
CITOCROMOS P450

E BIOTRANSFORMAÇÃO MICROBIANA

Eula Maria de Melo Barcelos Costa,¹ Valéria de Oliveira² e Fabiana Cristina Pimenta³

RESUMO

O interesse científico sobre o sistema enzimático citocromo P450 tem aumentado consideravelmente. Sua participação no metabolismo oxidativo de xenobióticos propicia a conversão de compostos lipofílicos em hidrofílicos, facilitando a excreção celular. A similaridade desse sistema em mamíferos e em diversos microrganismos permite empregar a biotransformação microbiana para obter quantidades consideráveis de metabólitos de difícil obtenção por meio de modelos animais ou por síntese química. Os metabólitos obtidos são identificados e caracterizados quanto às suas estruturas químicas, propriedades e atividades biológicas. Diversos fármacos ativos em doenças tropicais têm sido pesquisados por intermédio dessa metodologia.

DESCRITORES: Biotransformação. Citocromo P450. Doenças tropicais.

INTRODUÇÃO

Os termos “biotransformação” ou “bioconversão” referem-se ao metabolismo de substâncias estranhas – xenobióticos –, sendo que, em mamíferos, aplicam-se especialmente às reações de “detoxificação” que acontecem no fígado. Os metabólitos resultantes são geralmente mais polares que as substâncias que os originaram e quimicamente distintos. O aumento de polaridade implica difusão mais lenta através das membranas celulares em relação à substância original. Tais

-
1. Disciplina Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.
 2. Disciplina Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.
 3. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Endereço para correspondência: Eula Maria de Melo Barcelos Costa. Rua Delenda Rezende de Melo, esq. com 1ª Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO

Recebido para publicação em 6/11/2003. Revisto em 5/3/2004. Aceito em 19/3/2004.

metabólitos tendem a ser eliminados em menor tempo do organismo, posto que sua reabsorção nos túbulos renais torna-se reduzida. Tratando-se de medicamentos isso pode implicar atividade farmacológica diminuída, em decorrência da menor distribuição associada a uma excreção mais rápida (metabólito menos ativo). Por vezes, essas reações podem resultar na produção de compostos farmacologicamente mais ativos ou de substâncias tóxicas, em conseqüência das transformações promovidas na estrutura química inicial. As modificações moleculares decorrentes podem alterar significativamente a interação do novo composto com biorreceptores, o que resulta em alterações biológicas profundas (Barreiro & Fraga 2001).

As enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos participam de uma série de reações bioquímicas inter-relacionadas, de natureza oxidativa ou redutora, nas quais o produto de uma reação pode constituir-se em substrato para outra reação (Thomas 2003). As reações que resultam na adição de oxigênio e de grupamento hidroxila ou na remoção de hidrogênio caracterizam um processo oxidativo. Por sua vez, a introdução de hidrogênio na molécula do substrato caracteriza uma redução. Nos processos de hidrólise, geralmente uma molécula é clivada com a adição de água. Reações de conjugação envolvem a condensação do substrato ou seu metabólito com um composto de origem endógena, podendo gerar: glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e formação de aductos com glutatião (Barreiro 1996; Azerad 1999).

O processo de oxidação, comum na bioconversão, é dependente da participação de várias enzimas, destacando-se as oxidases de função mista do fígado, presentes nos microssomas (retículo endoplasmático liso). O termo “função mista” refere-se ao fato de a reação requerer oxigênio e fosfato de nicotinamida adenina-dinucleotídeo (NADPH – co-fator reduzido). Para a interação adequada dessas enzimas com membranas celulares, é necessário que o substrato desse sistema seja lipofílico (Barreiro & Fraga 2001). As oxidases de função mista do fígado têm pouca especificidade de substrato, o que lhes permite oxidar substratos diversificados. Duas oxidases de função mista diferente foram demonstradas nos microssomas, tendo em vista suas sensibilidades ao monóxido de carbono. Uma delas oxigena o nitrogênio das aminas formando aminas oxidadas. Esse sistema enzimático não é afetado pelo monóxido de carbono. O outro sistema enzimático possui uma hemoproteína oxidativa, essencial na metabolização de agentes químicos estranhos ao organismo, sendo, por sua vez, inibido pelo monóxido de carbono. O sistema como um todo é considerado primário, não específico na metabolização de xenobióticos, catalisando a oxidação de vários substratos, o que, provavelmente, advém da não-seletividade da enzima e da existência de numerosas isoenzimas (Thomas 2003). Os componentes principais desse sistema são um fosfolipídio, um citocromo redutase NADPH + H⁺- dependente e uma hemoproteína denominada citocromo P450, na qual o grupo heme é uma porfirina IX contendo o ferro coordenado.

CITOCROMO P450

No fim dos anos 50 um pigmento com perfil específico de absorção foi identificado nos microsomas de ratos e porcos (Garfinkel 1958; Klingenberg 1958). Esse pigmento foi em seguida caracterizado por Omura & Sato (1961) como uma hemoproteína com absorção em 450 nm (o que originou o nome desta classe de proteínas) após a redução de uma fração microsomal pela ditionita e a incubação em presença de monóxido de carbono. Pouco depois Cooper et al. (1965) demonstraram a função enzimática do citocromo P450 e sua importância no metabolismo de xenobióticos.

Os citocromos são classificados nos grupos *a*, *b* e *c*, conforme seu espectro de absorção, e se localizam na membrana interna de mitocôndrias, na membrana do retículo endoplasmático (principalmente do fígado, intestino, pulmões, rins e cérebro em mamíferos) e na membrana tilacóide dos cloroplastos de células eucarióticas. Em células procarióticas, participam de reações na membrana citoplasmática, entretanto são enzimas solúveis, o que tem permitido utilizá-las visando à elucidação da estrutura e do mecanismo de ação dos citocromos. Os citocromos P450 são prováveis membros do grupo *b*. O íon de ferro (Figura 1), presente no grupo heme, é responsável pela capacidade de transferência de elétrons dessas proteínas (Marzzoco 1999), podendo alternar entre os estados de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} .

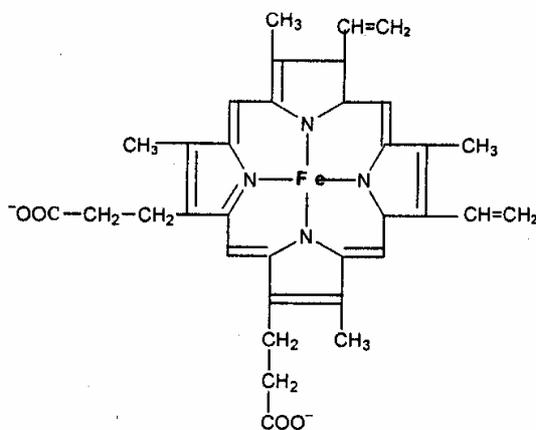


Figura 1. Estrutura geral do heme de citocromos do grupo *b*

O citocromo P450 é responsável pela transferência de elétrons do $NADPH + H^+$ para o oxigênio e pela transferência do grupamento OH para o substrato. Nessas reações, acredita-se que aconteça a hidroxilação (Figura 2) de um substrato (RH) na qual, inicialmente, este se liga ao citocromo P450. Em seguida, o átomo de ferro (Fe^{3+}) que representa o heme, grupo prostético da enzima, é reduzido pela adição de um elétron proveniente de uma molécula doadora (NADPH citocromo redutase no retículo endoplasmático e ferredoxin

na mitocôndria). A redução do átomo de ferro (Fe^{2+}) permite a sua ligação com o oxigênio molecular (O_2), e então um segundo elétron é introduzido na reação, propiciando a formação de uma espécie ativa de oxigênio com posterior absorção de prótons (H^+) do meio e liberação de água (H_2O). Isso resulta, também, na formação de um complexo (Fe^{3+}O) que transfere seu átomo de oxigênio para o substrato. Uma vez oxidado (ROH), o substrato é liberado, e, por sua vez, o citocromo P450 fica disponível para que o ciclo possa se repetir.

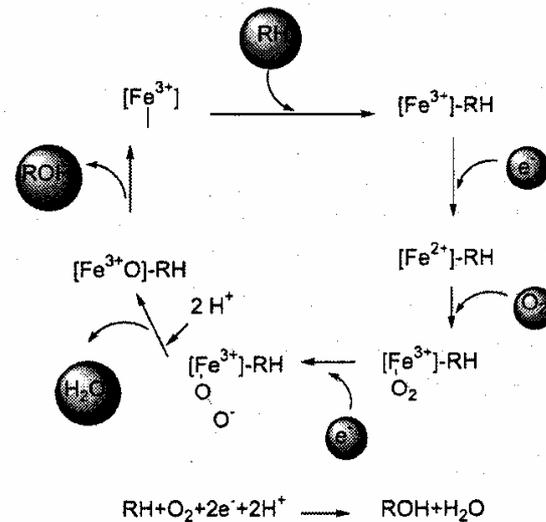


Figura 20. Ciclo simplificado da hidroxilação de um substrato (RH) catalisado por um citocromo P450. [Fe] representa o heme do grupo prostético catalítico

Citocromos P450 são essenciais para organismos eucariotos na biossíntese aeróbia de esterol, constituinte indispensável da membrana plasmática (colesterol em animais, ergosterol em fungos, fitosterol em plantas). No fígado e no pulmão esses citocromos catalisam a ω -hidroxilação de prostaglandinas e leucotrienos (Omura 1999).

Em muitas bactérias (procariotos) acredita-se também que eles tenham uma função essencial no metabolismo lipídico, servindo de exemplo a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que contém vinte diferentes genes (Leys 2003; Sansom 2003) para o citocromo P450. Craft (2003) e Eschenfeldt (2003) mencionaram a importância do citocromo P450 e do NADPH citocromo P450 redutase como complexos responsáveis pela ω -oxidação de *n*-alcanos e de ácidos graxos na levedura *Candida tropicalis* e salientaram seu uso potencial na área de biocatálises.

BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

Diversos estudos vêm mostrando, principalmente em humanos, a participação de citocromos P450 no metabolismo oxidativo de xenobióticos,

particularmente de fármacos, e na biossíntese e metabolismo de compostos endógenos, como hormônios esteróides, ácidos graxos, sais biliares e outros biofatores lipídicos. Ressaltam, também, seu envolvimento em atividades metabólicas em plantas, insetos e microrganismos (Singleton 1994; Tracy 1995; Zhang 1996; Bossche 1998; Van den Brink 1998; Omura 1999; Douglas 2000; Hussain 2003). A principal função atribuída a esse grupo de enzimas tem sido a hidroxilação de inúmeras substâncias, processo no qual se evidencia uma cadeia transportadora de elétrons, não fosforilante, cuja finalidade é bioconverter diferentes compostos através da ativação do citocromo P450. O metabolismo de xenobióticos que ocorre nas células hepáticas pode ser dividido em dois grupos de reações: fase I e fase II (Figura 3). A fase I inclui reações de oxidação, redução e hidrólise, denominadas reações de funcionalização, por introduzir um grupo funcional na molécula que está sendo biotransformada ($-OH$, $-COOH$, $-NH_2$). Essas reações são catalisadas por monoaminoxidases, flavinas e monoxigenases citocromo P450. A molécula biotransformada torna-se mais hidrofílica, podendo ser bioinativada ou apresentar-se mais ou menos reativa que a substância precursora. Na fase II podem ocorrer reações de conjugação entre o grupo polar do xenobiótico bioconvertido e substâncias endógenas (metabólito conjugado). Isso geralmente aumenta a solubilidade do metabólito em água, favorecendo sua eliminação da célula (Tracy 1995; Azerad 1999; Thomas 2003).

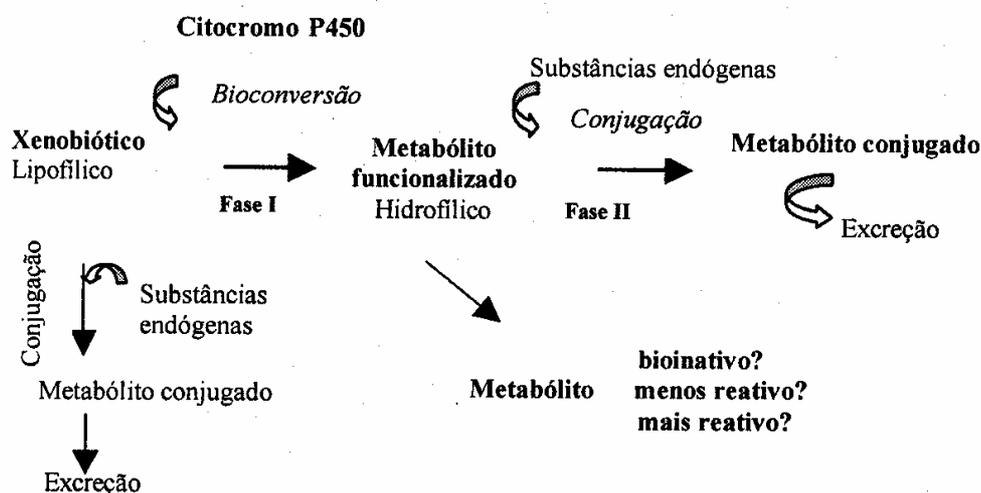


Figura 3. Metabolismo hepático de xenobióticos: reações das fases I e II

O interesse pelos métodos de biotransformações através da via microbiológica foi impulsionado pelo primeiro experimento de hidroxilação catalisado por uma monoxigenase P450 de fungo filamentosos, realizado em 1952, quando Peterson & Murray utilizaram o fungo *Rhizopus arrhizus* para

hidroxilar a progesterona, obtendo o derivado 11 α -hidroxilado, de onde surgiu a produção comercial dos corticosteróides (Figura 4).

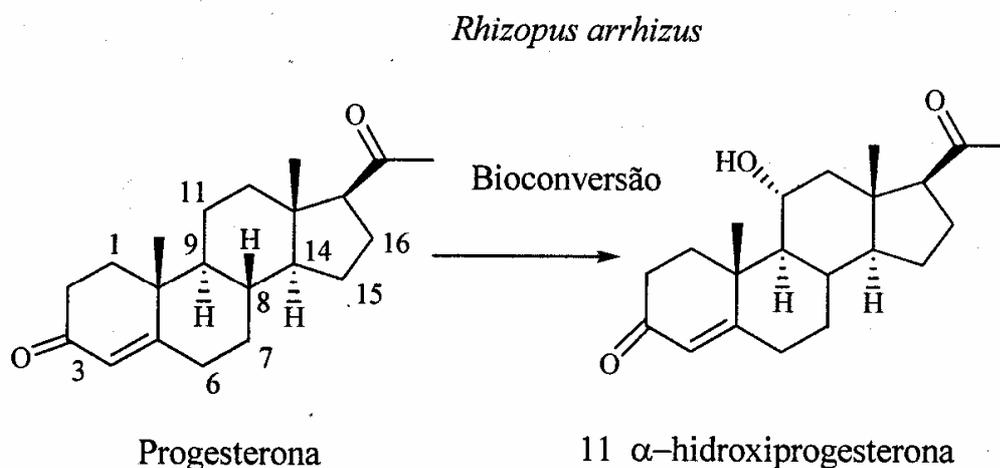


Figura 4. Bioconversão da progesterona em 11 α -hidroxiprogesterona por *Rhizopus arrhizus*

A literatura científica registra que, embasados em pesquisas sobre hidroxilações microbianas, em variados compostos aromáticos, Smith e Rosazza (1974) constataram que o sistema de bioconversão microbiano apresenta grande semelhança, principalmente, à fase I da bioconversão em mamíferos, ou seja, comporta a produção de metabólitos funcionais. Desde então, um número considerável de fármacos tem sido obtido com o emprego do modelo microbiano.

Ocasionalmente a fase II também pode ser observada no metabolismo microbiano, a exemplo dos estudos realizados por Zhang (1996) no fungo *Cunninghamella elegans* – que também revelou possuir a fase I do metabolismo –, a mais eficiente entre vinte espécies de fungos testadas pelo mesmo pesquisador.

Pesquisadores como Bossche (1998) e Van den Brink (1998) relataram o fato de fungos filamentosos secretarem grande diversidade de metabólitos, tanto primários quanto secundários (como antibióticos), através de diferentes complexos de conversões, como ocorre com a hidroxilação de hidrocarbonetos poliaromáticos e de compostos esteróides. De forma semelhante, Berrie et al. (2001) referiram que inúmeras evidências bioquímicas indicam o citocromo P450 como responsável por reações de hidroxilação em fungos filamentosos e em bactérias. Citaram a purificação recente dessa enzima em bactérias do gênero *Streptomyces*, como *Streptomyces roseochromogenus*, *Streptomyces griseolos* e *Streptomyces griseus*.

Existem disponíveis coleções internacionais de microrganismos já testados quanto a sua utilidade para bioconversão. Van den Brink (1998) apontou

como exemplos de fungos comumente utilizados nesse processo as espécies de *Cunninghamella* spp, *Beauveria* spp e *Mortierella isabelina*. Quanto a bactérias, Azerad (1999) fez menção aos gêneros *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Mycobacterium* ou *Corynebacterium*, cujo sistema enzimático é bastante similar ao dos fungos. Outras bactérias são ocasionalmente empregadas (*Pseudomonas*), porém seu uso é limitado, pelo fato de poderem consumir, de substâncias xenobióticas, elementos como carbono ou nitrogênio, o que torna o procedimento mais problemático. Entretanto, é importante que outros microrganismos, inclusive isolados de biomas pouco estudados como o cerrado, e ainda não classificados, também sejam testados quanto à sua capacidade metabólica e caracterizados geneticamente, tendo em vista o desenvolvimento sustentável e o conhecimento da biodiversidade.

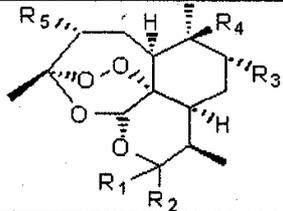
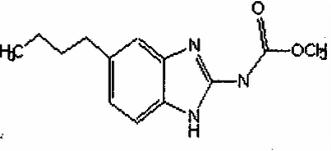
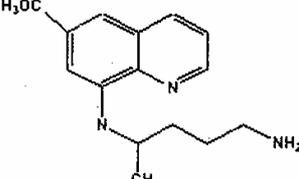
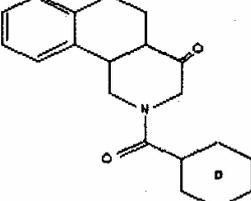
BIOTRANSFORMAÇÃO MICROBIANA E FÁRMACOS ATIVOS EM DOENÇAS TROPICAIS

Vários microrganismos têm sido utilizados para simulação do metabolismo animal em pesquisas de grande número de moléculas de interesse farmacológico. O interesse pelas monoxigenases microbianas (citocromo P450) se deve ao fato de elas proporcionarem uma hidroxilação régia e estereosseletiva, o que, por vezes, é extremamente difícil de se conseguir pela síntese química. A vantagem de se empregar a célula do microrganismo como um todo é a chance de prover os co-fatores necessários ao processo. A utilização de enzimas purificadas é mais complicada, em função da instabilidade de algumas delas.

Em muitos fármacos ativos em doenças tropicais, o estudo do seu metabolismo foi auxiliado por modelos microbianos. O tipo de reação processada evidencia uma similaridade notável entre reações catalisadas pelos sistemas enzimáticos animais e pelos microbianos, especialmente as oxidativas (Tabela 1).

Mais recentemente, diversas reações catalisadas por monoxigenases de microrganismos têm sido aplicadas em numerosas substâncias naturais (esteróides, terpenos, alcalóides) ou sintéticas. Tais reações vêm sendo empregadas para a funcionalização pontual de moléculas complexas, como no caso da progesterona ou de vários esteróides, ou ainda para a produção de alcalóides e antibióticos. Outras moléculas de interesse biológico, como as milbemicinas (acaricida) e a ivermectina (1), citadas por Nonaka (1999), têm sido investigadas por meio da biotransformação. Esta última substância é um metabólito de *Streptomyces avermitilis*, podendo ser convertida por processos microbiológicos (Figura 5) em ivermectina (2), um poderoso acaricida, inseticida e anti-helmíntico de largo espectro. A ivermectina (2) é utilizada mundialmente para o tratamento e prevenção de infecções por nematódeos e ainda, como relatou Vingtain (1988), na prevenção de infestação por oncocercária.

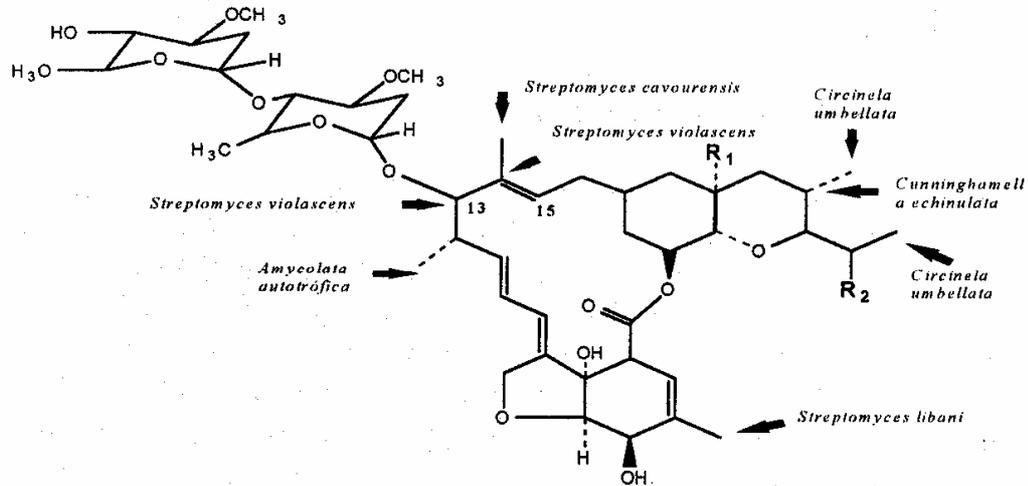
Tabela 1. Exemplos de fármacos ativos em doenças tropicais obtidos com o auxílio de biotransformação microbiana

Fármaco	Atividade terapêutica	Estrutura química	Metabolismo animal e microbiano	Referência
Artemisinina	Antimalárico		Oxidação em R ₁ e R ₂	Lee et al. (1989)
Parbendazol	Anti-helmintíco		Oxidação do grupo ω-metil	Dunn et al. (1973)
Primaquina	Antimalárico		Deaminação oxidativa do ácido carboxílico	Clark et al. (1981)
Praziquantel	Anti-helmintíco		Hidroxilação do anel D em posição não identificada	Clark et al. (1985)

Outra aplicação é a obtenção de intermediários sintéticos assimétricos, úteis em síntese orgânica, como mostram os exemplos da epibatidina e da hidroxilação de terpenos, o que oferece novos produtos potenciais para a indústria de perfumes (Olivo 1999).

Para pesquisas sobre metabolismo de compostos com potencial atividade biológica, geralmente se administram esses compostos a animais de laboratório e, em seguida, analisam-se os fluidos biológicos para verificação da presença de metabólitos e para sua identificação. O custo dos experimentos, controvérsias éticas, baixas quantidades de metabólitos isolados e tempo despendido impõem algumas limitações ao processo (Azerad 1999).

Avermectina (1)



Ivermectina R₁= H e R₂ = CH₃ (2)

Figura 5. Compostos empregados no tratamento de doenças tropicais e que tiveram os intermediários de síntese obtidos por meio da biotransformação

Em contrapartida, o emprego do modelo microbiano visando o estudo do metabolismo de substâncias bioativas apresenta vantagens práticas, como a menor demanda por animais de laboratório e grande redução no custo operacional, além do isolamento de metabólitos específicos e em maiores quantidades para estudos de detalhes estruturais e das atividades farmacológica e toxicológica. Ademais, trata-se de um processo simples e que requer menos tempo (Azerad 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A similaridade do metabolismo de determinados microrganismos com o metabolismo de mamíferos, no tocante à fase I hepática, permite produzir *in vitro*, empregando modelos microbianos, quantidades consideráveis de metabólitos de difícil obtenção por meio de modelos animais. Essa metodologia propicia a produção de metabólitos em maior escala e sua identificação de forma mais rápida, além de disponibilizá-los para futuros estudos farmacológicos e toxicológicos, podendo ser utilizada como uma alternativa eficiente em pesquisas farmacêuticas. Diante da importância da função do citocromo P450 nesse e em outros tipos de processos, o número de pesquisas e publicações sobre essa família de enzimas, em fungos e bactérias, tem expandido consideravelmente nas últimas décadas. Basta lembrar que já foram avaliadas as estruturas cristalizadas de mais de dez

diferentes citocromos P450 bacterianos, ampliando inclusive as possibilidades de aplicação dessas enzimas em biotecnologia.

ABSTRACT

Cytochrome P450 and microbial biotransformation

Emphasis is laid on the potential of cytochrome P450 in systems of biotransformation. The oxidative metabolism of xenobiotic allows the conversion of lipophilic substrates in hydrophilic molecules. There is a high similarity between the mammalian and microorganism metabolism allowing the use of microbial models for biotransformation. The microbial models allow the obtainment of molecules easier than in animal models. The metabolites are easily purified for the chemical structure determination for pharmacological activity assays. Several active drugs in tropical diseases have been researched by microbial biotransformation.

KEYWORDS: Biotransformation. Cytochrome P450.

REFERÊNCIAS

1. Azerad R. Microbial models for drug metabolism. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 63: 169-213, 1999.
2. Barreiro JE, Fraga CAM. *Química medicinal – as bases moleculares da ação dos fármacos*. Artmed. São Paulo, 2001.
3. Barreiro JE, Silva JFM, Fraga CAM. Noções básicas do metabolismo de fármacos. *Química Nova* 196: 641-650, 1996.
4. Berrie JR, Williams RAD, Smith KE. Microbial transformations of steroids-XII. Progesterone hydroxylation profiles are modulated by translational modification of an electron transfer protein in *Streptomyces roseochromogenes*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77: 87-96, 2001.
5. Bossche HV, Koymans L. Cytochrome P450 in fungi. *Mycoses*, 41 (Suppl. 1): 32-33, 1998.
6. Clark AM, Hufford CD, McChesney, JD. Primaquine: metabolism by microorganisms and ¹³C nuclear magnetic resonance assignments. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 19: 337-341, 1981.
7. Clark AM, McChesney JD, Hufford CD. The use of microorganisms for the study of drug metabolism. *Med. Res. Rev.* 5: 231-253, 1985.
8. Cooper DY, Levin S, Rosenthal O. Photochemical action spectrum of terminal oxidase of mixed function systems. *Science* 147: 400-402, 1965.
9. Craft DL, Madduri KM, Eshoo M, Wilson R. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to a, w-dicarboxylic acids. *Appl Environment Microbiol* 69: 5983-5991, 2003.
10. Douglas CR. *Patofisiologia geral – mecanismo da doença*. Robe Editorial. São Paulo, 2000.
11. Dunn GL, Gallager G, Davis D, Hoover, RE, Stedman J. Metabolites of methyl 5(6)-butyl-2-benzimidazolecarbamate (Parbendazole). Structure and synthesis. *J Med. Chem.* 16: 996-1002, 1973.

12. Eschenfeldt WH, Zhang Y, Samaha H, Stols L, Eirich D, Wilson CR, Donnelly MI. Transformation of fatty acids catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase enzymes of *Candida tropicalis*. *Appl Environment Microbiol* 69 : 5992- 5999, 2003.
13. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes I. enzyme and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 77: 493-509, 1958.
14. Hussain HA, Ward JM. Enhanced heterologous expression of two *Streptomyces griseolus* cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* ferredoxin reductase as potentially efficient hydroxylation catalysts. *Appl Environment Microbiol* 69: 373-382, 2003.
15. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75: 376-387, 1958.
16. Lee IK, Elsohly HN, Croom EM, Hufford CD. Microbial metabolism studies of the antimalarial sesquiterpene artemesinin. *J Nat Prod* 52: 337-341, 1989.
17. Leys D, Mowat CG, McLean KJ, Richmond A, Chapman SK, Walkinshaw MD, Munro AW. Atomic structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 to 1.06 Å reveals novel features of cytochrome P450. *J Biol Chem*. 278: 5141-5147, 2003.
18. Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica básica*. Guanabara Koogan, 2 ed. Rio de Janeiro, 1999.
19. Nonaka K, Kumasaka C, Okamoto Y, Mauyama F, Yoshikawa H. Bioconversion of milbemycin-related compounds: biosynthetic pathway of milbemycins. *J Antibiotics* 52:109-116, 1999.
20. Olivo HF, Hemennway MS. Total synthesis of (+,-)-epibatidine using a biocatalytic approach. *J Org Chem* 64: 8968-8969, 1999.
21. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*. 237: 1375-1376, 1961.
22. Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Resear Communicat* 266:690-698, 1999.
23. Peterson DH, Murray HC, Eppstein SH, Reineke LM, Weintraub A. Microbial transformations of steroids. Introduction of oxygen at Carbon-11 of progesterone. *J Am Chem Soc* 74: 5933-5936, 1952.
24. Sansom C. P450 Proteins show promise. *Lancet Infect Dis* 3: 182, 2003.
25. Singleton I. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. *J Chem Tech Biotechnol* 59: 9-23, 1994.
26. Smith RV, Rosazza JP. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 161: 551-558, 1974.
27. Thomas G. *Química medicinal – uma introdução*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.
28. Tracy JW, Vande Vaa, EA. Xenobiotic Metabolism. In: *Biochemistry and molecular biology of parasites*. Academic Press. New York, 1995, 369 p.
29. Van den Brink HJM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 23: 1-17, 1998.
30. Vingtain PP, Ginoux SM, Coulibaly Y, Bissan Y, Ranque P, Thillaye B. Ivermectin and human onchocerciasis: a study of 234 patients in Mali. *Bulletin de la Societe de Phatologie exotique et ses filiales* 81: 260-270, 1988.
31. Zhang D, Yang Y, Leakey JEA, Cerniglia CE. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. *FEMS Microbiol Letters* 138: 221-226, 1996.