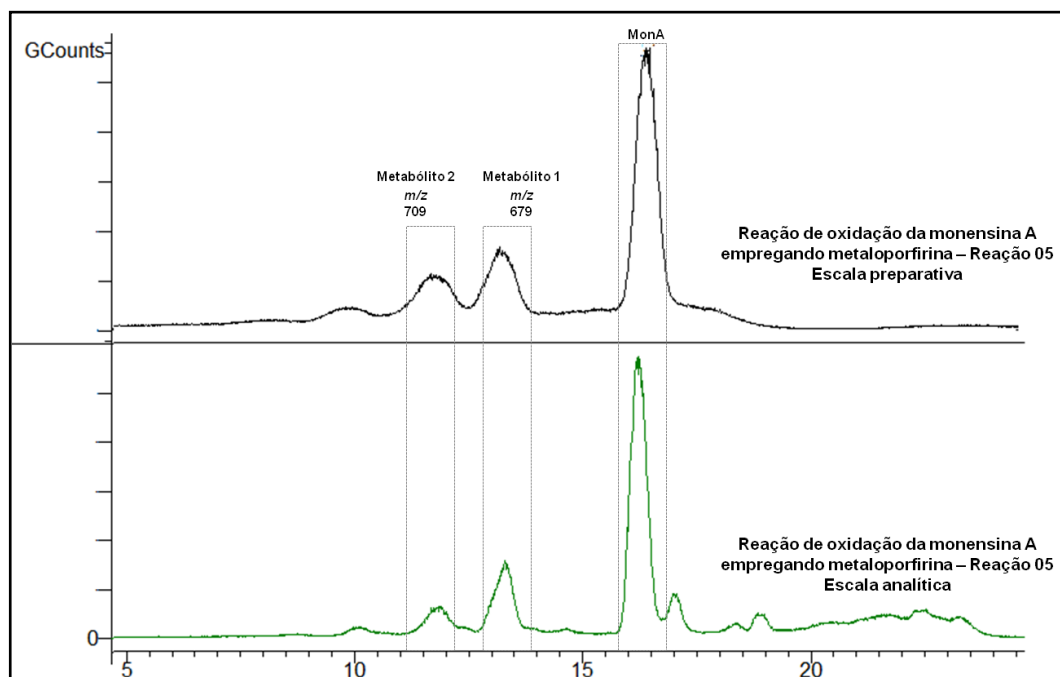


Figura 20. Perfil cromatográfico do sistema reacional 5, em escala analítica e em escala preparativa. Destacando os dois metabólitos isolados posteriormente por CCDP (eixo das abscissa em min).

A **Figura 20** mostra que o método foi eficiente em reproduzir os mesmos compostos quando em escala preparativa. Sendo assim, esta condição de reação foi utilizada e o isolamento dos produtos foi realizado por cromatografia em camada delgada preparativa (fase estacionária sílica gel), seguido da purificação dos produtos de oxidação por sucessivas CCD preparativas utilizando uma mistura de CHCl_3 :MeOH (93:7 v/v) como eluente. Depois de cada eluição, as bordas das placas foram reveladas com uma solução de ácido de vanilina (1% de vanilina e 1% de H_2SO_4 em etanol) para visualização dos metabólitos e facilitar seu isolamento. Foram isolados dois produtos, sendo cerca de 4 mg do produto de m/z 679 (nomeado como metabólito 1) e 4 mg do produto de m/z 709 (nomeado como metabólito 2).

4.3. Estudos de biotransformação da monensina A empregando fungos

O isolamento de novas culturas para um único estudo de biotransformação é morosa, por exemplo, a identificação de novos micro-organismos, o que leva à escolha de fungos de coleções já estudadas e com conhecida capacidade em biotransformar compostos orgânicos, tais como, fármacos e produtos naturais. Além disso, foi avaliado neste trabalho o uso de fungos isolados do ambiente marinho (o que poderia mostrar potencial deste tipo de micro-organismo em estudos de biotransformação) e ainda o uso de cepas padrões obtidas de bancos de deposição (gênero *Cunninghamella*, ATCC[®], “*American Type Culture Collection*”) com devidos relatos sobre a capacidade em reações de metabolização de outros substratos. Neste estudo optou-se por avaliar a aplicabilidade dos fungos descritos no Item 3.3, mantendo-se constantes todas as condições experimentais dos estudos de biotransformação da MonA.

Os estudos realizados nesta etapa consistiram em colocar o fungo ativado (PDA) e crescido (Meio pré-fermentativo - malte) em um meio apropriado (meio fermentativo - Czapek) juntamente com a MonA por um determinado período, verificando o potencial dos fungos em promover modificações químicas no substrato. Posteriormente, os produtos destas modificações foram estudadas, analisadas e identificadas para verificar o potencial destes micro-organismos em metabolizar de maneira semelhante às enzimas do CYP450 no metabolismo *in vivo* da MonA.

Para avaliar as possíveis reações de biotransformação da MonA pelas enzimas dos fungos testados, a cada 24 h alíquotas foram retiradas dos Erlenmeyers, um contendo fungo + substrato, e outro contendo somente o fungo adicionado de DMF (solvente utilizado para solubilização da MonA). Após essa etapa, os extratos eram particionados com CHCl₃. A fase orgânica foi evaporada sob fluxo de ar comprimido e os resíduos resuspendidos em solvente orgânico apropriado e submetidos a análises por CCDC (Dias 1, 3, 5 e 7) e LC-MS (Dias 0, 2, 4, 6 e 8).

As análises das placas de CCDC mostraram que os fungos *Glomerella cingulata*, *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason, *Papulaspora immersa* Hotson e *Penicillium crustosum* não foram capazes de biotransformar a MonA sob as condições empregadas neste estudo. Esse fato foi confirmado pela ausência de manchas nas placas de CCDC após a revelação química correspondente a

possíveis metabólitos resultantes da biotransformação. Outro indício que confirmou essa hipótese foi a presença da mancha referente à MonA ao longo do tempo de estudo de mesma intensidade, mostrando que não houve aparente consumo do substrato pelas enzimas dos fungos.

No entanto, para os outros fungos avaliados (*Aspergillus awamori*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium oxysporum*, MARINHO M61, *Mucor rouxii* e *Penicillium brevicompactum*) após a revelação das placas de CCDC, houve o aparecimento de manchas diferentes da mancha do substrato. Tais manchas não foram encontradas nos respectivos controles. Dessa forma, pode-se concluir que estas manchas eram correspondentes aos compostos provenientes da metabolização da MonA pelos fungos. Além do surgimento dessas manchas, houve ainda o indício de consumo do substrato pelos fungos, com redução na intensidade da mancha referente ao substrato ao longo dos dias de incubação. Outra conclusão, foi que os metabólitos eram mais polares (possuíam Rf menor) que a MonA. Este fato é condizente com o comportamento cromatográfico em análises que empregam fase normal, uma vez que os produtos de oxidação são geralmente mais polares que seus substratos em estudos de metabolismo sendo, portanto, mais retidos devido à sua maior afinidade pela fase estacionária polar (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Da mesma forma que as análises em CCDC, as análises dos perfis dos cromatogramas obtidos por LC-MS mostraram que os fungos endofíticos *Glomerella cingulata*, *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason, *Papulaspora immersa* Hotson, e *Penicillium crustosum* não foram eficientes em biotransformar a MonA nas condições empregadas neste estudo. Pode-se notar que não houve alteração da área referente ao pico de MonA durante todos os dias de incubação com estes fungos e não houve aparecimento de picos cromatográficos referentes a possíveis produtos de biotransformação.

No entanto, os outros fungos avaliados, *Aspergillus awamori*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium oxysporum*, MARINHO M61, *Mucor rouxii* e *Penicillium brevicompactum* mostraram potencial em biotransformar a MonA de maneira qualitativa mas não quantitativamente semelhante. Os resultados dos estudos de biotransformação mostraram que, dentre os fungos avaliados, os do gênero *Cunninghamella* (*Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A e *Cunninghamella elegans*

NRRL 1393 ATCC 10028B) foram os mais eficientes em biotransformar a MonA, levando a quatro principais produtos de biotransformação (**Figura 21** e **Figura 22**).

Os cromatogramas obtidos por LC-MS, apresentados na **Figura 21** e **Figura 22**, mostram o aparecimento de picos cromatográficos diferentes do pico referente à MonA. Tais picos não foram encontrados nos respectivos controles e brancos. Pode-se supor que tais picos são correspondentes aos derivados provenientes da biotransformação da MonA pelos fungos. Além do surgimento destes picos, há ainda indício de consumo do substrato pelos fungos devido à redução na área sob o pico referente ao substrato. As análises por LC-MS e CCD comprovaram ainda que a estrutura da MonA é estável em meio de cultura Czapek nas condições experimentais avaliadas, uma vez que a área referente ao pico cromatográfico da MonA no controle permaneceu inalterada durante todo o período de incubação (oito dias) e não houve aparecimento de picos diferentes do padrão de MonA.

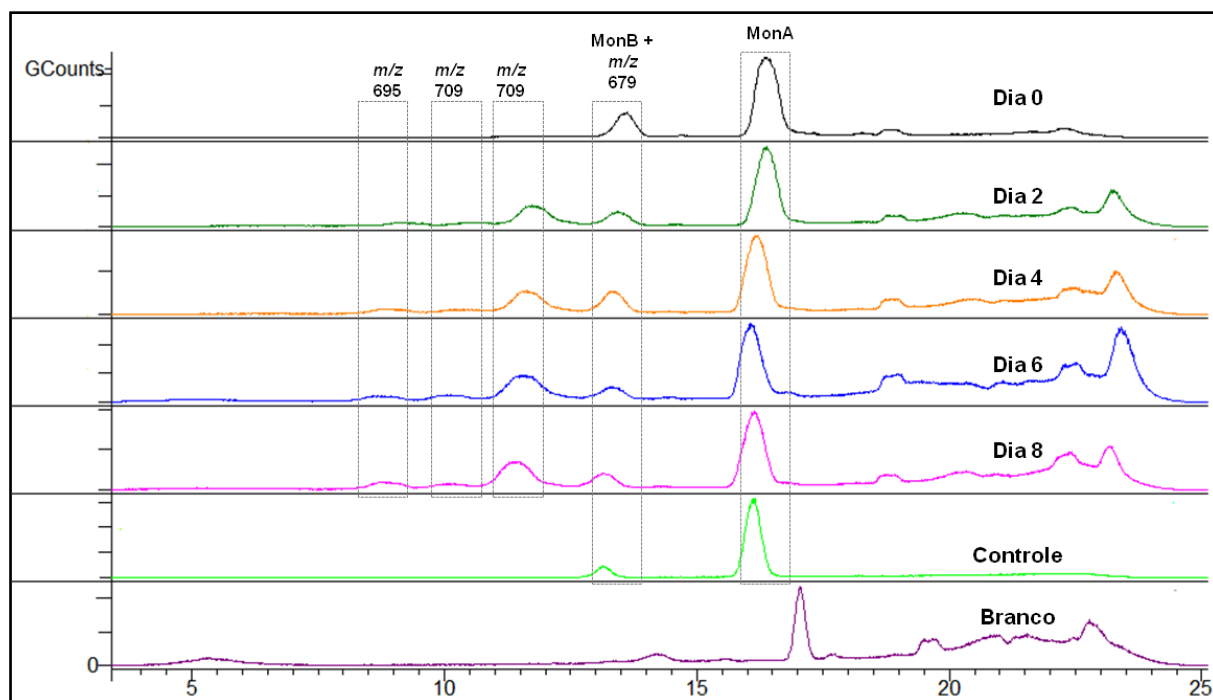


Figura 21. Cromatograma obtido na análise por LC-MS da cultura do fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 8688A incubado com a monensina A, mostrando os metabólitos formados. Cromatograma do Dia 0 – dia 8 = Meio de Czapek com MonA incubada com os fungos; Controle = MonA incubada apenas com meio Czapek; Branco = fungos incubadas em Czapek sem Mon.A. Na análise do

branco, o pico principal do cromatograma tem m/z 659, não correlacionado com produtos de biotransformação nem como metabólito secundário do fungo (eixo da abscissa em min).

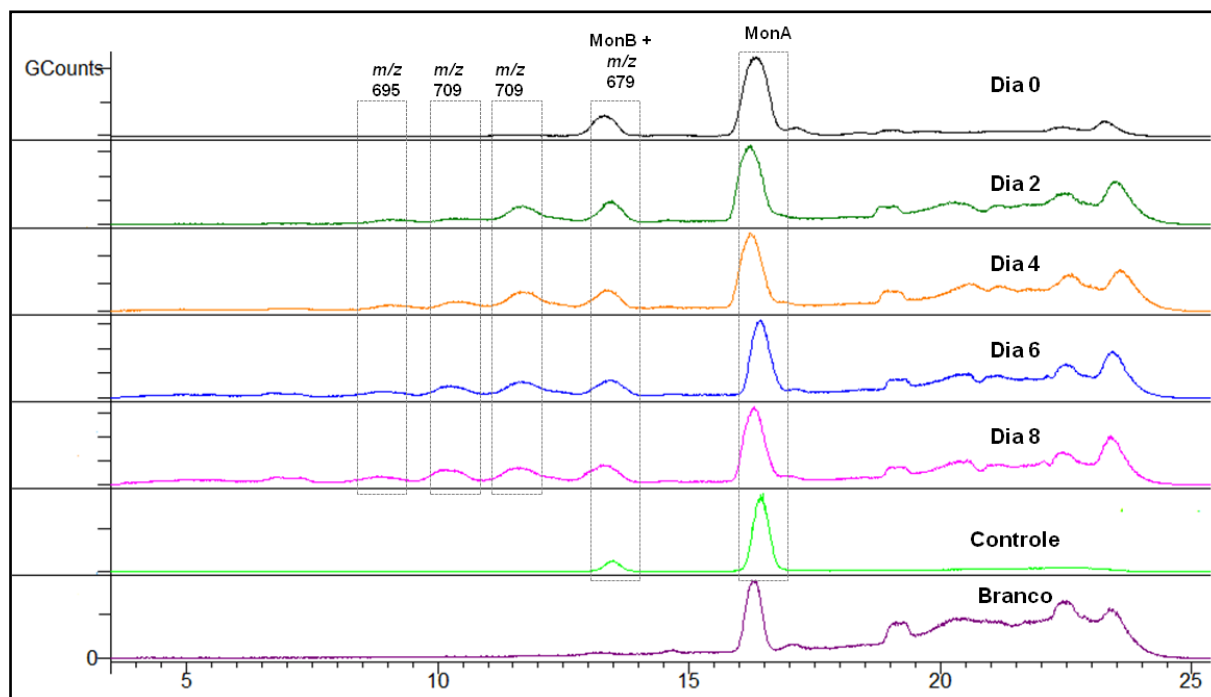


Figura 22. Cromatograma obtido na análise por LC-MS da cultura do fungo *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B incubado com a monensina A, mostrando os metabólitos formados. Cromatograma do Dia 0 – dia 8 = Meio de Czapek com MonA incubada com os fungos; Controle = MonA incubada apenas com meio Czapek; Branco = fungos incubadas em Czapek sem MonA. Na análise do branco, o pico principal do cromatograma tem m/z 659, não correlacionado com produtos de biotransformação nem como metabólito secundário do fungo.

A análise dos espectros de massas destes derivados evidencia, assim como observado no estudo empregando os catalisadores, a formação de cinco principais produtos da biotransformação da MonA, dois prováveis produtos hidroxilados de m/z 709, um produto *O*-desmetilado com m/z 679, e um produto *O*-desmetilado e hidroxilado com m/z 695. A elucidação estrutural destes compostos será descrita detalhadamente no **item 4.4**.

O metabólito obtido de m/z 679 coincidentemente possui o mesmo tempo de retenção e mesma m/z que a MonB (contaminante no padrão da MonA) mas estes possuem estruturas químicas diferentes. Este produto foi detectado ao se injetar por

infusão direta os meio reacionais de biotransformação. Nestes casos, pode-se notar que a intensidade do sinal m/z 679 no espectro de massas aumentou quando comparado ao sinal m/z 693 da MonA, indicando a provável formação de um produto resultante da O-desmetilação da MonA. Este possível produto formado é o principal metabólito observado nos estudos de metabolismo *in vivo* da MonA, como descrito anteriormente (NEBBIA et al., 1999, 2001).

Paralelamente, investigou-se a cinética da reação de biotransformação da MonA incubada com as espécies de *Cunninghamella* ao longo de oito dias. Para isso, determinou-se a razão relativa entre o substrato e seus produtos de biotransformação através das áreas dos picos obtidos nas análises por LC-MS. Após dois dias de incubação, cerca de 80 % da MonA foi biotransformada. A formação dos metabólitos 1, 2 e 3 (**Figura 23**), após oitos dias de incubação, tiveram um baixo rendimento em ambos os estudos. O rendimento máximo obtido para os metabólitos de 1, 2 e 3 após biotransformação da MonA pelo *C. echinulata* foi de 13, 3 e 3%, respectivamente no sexto dia de incubação e o rendimento máximo obtido para os metabólitos 1, 2 e 3 após biotransformação pelo *C. elegans* foi de 10, 6 e 3%, respectivamente, no oitavo dia de incubação.

Paralelamente aos estudos de biotransformação avaliou se a influência do substrato ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre o crescimento dos fungos do gênero *Cunninghamella*. Visualmente, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a MonA não apresentou toxicidade (inibição de crescimento) aparente sobre as duas espécies de *Cunninghamella*.

Da mesma forma que no estudo envolvendo os catalisadores, verificou-se a possibilidade de empregar a metodologia com fungos em escala ampliada, selecionando-se o fungo *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B. Este fungo foi selecionado devido a maior eficiência em biotransformar a MonA nos estudos iniciais; além disso, há um extenso número de estudos na literatura que demonstram o potencial deste gênero de fungo em ser empregado como modelo microbiano de metabolismo de fármacos e outros compostos orgânicos (ASHA; VIDYAVANTHI, 2009). Após os experimentos de biotransformação, o meio de cultura for particionado e a fase orgânica coletada e evaporada. O resíduo totalizou cerca de 88 mg. Este então foi submetido à análise por LC-MS para verificar a reprodutibilidade da transposição da escala analítica para escala ampliada, como pode ser observado na **Figura 23**.

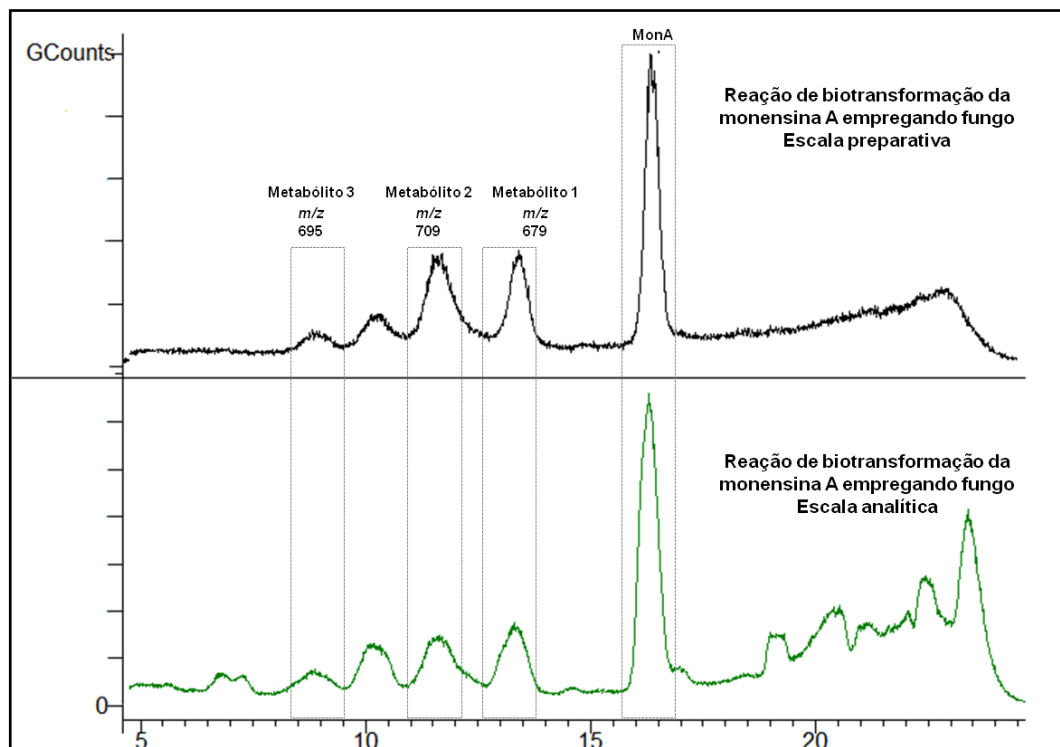


Figura 23. Perfil cromatográfico da reação de biotransformação empregando o fungo *Cunninghamella elegans* NRRL 1393 ATCC 10028B – Transposição da escala analítica para escala ampliada, destacando os metabólitos elucidados neste estudo (eixo da abscissa em min).

A **Figura 23** mostra que o método foi eficiente em produzir os mesmos metabólitos em escala ampliada. No entanto, esta metodologia para produção dos metabólitos da MonA foi preterida em favor dos sistemas biomiméticos empregando os catalisadores, uma vez que o meio de cultura contendo fungos é uma matriz complexa, o que torna o isolamento dos metabólitos mais moroso.

4.4. Elucidação estrutural dos produtos obtidos por espectrometria de massas em sequência

A **Figura 24** mostra os cromatogramas típicos dos meios de reação empregando os sistemas modelos usados para (bio)transformar a MonA (fungo e metaloporfirina), mostrando que em ambos os sistemas os produtos obtidos são similares (comprovados pelo t_R e espectro de íons produtos). Sendo assim, a identificação estrutural dos metabólitos formados será discutida conjuntamente para ambos os casos nesta seção. É necessário salientar que o metabólito de m/z 709 com t_R 10,2 minutos não foi identificado e, portanto, não será discutido. O produto de m/z 707 corresponde a um produto de degradação, que será discutido na seção seguinte (4.5). Nesta discussão a denominação dos metabólitos seguirá aquela apresentada na **Tabela 2**.

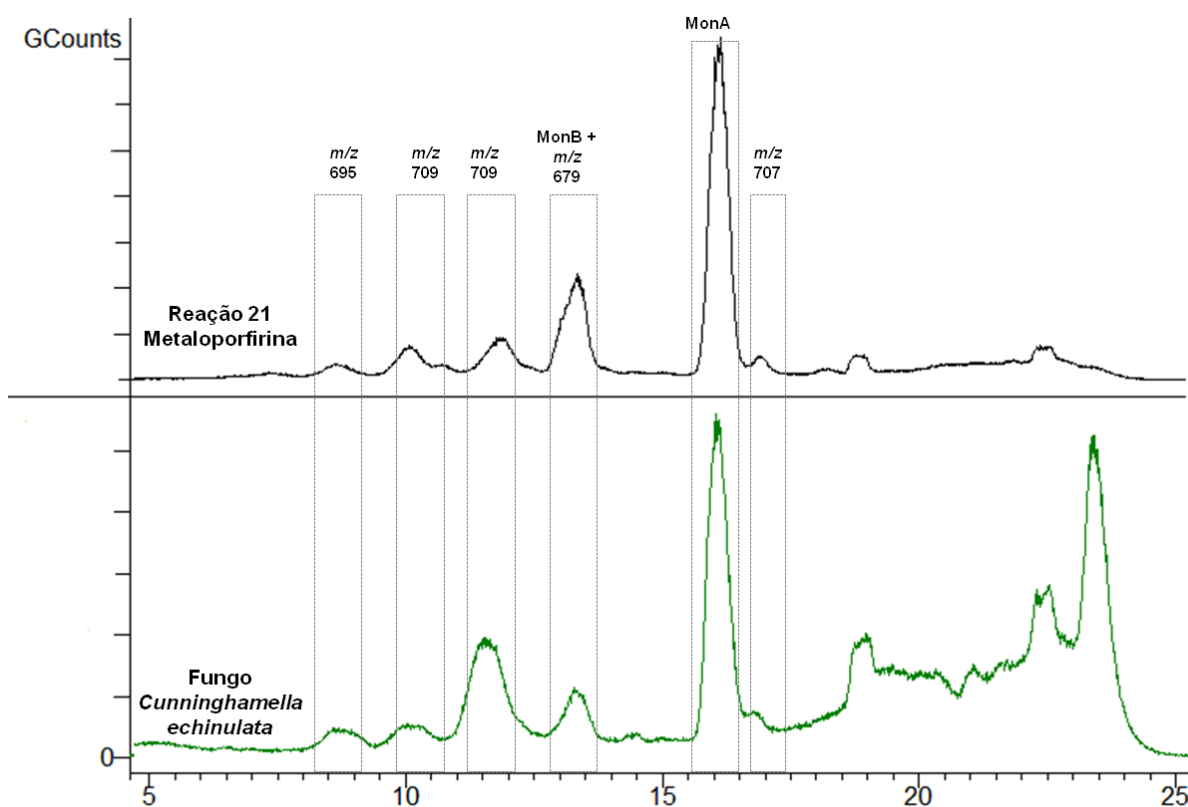


Figura 24. Cromatogramas típicos obtidos nas análises das reações de oxidação da monensina A empregando metaloporfirina e biotransformação empregando fungo (eixo da abscissa em min).

Tabela 2. Identificação dos picos cromatográficos observados nas análises das reações de (bio)transformação da monensina A.

<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	Denominação
679	13,1	Metabólito 1
709	11,7	Metabólito 2
709	10,1	Não identificado
695	8,7	Metabólito 3
707	17,0	Produto de degradação

Os estudos envolvendo MonA pela técnica de ESI-MS/MS, em uma investigação sistemática realizada por Lopes et al. (2002a, 2002b), mostraram que somente é possível detectar a forma protonada da MonA, $[M+H]^+$, em baixos valores de pH e alta tensão do cone ou, ainda, com a adição de éter de coroa em excesso na solução. A Adição de éter de coroa resulta em um aumento relativo na intensidade do íon molecular devido à competição do éter de coroa com a MonA pelo íon sódio (LOPES et al., 2001). Estes estudos revelaram as limitações do emprego da espectrometria de massas na identificação do íon protonado e, assim, a importância dos estudos empregando a MonA sodiada, $[M+Na]^+$. Além disso, Lopes et al. (2002^a, 2002b) relataram que é possível uma extensiva fragmentação da molécula sodiada empregando uma alta energia nos processos de dissociação induzida por colisão (CID). Estes estudos revelaram ainda que o emprego do íon precursor protonado em espectrometria de massas sequencial possui limitações e que entender os caminhos da fragmentação da sua forma sodiada pode trazer informações importantes. A fragmentação da MonA sodiada leva a um número significativo de íons produtos, que podem ser empregados para elucidação estrutural de seus derivados (LOPES et al., 2001).

Nas análises iniciais da MonA por MS/MS presentes nesta tese, otimizou-se as condições de fragmentação empregando altas energias de colisão, de forma a se obter os mesmos íons produtos que aquele obtidos Lopes et al. (2002a, 2002b), visando facilitar a compreensão dos mecanismos reacionais envolvidos nos estudos de fragmentação para a elucidação estrutural dos metabólitos obtidos na (bio)transformação da MonA. A **Figura 25** apresenta os principais íons fragmentos gerados a partir da fragmentação da MonA por ESI-MS/MS; **Figura 26** mostra o

espectro de íons produtos da MonA e a identificação deste íons produtos encontra-se na **Tabela 3**. Os íons produtos obtidos na fragmentação da MonA estão de acordo com os estudos prévios publicado por Lopes (2002a, 2002b). De acordo com Lopes et al. (2002a, 2002b) os íons produzidos a partir da fragmentação da MonA correspondem a fragmentações do tipo Grob-Wharton ou rearranjos pericíclicos, bem como perdas neutras simples de H₂O e CO. Os mesmos mecanismos de fragmentação foram observados nas análises por MS/MS da MonA obtidos no presente estudo, como mostrado na **Figura 25** e **Tabela 3**. A proposta de fragmentação dos metabólitos será discutida em detalhes em seguida.

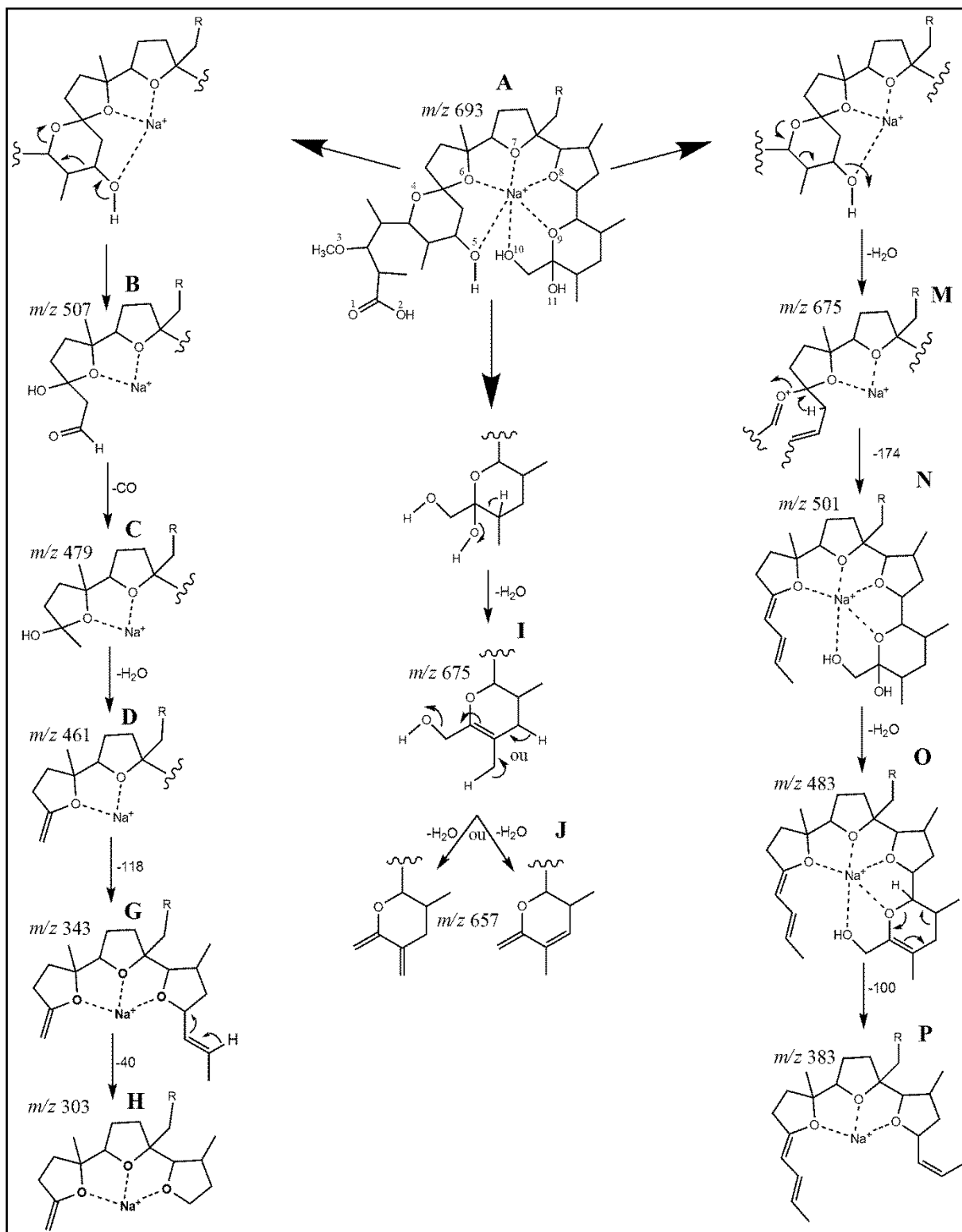


Figura 25. Rotas de fragmentação propostas para a monensina A sodiada, mostrando os principais íons produtos formados nas análises por ESI-EM/EM (monensina A (R=CH₃) e monensina B (R=H) (Adaptado de Lopes et al. (2002a, 2002b)).

O espectro MS/MS em baixa resolução da MonA e dos metabólitos 1, 2 e 3 (**Figura 26-29**) apresentam fragmentos estruturais que originaram-se a partir dos mecanismos de fragmentação do tipo Grob-Wharton (GROB, 1969; GROB; BAUMANN, 1955; WHARTON; HIEGEL, 1965) e/ou eliminação de H₂O e CO, como previamente proposto por Lopes et al. (2002a, 2002b) para MonA, empregando a espectrometria de massa de alta resolução. Nesse estudo os autores propuseram a fórmula molecular para cada íon. A **Tabela 3** contém as massas exatas e fórmulas teóricas com os erros relativos (ppm) para cada metabólito obtidos em análises por espectrometria de massas em alta resolução (ESI-Qq-TOF). A **Tabela 4** mostra a identidade de cada fragmento para todos os íons observados no espectro de íons produtos da MonA e seus principais metabólitos.

Tabela 3. Fórmula, massa observada, massa calculada, erro das análises da MonA e seus metabólitos empregando a espectrometria de massas de alta resolução.

Fórmula	Massa observada	Massa calculada	Erro (ppm)	Analito
C ₃₆ H ₆₂ NaO ₁₁	693,4200	693,4184	-2,3	Monensina A
C ₃₅ H ₆₀ NaO ₁₁	679,4026	679,4028	-2,6	Monensina B
C ₃₅ H ₆₀ NaO ₁₁	679,4008	679,4028	+2,9	Metabólito 1
C ₃₆ H ₆₂ NaO ₁₂	709,4134	709,4139	-0,1	Metabólito 2
C ₃₅ H ₆₀ NaO ₁₂	695,3977	695,3977	0	Metabólito 3

Tabela 4. Identificação dos íons fragmentos observados nos espectros dos íons produtos para monensina A e os metabólitos obtidos.

Íon	Monensina A	Metabólito 1	Metabólito 2	Metabólito 3
A	693	679	709	695
B	507	507	523	523
C	479	479	495	495
D	461	461	477	477
E	443	443	459	459
F	-	-	441	441
G	343	343	343	343
H	303	303	303	303
I	675	661	691	677
J	657	643	673	659
L	-	-	655	641
M	675	661	691	677
N	501	501	517	517
O	483	483	499	499
P	383	383	441	441

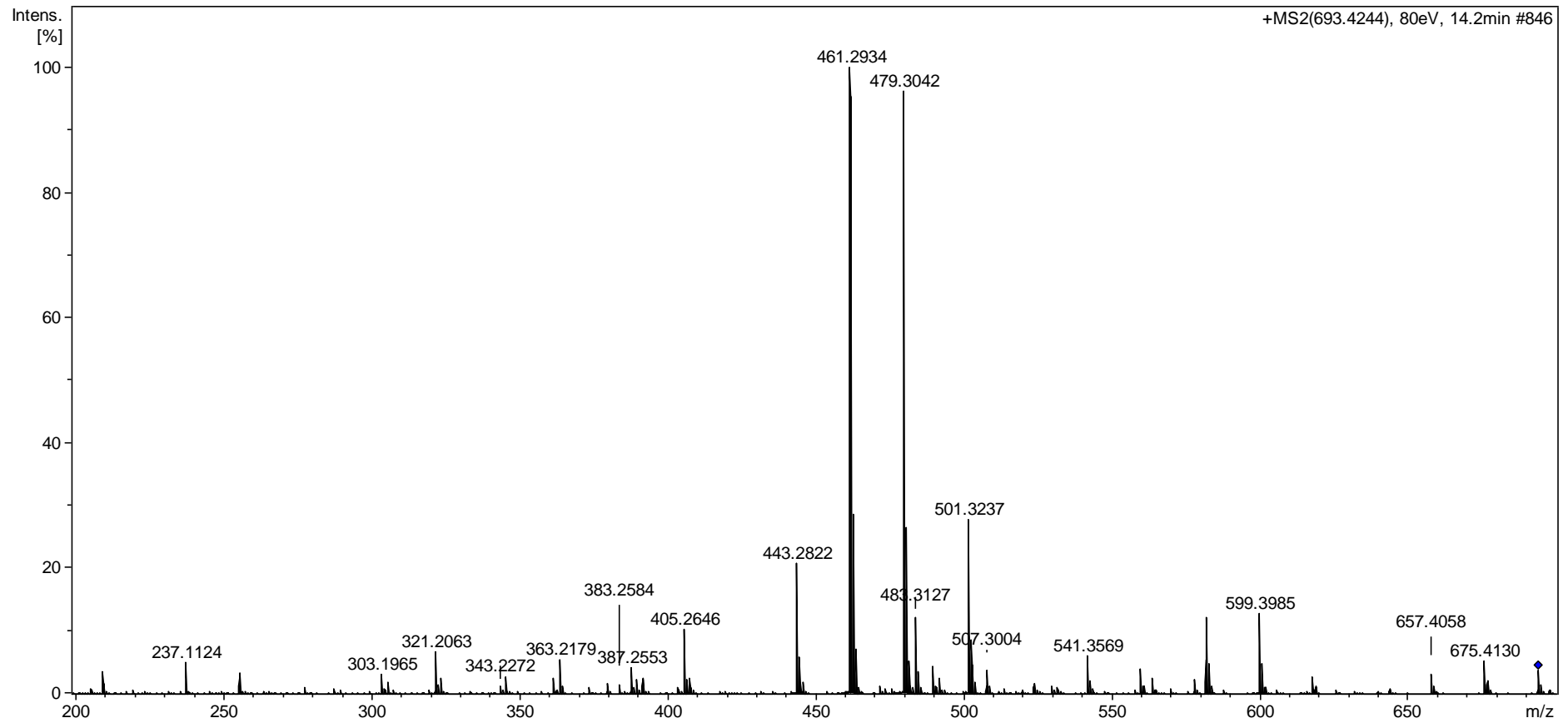


Figura 26. Espectro de massas dos íons produtos da monensina A.

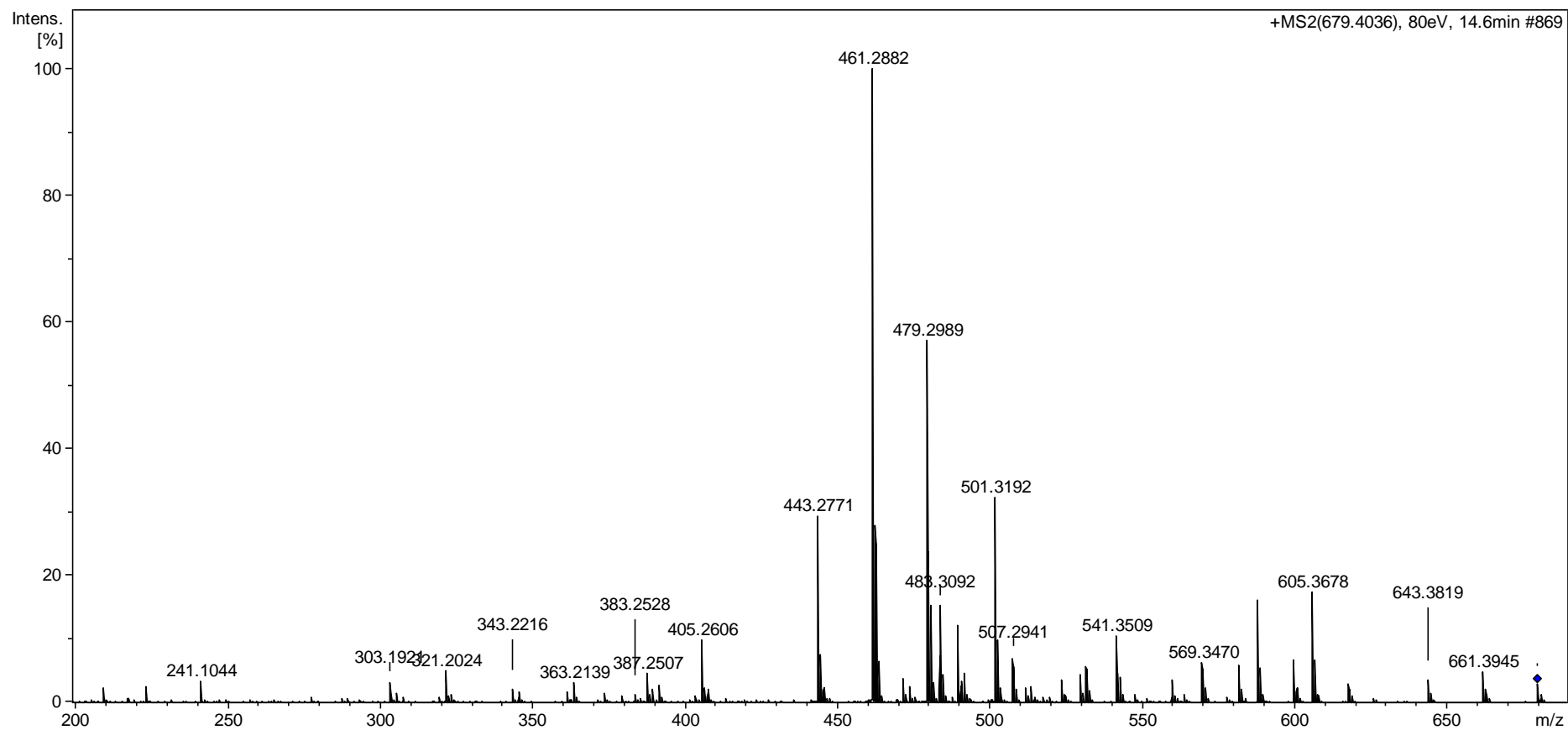


Figura 27. Espectro de massas dos íons produtos do metabólito 1 (m/z 679).

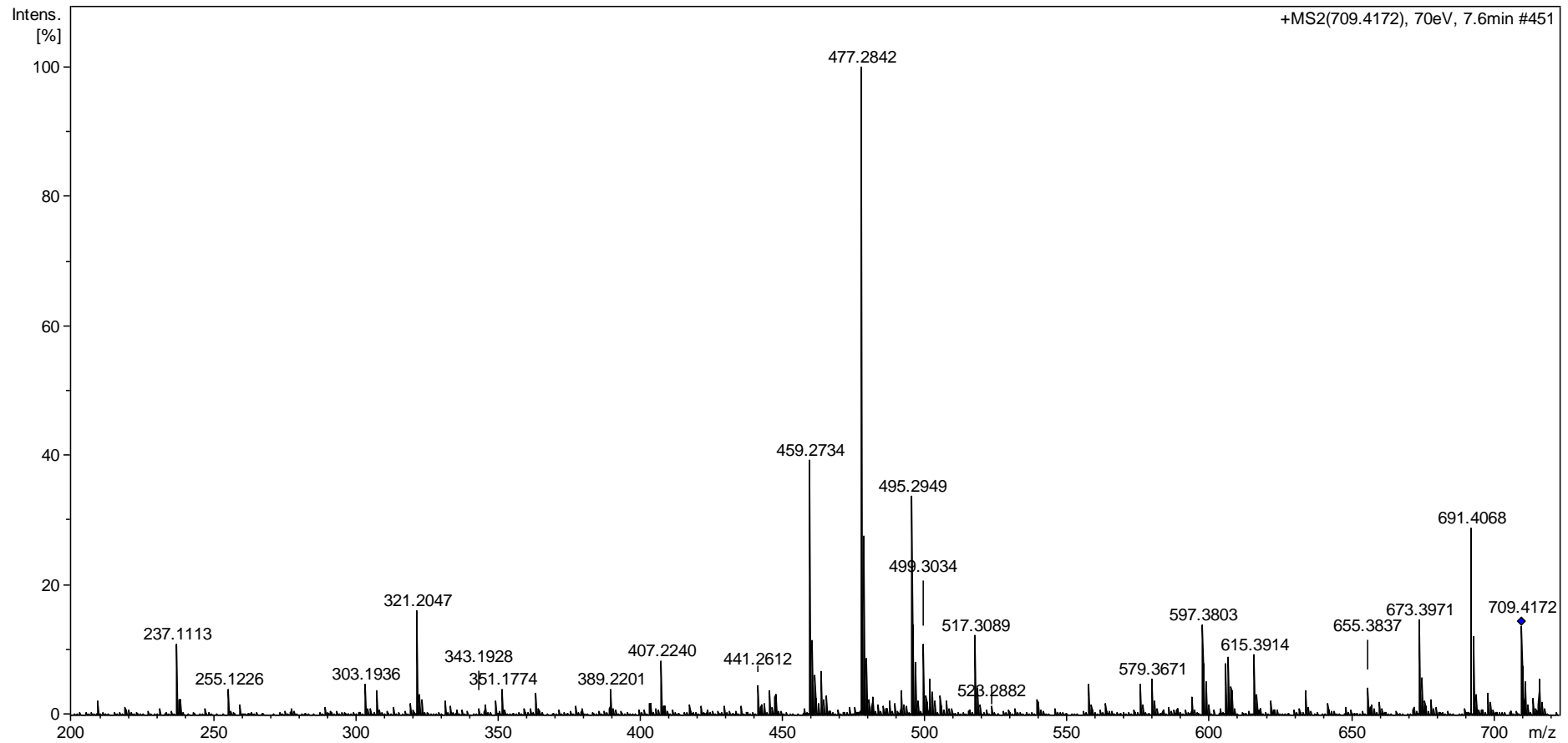


Figura 28. Espectro de massas dos íons produtos do metabólito 2 (m/z 709).

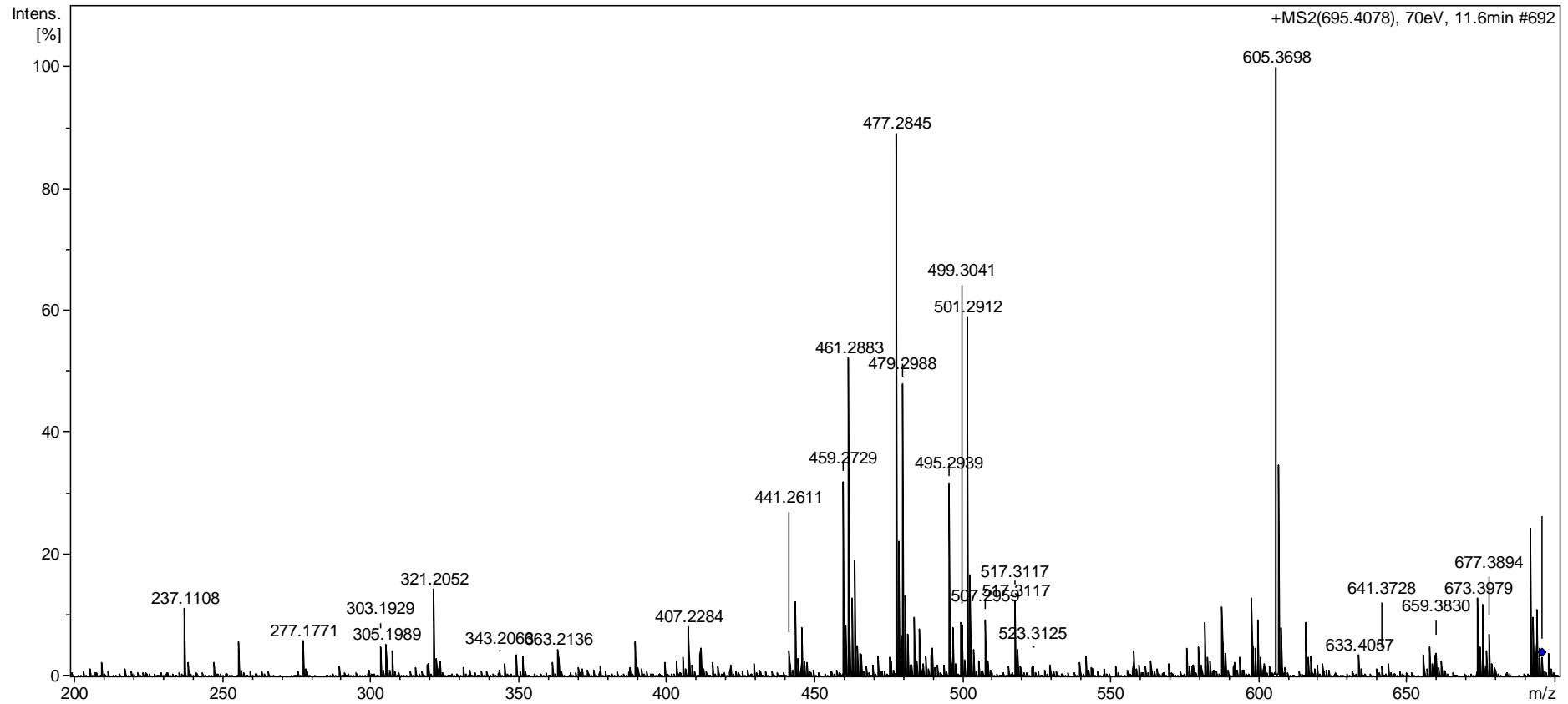


Figura 29. Espectro de massas dos íons produtos do metabólito 3 (m/z 695).

As **Figuras 30 à 33** mostram as propostas de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3. Nestas propostas, a função ácida sofre protonação, porque é a posição mais disponível para que isto ocorra em virtude da rigidez da estrutura do poliéter e do fato de que as demais funções orgânicas com características básicas da estrutura estão, em sua maioria, envolvidas na coordenação com o Na^+ . Esta afirmação está de acordo com os dados publicados sobre a estrutura tridimensional de MonA no estado sólido (DUAX; SMITH; STRONG, 1980; MARTINEK et al., 2000; PAZ et al., 2003).

A **Figura 30** mostra que a perda neutra de 172 u para os metabólitos 1 e 3 e de 186 u para o metabólito 2, ocorre segundo um mecanismo de fragmentação do tipo Grob-Wharton, iniciando as fragmentações destes metabólitos. Esta eliminação envolve o anel A (O-4) e resulta na formação do íon produto **B** (m/z 507, 523 e 523 para os metabólitos 1, 2 e 3, respectivamente). O íon produto **B** fragmenta-se pela eliminação de CO e H_2O , o que resulta na formação do íon produto **C** (m/z 479, 495 e 495 para os metabólitos 1, 2 e 3, respectivamente) e íon produto **D** (m/z 461, 477 e 477 para os metabólitos 1, 2 e 3, respectivamente). O íon produto **D** fragmenta-se pela eliminação de H_2O , dando origem ao íon produto **E** (m/z 443, 459 e 459 para os metabólitos 1, 2 e 3, respectivamente).

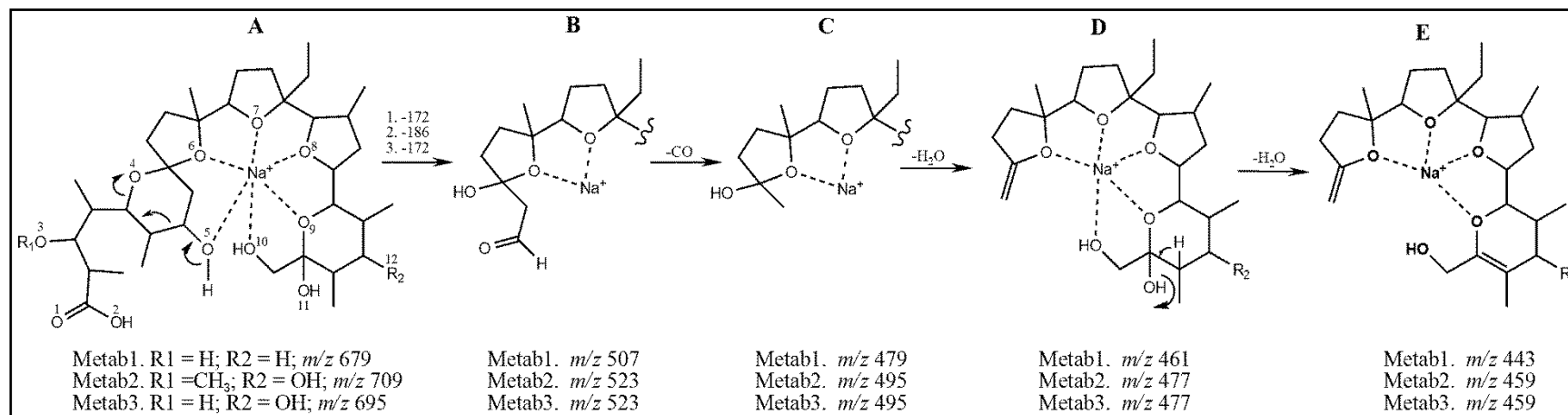


Figura 30. Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto E.

Os íons produtos com m/z 343 (**G**) e m/z 303 (**H**) (**Figura 31**) são originados a partir do íon produto **E**. Duas vias de fragmentação são possíveis para a formação desses íons. A primeira via envolve a eliminação de uma molécula de H_2O a partir do anel tetraidrofurânico, formando o íon produto **F** (m/z 441), sendo que este pode dar origem ao íon produto **H** (m/z 303) via fragmentação do tipo Grob-Wharton pela perda neutra de 98 u (metabólitos 2 e 3) e 82 u (metabólito 1), seguida por uma perda neutra de 40 u (eliminação de 1,4 propino via mecanismo de carga remota).

Na segunda via mecanística proposta, o íon produto de m/z 303 é formado pela perda neutra de 140 u para o metabólito 1 e 156 u para os metabólitos 2 e 3 a partir íon produto **E**, segundo um rearranjo pericíclico concertado e posterior eliminação de propino, similar àquela discutida anteriormente. Baseado no caminho de fragmentação proposto, em conjunto com os estudos de fragmentação da MonA e MonB em fase gasosa, identificou-se a posição da hidroxilação na estrutura do poliéter. Todas estas vias de fragmentação estão de acordo com os dados publicados anteriormente para MonA e MonB (LOPES et al., 2002a, 2002b).

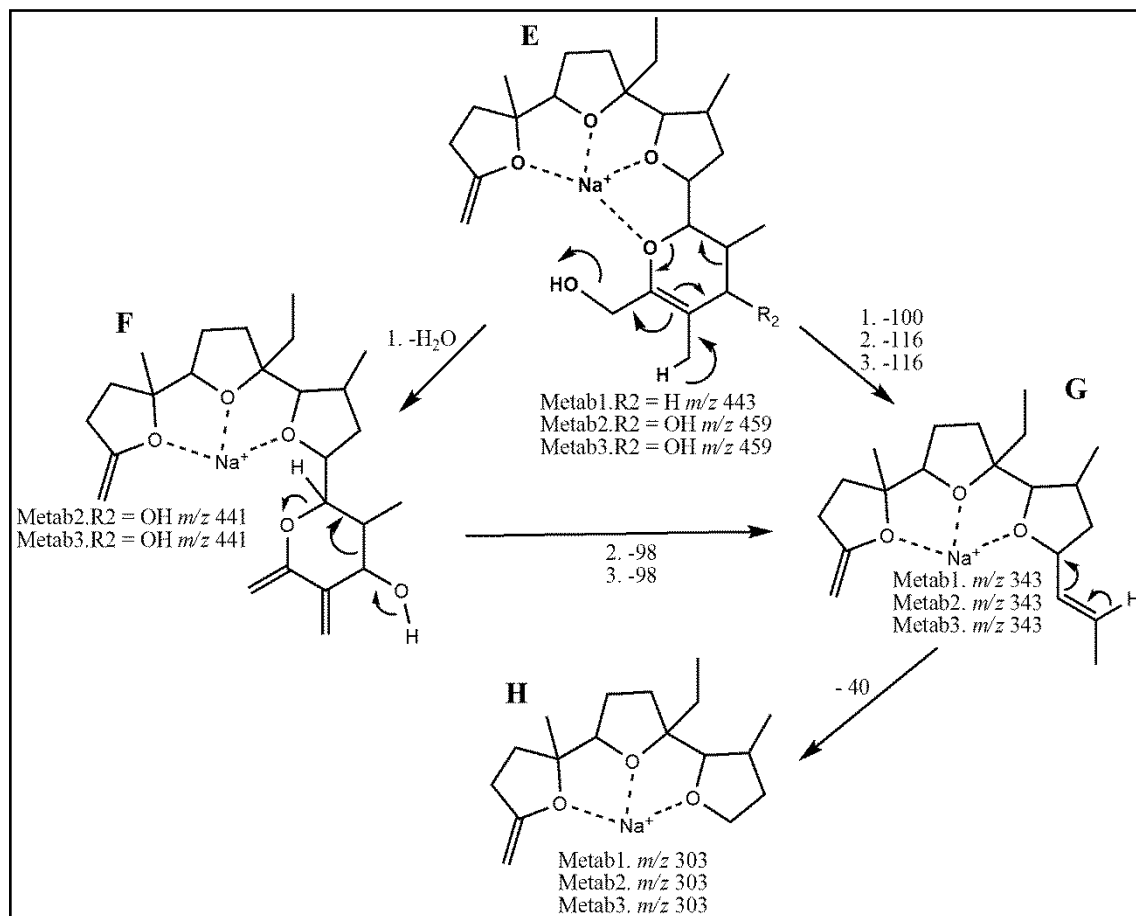


Figura 31. Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto m/z 303

A segunda via de fragmentação proposta para os metabólitos é a perda de uma molécula de água, envolvendo o átomo de oxigênio O-11 (**Figura 32**), o qual origina o íon produto **I** a partir do íon **A**. Este íon sofre um rearranjo pericíclico análogo ao observado para o fragmento diidropirano, dessa forma, gerando o íon produto de m/z 575 após perda neutra de 116 u, não mostrado no esquema. Outra possibilidade seria a perda neutra de 2 moléculas de água, envolvendo os átomos de oxigênio O-10 e O-11, com a formação do íon produto **L** (m/z 655 e m/z 641 para os metabólitos 2 e 3, respectivamente). Esta terceira eliminação de H_2O envolvendo O-12 é favorecida pela migração de um próton em posição β , levando à formação de um sistema π -conjugado e impedindo a eliminação de 116 u por rearranjo pericíclico no anel E, como mostrado na formação do íon produto m/z 575.

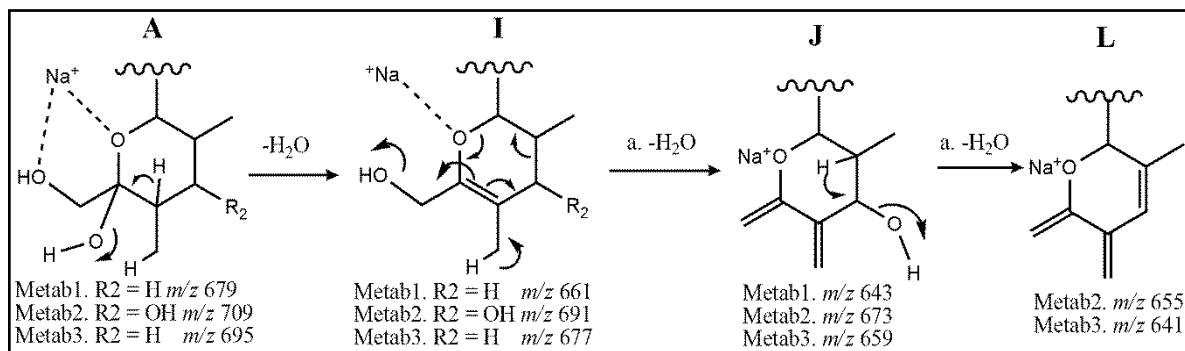


Figura 32. Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto L.

A correlação do grupo hidroxila em O-5 e o oxigênio do éter (O-4) do anel A pode levar à perda neutra de uma molécula de água, produzindo o íon produto **M** e gerando a terceira rota de fragmentação do íon **A** (**Figura 33**). Este íon pode fragmentar produzindo o íon produto **N** com m/z 501, 517, e 517 para os metabólitos 1, 2 e 3, e pela perda neutra de 160, 174, e 160 u, respectivamente. A **Figura 33** sugere que a eliminação da molécula de H_2O envolve o sistema diidropirano do íon produto **O**. Conseqüentemente, o íon produto **O** pode fragmentar pela migração de um próton em posição α ao grupo carbonila, produzindo o íon **O'** (m/z 441) pela perda neutra de 58 u a partir dos derivados hidroxilados (**Figura 33**). Para o metabólito 1, o íon **O** pode sofrer perda neutra de 100 u, resultando no íon **P**, o mesmo íon observado nos estudos de fragmentação com a MonA. A existência do íon produto de m/z 441 como um fragmento da OH-MonA pode representar um íon chave para justificar a posição da -OH na molécula de MonA.

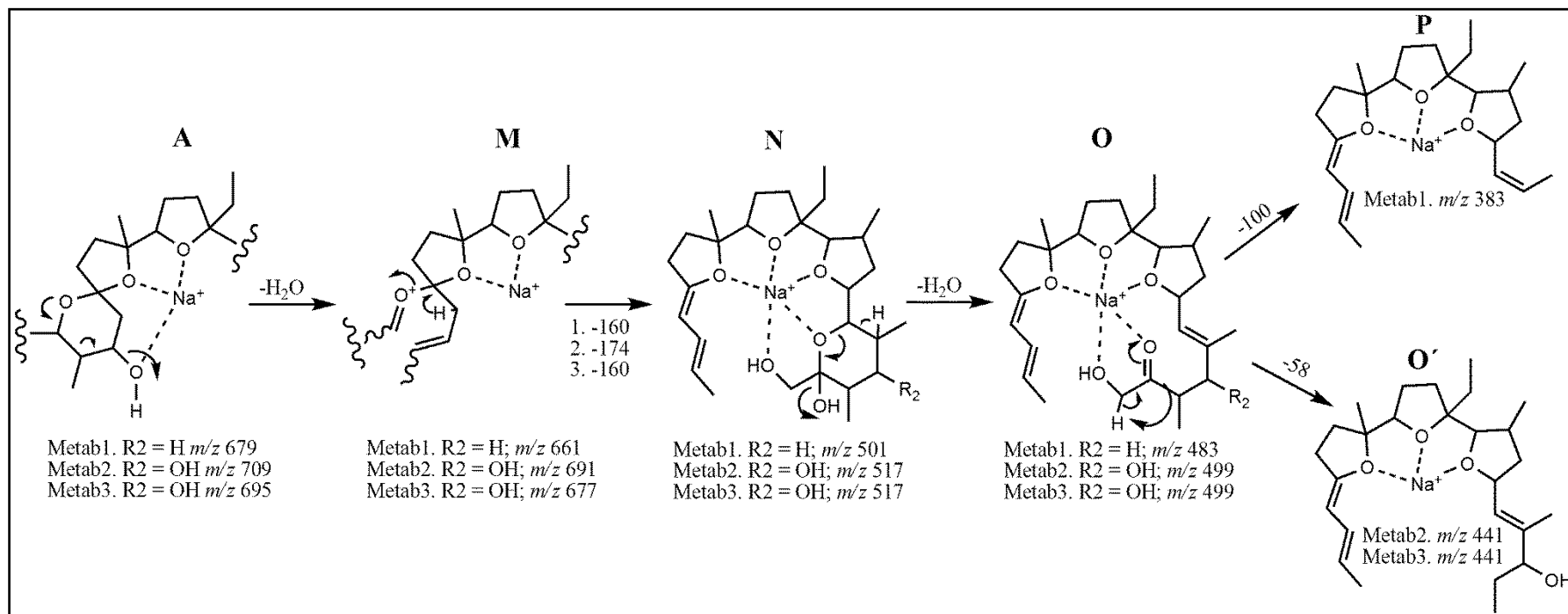


Figura 33. Proposta de fragmentação dos metabólitos 1, 2 e 3 mostrando a formação do íon produto de *m/z* 441, íon chave para detecção da posição da -OH nos metabólitos 2 e 3.

Com base nos resultados das análises espectrométricas dos metabólitos formados nos modelos microbianos e biomiméticos, foram elucidados três metabólitos: metabólito 1 (3-*O*-desmetil-monensina A), m/z 679; metabólito 2 (12-hidroxi-monensina A), m/z 709; metabólito 3 (12-hidroxi-3-*O*-desmetil-monensina A), m/z 695, como derivados da MonA. Os produtos foram identificados por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e também por comparação com padrões obtidos em outros estudos (item 4.5) (**Figura 34**).

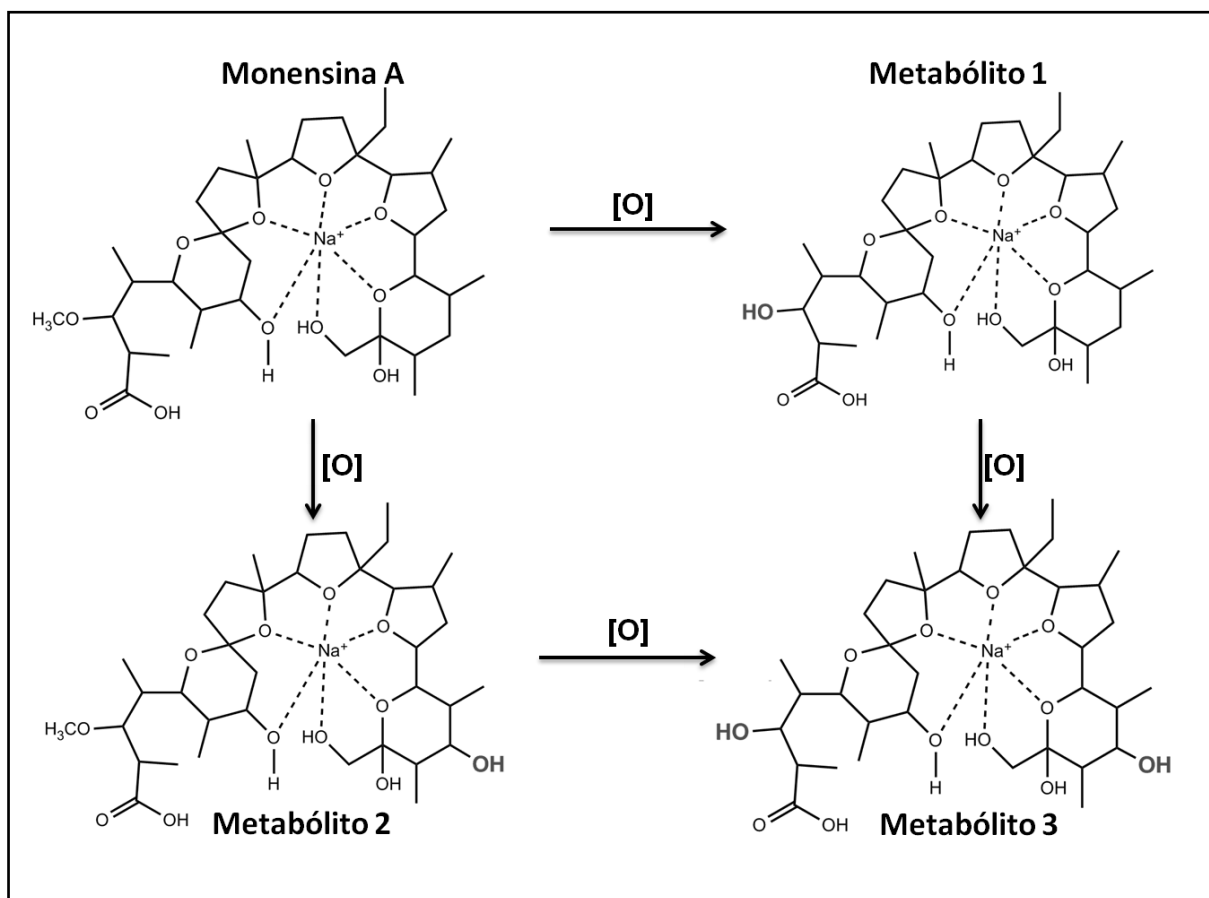


Figura 34. Estrutura química da monensina A e dos metabólitos obtidos; Metabolito 1 (m/z 679, 3-*O*-desmetil-monensina A), metabolito 2 (m/z 709, 12-hidroxi-monensina A e metabolito 3 (m/z 695, 3-*O*-desmetil-12-hidroxi-monensina A).

A literatura tem relatado diversos estudos envolvendo o metabolismo da MonA, empregando diferentes espécies de animais, como ratos, gados e galinhas, indicando que este fármaco é extensivamente metabolizado pelas enzimas da CYP450. Os metabólitos formados nestes estudos são qualitativamente mas não

quantitativamente semelhantes entre as espécies estudadas (DAVISON, 1984; NEBBIA et al., 1999, 2001). Os metabólitos identificados nestes estudos *in vivo* demonstram que as principais reações que ocorrem durante a metabolização deste ionóforo são O-desmetilação e/ou hidroxilação, ocorrendo em várias posições ao longo da cadeia carbônica da MonA (**Figura 35**) (DAVISON, 1984; KIEHL; JULIAN; KENNINGTON, 1998; NEBBIA et al., 1999, 2001). Nebbia et al. (1999), em um estudo empregando microsomas de fígado de ratos, mostrou que a principal família da citocromo P450 que participa do metabolismo oxidativo da MonA é a família 3A, grupo de enzimas responsáveis pelo metabolismo de cerca de 70% de fármacos, o que pode acarreta a possibilidade de interações medicamentosas da MonA com outros fármacos ou xenobióticos.

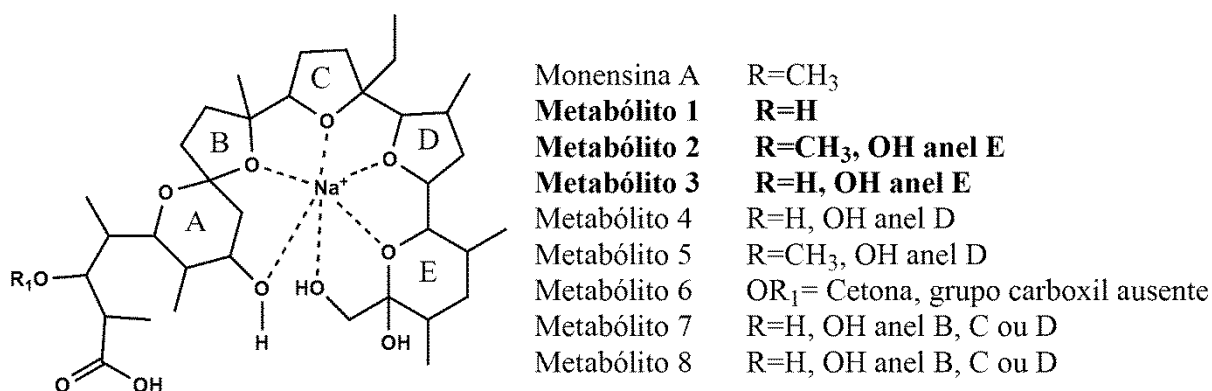


Figura 35. Monensina A e seus metabólitos encontrados em sistemas *in vivo* (NEBBIA et al., 1999). Em destaque os metabólitos 1, 2 e 3 que também foram descritos neste trabalho.

Os três metabólitos (metabólito 1, 2 e 3) obtidos neste trabalho foram descritos anteriormente em estudos que envolvem o metabolismo *in vivo* da MonA (DONOHO, 1978; DAVISON, 1984; KIEHL; JULIAN; KENNINGTON, 1998) demonstrando que ambos os sistemas empregados neste estudo foram capazes de mimetizar as enzimas da CYP450 no metabolismo da MonA, produzindo os mesmos metabólitos que os estudos *in vivo*.

Uma enorme quantidade de fungos e outros micro-organismos têm capacidade hidrolítica e redutiva para metabolizar substâncias orgânicas de maneira semelhante aos sistemas de metabolização de mamíferos, portanto, estes micro-

organismos podem ser aplicados como modelos para os estudos do metabolismo em mamíferos. Entre os fungos estudados, o gênero *Cunninghamella* pode metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos de maneira régio- e estereoseletiva, assemelhando-se as reações que ocorrem em mamíferos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; PUPO et al., 2008).

Em um único estudo envolvendo a biotransformação da MonA por micro-organismo, Vaufrey et al. (1990) descreveram a transformação microbiana da MonA utilizando a bactéria do solo *Sebekia benihana* NRRL 11111. Este micro-organismo foi capaz, de maneira eficiente, metabolizar a MonA em três compostos majoritários. Este estudo mostrou que os três metabólitos continham um anel aberto terminal, e que uma oxidação adicional ocorre nesta posição, dando origem aos dois outros metabólitos (VAUFREY et al., 1990). Apesar do estudo descrito por Vaufrey et al., (1990) ser o primeiro a descrever a biotransformação de MonA por um micro-organismo, o presente trabalho é o primeiro a relatar um sistema que emprega micro-organismo capaz de metabolizar a MonA de maneira semelhante ao metabolismo *in vivo*. Além disso, este trabalho também é pioneiro em utilizar modelos envolvendo metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen para se obter os mesmos metabólitos formados nos sistemas *in vivo* de mamíferos, para esta classe de composto, o que torna estes modelos alternativas muito atraentes para obtenção dos metabólitos deste ionóforo (ROCHA et al., 2014; SOUSA-JUNIOR et al., 2013).

4.5. Confirmação dos metabólitos elucidados

A estrutura química do metabólito 1 foi confirmada por comparação com o padrão previamente isolado por Pospíšil et al. (1986). Estes autores isolaram esta substância como um metabólito secundário de culturas de *Streptomyces cinnamonensis* na presença de um inibidor de metilação e, posteriormente, determinaram a sua estrutura química por MS/MS e ressonância magnética nuclear de ^1H (POSPÍŠIL; ZIMA, 1987; POSPÍŠIL et al., 1987). Este metabólito foi gentilmente cedido pelo pesquisador Stanislav Pospíšil e usado como padrão para a comparação com os nossos estudos. Comparou-se o comportamento cromatográfico (t_R) e espectro de massas de íons produtos deste padrão com o do metabólito obtido

neste trabalho. As análises por LC-ESI-MS/MS revelaram que ambas as substâncias apresentam os mesmos espectros de íons produtos e tempo de retenção semelhantes (**Figura 36**).

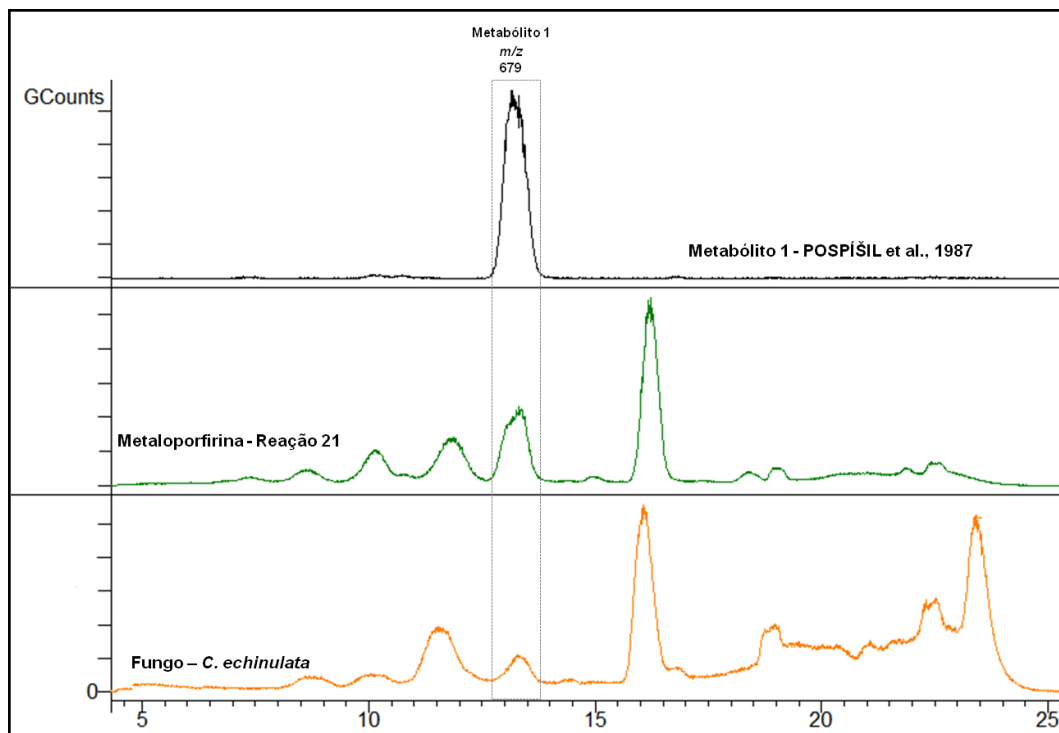


Figura 36. Perfis cromatográficos obtidos nos estudos de biotransformação da monensina A pelo fungo *C. echinulata* bem como no modelo biomimético (sistema reacional 21) em comparação com o padrão do metabólito 1 descrito por Pospisil et al. (1986) (eixo da abscissa em min).

Sousa-Junior et al. (2013) relataram anteriormente a obtenção e elucidação estrutural do metabólito 2. Estes autores obtiveram o produto hidroxilado (m/z 709, metabólito 2) empregando um sistema catalítico utilizando a metaloporfirina Fe(TPP)Cl e como oxidante o PhIO. A caracterização foi realizada utilizando MS/MS de alta resolução (SOUSA-JUNIOR et al., 2013). Assim como para o metabólito 1, o comportamento cromatográfico (t_R) e espectro de massas deste produto hidroxilado com a do metabólito 2 obtido neste estudo foram comparados. Ambas as substâncias exibiram o mesmo espectro de íons produto e tempo de retenção nas análises por LC-ESI-MS/MS (**Figura 37**), confirmando assim a estrutura química do metabólito 2 proposta.

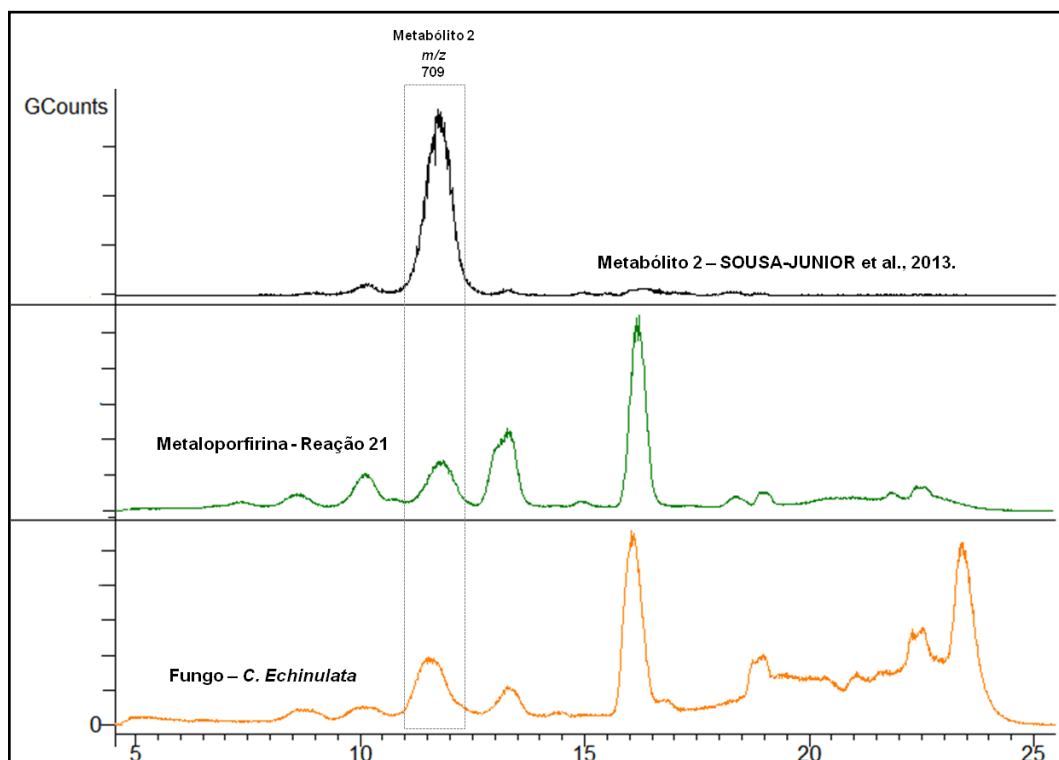


Figura 37. Perfis cromatográficos obtidos nos estudos de biotransformação da monensina A pelo fungo *C. echinulata* bem como no modelo biomimético (sistema 21) em comparação com o padrão do metabólito 2 descrito por Sousa-Junior et al. (2013) (eixo da abscissa em min).

Visando a confirmação da estrutura do metabólito 3, obtido neste estudo, e dada a indisponibilidade (comercial ou por parte de outros pesquisadores) deste metabólito e somente sua identificação em estudos *in vivo*, sem posterior isolamento, utilizamos o sistema biomimético descrito anteriormente (Sousa-Junior et al., 2013) na oxidação do metabólito 1 isolado da oxidação da MonA para obter o metabólito 3. A **Figura 38**, mostra que a oxidação do metabólito 1 pelo sistema catalíticos empregado levou à formação do metabólito 3 (t_R e espectro de íons produtos semelhantes aos observados nos estudos de oxidação da MonA empregando fungos e catalisadores) confirmando assim a proposta da estrutura deste metabólito.

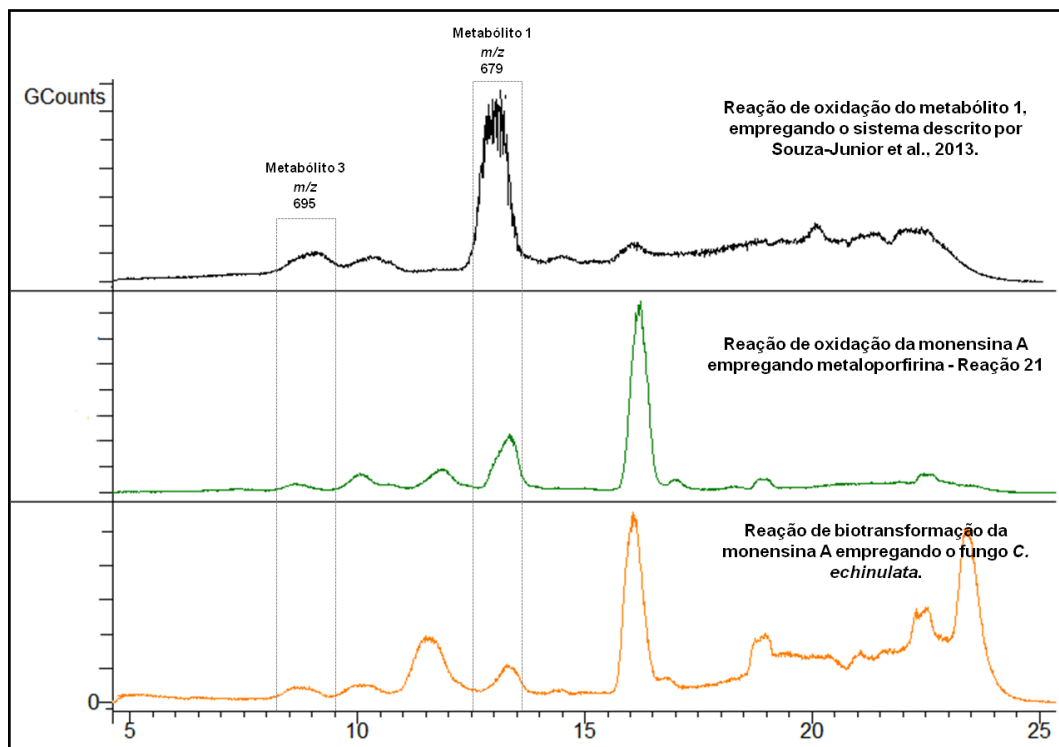


Figura 38. Perfis cromatográficos obtidos nos estudos de biotransformação da monensina A pelo fungo *C. echinulata* bem como no modelo biomimético (Reação 21) em comparação com o estudo de oxidação do metabólito 2 pelo sistema biomimético descrito por Sousa-Junior (2013) (eixo da abscissa em min).

4.6. Produtos de degradação da monensina A

Nas análises das soluções metanólicas do padrão de MonA (cerca de 20 dias em temperatura de 4°C), mostrados na **Figura 39**, bem como em algumas análises das reações de oxidação empregando fungos e catalisadores, houve aparecimento de picos cromatográficos de m/z 721, dois de m/z 707 e um de m/z 693, sendo estes referentes a produtos de degradação da MonA como discutido a seguir.

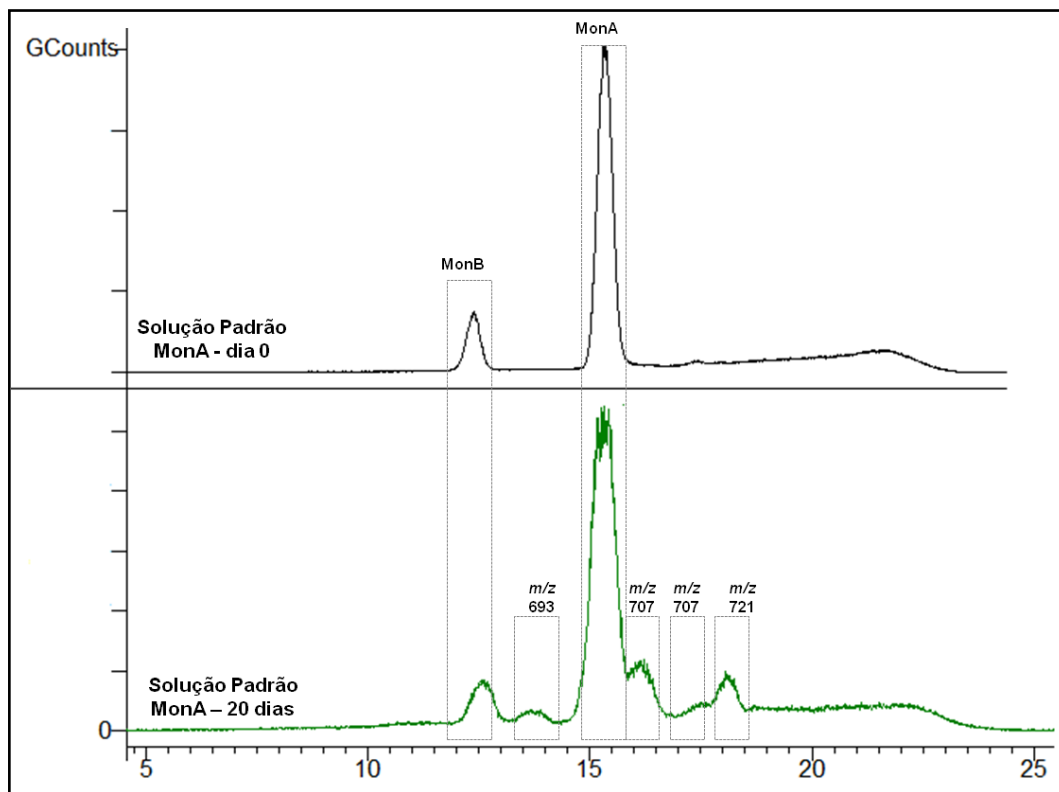


Figura 39. Perfis cromatográficos obtidos a partir das injeções de soluções metanólicas do padrão de MonA logo após preparo e após 20 dias em temperatura de 4°C, mostrando as formação de 4 principais produtos de degradação (eixo da abscissa em min).

A análise do espectro de íons produtos (**Figura 40**) do produto de degradação de m/z 707 (t_R 16,5 min), bem como os dados da literatura descritos por Huczynski et al. (2006) sugerem que este composto é resultado da formação de um éster (metil-éster-monensina). A proposição das estruturas químicas dos principais íons produtos formados a partir da fragmentação do metil-éster-monensina A, é apresentado na **Figura 41** (HUCZYNSKI et al., 2006). Lopes et al. (2001) estudaram o efeito do pH, do potencial do cone, do solvente e a influência de éteres de coroa na intensidade relativa do sinal da MonA protonada $[M+H]^+$ com ionização por ESI. Estes autores relatam a esterificação do ácido carboxílico, em baixos valores de pH, em soluções MeOH-H₂O, com a formação do mesmo produto de degradação (metil-éster-monensina A) de m/z 707. O produto de degradação de m/z 693 presente no cromatograma da **Figura 39** deve ser resultado da esterificação da MonB (m/z 679 +

14 u = m/z 693) de maneira semelhante à MonA, mas nenhuma análise adicional para este íon foi realizada.

Em outro dois estudos, Rodios e Anteunis (1980) e Sedmera e Pospíšil (1999) descrevem alterações na estrutura química da MonA, com formação de um acetal no C-25 (sugere-se o pico cromatográfico de m/z 707, t_R 17,9 min) da sua estrutura em presença de MeOH, que somado à formação do metil-éster resultaria no produto de degradação de m/z 721 (t_R 18,5 min) (**Figura 41 e Figura 42**).

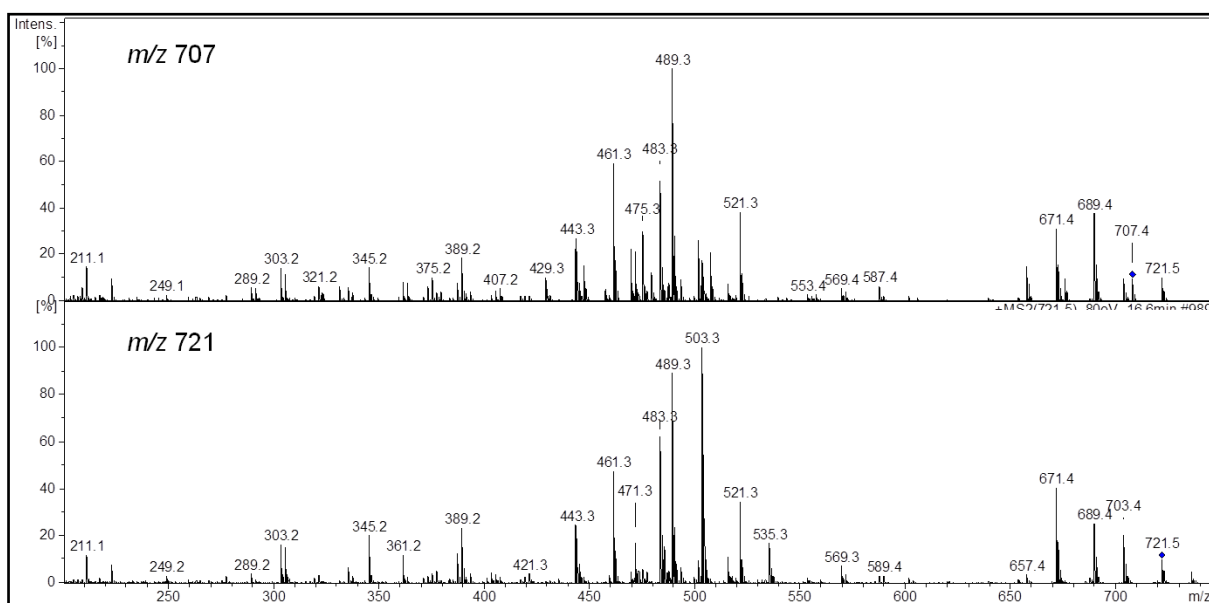


Figura 40. Espectros de massas dos íons produtos dos produtos de degradação de m/z 707 (t_R 16,5 min- metil-éster-monensina A) e m/z 721 (t_R 18,5 min - metil-éster-monensina somado com um cetal).

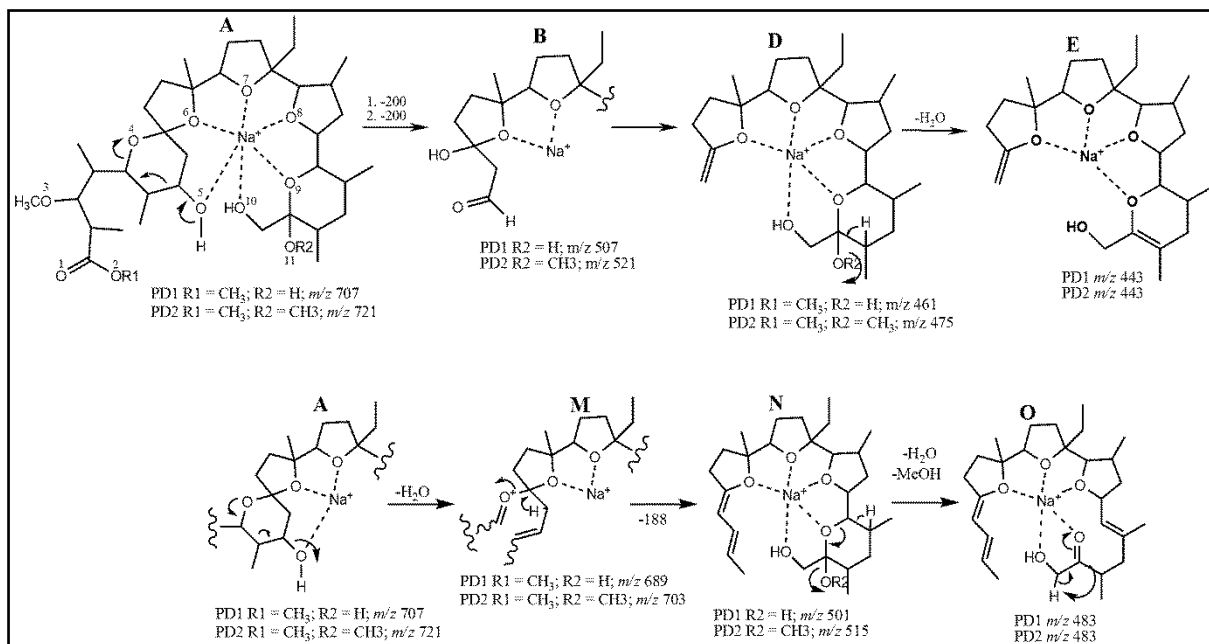


Figura 41. Estrutura dos principais íons fragmentos observados nos estudos de fragmentação dos produtos de degradação de m/z 707 (t_R 16,5 min- Metil-éster-monensina A, PD1) e m/z 721 (t_R 18,5 min- metil-éster-monensina somado com um cetal, PD2).

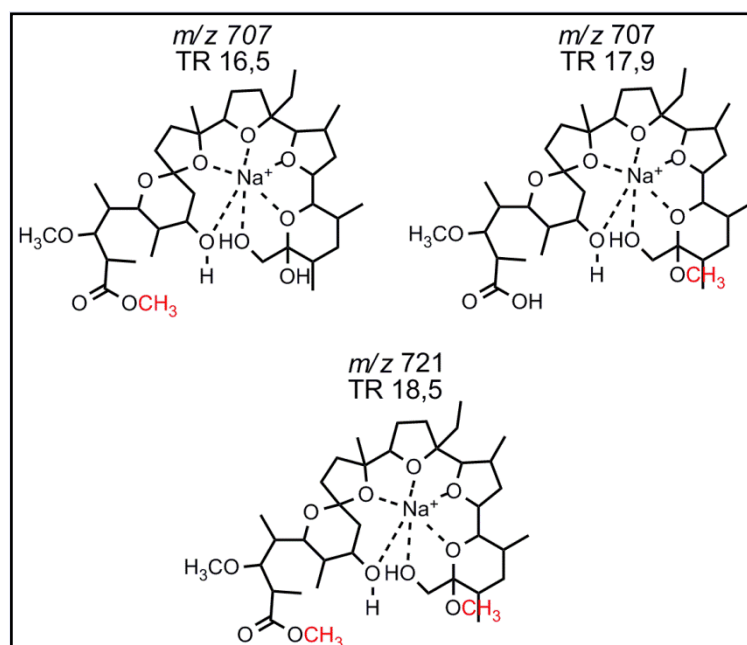


Figura 42. Estruturas químicas propostas para os produtos de degradação da monensina A.

4.7. Estudo do metabolismo *in vitro* da monensina A empregando microssomas de fígados de ratos e humanos

Relatos sobre a presença de resíduos deste antibiótico em alimentos (eventual interação com outros fármacos ou possíveis problemas de saúde, tais como a resistência aos antibióticos) e estudos recentes envolvendo suas propriedades biológicas para tratamento do câncer têm chamado atenção para a busca da compreensão do metabolismo deste fármaco em seres humanos (HUCZYNSKI, 2012; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013). Esta busca, leva à investigação do metabolismo *in vitro* da MonA empregando microssomas de fígado humano e ratos, uma vez que estes modelos representam uma estratégia eficaz para estimar os destinos metabólicos de fármacos em seres humanos e animais (ASHA; VIDYAVATHI, 2010; LI, 2004). Além disso, microssomas é um modelo muito bem caracterizado para os estudos do metabolismo *in vitro* de xenobióticos (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

Para estabelecer correlações entre os produtos formados nos modelos microbianos e reações biomiméticas e no metabolismo mediado pelas enzimas da CYP450, a MonA foi incubada com microssomas de fígado humano e de ratos. Normalmente, este modelo *in vitro* produz baixas quantidades de metabólitos. Portanto, utilizou-se o modo MRM (monitoramento de reação múltipla) nas análises por LC-ESI-MS/MS. Dessa forma, foram monitoradas as seguintes transições: m/z 693 > 461 para MonA, m/z 679 > 465 para MonB, m/z 679 > 461 para o metabólito 1, m/z 709 > 477 para metabólito 2 e m/z 695 > 477 para o metabólito 3.

Os estudos envolvendo a biotransformação da MonA utilizando microssomas de ratos (**Figura 43**) e de humanos (**Figura 44**) mostraram a formação dos metabólitos 1 e 2, mas não do metabólito 3 nas condições experimentais empregadas. Os metabólitos apresentaram t_R similares aos observados nos estudos de transformação microbiana e biomimético (**Figura 45**), bem como o mesmo espectro de ions produtos obtidos nos estudos de fragmentação. Além disso, estimou-se o metabolismo total da MonA quantificando a taxa de desaparecimento do substrato do meio microssomal. Essas análises, em ambos os casos, mostraram que cerca de 20 % da MonA foi metabolizada.

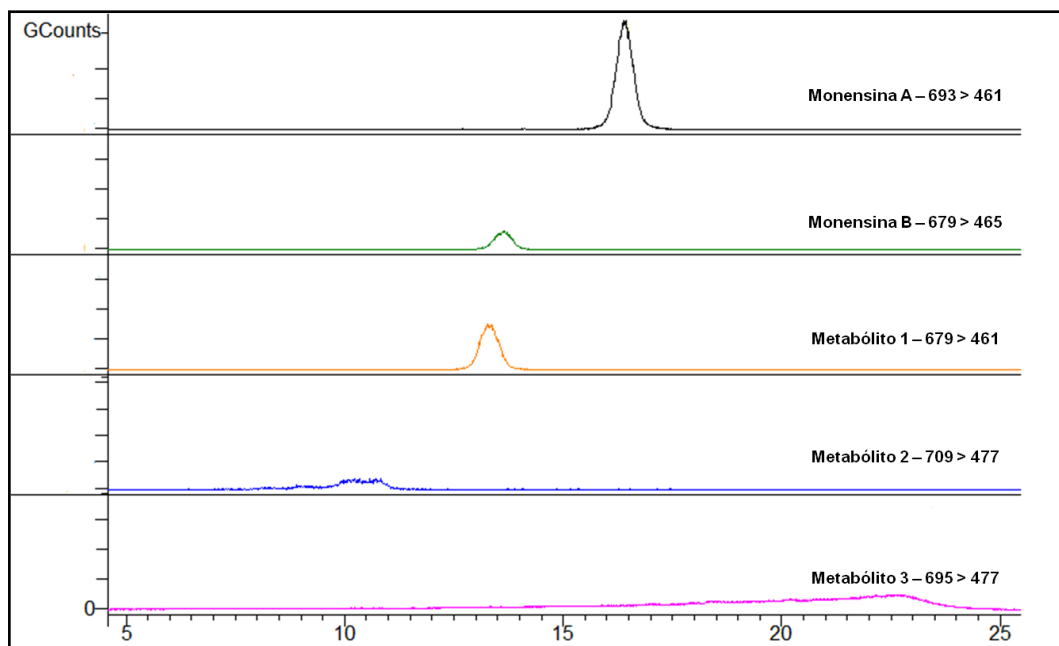


Figura 43. Cromatogramas (LC-ESI-MS/MS – modo de aquisição MRM) da MonA, MonB, metabólito 1, metabólito 2 e metabólito 3 obtidos no estudo de metabolismo *in vitro* com microsomas de fígado de ratos (eixo da abscissa em min).

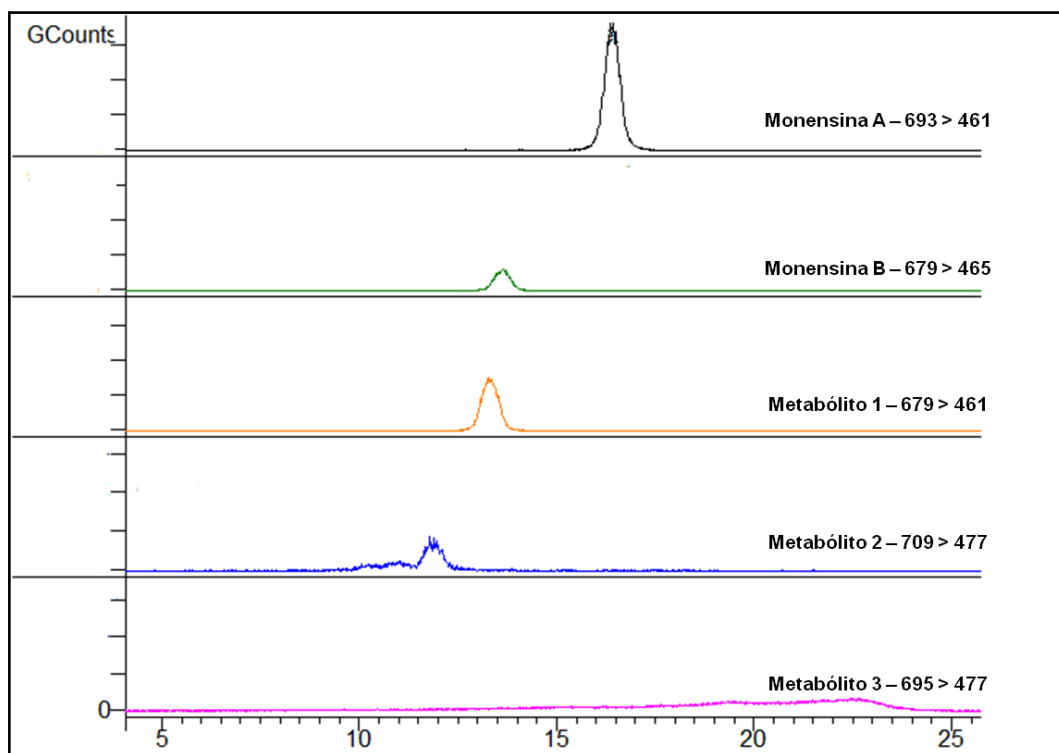


Figura 44. Cromatogramas (LC-ESI-MS/MS – modo de aquisição MRM) da MonA, MonB, metabólito 1, metabólito 2 e metabólito 3 obtidos no estudo de metabolismo *in vitro* com microsomas de fígado de humanos (eixo da abscissa em min).

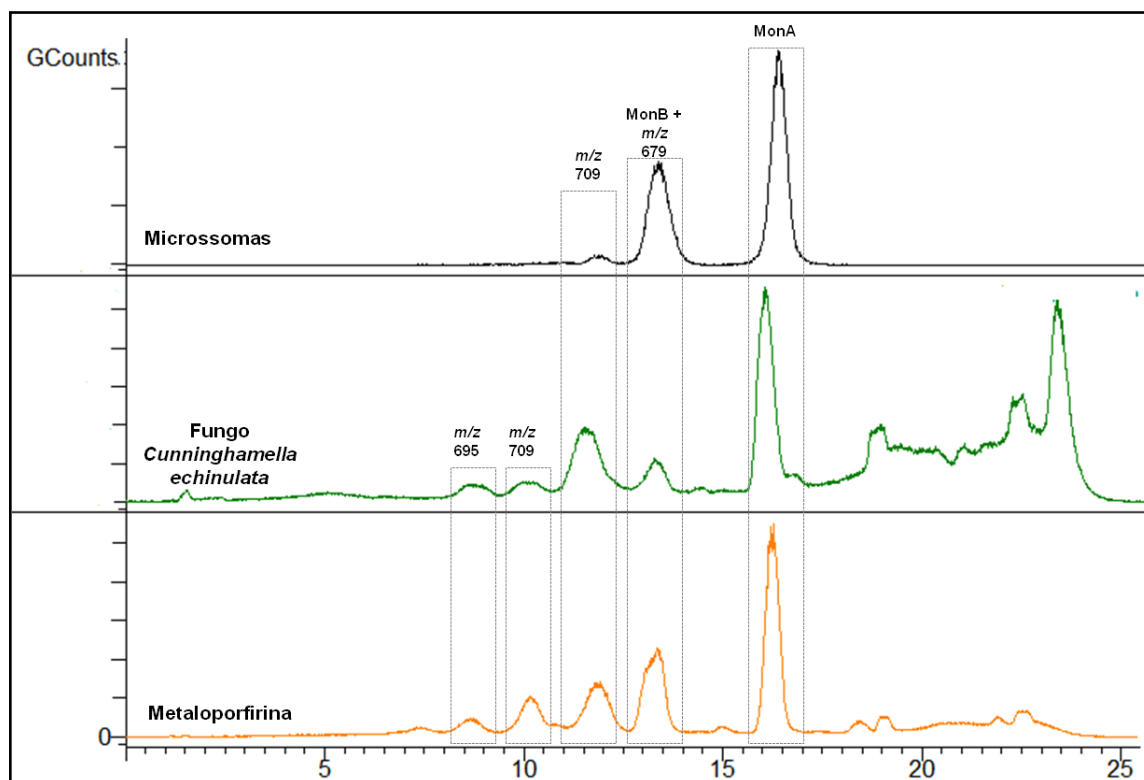


Figura 45. Perfil cromatográfico das reações de (bio)transformações da monensina A nos 3 modelos empregados: Microsomas (de fígado de humanos), microbiológico (fungo *Cunninghamella echinulata*) e biomimético (metaloporfirina - reação 21) (eixo da abscissa em min).

4.8. Avaliação da toxicidade da monensina A e metabólitos utilizando o modelo mitocondrial

A mitocôndria é uma estrutura intracelular responsável por transformar a energia dos alimentos em energia útil e transportável às células, através da molécula de adenosina trifosfato, comumente denominada ATP. Sendo assim, as mitocôndrias, fonte primária de energia, são fundamentais para a vida celular da maioria dos organismos eucariotos (OTERA; ISHIHARA; MIHARA, 2013).

Atualmente esta organela tem se tornado uma ferramenta importante para a toxicologia, com a finalidade de entender e prever efeitos adversos de diversos xenobióticos, sendo que os danos mitocondriais podem estar associados a diversas injúrias teciduais ou doenças (LEMASTERS, 1999). Muitas vezes um mesmo

xenobiótico apresenta diferentes efeitos na função mitocondrial. Portanto, a utilização de mitocôndrias isoladas pode ser considerada como um bom modelo experimental para avaliar o efeito tóxico de diversos compostos (PEREIRA et al., 2012; PEREIRA; SOUZA; DORTA, 2013).

Há uma ampla gama de compostos estudados em ensaios mitocondriais, como praguicidas (BERNDT; HOLZHÜTTER; BULIK, 2013), flavonóides (ZHANG et al., 2013), plastificantes (JIANG et al., 2013), entre outros. Portanto, mesmo que a MonA seja considerada segura e eficaz quando usada nas dosagens recomendadas, ensaios avaliando sua ação tóxica sobre modelos biológicos ainda é necessário, pois a mesma possui uma estreita janela terapêutica e vários casos de intoxicações têm sido descritos na literatura, seja envolvendo animais (HENRI et al., 2008) ou humanos (CALDEIRA et al., 2001; KOUYOUMDJIAN et al., 2001; SOUZA et al., 2005).

Assim, o uso do modelo mitocondrial pode ser de extrema contribuição para o entendimento dos mecanismos de toxicidade da MonA, uma vez que tem sido atribuído a este composto alguns distúrbios celulares, como desequilíbrio celular de íons, sobrecarga de cálcio, peroxidação lipídica e desintegração das membranas celulares (MOLLENHAUER; MORRÉ; ROWE, 1990; SOUZA et al., 2005).

Como observado por Souza et al. (2005), em seu estudo com uma linhagem de células em cultura, a MonA induziu apoptose, levando a um déficit energético. Os autores consideraram a possibilidade de ação sobre as mitocôndrias, devido ao fato de que a MonA causa um desequilíbrio de íons ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) e alteração no estado oxidativo. Assim, este ionóforo pode comprometer o funcionamento de órgãos com elevada demanda energética, como por exemplo, o coração.

Nossos resultados mostraram que, dentre as concentrações avaliadas (0,01, 0,1 e 1 μM), somente a concentração de 1 μM de MonA afetou os parâmetros mitocondriais testados. Na **Tabela 5** observa-se que a MonA aumentou em 44 % o estado 4 do consumo de oxigênio e, conseqüentemente, diminuiu em 33 % a proporção do controle respiratório (RCR). Além disso, também causou uma redução de 48 % na eficiência da fosforilação oxidativa, o que leva a uma diminuição na eficiência respiratória mitocondrial (**Tabela 5**).

Tabela 5. Valores dos efeitos causados pela monensina A e os seus metabólitos 1 e 2 na concentração de 1 μM , nos parâmetros respiratórios, tendo como substrato glutamato + malato.

	V3	V4	RCR	ADP/O
Controle	66.11 \pm 2.45 ^a	9.80 \pm 0.32 ^a	6.75 \pm 0.12 ^a	2.87 \pm 0.03 ^a
Monensina A	64.10 \pm 2.35 ^a	14.1 \pm 0.97 ^b	4.55 \pm 0.16 ^b	1.50 \pm 0.01 ^b
Metabólito 1	66.36 \pm 2.29 ^a	10.0 \pm 0.11 ^a	6.62 \pm 0.27 ^a	2.76 \pm 0.09 ^a
Metabólito 2	66.73 \pm 1.95 ^a	9.83 \pm 0.07 ^a	6.79 \pm 0.15 ^a	2.73 \pm 0.06 ^a

* Consumo de nmol O₂/mg de proteína/min foi avaliado em mitocôndria isolada de fígado de rato (1 mg proteína.mL⁻¹), incubada conforme descrito nos materiais de métodos.

* Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o Teste de Tukey (p <0,05).

* V3 = estado 3; V4 = estado 4; RCR (V3/V4) = Razão do controle respiratório; ADP/O = Eficiência na fosforilação oxidativa.

O aumento no estado 4 da respiração mitocondrial é um indicativo de atividade desacopladora da MonA, o que leva à redução observada no potencial de membrana mitocondrial. O potencial de membrana provavelmente foi afetado devido ao fato de que a MonA possui capacidade de causar deslocamento de íons entre eles, por exemplo H⁺, sendo este o responsável pela formação do potencial de membrana mitocondrial (GARRISON; ARRIZABALAGA, 2009).

As **Figuras 46, 47 e 48** mostram os efeitos da MonA e dos metabólitos 1 e 2, na concentração de 1 μM sobre a dissipação do potencial da membrana mitocondrial, inchamento mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs), respectivamente.

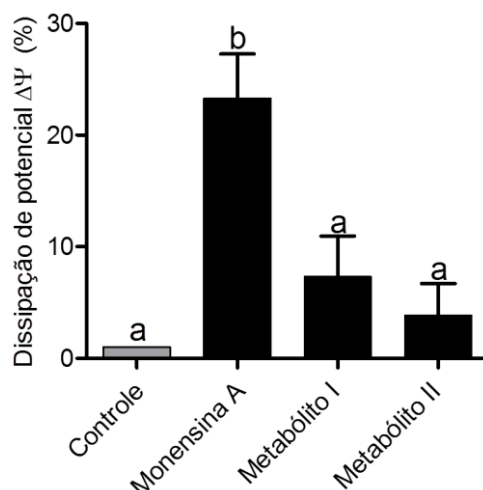


Figura 46. Avaliação da monensina A e do metabólito 1 e 2 ($1 \mu\text{M}$) sobre a dissipação do potencial da membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos ($1 \text{ mg de proteína.mL}^{-1}$). Os pontos representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle (ausência do composto). * Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

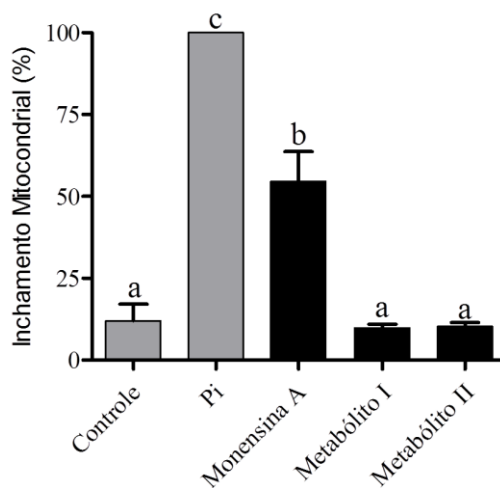


Figura 47. Avaliação da monensina A e dos metabólitos 1 e 2 ($1 \mu\text{M}$) sobre o inchamento mitocondrial de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos ($1 \text{ mg proteína.mL}^{-1}$). Os pontos representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle (ausência do composto). * Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

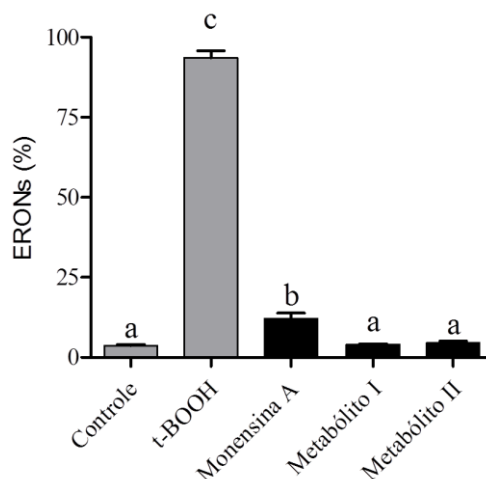


Figura 48. Avaliação da monensina A e dos metabólitos 1 e 2 (1 μM) sobre a produção de espécies reativas do oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (1 mg de proteína. mL^{-1}) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle (ausência do composto). * Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observou-se que todos os três parâmetros foram significativamente afetados apenas pela MonA (1 μM), sendo que os metabólitos testados não apresentaram efeito tóxico. A MonA, foi responsável por causar 23 % de dissipação do potencial de membrana mitocondrial e também induziu o inchamento mitocondrial, sendo que para este parâmetro a MonA apresentou um efeito de 55 %, cerca de metade do efeito causado pelo controle positivo com Pi. Além do efeito sobre a função bioenergética desta organela, a MonA estimulou em 12 % a produção/acúmulo de EROs, revelando que a MonA gera um estresse oxidativo na mitocôndria.

A ocorrência do inchamento mitocondrial também está relacionada com o efeito sobre estes parâmetros, pois a MonA também afeta a regulação de Na^+ e Ca^{2+} mitocondrial. Esta desregulação compromete o equilíbrio osmótico, causando inchamento desta organela (MOLLENHAUER; MORRÉ; ROWE, 1990).

A MonA (1 μM) também afetou o estresse oxidativo mitocondrial como também foi observado por Ketola et al. (2010) em experimentos utilizando $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ em uma linhagem de células cancerígenas da próstata. Esta produção de EROs pode ocorrer pelo fato da MonA causar desregulação dos estados bioenergéticos

mitocondriais decorrentes das alterações iônicas, além de possuir capacidade de causar peroxidação de lipídios de membrana, o que causa danos à mesma, resultando numa produção de radicais livres (SINGH; KALLA; SANYAL, 2007). Entretanto, seus metabólitos não apresentaram aumento na produção de EROs nas concentrações testadas, indicando que a metabolização da MonA impede sua ação oxidativa.

O efeito tóxico observado a partir da interação da MonA com as mitocôndrias isoladas de fígado de ratos pode comprometer a produção de ATP, como foi descrito por Mollenhauer, Morré e Rowe (1990). Isto ocorre como resultado pois a depleção do ATP é um dos eventos iniciais da toxicidade induzida por xenobióticos, como consequência das alterações no consumo de oxigênio, dissipação do potencial de membrana mitocondrial, bem como geração de espécies reativas (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001; MINGATTO et al., 2002).

Em suma, como observado em todos os ensaios realizados, apenas a MonA, na concentração de 1 μ M, afetou os parâmetros avaliados, os quais não foram afetados por nenhum dos dois metabólitos testados. Pode-se concluir que o processo de metabolização da MonA leva a uma detoxificação deste composto neste tipos de ensaios avaliados.

4.9. Avaliação da atividade antibacteriana da monensina A e seus metabólitos

Com intuito de avaliar e comparar as propriedades antibacterianas da MonA e seus metabólitos, os metabólitos 1 e 2 foram isolados à partir da reação biomimética 5. A atividade antibacteriana desses analitos foram testadas contra as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermididis* ATCC 14990, e contra bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados apresentados na **Tabela 6**, mostraram que MonA foi eficiente contra as cepas Gram-positivas. No entanto, o metabólito 1 apresentou uma redução na atividade antimicrobiana quando comparado com a MonA, enquanto o metabólito 2 mostrou-se inativo contras as cepas de bactérias testadas.

Tabela 6. Concentração Bactericida Mínima da monensina A, metabólito 1 e metabólito 2 e controles (DMSO, Cloranfenicol) contra as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, e contra bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Resultados expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Amostra Bactéria	Monensina A	Metabólito1	Metabólito 2	DMSO	Cloranfenicol
	<i>S. aureus</i>	3,1	25,0	>100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA	6,3	50,0	>100	>100	8,3
<i>S. epidermidis</i>	25,0	>100	>100	>100	6,3
<i>E. coli</i>	>100	>100	>100	>100	3,1
<i>P. aeruginosa</i>	>100	>100	>100	>100	100,0

Os resultados das concentrações bactericidas mínimas obtidas para MonA corroboram o estudo de Lowicki e Huczynski (2013), que avaliaram as atividades antimicrobianas de alguns análogos semi-sintéticos em comparação com a MonA (modificações nos grupos hidroxila e carboxila). Assim como a MonA, os derivados obtidos mostraram ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e não contra bactérias Gram-negativas, sendo que o resultado da atividade antimicrobiana da MonA contra *S. aureus* 25923 foi semelhante ao apresentado neste estudo (HUCZYNSKI, et al., 2011; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013).

Os resultados encontrados para a MonA contra *S. aureus* ATCC 25923 ($3,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foi praticamente idêntico ao relatado por Lowicki e Huczynski (2013), que encontrou em seu estudo o valor de $2,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a mesma cepa padrão da bactéria testada, sugerindo então que a metodologia utilizada neste trabalho é confiável. No entanto, os valores encontrados por Lowicki e Huczynski (2013) para a bactéria *S. epidermidis*, foram diferentes ($2,9$ e $5,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as estirpes ATCC 12228 e ATCC 35984, respectivamente) quando correlacionados com o valor encontrado neste trabalho ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Esta diferença pode ser explicada uma vez que, apesar de ser a mesma bactéria, as cepas usadas foram diferentes.

Dados da literatura sobre a atividade dos metabólitos da MonA são escassos. Donoho (1984) avaliou a atividade antimicrobiana do metabólito 1 (3-O-desmetil monensina A) por bioautografia contra a bactéria *Bacillus subtilis* e por ensaio

turbidimétrico contra *Streptococcus faecalis*. Neste estudo, o metabólito 1 teve apenas 5% de atividade quando comparado à MonA, o que sugere que a MonA é metabolizada a produtos com pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana. Outros estudos sobre a atividade biológica do metabólito 1 relatam que este composto tem menor atividade antimicrobiana, anticoccidiana, cardiotóxica e citotóxica em relação à MonA (DONOHO, 1984; SASSMAN; LEE, 2007). Os resultados mostrados na **Tabela 6** corroboram com estes estudos sobre as atividades biológicas do metabólito 1, já que este apresentou diminuição da atividade antibacteriana (25,0 e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para *S. aureus* e *S. aureus* MRSA, respectivamente), e o metabólito 2 o qual não apresentou atividade ($> 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A atividade biológica da MonA é dependente dos complexos formados com íons, que exibem um interior polar e um exterior altamente hidrofóbico, que permite livre movimento destes complexos através da bicamada lipídica das células. Esta ação resulta em desequilíbrio químico de íons, o que resulta em suas atividades biológicas e toxicológicas (HUCZYNSKI, 2012; LOWICKI; HUCZYNSKI 2013; SASSMAN; LEE, 2007). Os resultados das atividades antibacterianas apresentados nesta tese demonstram que o metabólito 1 e o metabólito 2 foram menos ativos do que MonA para todos os microrganismos testados. Assim, sugere-se que o primeiro passo no metabolismo da MonA esteja relacionado com a produção de metabólitos mais polares, o que resulta em uma redução das suas propriedades biológicas e aumenta sua excreção.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta tese demonstram a capacidade dos três modelos testados: modelo químico (metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen), modelo microbiológico (fungos, principalmente do gênero *Cunninghamella*) e modelo biológico (microssomas hepático de humanos e ratos) em mimetizar as reações das enzimas da CYP450 no metabolismo da MonA. Estas metodologias foram capazes de produzir três principais metabólitos (3-O-desmetil-monensina A, 12-hidroxi-monensina A e 12-hidroxi-3-O-desmetil-monensina A) já descritos na literatura em estudos *in vivo* da MonA.

A capacidade dos modelos químicos e biológicos em mimetizar o metabolismo dos mamíferos e produzir quantidades significativas dos metabólitos da MonA, mostram que estes sistemas representam alternativas atraentes e adequadas para os estudos de biotransformação de fármacos e candidatos, podendo complementar os estudos de metabolismo *in vivo*, dispensando assim a necessidade da utilização de grande quantidade de animais em pesquisas experimentais. Além destas vantagens, os modelos biomiméticos envolvendo catalisador de Jacobsen alia ainda as características de ser um sistema barato, leva a resultados rápidos e à maior facilidade de purificação e isolamento dos produtos, constituindo-se portanto na melhor estratégia para produção de metabólitos para estudos posteriores.

Os metabólitos da MonA foram elucidados por espectrometria de massas sequencial, e estes estudos demonstraram que a técnica LC-ESI-MS/MS é uma ferramenta poderosa para os estudos de metabolismo *in vitro* de fármacos e produtos naturais.

Os ensaios biológicos envolvendo atividade tóxica em mitocôndrias, bem como a atividade antimicrobiana da MonA e seus metabólitos 1 e 2 isolados a partir das reações com catalisadores químicos mostraram que os metabólitos são menos ativos, nos parâmetros biológicos testados, do que a MonA. Assim, a biotransformação da MonA corresponde a uma via de detoxicação clássica: onde, as moléculas resultantes são mais polares, o que facilita a sua eliminação / excreção e que este efeito pode ser atribuído à maior polaridade do metabólito 1 e metabólito 2, que pode dificultar o transporte de complexos cationizados através das membranas diminuindo sua propriedades biológicas.

Referências

REFERÊNCIAS

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

ADLER, D. A.; LONGO, F. R.; SHERGALI, W.; KAMPAS, F.; KIM, J. On the preparation of metaloporphirins. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, Oxford, v. 32, p. 2443-2445, 1970.

ADOVELANDE, J.; SCHRÉVEL, J. Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium vinckei petteri in vivo*. **Life Sciences**, Oxford, v. 59, p. 309-315, 1996.

AGTARAP, A.; CHAMBERLIN, J. W.; PINKERTON, M.; L. STEINRAUF. The structure of monensic acid, a new biologically active compound. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 89, p. 5737-5739, 1967.

AKERMAN, K. E. O.; WIKSTROM, M. K. F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 68, p. 191-197, 1976.

ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology and immunobiology of *eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, 58-65, 2002.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 48, p. 5-16, 2001.

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

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role human liver microsomes *in vitro* metabolism of drugs - a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 160, p. 1699-1722, 2010.

ASSIS, M. D.; MELO, A. J. B.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Study of catalytic activity of nitro substituted ironporphyrins. **Journal Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v. 97, p. 41-47, 1995.

BAHRAMIAN, C.; MIRKHANI, V.; TANGESTANINEJAD, S.; MOGHADAM, M. S. Catalytic epoxidation of olefins and hydroxylation of alkanes with sodium periodates by water soluble manganese III salen. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amesterdam, v. 244, p. 139-145, 2005.

BAHRAMIAN, C.; MIRKHANI, V.; MOGHADAM, M. S.; TANGESTANINEJAD, S. Manganese III salen immobilized on montomorillonite as biomimetic alkene epoxidation and alkane hydroxylation catalyst with sodium periodates. **Catalysis Communications**, Amsterdam, v. 7, p. 289-296, 2006.

BARTH, T.; ALEU, J.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. HPLC Analysis of midodrine and desglymidodrine in culture medium: evaluation of static and shaken conditions on the biotransformation by fungi. **Journal of Chromatographic Science**, Cary, v. 51, p. 460-467, 2013.

BARTH, T.; CONTI, R.; PUPO, M.T.; OKANO, L. T.; BONATO, P. S. Chiral HPLC analysis of donepezil, 5-O-desmethyl donepezil and 6-O-desmethyl donepezil in culture medium: application to fungal biotransformation studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 404, p. 257-266, 2012.

BERGER, J.; RACHLIN, A. I.; SCOTT, W .E., STERNBACH, L. H.; GOLDBERG, M. W. The isolation of three new crystalline antibiotics from *streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 73, p 5295-5298, 1951.

BERKESSEL, A. Diversity-based approaches to selective biomimetic oxidation catalysis. **Advances in Inorganic Chemistry**, San Diego, v. 58, p. 1-28, 2006.

BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**, Weinhein v. 346, p. 171-184, 2004.

BERNDT, N.; HOLZHÜTTER, H. G.; BULIK, S. Implications of enzyme deficiencies on mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species formation of

neurons involved in rotenone-induced Parkinson's disease: a model-based analysis. **FEBS Journal**, Hoboken, v. 280, p.5080-5093, 2013.

BOCATO, M. Z.; PUPO, M. T.; SIMÕES, R. A.; CALIXTO, L. A. GAITANI, C. M.; PUPO, M. T.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Solid phase microextraction and LC-MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal biotransformation of risperidone. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 742, p. 80-89, 2012.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURAN-PATRON, R. PUPO, M. T.; BONATO, P. S. COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron Asymmetry**, Oxford, v. 20, 385-397, 2009.

BORGES, K. B.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BARTH, T.; JABOR, V. A. P.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. LC-MS/MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 399, p. 915-925, 2010.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T.; Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation. **Current Organic Chemistry**, Sharjah, v. 13, p.1137-1163, 2009

BOTTCHER, A.; GRINSTAFF, M. W.; LABINGER, J. A.; GRAY, H. B. Aerobic oxidation of hydrocarbons catalyzed by electronegative iron salen complexes. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v. 113, p.191-200, 1996.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. (Orgs.). **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri: Manole, 2003. p. 227-246.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.). **Biochemical toxicology**. Oxford: IRL Press, 1987. p. 217-254.

CALDEIRA C.; NEVES, W. S.; CURY, P. M.; SERRANO, P.; BAPTISTA, M. A.; BURDMANN, E. A. Rhabdomyolysis, acute renal failure, and death after monensin

ingestion. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 38, p. 1108-1112, 2001.

CALIXTO, L. A.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; JABOR, V. A. P.; BONATO, P. S. *In vitro* characterization of rosiglitazone metabolites and determination of the kinetic parameters employing rat liver microsomal fraction. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Paris, v. 36, p. 159-166, 2011.

CARRAO, D. B.; BORGES, K. B.; BARTH, T.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction for the enantioselective determination of albendazole sulfoxide after biotransformation of albendazole by an endophytic fungus. **Electrophoresis**, Hoboken, v. 32, p. 2746-2756, 2011.

CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B. N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 134, p. 111-116, 1983.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**, Hoboken, v. 17, p. 65-134, 1956.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006. v. 7.

DA-SILVA, D. C.; MAC LEOD, T. C. O.; FARIA, A. L.; SANTOS, J. S.; CARVALHO, M. E. M. D.; REBOUÇAS, J. S.; IDEMORI, Y. M.; ASSIS, M. D. Carbamazepine oxidation catalyzed by manganese porphyrins: effects of the β -bromination of the macrocycle and the choice of oxidant. **Applied Catalysis A-General**, Amsterdam, v. 408, p. 25-30, 2011.

DAVISON, K. L. Monensin absorption and metabolism in calves and chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 32, p. 1273-1277, 1984.

DENISOV, I. G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G.; SCHLICHTING, I. Structure and chemistry of cytochrome p-450. **Chemical Reviews**, Washington, v. 105, p. 2253-2278, 2005.

DING, X.; LILLEHOJ, H. S.; DALLOUL, R. A.; MIN, W.; SATO, T.; YASUDA, A.; LILLEHOJ, E. P. In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. **Vaccine**, Oxford, v. 23, p. 3733-3740, 2005.

DONOHO, A. L. Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, p.1528-1539, 1984.

DOS SANTOS, J. S.; PALARETTI, V.; FARIA, A. L.; CREVELIN, E. J.; MORAES, L. A. B.; ASSIS, M. D. Biomimetic simazine oxidation catalyzed by metalloporphyrins. **Applied Catalysis A-General**, Amsterdam, v. 408, p. 163-170, 2011.

DOS SANTOS, M. D.; MARTINS, P. R.; DOS SANTOS, P. A.; BORTOCAN, R.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N. P. Oxidative metabolism of 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p. 62-70, 2005.

DOS SANTOS, M. D.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N. P. HPLC-ESI-MS/MS analysis of oxidizes di-caffeoylquinic acids generated by metalloporphyrin-catalyzed reactions. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 767-770, 2008.

DUAX, W. L.; SMITH, C. D.; STRONG, P. D. Complexation of metal ions by monensin. Crystal and molecular structure of hydrated and anhydrous crystal forms of sodium monensin. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 102, p. 6725-6729, 1980

DUSI, G.; GAMBA, V. Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feed using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 835, p. 243-246, 1999.

DUTTON, C. J.; BANKS, B. J.; COOPER, C. B. Polyether ionophores. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 12, p. 165-181, 1995.

ELLIOT, C. T.; MACCAGHEY, W. J. Critical review: methods for detection of polyether ionophore residues in poultry. **Analyst**, Cambridge, v. 123, p. 45-56, 1998.

FABER, K.; In: FABER, K. (ed). **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2011, v. 6.

FABER, K.; In: FABER, K. (ed). **Biotransformations in Organic Chemistry**, Berlin: Springer-Verlag: 2004, p. 1-26.

FARIA, A. L. **Complexos salen e metaloporfirínicos como catalisadores na oxidação de hidrocarbonetos e fármacos em meio homogêneo e heterogêneo**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FARIA, A. L.; MAC LEOD, T. C. O; ASSIS, M. D. Carbamazepine oxidation catalyzed by iron and manganese porphyrins supported on amino functionalized matrices. **Catalysis Today**, Amsterdam, v.133 p. 863-869, 2008.

FASAN, R. Tuning P450 enzymes as oxidation catalysts. **ACS Catalysis**, Washington, v. 2, p. 647-666, 2012.

FERNANDES, E. F. A. **Estudo do metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenóico**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FERREIRA, L. S.; CALLEJON, D. R.; ENGEMANN, A.; CRAMER, B.; HUMPF, H.U.; BARROS, V. P.; ASSIS, M. D.; SILVA, D. B.; ALBUQUERQUE, S.; OKANO, L. T.; KATO, M. J.; LOPES, N. P. *In vitro* metabolism of grandisin, a lignan with anti-chagasic activity. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, p. 1939-1941, 2012.

FITZPATRICK, A. Ethics and animal research. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Amsterdam, v. 141 p. 89-90, 2003.

FORTES, S. S.; BARTH, T.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; GAITANI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction in the stereoselective determination of cetirizine following the fungal biotransformation of

hydroxyzine and analysis by capillary electrophoresis. **Talanta**, Amsterdam, v. 116, p. 743-52, 2013.

GARRISON, E. M.; ARRIZABALAGA, G. Disruption of a mitochondrial MutS DNA repair enzyme homologue confers drug resistance in the parasite *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 72, p. 425-441. 2009.

GROB, C. A. Mechanisms and stereochemistry of heterolytic fragmentation. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 8, p. 535-546, 1969.

GROB, C. A.; BAUMANN, W. Die 1,4-Eliminierung unter fragmentierung. **Helvetica Chimica Acta**, Weinheim, v. 38, p. 594-610, 1955

GROVES, J. T. High-valent iron in chemical and biological oxidations. **Journal Inorganic Biochemistry**, New York, v. 100, p. 434-447, 2006.

GROVES, J. T. Reactivity and mechanisms of metalloporphyrins-catalyzed oxidations. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, West Sussex, v. 4, p.350-352, 2000.

GROVES, J. T.; NEMO, T. E.; MYERS, R. S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphyrine complexes, oxygen transfer from iodosilbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 101, p 1032-1033, 1979.

GUPTA, K. C.; SUTAR, A. K.; Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, Laussane, v. 252, p. 1420-1450, 2008.

HANEY, M. E.; HOEHN, M. M. Monensin, a new biologically active compound: discovery and isolations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington v. 1, p. 349-355, 1967.

HENRI, J.; MANCEAU, J.; SANDERS P.; LAURENTIE M. Cytochrome P450-dependent metabolism of monensin in hepatic microsomes from chickens and turkeys. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Hoboken, v. 31, p. 584-586, 2008.

HILARIO, V. C.; CARRAO, D. B.; BARTH, T.; BORGES, K. B.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Assessment of the stereoselective fungal biotransformation of albendazole and its analysis by HPLC in polar organic mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 61, p. 100-107, 2012.

HOLBACH, M.; WECK, M. Modular approach for the development of supported monofunctionalized, salen catalysts. **Journal of Organic Chemistry**, Washington v. 71, p. 1825-1836, 2006.

HUCZYNSKI, A. Polyether ionophores - promising bioactive molecules for cancer therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 22, p. 7002-7010, 2012.

HUCZYNSKI A.; JANCZAK, J.; LOWICKI D.; BRZEZINSKI, B. Monensin A acid complexes as a model of electrogenic transport of sodium cation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1818, p. 2108-2119, 2012.

HUCZYNSKI, A.; PRZYBYLSKI, P.; BRZEZINSKI, B.; BARTL, F. Monensin A methyl ester complexes with Li^+ , Na^+ , and K^+ , cations studied by ESI-MS, ^1H - and ^{13}C -NMR, FTIR, as well as PM5 semiempirical method. **Biopolymers**, Hoboken, v. 81, p. 282-294, 2006.

HUCZYNSKI, A.; RATAJCZAK-SITARZ M.; STEFANSKA J.; KARTUSIAK A.; BRZEZINSKI B.; BARTL, F. Reinvestigation of the structure of monensin A phenylurethane sodium salt based on X-ray crystallographic and spectroscopic studies and its activity against hospital strains of methicillin-resistant *S. epidermidis* and *S. aureus*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 64, p. 249-256, 2011.

HUCZYNSKI, A.; STEFANSKA, J.; PRZYBYLSKI, P.; BRZEZINSKI, B.; BARTL, F. Synthesis and antimicrobial properties of monensin A esters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 18, p. 2585-2589, 2008.

JANECZKO, T.; GLADKOWSKI, W.; KOSTREWA-SUSLOW, E. Microbial transformations of chalcones to produce food sweetener derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, Amsterdam, v. 98, p. 55-61, 2013.

JIANG, Y.; LIU, J.; LI, Y.; CHANG, H.; LI, G.; XU, B.; CHEN, X.; LI, W.; XIA, W.; XU, S. Prenatal exposure to bisphenol A at the reference dose impairs mitochondria in the heart of neonatal rats. **Journal of Applied Toxicology**, Hoboken, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.2924/pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

JOHNSON, D. C.; SPEAR, P. G. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 43, p. 1102-1112, 1982.

KETOLA, K.; VAINIO, P.; FEY, V.; KALLIONIEMI, O.; ILJIN, K. Monensin is a potent inducer of oxidative stress and inhibitor of androgen signaling leading to apoptosis in prostate cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 9, 3175-3185, 2010.

KIEHL, D. E.; JULIAN, R. K.; KENNINGTON, A. S. Electrospray ionization mass spectrometry with in-source collision-induced dissociation of monensin factors and related metabolites. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 12, 903-910.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; MORITA, M. P. A.; SATO, A. K.; PISSOLATI, A. F. Fatal rhabdomyolysis after acute sodium monensin (Rumensin[®]) toxicity. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 59, p. 596–598, 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 495, 12-15, 2001.

LAMBERT, J. D.; HONG, J. H.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 284-291, 2005.

LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 276, n. 1, p. 1-6, 1999.

LEMASTERS, J. J.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEM, A. L.; HERMAN, B. Blebbing. free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. **Nature**, London, v. 325, p. 78-81, 1987.

LI, A. P. *In vitro* approaches to evaluate ADMET drug properties. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 4, p. 701-706, 2004.

LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drugs properties in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 6, p. 357–366, 2001.

LI, G. Q.; KANU, S.; XIAO, S. M.; XIANG, F. Y. Responses of chickens vaccinated with a live attenuated multi-valent ionophore-tolerant *Eimeria* vaccine. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 179-186, 2005.

LIU, J. H.; YU, B. Y. Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds. **Current Organic Chemistry**, Sharjah, v. 14, p. 1400-1406, 2010.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: strategies, advantages and limitations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heideberg, v. 391, p. 79-96, 2008.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; GATES, P. J.; STAUNTON, J. Fragmentation studies on monensin A by sequential electrospray mass spectrometry. **Analyst**, Cambridge, v. 127, p. 503-506, 2002a.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; HONG, H.; GATES, P. J.; STAUNTON J. Fragmentation studies on monensin A and B by accurate mass electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 16, p. 414-420, 2002b.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; HONG, H.; GATES, P. J.; STAUNTON, J. A study of the effect of pH, solvent system, cone potential and the addition of crown ethers on the formation of the monensin protonated parent ion in electrospray mass spectrometry. **Analyst**, Cambridge, v. 126, p. 1630-1632, 2001.

LOWICKI, D.; HUCZYNSKI, A. Structure and antimicrobial properties of monensin A and its derivatives: summary of the achievements. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 742149, 2013.

MAC LEOD, T. C. O. **Metaloporfirinas e compostos de salen como modelos biomiméticos do citocromo P450 no metabolismo de fármacos anticonvulsivantes e antidepressivo**. 2008. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia Ciências de Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MAC LEOD, T. C. O.; BARROS, V. P.; FARIA, A. L.; SCHIAVON, M. A.; YOSHIDA, I. V. P.; QUEIROZ, M. E. C.; ASSIS, M. D. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v. 273, p. 259-264, 2007.

MAC LEOD, T. C. O.; FARIA, A. L.; BARROS, V. P.; QUEIROZ, M. E. C.; ASSIS, M. D. Primidone oxidation catalyzed by metalloporphyrins and Jacobsen catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v. 296, p. 54-60, 2008.

MAC LEOD, T. C. O.; KIRILLOVA, M. V.; POMBEIRO, A. J.; SCHIAVON, M. A.; ASSIS, M. D. Mild oxidation of alkanes and toluene by *tert*-butylhydroperoxide catalyzed by an homogeneous and immobilized Mn(salen) complex. **Applied Catalysis A-General**, Amsterdam, v. 372, p. 191-198, 2010.

MAC LEOD, T. C. O.; PALARETTI, V.; BARROS, V. P.; FARIA, A. L.; SILVA, T. A.; ASSIS, M. D. Jacobsen catalyst immobilized on chitosan membrane as interface catalyst in organic/aqueous system for alkene oxidation. **Applied Catalysis A-General**, Amsterdam, v. 361, p. 152-159, 2009.

MANSUY, D. A. Brief historical overview and recent progress on cytochromes P450: adaptation of aerobic to their chemical environment and new mechanisms of prodrug bioactivation. **Annales Pharmaceutique Françaises**, Paris, v. 69, p. 62-69, 2011.

MARQUES, L. M. M. **Estudo de metabolismo *in vitro* do alcaloide Piplartina empregando microssomas hepático de ratos**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MARTINEK, T.; RIDDELL, F. G.; WILSON, C.; WELLER, C. T. The conformation of monensin A metal complexes in solution determined by NMR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, London, v. 1, p. 35-41, 2000.

MAURIN, A. J. M.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N. P.; LINDSAY-SMITH, J. R.; BONATO, P.S. LC-MS/MS identification of drug metabolites obtained by metalloporphyrin mediated oxidation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, p. 322-328, 2003.

MELO, A. J. B.; IAMAMOTO, Y.; MAESTRIN, A. P. J.; LINDSAY-SMITH, J. R.; SANTOS, M. D.; LOPES, N. P.; BONATO, P. S. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v. 226, p. 23-31, 2005.

MESSIANO, G. B.; SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, L. S.; SIMOES, R. A.; KATO, M. J.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism study of the promising anticancer agent the lignan (-)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 72, p. 240-244, 2013.

MEUNIER, B. Models of heme peroxidases and catalases. In: MEUNIER, B. (Ed.). **Biomimetic oxidations catalysed by transition metal complexes**. London: Imperial College Press, 2000. p. 171-214.

MEUNIER, B.; BERNADOU, J. Active iron-oxo and iron-peroxo species in cytochromes P450 and peroxidases; Oxo-hydroxo tautomerism with water-soluble metalloporphyrins. In: MEUNIER, B (Ed.). **Metal-oxo and metal-peroxo species in catalytic oxidations**. Berlin: Springer, 2000. v. 97, p. 1-34.

MEUNIER, B.; DE VISSER, S. P.; SASON, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 104, p. 3947-3980, 2004.

MINGATTO, F. E.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C.; SANTOS, A. C. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 303, p. 601-607, 2002.

MIRKHANI, V.; MOGHADAM, M.; TANGESTANINEJAD, S.; KARGAR, H. Mn(Br₃TPP)Cl supported on polystyrene-bound imidazole: an efficient and reusable catalyst for biomimetic alkene epoxidation and alkane hydroxylation with sodium periodate under various reaction conditions. **Applied Catalysis A-General**, v. 303, p. 221-229, 2006.

MOLLENHAUER, H. H.; MORRÉ, D. J.; ROWE, L. D. Alteration of intracellular traffic by monensin: mechanism, specificity and relationship to toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1031, p. 225-246, 1990.

MOLONEY, M.; CLARKE, L.; O'MAHONY, J.; GADAJ, A.; KENNEDY, R.; DANAHER, M. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1253, p. 94-104, 2012.

NAM, W.; HAN, H. J.; OH, S. Y.; LEE, Y. J.; CHOI, M. H.; HAN, S. Y.; KIM, C.; WOO, S. K. SHIN, W. New insights into the mechanism of O-O bond cleavage of hydrogen peroxide and tert-alkyl hydroperoxides by iron(III) porphyrin complexes. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 122, p. 8677-8684, 2000a.

NAM, W.; LIM, M. H.; LEE, H. J.; KIM, C. Evidence for the participation of two distinct reactive intermediates in iron(III) porphyrin complex-catalyzed epoxidation reactions. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 122, p. 6641-6647, 2000b.

NAM, W.; RYU, Y. O.; SONG, W. J. Oxidizing intermediates in cytochrome P450 model reactions. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, New York, v. 9, p. 654-660, 2004.

NEBBIA, C.; CEPPA, L.; DACASTO, M.; CARLETTI, M.; NACHTMANN, C. Oxidative metabolism of monensin in rat liver microsomes and interactions with tiamulin and other chemotherapeutic agents: evidence for the involvement of cytochrome P450 3A subfamily. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 27, p. 1039-1044, 1999.

NEBBIA, C.; CEPPA, L.; DACASTO, M.; NACHTMANN, C.; CARLETTI, M. Oxidative monensin metabolism and cytochrome P450 3A content and functions in liver

microsomes from horses, pigs, broiler chicks, cattle and rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Hoboken, v. 24, p. 399-403, 2001.

NEVES, C. M. B.; SIMÕES, M. M. Q.; DOMINGUES, R. M.; SANTOS, I. C. M. S.; NEVES, M. G. P. M. S.; ALMEIDA, F. A.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J.A.S. Oxidation of diclofenac catalyzed by manganese porphyrins: synthesis of novel diclofenac derivatives. **RSC Advances**, Cambridge, v. 2, p. 7427-7438, 2012.

NEVES, C. M. B.; SIMÕES, M. M. Q.; SANTOS, I.C.M.S.; DOMINGUES F. M. J.; NEVES, M. G. P. M. S; PAZ, F. A. A.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Oxidation of caffeine with hydrogen peroxide catalyzed by metalloporphyrins. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 52, 2898-2902, 2011.

NIEHUES, M.; BARROS, V. P.; EMERY, F. S.; DIAS-BARUFFI, M.; ASSIS, M. D.; LOPES, N. P. Biomimetic *in vitro* oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the *in vivo* phase I metabolism of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 54, 804-812, 2012.

ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 110, p. 932-948, 2010.

OTERA, H.; ISHIHARA, N.; MIHARA, K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam v. 1833, p. 1256-1268, 2013.

PAL, R.; GALLO, R. C.; SARNGADHARAN, M. G. Processing of the structural proteins of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of monensin and cerulenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, p. 9283-9286, 1988.

PALUDO, C. R.; SILVA-JUNIOR, E. A.; SANTOS, R. A.; PUPO, M. T.; EMERY, F. S.; FURTADO, N. A. J. C. Microbial transformation of β -lapachone to its glycosides by *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 6, p. 657-661, 2013.

PARSHIKOV, I. A.; NETRUSOV, A. I.; SUTHERLAND, J. B. Microbial transformation of antimalarial terpenoids. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 30, p. 1516-1523, 2012.

PAZ, F. A. A.; GATES, P. J.; FOWLER, S.; GALLIMORE, A.; HARVEY, B.; LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; STAUNTON, J.; KLINOWSKI, J.; SPENCER, J. B. Sodium monensin Dihydrate. **Acta Crystallographica Section E**, Hoboken, v. 59, p. 1050-1052, 2003.

PEKALA, E.; KUBOWICZ, P.; LAZEWASKA, D. *Cunninghamella* as a microbiological model for metabolism of histamine H3 receptor antagonist 1-[3-(4-*tert*-Butylphenoxy)propyl]piperidine. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 168, p. 1584-1593, 2012.

PEREIRA, L. C.; SOUZA, A. O.; DORTA, D. J. Polybrominated diphenyl ether congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Hoboken, v. 112, p. 418-424, 2013.

PEREIRA, L. C.; SOUZA, A. O.; PAZIN, M.; DORTA, D. J. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 25, 1-14, 2012.

PIGATTO, M. C.; UCHOA, F. T.; TORRES, B.; HASS, S.; LIMA, MCA.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; LOPES, N.P.; COSTA, T. C. Pre-clinical pharmacokinetics of the acridine antitumour candidate AC04 and its 1-oxo-metabolite plasma profile. **Xenobiotica**, London, v. 42, p. 701-707, 2012.

PIRES, S. M. G.; DE PAULA, R.; SIMÕES, M. M. Q.; SILVA, A. M. S.; DOMINGUES, M. R. M.; SANTOS, I. C. M. S.; VARGAS, M. D.; FERREIRA, V. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Novel biomimetic oxidation of lapachol with H₂O₂ catalysed by a manganese (III) porphyrin complex. **RSC Advances**, Cambridge, v. 1, p. 1195-1199, 2011.

POSPÍŠIL, S.; SEDMERA, P.; VOKOUN, J.; VANEK, Z.; BUDĚŠÍNSKÝ, M. 3-O-Demethylmonensins A and B produced by *Streptomyces cinnamonensis*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 40, p. 555-557, 1987.

POSPÍŠIL, S.; ZIMA, J. Biosynthesis of monensins and 3-O-demethylmonensins in *Streptomyces cinnamonensis* in the presence of methylation inhibitors. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 44, p. 283-287, 1987.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto v. 45, p. 501-503, 1976.

PUPO, M. T.; BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; BONATO, P. S. Fungal biotransformation: a powerful tool in drug metabolism studies. In: SAIKAI, R. (Org.) **Microbial biotechnology**. New Delhi: New India Publishing Agency, 2008. p. 47-66.

RITTLE, J.; GREEN, M. T. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. **Science**, Washigton, v. 330, p. 933-937, 2010.

ROCHA, B. A.; ASSIS, M. D.; PETI, A. P. F.; MORAES, L. A. B.; MOREIRA, F. L.; LOPES, N. P.; POSPÍŠIL, S.; GATES, P. J.; DE OLIVEIRA, A. R. *In vitro* metabolism of monensin A: microbial and human liver microsomes models. **Xenobiotica**, London, v. 44, p. 326-335, 2014.

ROCHA, B. A.; PUPO, M. T.; ANTONUCCI, G. A.; SAMPAIO, S. V.; PAIVA, R. M. A.; SAID, S., GOBBO-NETO, L.; DA COSTA, F. B. Microbial transformation of the sesquiterpene lactone tagitinin C by the fungus *Aspergillus terreus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 39, p. 1719-1724, 2012.

RODIOS, N. A.; ANTEUNIS, M. J. O. Non closed forms of monensin and nigericin free-acid in protic solvents. **Bulletin des Societes Chimiques Belges**, Weinheim, v. 89, p. 537-550, 1980.

ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method. **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, Oxon, v. 23, p. 470-478, 2006.

ROSÉN, J. Efficient and sensitive screening and confirmation of residues of selected polyether ionophore antibiotics in liver and eggs by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analyst**, Cambridge, v. 126, p. 1990-1995, 2001.

RUTKOWSKI, J.; BRZEZINSKI, B. Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-31, 2013.

SANTOS, J. S. **Metaloporfirinas como modelos biomiméticos do citocromo P450 na oxidação de herbicida simazina**. 2012. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia Ciências de Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SASSMAN, S. A.; LEE, L. S. Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: monensin and lasalocid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 26, p. 1614-1621, 2007.

SCHAAB, E. H.; CROTTI, A. E. M.; IAMAMOTO, Y.; KATO, J. M.; LOTUFO, L. V. C.; LOPES, N. P. Biomimetic oxidation of piperine and piplartine catalyzed by iron(III) and manganese (III) porphyrins. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 33, p. 912-916, 2010.

SEDMERA, P.; POSPÍŠIL, S. Acetal formation is responsible for the non-closed form of monensin A in methanolic solution. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, Weinheim, v. 64, p. 703-709, 1999.

SEVERIANO, M. E.; SIMÃO, M. R., RAMOS, H. P.; PARREIRA, R. L. T.; ARAKAWA, N. S.; SAID, S.; FURTADO, N. A. J. C.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; GREGÓRIO, L. E.; TIRAPELLI, C. R.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. Biotransformation of *ent*-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus Niger*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 21, p. 5870-5875, 2013.

SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOSA, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. **Dalton Transactions**, Cambridge, v. 42, 3116-3126, 2013.

SHAREFKIN, J.G.; SALTZMANN, H.; Iodobenzene. **Organic Synthesis Collect.** New York, v. 5, p. 658, 1973.

SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L.; TOMLEY, F. M. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. **Advances in Parasitology**, San Diego, v. 60; 285-330, 2005.

SILVA-JUNIOR, E. A. **Estudos de metabolismo *in vitro* de produtos naturais: biotransformação microbiana da piplartina**. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SIMÕES, M. M. Q.; DE PAULA, R.; NEVES M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Metalloporphyrins in the biomimetic oxidative valorization of natural and other organic substrates. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, Hackensack, v. 13, p. 589-596, 2009.

SIMÕES, M. M. Q.; NEVES, C. M. B.; PIRES, S. M. G.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Mimicking P450 processes and the use of metalloporphyrins. **Pure and Applied Chemistry**, Durham, v. 85, p. 1671-1681, 2013.

SIMÕES, R. A.; BARTH, T.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of ranolazine and desmethyl ranolazine in microsomal medium using dispersive liquid liquid microextraction and LC-MS/MS. **Bioanalysis**, London, v. 5, p. 171-183, 2013.

SINGH, M.; KALLA, N. R.; SANYAL, S. N. Effect of monensin, a Na⁺-specific carboxylic ionophore on the oxidative defense system in rat testis. **Pharmacological Reports**, Krakow, v. 59, p. 456-461. 2007.

SMITH, J. R. L.; IAMAMOTO, Y.; VINHADO, F. S. Oxidation of alkanes by iodosylbenzene (PhIO) catalysed by supported Mn(III) porphyrins: activity and mechanism. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v. 252, p. 23-30, 2006.

SOUSA-JUNIOR, J. N.; ROCHA, B. A.; ASSIS, M. D. PETI, A. P. F.; MORAES, L. A. B.; YAMAMOTO, Y.; GATES, P. J. DE OLIVEIRA, A. R.; LOPES, N. P. Biomimetic oxidation studies of monensin A catalyzed by metalloporphyrins. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 23, p. 621-629, 2013.

SOUZA, A. C.; MACHADO, F.S.; CELES, M. R.; FARIA, G.; ROCHA, L. B.; SILVA, J. S.; ROSSI, M. A. Mitochondrial damage as an early event of monensin-induced cell injury in cultured fibroblasts L929. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, Hoboken, v. 52, p. 230-237, 2005.

SUROLIA, R.; PACHACURI, M.; GHOSH, P. C. Preparation and characterization of monensin loaded PLGA nanoparticles: *in vitro* anti-malarial activity against *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Valencia, v. 8, p. 172-181, 2012.

TOSHIYUKI, S. Practical application of cytochrome P450. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, p. 844-849, 2012.

TRAYLOR, P. S.; DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G. Sterically protected hemins with electronegative substituents: efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation, **Journal of Chemistry Society-Chemical Communications**, Cambridge, v. 5, p. 279-280, 1998.

VAUFREY, F.; DELORT, D.; JEMINET; DAUPHIN, G. Bioconversion of monensin by a soil bacterium *Sebekia benihana*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 43, 1189-1191, 1990.

WESTLEY, J. W. In: WESTLEY, J. W. (Ed.). **Polyether antibiotics. Naturally occurring acid ionophores**. New York: Marcel Dekker, 1982. v. 1, p. 1-20.

WHARTON, P. S.; HIEGEL, G. A. Fragmentation of 1,10-Decalindiol monotosylates. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 30, p. 3254-3257, 1965.

WU, H.; LI, L.; SHEN, J.; WANG, Y.; ZHANG, S. *In vitro* metabolism of cyadox in rat, chicken and swine using ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 67, p. 175-85, 2012.

ZHANG, Y.; SHAN, L.; HUA, Y.; WANG, D.; ZENG, H.; LIU, R.; ZHANG, W.; HU, Z. Baicalein selectively induces apoptosis in activated lymphocytes and ameliorates concanavalin a-induced hepatitis in mice. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 69592-69603, 2013

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.