

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

TATIANA CAIXETA FERREIRA GOMES

**BIOCONVERSÃO DO DERIVADO N-FENILPIPERAZÍNICO  
LASSBIO 579, UM POTENCIAL CANDIDATO  
A PROTÓTIPO DE FÁRMACOS**

Goiânia  
2007

TATIANA CAIXETA FERREIRA GOMES

**BIOCONVERSÃO DO DERIVADO N-FENILPIPERAZÍNICO  
LASSBIO 579, UM POTENCIAL CANDIDATO  
A PROTÓTIPO DE FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria de Oliveira

Goiânia  
2007

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(GPT/BC/UFG)**

**Gomes, Tatiana Caixeta Ferreira.**

**G633b Bioconversão do derivado *N*-Fenilpiperazínico LASSBio 579, um potencial candidato a protótipo de fármacos / Tatiana Caixeta Ferreira Gomes. –2007.**

**118 f. : il., figs., qds., grafs., tabs.**

**Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Oliveira.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2007.**

**Bibliografia: f. 114-118.**

**Inclui listas de figuras , quadros, esquemas, gráficos, tabelas e de abreviaturas.**

**1. Química farmacêutica 2. Fungos – Bioconversão 3. Fungos filamentosos 4. Metabolismo animal I. Oliveira, Valéria II. Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Farmácia III. Título.**

**CDU: 615.011**

*Aos meus pais,*

*Pela motivação na busca de novos caminhos, pelo exemplo, compreensão e amor.*

## *Agradecimentos*

*A Deus, pela presença, força, sabedoria.*

*Aos meus Pais, uma das razões de minha luta constante. Agradeço por me ensinarem durante este caminho a ter confiança em minhas capacidades e a superar os obstáculos.*

*Ao Emílio pelo carinho e paciência, por valorizar a minha presença e compreender a minha ausência quando necessário. Obrigada pelos valiosos estímulos que equilibraram minha luta. Desejo sempre compartilhar alegrias e comemorar vitórias como esta ao seu lado.*

*A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria de Oliveira que com seus conhecimentos, experiências profissionais e de vida me guiaram para além das teorias e técnicas. Obrigada por sua amizade, delicadeza e apoio. Obrigada por despertar em mim o interesse pela leitura crítica e desenvolvimento de uma postura investigadora e questionadora. Você é exemplo de competência, amadurecimento profissional e comprometimento com a gestação e desenvolvimento do LaBioCon.*

*Ao Prof Dr Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro pelo aceite em participar da banca de defesa, contribuindo com o seu conhecimento.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cecília Maria Alves de Oliveira pelo aceite em participar da banca de defesa, pela participação na banca de qualificação e pelas discussões e sugestões a este trabalho.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Rosário pelo aceite em participar da banca de defesa, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anna Maria Canavarro Benite e ao Prof Dr José Realino de Paula pela participação na banca de qualificação e grande colaboração.*

*Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de realização profissional.*

*A CAPES que proporcionou o suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Inês S. Resck, da UNB, pela colaboração com os espectros de RMN, e principalmente pela atenção, disponibilidade, delicadeza e cordialidade com que me tratou. Jamais esquecerei este gesto.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Teresa F. Bara e ao Prof Dr Ricardo Menegatti pelo apoio, sugestões valiosas e conversas tão esclarecedoras durante a realização deste trabalho.*

*Francine Pazini e Hérica Núbia Cardoso Cirilo, descobri em vocês um exemplo de generosidade,*

*responsabilidade e determinação no apoio constante durante estes anos juntas. Agradeço-lhes pela amizade e sobretudo, pelo prazer da convivência.*

*Andrezza Lopes e Sousa, Ane Rosalina Trento e Emmanuel Carneiro, que sempre participam, incentivam, vibram e me ajudam. O caminho ameniza-se, quando temos alguém com quem contar. Obrigada pela amizade.*

*A aluna de doutorado Waleria, da UNB, pela atenção, simpatia e amabilidade em me ajudar.*

*Ao Fram Moreira Mundim, do ICF, pelo auxílio na realização das análises de EM.*

*Aos colegas de mestrado, principalmente a Núbia Custódio de Paula por compartilhar desta vitória e pela agradável convivência, apoio e incentivo.*

*A Maria Pacheco, por nossas “conversações”, sempre acompanhadas de tamanha amizade e delicadeza. Uma verdadeira lição de sabedoria que, em gestos, cotidianamente acompanham as suas palavras, sempre tão sábias.*

*A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal.*

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram mas na intensidade com que elas acontecem, por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

As reações de bioconversão utilizando fungos filamentosos têm sido bastante exploradas e os resultados obtidos são interessantes para estudos do metabolismo. Os modelos microbianos do metabolismo animal, baseados na similaridade do metabolismo hepático e enzimático microbiano, tornaram-se uma alternativa promissora para a elucidação da rota metabólica de fármacos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi a realização de estudos de bioconversão com o derivado N-fenilpiperazínico, LASSBio 579, (1-[-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-metil]-4-fenil-piperazina), um potencial candidato a protótipo de fármacos. Para isso foram desenvolvidas e testadas metodologias analíticas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência para monitorar as reações de bioconversão desse composto. Diante da atividade catalítica documentada para diferentes microrganismos, foram empregados nesse estudo quinze fungos filamentosos: *Absidia blakesleana* ATCC 26617; *Absidia blakesleana* ATCC 10148b; *Aspergillus candidus* ATCC 2023; *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009; *Beauveria bassiana* ATCC 7149; *Chaetonium indicum* LCP 984200; *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244; *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245; *Cunninghamella elegans* ATCC 36112; *Cunninghamella elegans* ATCC 26169; *Curvularia lunata* NRRL 2380; *Fusarium roseum* ATCC 14717; *Mortierella isabelina* NRRL 1757; *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a; *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145. As cepas *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Aspergillus candidus* ATCC 2023 foram as de escolha para estudos em escala semi-preparativa devido a respectiva capacidade de produzir uma maior diversidade de metabólitos e um desses derivados em maior quantidade. Foram detectados cinco diferentes derivados dos quais três foram caracterizados por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas (LaBioCon 23, 24 e 25) como derivados hidroxilado, glicosilado e metilpiperazínico respectivamente, sendo este último comparado e identificado como sendo o metabólito animal do LASSBio 579.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioconversão, LASSBio 579, fungos filamentosos, derivados funcionalizados.

## ABSTRACT

Bioconversion reactions using filamentous fungi have been extensively exploited and the results obtained are interesting for metabolism studies. The microbial models of animal metabolism, based on the similarity between mammalian metabolism and enzymatic microbial, became a promising alternative for the elucidation of metabolic routes of drugs. In this context, the aim of this work was to promote bioconversion studies with the *N*-phenylpiperazine derivative LASSBio 579, (1-[1-(4-Chlorophenyl)-1H-pyrazol-4-methyl]-4-phenyl-piperazine), a potential lead of drugs prototypes. For that HPLC and TLC analytical methodologies were developed and tested for monitoring the bioconversion reactions for this compound. Beneath the documented catalytic activity for different microorganism, fifteen of filamentous fungi were employed in this study: *Absidia blakesleana* ATCC 26617; *Absidia blakesleana* ATCC 10148b; *Aspergillus candidus* ATCC 2023; *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009; *Beauveria bassiana* ATCC 7149; *Chaetonium indicum* LCP 984200; *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244; *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245; *Cunninghamella elegans* ATCC 36112; *Cunninghamella elegans* ATCC 26169; *Curvularia lunata* NRRL 2380; *Fusarium roseum* ATCC 14717; *Mortierella isabelina* NRRL 1757; *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a; *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145. *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 and *Aspergillus candidus* ATCC 2023 were chosen for studies in semi-preparative scales due to their capacity of producing a bigger variety of metabolites and one of them in greater amount, respectively. Five different derivatives were detected of which three were characterized by NMR and MS (LaBioCon 23, 24 and 25) as hydroxylated, glycosylated and methylpiperazine derivatives respectively, being this last comparative one and identified as being the mammalian derivate of LASSBio 579.

Key-words: Bioconversion, LASSBio 579, filamentous fungi, functionalized derivatives.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Biotransformação estereoseletiva do antidepressivo doxepina por <i>Cunninghamella elegans</i> (MOODY, FREEMAN, CERNIGLIA, 1999).....	23
Figura 1.2	Síntese de intermediários da buprenorfina a partir do derivado A da tebaína com <i>Cunninghamella echinulata</i> (ABEL et al., 2003).....	24
Figura 1.3	Metabólitos ativos obtidos por meio de reação de biotransformação Fase I, hidroxilação aromática da atorvastatina. (FURA, 2006).....	28
Figura 1.4	Estrutura do grupo heme (ferro protoporfirina IX, heme b) (SONO et al., 1996).....	29
Figura 1.5	Ciclo catalítico do citocromo P450 (WILLIAMS, 2002).....	32
Figura 1.6	Exemplos de metabólitos obtidos por meio de reações de biotransformação Fase II (conjugação): glicuronidação da morfina (a) (RITTER, 2000) e sulfatação do minoxidil (b) (ANDERSON, et al., 1998).....	33
Figura 1.7	Bioconversão do propranolol por <i>Cunninghamella echinulata</i> e seus metabólitos Fase I, humanos e fúngicos (FOSTER et al., 1989).....	36
Figura 1.8	Reação de redução do anticoagulante, warfarina, por <i>Cunninghamella elegans</i> (WONG, DAVIS, 1989).....	37
Figura 1.9	Hidrólise da 7,4'-diacetoxidaidzeína por <i>Aspergillus niger</i> levando a produção da daidzeína (MIYAZAWA et al., 2004).....	37
Figura 1.10	Bioconversão da besipirdina por <i>Cunninghamella elegans</i> gerando quatro metabólitos (A, B, C e D), sendo que três deles são encontrados no metabolismo animal (A, C e D) (RAO, DAVIS, 1997).....	38
Figura 1.11	Bioconversão do omeprazol por <i>Cunninghamella elegans</i> produzindo seis metabólitos (A, B, C, D, E, F) sendo que três deles correspondem a metabólitos animais (A, B, C) (PEARCE, LUSHNIKOVA, 2006).....	39
Figura 1.12	Bioconversão do LASSBio 939 por <i>Beauveria bassiana</i> promovendo a obtenção de metabólitos hidroxilado (LaBioCon 15) e glicosilado (LaBioCon 14) (CIRILO, 2006).....	40
Figura 1.13	Bioconversão do LASSBio 581 por <i>Cunninghamella echinulata</i> e <i>Mortierella isabelina</i> e obtenção de seis diferentes metabólitos (PAZINI, 2006).....	41
Figura 1.14	Planejamento estrutural do candidato protótipo a agente anti-psicótico, a partir da clozapina e L-741 (MENEGATTI, 2001) .....	43
Figura 1.15	Representação esquemática das etapas da síntese do LASSBio 579 (MENEGATTI, 2001).....	44
Figura 3.1	Procedimento experimental .....	63
Figura 3.2	Administração do LASSBio 579 em animais e análise cromatográfica dos plasmas para uma correlação com o	

	metabolismo fúngico.....	64
Figura 4.1	Espectrograma do substrato LASSBio 579 0,01 mg/ml em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 800,0 nm em espectrofotômetro Cintra 10 <sup>e</sup> UV-visible Spectrometer.....	65
Figura 4.2	Aspecto macroscópico das colônias em ágar batata e no meio líquido PDSM de <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023 e <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, cepas selecionadas para ensaios em escala semipreparativa após 72 horas de incubação a 200 rpm, 28 ± 2 °C.....	69
Figura 4.3	Perfil cromatográfico do substrato LASSBio 579 (0,5 mg/ml em metanol) sistema gradiente (sistema 5) e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	73
Figura 4.4	Perfil cromatográfico do meio reacional (PDSM) em sistema gradiente (sistema 5) e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	74
Figura 4.5	Perfis cromatográficos dos sobrenadantes de incubação do LASSBio 579 com as diversas cepas testadas, enumeradas de 1 a 15, no tempo de 48 horas em sistema gradiente (Sistema 5) e comprimento de onda 257 nm (---- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	75
Figura 4.6	Cromatograma referente ao sobrenadante de incubação do substrato LASSBio 579 com a cepa <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 no período 48 horas. PDSM: meio reacional, Metabólitos: I, II, III, IV, V e substrato LASSBio 579: L. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (---- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	87
Figura 4.7	Cromatograma referente ao sobrenadante de incubação do substrato LASSBio 579 com a cepa <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023 no período 48 horas. PDSM: meio reacional, Metabólitos I, II e substrato LASSBio 579. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	88
Figura 4.8	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do substrato LASSBio 579 (CD <sub>3</sub> OD/TMS/300MHz).....	91
Figura 4.9	Expansão 1 do espectro de RMN <sup>1</sup> H do substrato LASSBio 579 (CD <sub>3</sub> OD/TMS/300 MHz).....	92
Figura 4.10	Expansão 2 do espectro de RMN <sup>1</sup> H do substrato LASSBio 579 (CD <sub>3</sub> OD/TMS/300MHz).....	93
Figura 4.11	Bioconversão do LASSBio 579 por <i>Cunninghamella echinulata</i> formando o produto hidroxilado LaBioCon 23....	94
Figura 4.12	Cromatograma do produto purificado LaBioCon 23. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	95
Figura 4.13	Espectro de massa do derivado LaBioCon 23, destacando o pico do íon molecular e o fragmento do substrato.....	96
Figura 4.14	Espectro de RMN e estrutura química proposta para o produto purificado LaBioCon 23 (CDCl <sub>3</sub> /TMS/300 MHz)....	98
Figura 4.15	Bioconversão do LASSBio 579 por <i>Cunninghamella</i>	

	<i>echinulata</i> formando o produto glicosilado LaBioCon 24.....	99
Figura 4.16	Cromatograma do produto purificado LaBioCon 24. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	100
Figura 4.17	Espectro de massa do derivado LaBioCon 24, destacando o pico do íon molecular e o fragmento do substrato.....	101
Figura 4.18	Produto formado, LaBioCon 25, pela hidrólise do composto dihidroxilado por <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023.....	102
Figura 4.19	Perfil cromatográfico do derivado, solúvel em água, obtido da fração cetônica. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).....	103
Figura 4.20	Espectro de Infravermelho do substrato LASSBio 579 (KBr/ 4000 a 450 $\text{cm}^{-1}$ ).....	105
Figura 4.21	Espectro de Infravermelho do produto LaBioCon 25 (KBr/ 4000 a 450 $\text{cm}^{-1}$ ).....	106
Figura 4.22	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ : A e espectro em janela menor: B do produto LaBioCon 25( $\text{D}_2\text{O}/\text{TMS}/300$ MHz).....	107
Figura 4.23	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ – APT: A e espectro em janela menor: B do produto LaBioCon 25( $\text{D}_2\text{O}/\text{TMS}/300$ MHz).....	108
Figura 4.24	Perfil cromatográfico do substrato LASSBio 579 e das amostras de plasma de ratos coletadas nos tempos de 0,5 h, 2 h, 6 h, 12 h e 24 h após a administração do substrato. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 $\mu$ ); Sistema 5; detecção a 257 nm.....	109
Figura 4.25	Sobreposição dos cromatogramas da amostra de plasma de 12 horas (-----) e alíquota de incubação de 48 horas de <i>A. candidus</i> (-----). Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 $\mu$ ); Sistema 5; detecção a 257 nm.....	110

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ensaio realizado para avaliação do efeito central (NEVES, 2003).....	45
Quadro 2	Ensaio referente aos comportamentos e efeitos mediados pelo sistema dopaminérgico (NEVES, 2003).....	45
Quadro 3	Caracterização morfológica macroscópica em meio líquido PDSM das diferentes cepas testadas durante o “screening” : massa amorfa ou “pellets” (seguidos do diâmetro – cm).....	68

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Processo de extração dos derivados ao término da incubação.....	57
Esquema 2	Esquema do processo de extração dos derivados após incubação com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244.....	58
Esquema 3	Etapas de purificação após incubação com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244.....	60
Esquema 4	Etapas de purificação da fração cetônica após incubação com <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Número de metabólitos formados a partir dos substratos LASSBio 579 e 581, pelas mesmas cepas e sob as mesmas condições reacionais.....	72
Gráfico 2	Produção do Metabólito I pelas diversas cepas ensaiadas x consumo do substrato LASSBio 579.....	83
Gráfico 3	Produção do Metabólito II pelas diversas cepas ensaiadas x consumo do substrato LASSBio 579.....	84
Gráfico 4	Produção dos Metabólitos III, IV e V pelas diversas cepas ensaiadas.....	85
Gráfico 5	Representação das cinéticas de formação dos metabólitos do LASSBio 579 nos períodos de 24, 48, 72 horas por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 $\mu$ ); Sistema 5; detecção a 257 nm.....	86
Gráfico 6	Representação da cinética de formação de metabólitos do LASSBio 579 em plasma de ratos. Gráfico de concentração ( $\mu$ l/AU) em função do tempo (horas).....	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Bioconversão do LASSBio 579 por várias cepas de fungos filamentosos.....	71
Tabela 2	Valores de fator de retenção (Rf) para o substrato e os produtos obtidos após purificação por <i>flash</i> cromatografia e CCD preparativa. Fase móvel de acetato de etila/metanol 95:05 v/v.....	89
Tabela 3	Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD; 300MHz) para o substrato LASSBio 579, número de hidrogênios (N <sup>o</sup> -H), deslocamentos químicos (δ, ppm), Multiplicidade (Multiplic.), Constante de acoplamento (J, Hz) .....	90
Tabela 4	Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> Cl; 300MHz) para o produto LaBioCon 23. Número de hidrogênios (N <sup>o</sup> -H), deslocamentos químicos (δ, ppm), Multiplicidade (Multiplic.), Constante de acoplamento (J, Hz).....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AMPA	ácido $\alpha$ - amino-3hidroxi-5-metilsoxazola-4-propionato
APT	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ utilizando transferência de polarização
ATCC	American Type Culture Colletion
CCD	Cromatografia em camada delgada
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
$\text{CD}_3\text{OD}$	Metanol deuterado
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CO	Monóxido de carbono
CYP450	Citocromo P450
d	Dubleto
$\text{D}_2\text{O}$	Água deuterada
EI	Espectrometria de Infravermelho
EM	Espectrometria de Massas
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FMN	Flavina mononucleotídeo (forma oxidada)
$\text{FMNH}_2$	Flavina mononucleotídeo (forma reduzida)
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
i.p	intraperitonal
i.v	intravenosa
LaBioCon	Laboratório de Bioconversão
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LCP	Laboratoire de Cryptogamie Paris
M	Molar
m	Multiplete
min	Minutos
MeOH	Metanol

na	Não avaliado
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NRRL	Northern Utilisations Research and Development Division
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
PDSM	Potato dextrose soy medium
p.o	per oral
PVN	Núcleo paraventricular
ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de retenção
Rt	Tempo de retenção
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RP	Fase reversa
rpm	Rotações por minuto
s	Singleto
SNC	Sistema nervoso central
SnCl <sub>2</sub>	Cloreto de estanho
S-P	Semi-preparativo
Subst.	Substrato
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
δ	Deslocamento químico

# SUMÁRIO

	<b>RESUMO .....</b>	<b>8</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
	<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>13</b>
	<b>LISTA DE ESQUEMAS .....</b>	<b>14</b>
	<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>15</b>
	<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>16</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>17</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	BIOCONVERSÃO .....	21
1.1.1	<b>Fatores que influenciam no processo de bioconversão ...</b>	<b>25</b>
1.2	METABOLISMO DE FÁRMACOS .....	27
1.2.1	<b>Reações de Fase I .....</b>	<b>27</b>
1.2.1.1	Sistema enzimático CYP450 .....	29
1.2.1.2	Família do CYP450 .....	30
1.2.1.3	Sistema de transporte de elétrons .....	30
1.2.2	<b>Reações de Fase II .....</b>	<b>32</b>
1.3	MODELO MICROBIANO DO METABOLISMO ANIMAL .....	34
1.3.1	<b>Monoxigenases fúngicas e suas aplicações no Metabolismo Microbiano de Fármacos .....</b>	<b>35</b>
1.4	LASSBIO 579 – POTENCIAL CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACOS .....	41
1.5	MÉTODOS DE MONITORAMENTO APLICADOS AOS ESTUDOS DE BIOCONVERSÃO .....	47
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
3.1	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .....	50
3.2	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS .....	53
3.2.1	<b>Microrganismos .....</b>	<b>53</b>
3.2.2	<b>Meios de cultura .....</b>	<b>54</b>
3.2.3	<b>Manutenção das cepas .....</b>	<b>54</b>

3.3	TRIAGEM .....	55
3.4	SEMI-PREPARATIVO .....	56
<b>3.4.1</b>	<b>Filtração e Extração .....</b>	<b>56</b>
3.4.1.1	1° Ensaio (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244) ....	57
3.4.1.2	2° Ensaio (Cepa: <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023) .....	58
<b>3.4.2</b>	<b>Isolamento e Purificação dos produtos formados .....</b>	<b>59</b>
3.6	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS .....	62
3.7	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS PLASMAS .....	64
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
4.1	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA MONITORAMENTO DAS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO .....	65
4.2	TRIAGEM .....	67
4.3	MONITORAMENTO DAS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO..	70
<b>4.3.1</b>	<b>Bioconversão do LASSBio 579 .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Cinética de Bioconversão .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Produção de derivados em escala semi-preparativa .....</b>	<b>87</b>
4.3.3.1	1° Ensaio (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244) ....	88
4.3.3.2	2° Ensaio (Cepa: <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023) .....	89
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS .....	89
<b>4.4.1</b>	<b>LaBioCon 23 (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244) .....</b>	<b>94</b>
<b>4.4.2</b>	<b>LaBioCon 24 (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244) .....</b>	<b>99</b>
<b>4.4.3</b>	<b>LaBioCon 25 ( Cepa: <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023) ...</b>	<b>102</b>
4.5	ESTUDO DO METABOLISMO ANIMAL .....	109
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>114</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>115</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIOCONVERSÃO

A bioconversão pode ser definida como a conversão química de um substrato usando métodos biológicos ou biocatalisadores (enzimas ou células inteiras, biocatálise ou biotransformação). A biocatálise é a conversão química de um substrato em um produto desejado com a adição de uma enzima livre ou imobilizada enquanto que a biotransformação utiliza células inteiras que contém enzimas necessárias para essa conversão (LERESCHE, MEYER, 2006). O termo biotransformação também refere-se a reações metabólicas *in vivo* (células hepáticas).

Dentre os microrganismos utilizados em reações de biotransformação destacam-se os fungos filamentosos, que são formados por células eucarióticas. O uso de bactérias (organismos procarióticos) está limitado às cepas de Actinomicetos (gêneros: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Mycobacteria* e *Corynebacteria*) por apresentarem um equipamento enzimático similar ao dos fungos. O uso de culturas de microrganismos não está limitado apenas a bactérias ou fungos, algas unicelulares também tem sido empregadas em estudos de biotransformação, além de culturas de células de algumas plantas (AZERAD, 1999).

A bioconversão de compostos orgânicos é uma técnica que tem recebido grande atenção da indústria químico-farmacêutica. Os biocatalisadores empregados nos processos de bioconversão apresentam várias vantagens quando comparados aos catalisadores químicos usuais. Dentre essas vantagens, destacam-se:

- As enzimas são catalisadores muito eficientes. Os processos mediados por enzimas são acelerados, comparados a algumas reações não-enzimáticas correspondentes. A velocidade de reações aumenta cerca de  $10^8$ - $10^9$ , podendo exceder até  $10^{12}$ , o que é muito além da aceleração observada por catalisadores químicos (FABER,2000).
- Diferente dos metais pesados, por exemplo, os biocatalisadores são completamente degradados no meio ambiente (FABER,2000).

- As enzimas são compatíveis entre si. Uma vez que elas atuam sob condições similares, diversas reações biocatalíticas podem ser realizadas em um recipiente. Assim, reações seqüenciais podem ser desenvolvidas usando sistemas multienzimáticos a fim de simplificar processos reacionais (FABER,2000).
- As enzimas são capazes de atuar em uma grande variedade de substratos sintéticos não-naturais. Muitas delas apresentam uma elevada especificidade para um determinado tipo de reação, aceitando uma ampla diversidade estrutural em seus substratos (FABER,2000).
- A biodiversidade enzimática fúngica pode ser demonstrada pela geração de moléculas que podem apresentar atividade farmacológica diferente do fármaco original.
- Seletividade enzimática  
As enzimas são catalisadores altamente seletivos, apresentando todos os tipos de seletividade química essenciais à química orgânica sintética, que são a quimioseletividade, a regioseletividade e a enantioseletividade.

#### Quimioseletividade

As enzimas agem em grupos funcionais específicos, assim, outros sítios da molécula permanecem inalterados. Observa-se uma menor ocorrência de reações paralelas indesejadas, resultando em produtos mais puros e com uma purificação menos trabalhosa quando comparada às catálises químicas (FABER, 2000).

#### Regioseletividade

Devido a estrutura tri-dimensional complexa das enzimas, elas podem distinguir grupos funcionais idênticos situados em regiões diferentes da molécula do substrato (FABER, 2000).

#### Enantioseletividade

As enzimas são formadas por *L*-amino ácidos e assim são catalisadores quirais. Dessa forma, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é reconhecido formando o complexo enzima-substrato. Substratos pró-quirais podem ser transformados em produtos opticamente ativos e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir em diferentes

velocidades e serem separados por resolução cinética (ABOURASHED, CLARK, HUFFORD, 1999; FABER, 2000).

Um exemplo de seletividade enzimática pode ser observado pela biotransformação estereoseletiva do antidepressivo tricíclico doxepina por *Cunninghamella elegans* (Figura 1.1). A doxepina apresenta-se como uma mistura das formas *cis* (*Z*) e *trans* (*E*). Após incubação identificaram-se os seguintes metabólitos: (*E*)-3-hidroxi-*N*-desmetildoxepina, (*E*)-4-hidroxi-*N*-desmetildoxepina, (*E,Z*)-8-hidroxi-*N*-desmetildoxepina, (*E*)-2-hidroxi-*N*-desmetildoxepina, (*E*)-3-hidroxi-do-xepina, (*E*)-2-hidroxi-do-xepina, (*Z*)-8-hidroxi-do-xepina, (*E*)-*N*-desmetildoxepina, (*E*)-doxepina-*N*-óxido, (*E*)-*N*-formil-*N*-desmetildoxepina, (*E*)-*N*-acetildidesmetildoxepina, (*E*)-*N*-acetil-*N*-desmetildoxepina (MOODY, FREEMAN, CERNIGLIA, 1999).

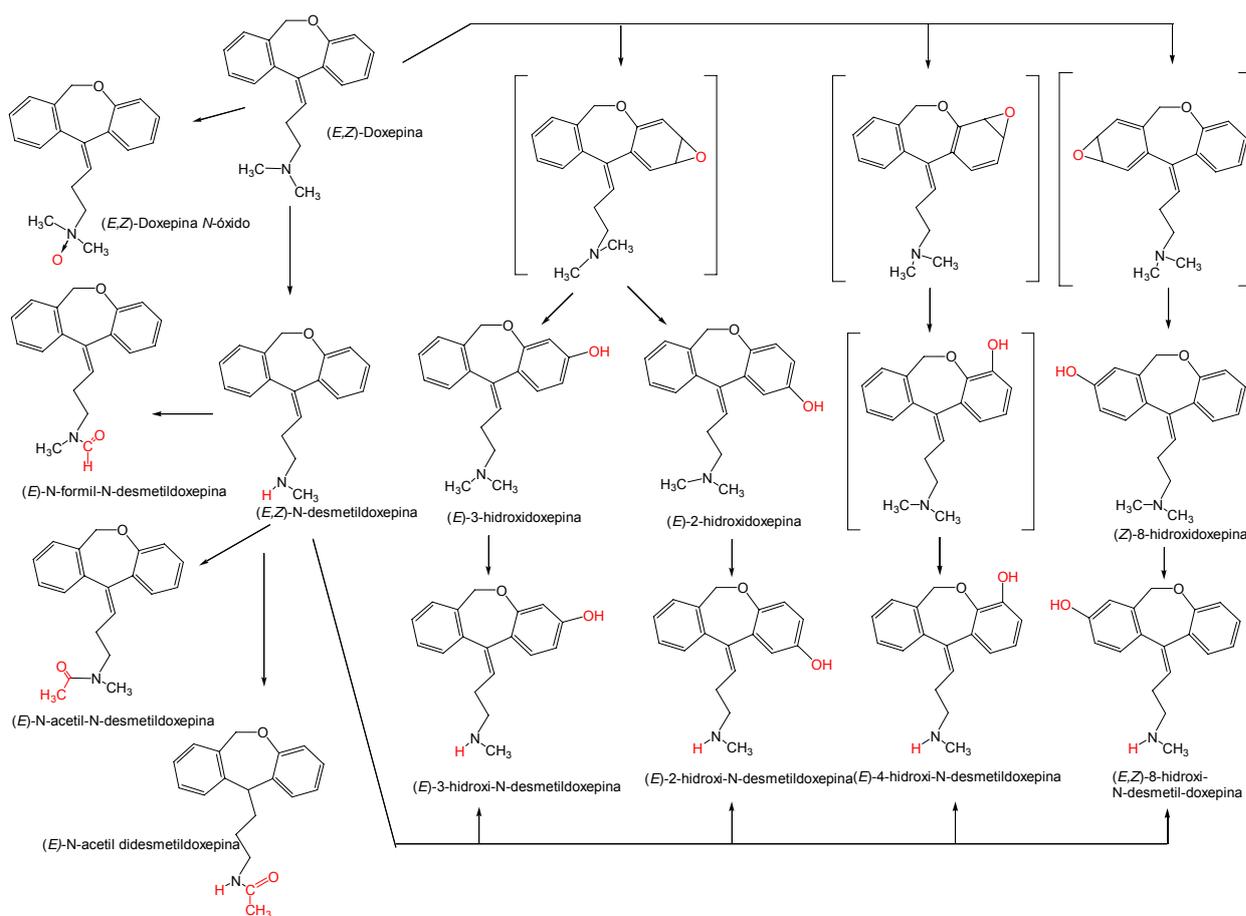


Figura 1.1 – Biotransformação estereoseletiva do antidepressivo doxepina por *Cunninghamella elegans* (MOODY, FREEMAN, CERNIGLIA, 1999).

Um outro exemplo é a síntese de intermediários da buprenorfina, um agonista/antagonista de receptores morfínicos subtipo  $\mu$ , a partir do derivado A da tebaína por reações microbianas de N e O-demetilação regioseletivas com *Cunninghamella echinulata* (Figura 1.2) (ABEL et al., 2003).

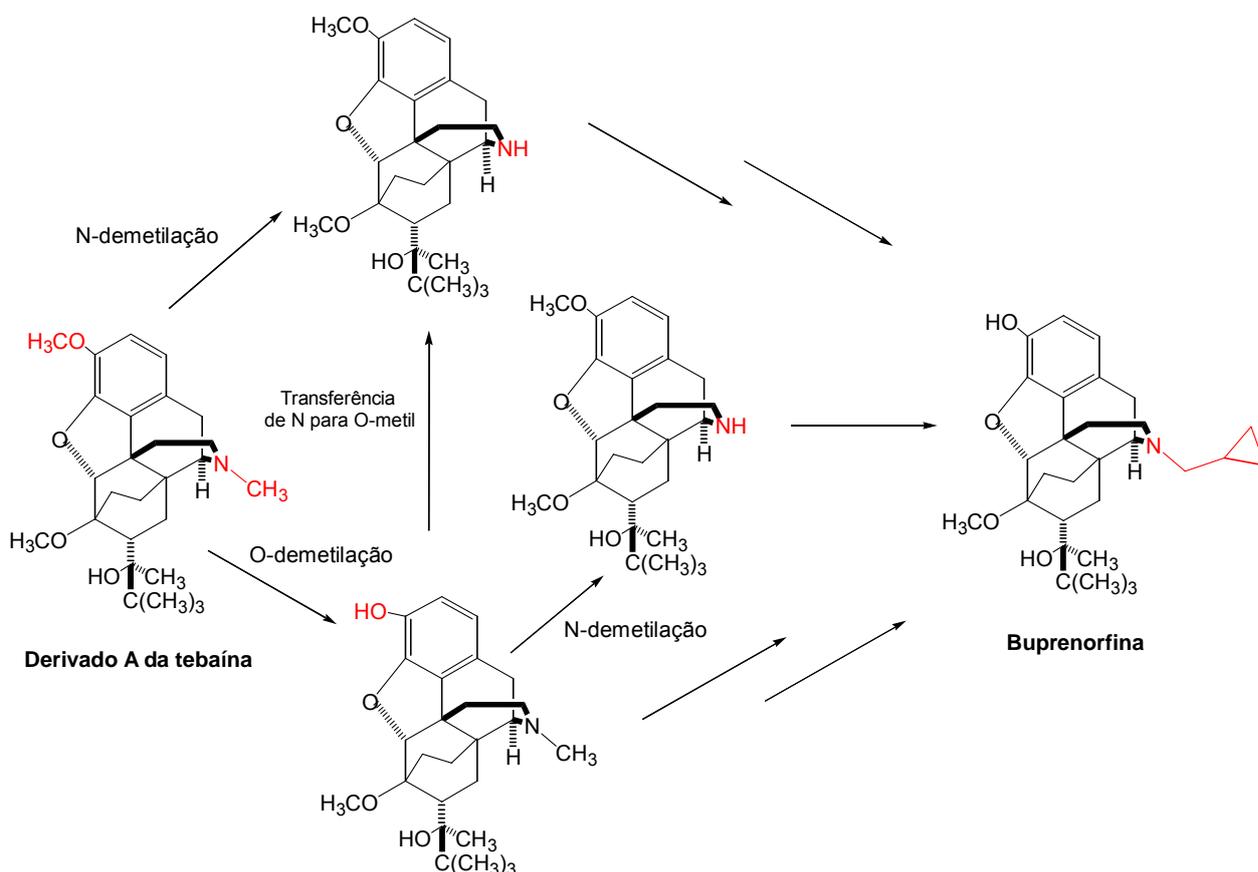


Figura 1.2 – Síntese de intermediários da buprenorfina a partir do derivado A da tebaína com *Cunninghamella echinulata* (ABEL et al., 2003).

No entanto, os biocatalisadores apresentam algumas desvantagens que devem ser destacadas como:

- a dificuldade de se encontrar um biocatalisador adequado e por isso o emprego de extensos procedimentos de seleção (AZERAD, 1999).
- as enzimas são encontradas apenas em uma forma enantiomérica. Assim, não é possível inverter a quiralidade de um processo enzimático simplesmente substituindo o catalisador por seu outro enantiômero, estratégia bastante usada na síntese química (FABER, 2000).
- os baixos rendimentos obtidos podem ocorrer devido a grande variedade de produtos formados.

### 1.1.1 Fatores que influenciam no processo de bioconversão

As condições reacionais de incubação desempenham um papel fundamental na obtenção de processos biocatalíticos eficientes na produção de derivados de interesse. Parâmetros como a composição do meio, a velocidade de agitação e aeração, o pH e a temperatura influenciam tanto na morfologia das colônias quanto na produtividade dos microrganismos.

Fungos filamentosos são microrganismos morfológicamente complexos que apresentam diferentes formas estruturais durante todo o ciclo de vida. Quando se desenvolvem em cultura submersa, estes fungos exibem várias formas morfológicas diferentes, variando de filamentos miceliais dispersos a massa micelial densa conhecida como “pellets”. Essa forma não é determinada apenas pelo material genético da espécie fúngica, mas também pela natureza do inóculo bem como pelas condições químicas (constituintes do meio, concentração dos componentes) e físicas (temperatura, pH, agitação). A mudança na morfologia durante o crescimento afeta o consumo de nutrientes e a taxa de oxigênio na cultura submersa. (PAPAGIANNI, 2004). A formação de metabólitos por fungos na forma de “pellets” é reduzida e a principal causa é a limitação no transporte de nutrientes e oxigênio para as células no interior dos “pellets” (GIBBS et al., 2000).

Estudos mostraram que informações sobre a morfologia dos “pellets” produzidos são importantes para estabelecer rendimentos, se forem pequenos poderiam oferecer uma menor barreira para difusão de O<sub>2</sub> e outros nutrientes apresentando rendimentos mais elevados do que quando compactos e grandes (GIBBS et al., 2000).

O meio utilizado em culturas submersas influencia tanto no crescimento quanto na produção dos metabólitos. Fungos necessitam de água, oxigênio molecular, carbono, nitrogênio, podendo ser necessário fósforo, potássio, magnésio dentre outros vários elementos. Todos os fungos filamentosos são heterotróficos e utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Os mais empregados são os açúcares (D-glucose, D-frutose, sucrose), seguidos de polissacarídeos, aminoácidos, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, álcool e até hidrocarbonetos. Em estudos de bioconversão podem ser empregados diversos tipos de meios diferentes, desde que atendam a uma composição mínima como

descrita acima. A agitação do meio deve ser constante, permitindo uma homogeneidade do sistema e a transferência de calor e oxigênio por toda a biomassa dentro do recipiente de incubação (PAPAGIANNI, 2004).

O O<sub>2</sub> não é o único nutriente que pode tornar-se limitante devido a uma pobre agitação, mas é provavelmente o mais importante fisiologicamente, pois uma limitação de O<sub>2</sub> pode resultar na supressão ou até na inibição total da produção de metabólitos em fungos aeróbios (GIBBS et al., 2000; PAPAGIANNI, 2004). No entanto, uma agitação muito vigorosa durante a incubação cria forças que podem afetar os microrganismos de diversas maneiras, por exemplo, danificando a estrutura das hifas, causando mudanças morfológicas, bem como, variações na taxa de crescimento e na formação do produto (PAPAGIANNI, 2004).

O pH do meio é um fator muito importante freqüentemente negligenciado e que tem afetado a morfologia fúngica. O pH de uma solução pode ser mensurado pela concentração de íons H<sup>+</sup> presentes. Diferentes valores de pH podem ser observados durante a incubação e estarem relacionados ao transporte de nutrientes, a solubilização de nutrientes, a reações enzimáticas ou a fenômenos de superfície. Os fungos podem crescer sobre uma larga escala de pH, sendo que a maioria tolera uma escala de pH de 4 a 9, mas atingem o máximo crescimento e esporulação próximo da neutralidade (PAPAGIANNI, 2004).

A composição do meio pode afetar o pH inicial e a extensão e o sentido desse pH durante o crescimento dos fungos. Meios pouco tamponados contendo sais de amônia tornam-se provavelmente mais ácidos durante o crescimento, enquanto os meios que contêm nitrato tornam-se mais alcalinos. Minimizar as variações do pH durante o crescimento é o objetivo desejável, porém difícil de conseguir. As altas concentrações de íons, como fosfato, são utilizadas para alcançar pH estáveis, principalmente quando se deseja medir a atividade biológica, como crescimento e atividade enzimática (PAPAGIANNI, 2004).

Há poucos estudos a respeito dos efeitos da temperatura no crescimento e na produção de metabólitos por fungos filamentosos. A temperatura é um parâmetro ambiental facilmente controlável e que pode provocar mudanças em outras variáveis, como taxa de crescimento, oxigênio dissolvido e pH (PAPAGIANNI, 2004).

## 1.2 METABOLISMO DE FÁRMACOS

A aprovação de um fármaco para uso terapêutico depende de extensivos estudos os quais estabeleçam a sua eficácia e segurança. A elucidação do metabolismo de fármacos constitui uma etapa importante e necessária para essa avaliação (AZERAD, 1999).

As biotransformações de fármacos são consideradas como reações de detoxificação, resultando em substâncias mais polares que são mais facilmente eliminadas do organismo. Os fármacos são metabolizados por processos enzimaticamente catalisados. Várias enzimas encontradas no organismo, específicas ou não, catalisam o metabolismo de xenobióticos de forma estereoespecíficas, com o objetivo de converter o fármaco lipofílico em metabólitos mais polares facilitando a eliminação (AZERAD, 1999; WILLIAMS, 2002).

O fígado é o maior sítio de metabolismo de fármacos, embora outras enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos sejam encontradas em tecido nervoso, pulmão, rim, plasma e trato gastrointestinal (WILLIAMS, 2002).

O processo de metabolismo de xenobióticos envolve dois tipos de transformações classificadas como reações de Fase I (funcionalização) e Fase II (conjugação) (WILLIAMS, 2002).

As reações de biotransformação podem envolver hidroxilação de carbonos alifáticos ou aromáticos, *N*-, *O*-, ou *S*- dealquilação, epoxidação, oxidação de heteroátomos (N, S e P), redução, glicuronidação, sulfatação e acetilação (ABOURASHED; CLARK; HUFFORD, 1999; AZERAD, 1999; WILLIAMS, 2002).

### 1.2.1 Reações de Fase I

As reações de Fase I incluem oxidação, redução e hidrólise. Nessas reações enzimáticas um novo grupo funcional é introduzido na molécula do substrato, um grupo funcional existente é modificado, ou um grupo funcional ou um sítio acceptor para reações de transferência de fase II é exposto, tornando assim o xenobiótico mais polar e conseqüentemente mais facilmente excretado (FURA, 2006).

As reações de oxidação de Fase I são as mais comuns e importantes no metabolismo de xenobióticos e dependem da participação de várias enzimas, destacando-se o citocromo P450 (CYP450), um sistema enzimático da hemeoproteína oxidativa que se apresenta solúvel no citoplasma de células procarióticas e localiza-se na membrana de mitocôndrias e retículo endoplasmático liso do fígado e de outros tecidos extra-hepáticos de células eucarióticas (WILLIAMS, 1995; AZERAD, 1999).

O CYP450 funciona como um sistema transportador de elétrons responsável pelo metabolismo oxidativo de várias substâncias endógenas (esteróides, prostaglandinas, e ácidos biliares), e substratos exógenos (xenobióticos) incluindo carcinógenos, inseticidas, poluentes ambientais e fármacos, como a atorvastatina, um hipocolesterolêmico, que é metabolizado pelo CYP450 em dois metabólitos ativos, 2- e 4- hidroxiatorvastatina por hidroxilação aromática (Figura 1.3).

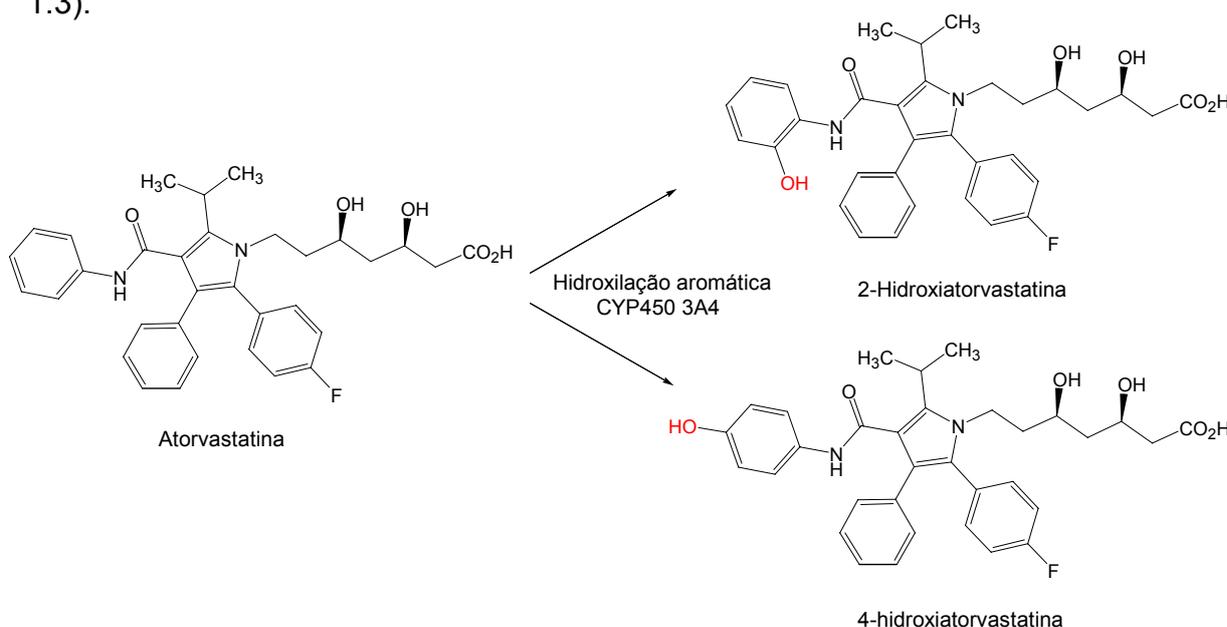


Figura 1.3 – Metabólitos ativos obtidos por meio de reação de biotransformação Fase I, hidroxilação aromática da atorvastatina. (FURA, 2006).

As reações de hidrólise são catalizadas por esterases e podem ser facilmente mimetizadas por uma das numerosas preparações de enzimas purificadas disponíveis comercialmente.

A maioria das reações de redução envolve a redução por um NAD(P) desidrogenase H-dependente de um composto cetônico a um álcool secundário esteriomérico correspondente (AZERAD, 1999).

### 1.2.1.1 Sistema enzimático CYP450

O CYP450 apresenta no mínimo dois componentes protéicos: uma hemoproteína chamada citocromo P450 e uma flavoproteína chamada NADPH-CYP450 redutase contendo uma flavina mononucleotídeo (FMN) e uma flavina dinucleotídeo (FAD). CYP450 funciona como o sítio de ligação do substrato e do oxigênio, visto que a NADPH-CYP450 redutase atua como transportadora de elétrons do NADPH para o CYP450. A fosfatidilcolina é outro componente essencial para o transporte de elétrons facilitando a transferência de elétrons de NADPH-CYP450 redutase para CYP450 (WILLIAMS, 2002).

Dos três componentes envolvidos no metabolismo oxidativo microsomal, o CYP450 é importante devido ao seu papel vital na ativação do oxigênio e na ligação ao substrato. O sítio ativo do CYP450 consiste de um domínio ligado ao substrato hidrofóbico no qual se encontra o grupo prostético ferro protoporfirina (heme) que está coordenado com quatro nitrogênios no anel porfirínico. O ligante tiol da cisteína funciona como um quinto ligante ao átomo de ferro do grupo heme e está presente em todos os estágios da enzima sendo o responsável pela característica de absorção óptica em 450nm. A sexta posição é ocupada por uma molécula de água que é facilmente trocada por ligantes mais fortes como aminas, imidazóis, e pirimidinas (Figura 1.4) (OMURA, 1999; WILLIAMS, 2002).

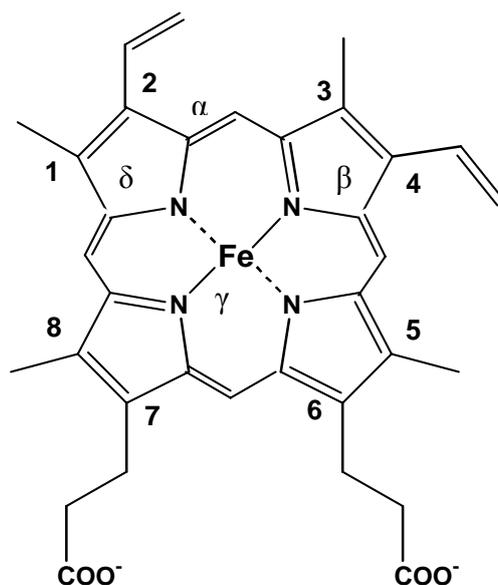


Figura 1.4 - Estrutura do grupo heme (ferro protoporfirina IX, heme b) (SONO et al., 1996).

O sistema completo é não-específico, catalisando diversos tipos de reações incluindo: a oxidação de alcanos e compostos aromáticos, a epoxidação de alcenos, hidrocarbonetos policíclicos, e benzenos halogenados, a dealquilação de aminas secundárias e terciárias, a deaminação de aminas, provavelmente devido a não-seletividade da enzima e também pela existência de numerosas isoenzimas (SONO et al, 1996; AZERAD, 1999).

O CYP450 tem uma necessidade por NADPH (forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). A função mais importante do CYP450 é a sua habilidade para ativar o oxigênio molecular, permitindo a incorporação de um átomo de oxigênio em uma molécula de substrato orgânico concomitante com a redução de outro átomo de oxigênio a água. A introdução de um grupo hidroxil no substrato hidrofóbico fornece um local para uma subsequente conjugação com compostos hidrofílicos (Fase II), aumentando a solubilidade em água do produto para seu transporte e excreção do organismo (SONO et al, 1996; ORTIZ, 2000; WILLIAMS, 2002).

#### 1.2.1.2 Família do CYP450

As enzimas do CYP450 formam uma grande família (superfamília) de enzimas correlatas, porém distintas. Essas enzimas diferem uma da outra na sua seqüência de aminoácidos, na regulação por agentes inibidores e indutores e na especificidade das reações que catalisam. Os diferentes membros da família exibem especificidades de substratos distintas, porém freqüentemente superpostas, de modo que algumas enzimas atuam sobre os mesmos substratos, porém em diferentes velocidades. Até o momento foram descritas 74 famílias de genes CYP, das quais as três principais (CYP1, CYP2 e CYP3) estão envolvidas no metabolismo de fármacos no fígado humano (GUENGERICH, 1995; BERNHARDT, 2006).

#### 1.2.1.3 Sistema de transporte de elétrons

A principal função do CYP450 é a monooxigenação de vários substratos, que requerem oxigênio molecular e equivalentes redutores como NADPH ou NADH

para as reações. O mecanismo catalítico mostra-se uniforme para as diversas isoformas isoladas do CYP450, interagindo com moléculas do substrato, doadores de elétrons e oxigênio em uma série de etapas (WILLIANS, 2002).

Na primeira etapa, o CYP450 na sua forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) liga-se reversivelmente a molécula do substrato resultando em um complexo similar ao complexo enzima-substrato. A ligação do substrato facilita a primeira etapa da redução de um elétron (Figura 1.5-1).

O complexo substrato-CYP450 férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) submete-se, na segunda etapa, a uma redução formando um complexo substrato-CYP450 ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pela transferência de um elétron do NADPH pela flavoproteína, NADPH-CYP450 redutase do complexo  $\text{FMNH}_2/\text{FADH}$  (Figura 1.5-2).

Durante a terceira etapa o complexo CYP450 reduzido se liga ao oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) como um sexto ligante ferroso para formar o complexo oxiCYP450 (Figura 1.5-3). Este complexo sofre auto-oxidação a ânion superóxido na quarta etapa do ciclo (Figura 1.5-4).

Na quinta etapa, o ânion superóxido férrico sofre uma redução adicional recebendo um segundo elétron da flavoproteína (ou possivelmente do citocromo  $b_5$ ) para formar um complexo reduzido em dois elétrons, peroxiCYP450. O ciclo pode ser interrompido a partir da subsequente hidroxilação do substrato nessa etapa por xenobióticos que podem levar o ânion superóxido a um desequilíbrio formando um peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular regenerando, dessa forma, o ponto inicial do ciclo, o complexo substrato-heme proteína férrica (Figura 1.5-5).

Caso não aconteça a interrupção do ciclo, o complexo peroxiCYP450 sofre, na sexta etapa, uma clivagem heterolítica de ânion peróxido a água e a um intermediário altamente eletrofílico perferril oxinóide ( $\text{Fe}^{5+}=\text{O}$ ) ou um complexo perferril oxigênio-cisteína-porfirina estabilizado por ressonância. Essa espécie perferril oxigênio representa a espécie cataliticamente ativa da oxigenação (Figura 1.5-6).

Na sétima etapa, a retirada de um hidrogênio do substrato pelo perferril oxigênio transfere o radical hidroxila periférico para o carbono central, a adição do radical em ligação  $\pi$  ou a retirada de um elétron de um heteroátomo para formar um radical catiônico central no heteroátomo do intermediário perferril (Figura 1.5-7).

Na última etapa, a recombinação subsequente do radical (religação do oxigênio) ou transferência de elétrons (deprotonação) rende produtos hidroxilados e a geração de um complexo enzimático CYP450 férrico (Figura 1.5-8).

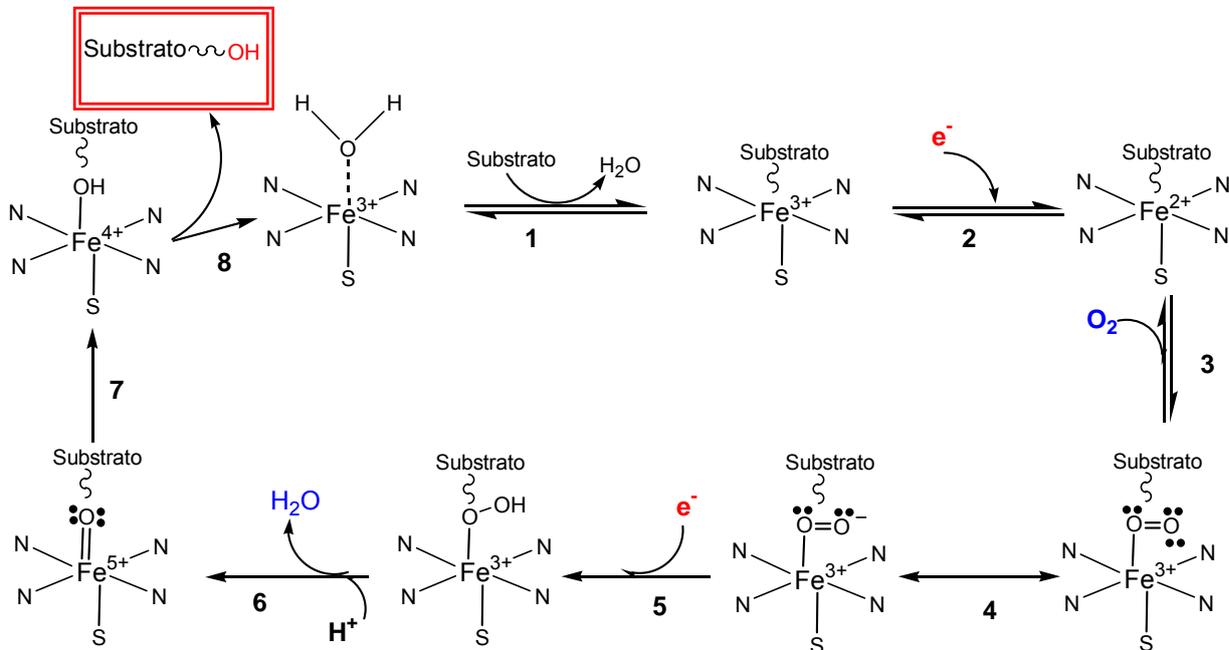


Figura 1.5 – Ciclo catalítico do citocromo P450 (WILLIAMS, 2002).

### 1.2.2 Reações de Fase II

Os xenobióticos geralmente são lipofílicos, bem absorvidos no sangue, mas lentamente excretados na urina. Somente após a adição de uma molécula iônica hidrofílica, tal como ácido glicurônico, sulfato ou glicina ao xenobiótico por meio de reações de Fase II é que sua solubilidade em água aumenta o suficiente para tornar a eliminação renal possível. Reações de conjugação podem ser precedidas por reações de Fase I, basta o xenobiótico funcionalizado apresentar um grupo funcional disponível para a conjugação. Essas reações de conjugação são mediadas por enzimas tal como glicuroniltransferase, sulfotransferase e N-acetiltransferase (WILLIAMS, 2002; FURA, 2006).

As maiores reações de conjugação (glicuronidação e sulfatação) foram consideradas responsáveis por finalizar a atividade farmacológica transformando o fármaco ou o metabólito de Fase I em produtos iônicos polares prontos para serem

excretados. Além disso, esses metabólitos finais não teriam nenhuma atividade farmacológica significativa, porém, observou-se que isso poderia não acontecer, com a descoberta de que a morfina 6-glicuronídeo tem maior atividade analgésica que a morfina em humanos (RITTER, 2000) e que o sulfato de minoxidil é o metabólito ativo do anti-hipertensivo minoxidil (ANDERSON, et al., 1998) (Figura 1.6).

Para a maioria dos xenobióticos, a conjugação é um mecanismo de detoxificação, mas alguns compostos, entretanto, formam intermediários reativos que tem sido envolvido em carcinogênese, reações alérgicas e danos teciduais (WILLIAMS, 2002).

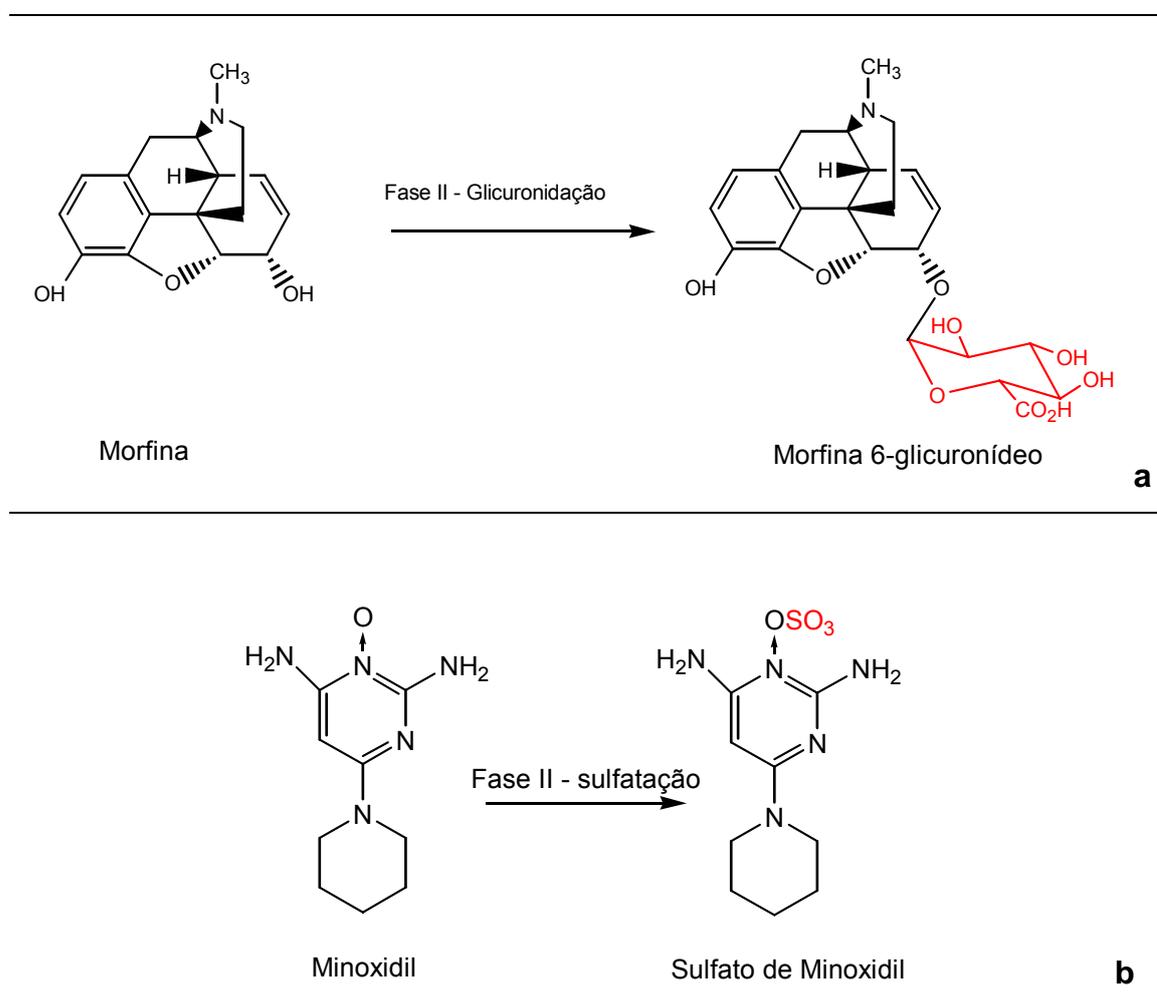


Figura 1.6 - Exemplos de metabólitos obtidos por meio de reações de biotransformação Fase II (conjugação): glicuronidação da morfina (a) (RITTER, 2000) e sulfatação do minoxidil (b) (ANDERSON, et al., 1998).

### 1.3 MODELO MICROBIANO DO METABOLISMO ANIMAL

Fungos filamentosos são encontrados no ambiente, habitando nichos ecológicos como o solo, plantas e material orgânico. A habilidade dos fungos de adaptar rapidamente seu metabolismo variando fontes de carbono e nitrogênio é um aspecto fundamental a sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica é conseguida pela presença de um grande conjunto de enzimas intra e extracelulares capazes de degradar biopolímeros complexos. Além da produção e secreção de enzimas, os fungos filamentosos podem secretar uma diversidade de metabólitos primários e secundários (antibióticos) e executar muitas conversões complexas como a hidroxilação de hidrocarbonetos poliaromáticos complexos e compostos esteróidais. Evidências bioquímicas indicaram que esses, e outros, tipos de bioconversões são frequentemente mediados por enzimas monooxigenases pertencentes à superfamília do CYP450 (BRINK et al, 1998).

Após o primeiro experimento de hidroxilação catalisado pelo sistema enzimático de um fungo filamentoso, realizado em 1952 por Peterson e Murray, o interesse por modelos de bioconversões por via microbiológica cresceu muito. A examinação sistemática de hidroxilações microbianas em uma variedade de compostos aromáticos, seguida pela comparação de reações de *O*- e *N*-dealquilação, induziram Smith e Rosazza (1974) a propor que o sistema microbiano poderia mimetizar a maioria das reações de Fase I de fármacos observadas em mamíferos e que microrganismos poderiam também ser empregados de forma preditiva, em que os metabólitos microbianos poderiam ser similares ou idênticos àqueles formados por sistemas animais definindo, assim, o sistema microbiano como Modelo Microbiano do Metabolismo Animal (SMITH, ROSAZZA, 1974; ABOURASHED, CLARK, HUFFORD, 1999; AZERAD, 1999).

Tradicionalmente estudos metabólicos são realizados em modelos animais, perfusão de órgãos e culturas de células malignas ou normais. Modelos microbianos podem constituir uma alternativa, ou pelo menos, um complemento ao uso do sistema animal, desde que possam mimetizar o metabolismo de mamíferos e proporcionar alguma informação pertinente sobre a rota metabólica de fármacos (AZERAD, 1999).

Algumas vantagens no uso do sistema microbiano como modelo para o metabolismo de fármacos são: meios de cultura simples de fácil preparo e baixo custo, a triagem para a escolha da cepa é um processo repetitivo simples, as concentrações usadas são maiores que àquelas empregadas em modelos de células ou tecidos (geralmente de 0,2 a 0,5 g/L), facilitando a detecção, isolamento e identificação estrutural (ABOURASHED, CLARK, HUFFORD, 1999; AZERAD, 1999).

A utilização de sistemas enzimáticos, como o CYP450 ainda é limitada devido às dificuldades de purificação e ao alto custo. A purificação do CYP450 poderia representar um avanço nos estudos de modelagem molecular que contribuiriam para elucidação do mecanismo de ação em nível molecular, entretanto por se tratar de um processo bastante complexo, uma vez que estas enzimas encontram-se nas membranas de células, para algumas reações é mais vantajoso a utilização de organismos inteiros, como bactérias e fungos filamentosos, dotados dessa enzima (ABOURASHED, CLARK, HUFFORD, 1999; AZERAD, 1999).

### **1.3.1 Monoxigenases fúngicas e suas aplicações no Metabolismo Microbiano de Fármacos**

Diversas reações catalisadas por monooxigenases de microrganismos tem sido aplicadas para a funcionalização pontual de numerosas substâncias, naturais ou sintéticas.

A habilidade de diferentes fungos filamentosos, como *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata*, *Beauveria bassiana* e *Mortierella isabelina* em promoverem funcionalizações em diversos substratos têm sido descrita por estudos de Cerniglia et al., 1982; Griffiths et al., 1991; Rao, Davis, 1997; Alexandre et al., 2004 (BRINK et al., 1998).

Smith e Rosazza, em 1983, testaram a capacidade de microrganismos em promoverem hidroxilações aromáticas de um número de substratos aromáticos. *Aspergillus ochraceous*, espécies de *Streptomyces* e *Cunninghamella*, *Curvularia lunata* foram os microrganismos utilizados. Eles foram escolhidos como potenciais modelos microbianos de hidroxilações aromáticas de substratos como: cumarina, naftaleno, nitrobenzeno, tolueno, dentre outros. A seleção dos substratos foi baseada no fato de que cada composto tem sido estudado em sistemas animais,

permitindo a comparação entre os sistemas animais e microbianos em relação ao metabolismo de fármacos (SMITH, ROSAZZA, 1983).

Foster et al. demonstrou a bioconversão do bloqueador beta adrenérgico por *Cunninghamella echinulata* (Figura 1.7) que propiciou a formação de quatro metabólitos hidroxilados na cadeia lateral (desisopropilpropranolol, 1-ácido nafitoxilático, propranolol glicol, 1-ácido nafitoxiacético) e um metabólito hidroxilado no anel aromático (4-hidroxiopropranolol). Os cinco metabólitos Fase I também foram observados na biotransformação deste composto em humanos, indicando a importância deste fungo em estudos de metabolismo (FOSTER et al., 1989).

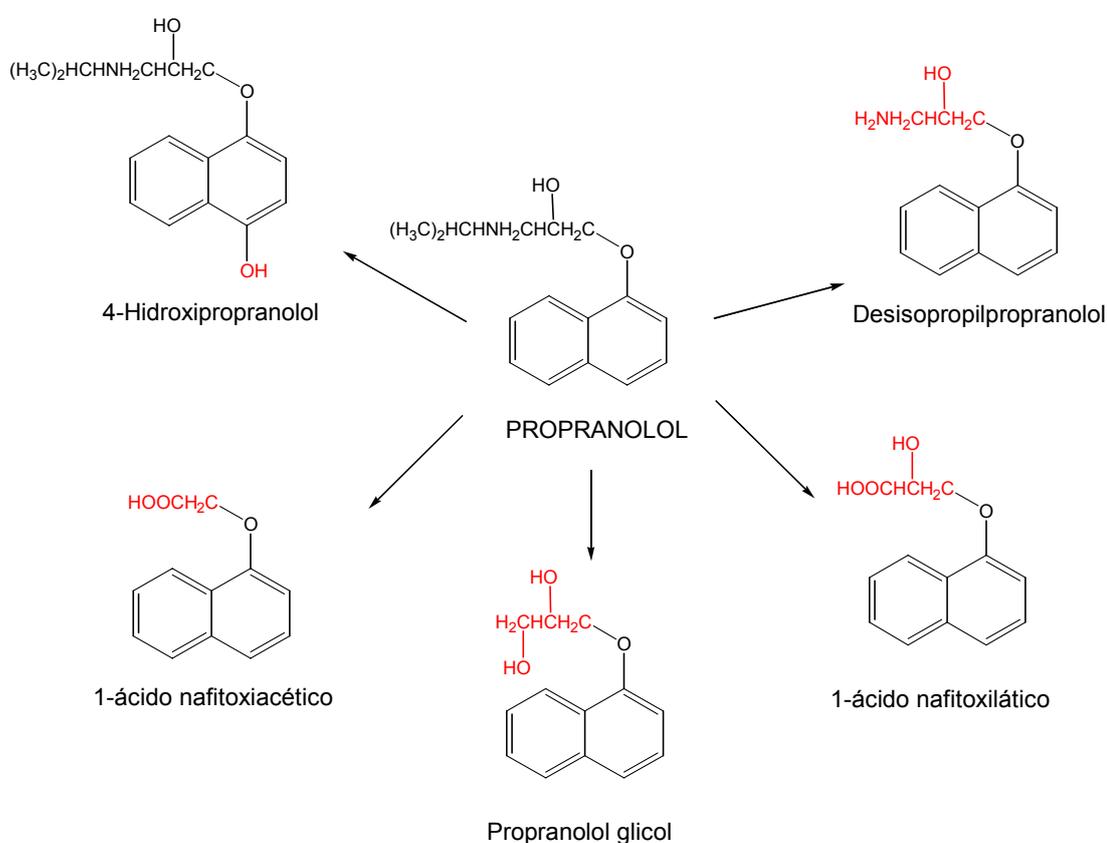


Figura 1.7 – Bioconversão do propranolol por *Cunninghamella echinulata* e seus metabólitos fúngicos Fase I também observados em humanos (FOSTER et al., 1989).

A bioconversão do anticoagulante warfarina por *Cunninghamella elegans* é um exemplo da redução de compostos cetônicos a álcoois estereoisoméricos. A warfarina é reduzida na cetona da cadeia lateral formando os produtos alcoólicos, 9R-warfarina-11R-álcool; 9S-warfarina-11S-álcool; 9R-warfarina-11S-álcool e 9S-warfarina-11R-álcool (Figura 1.8) (WONG, DAVIS, 1989).

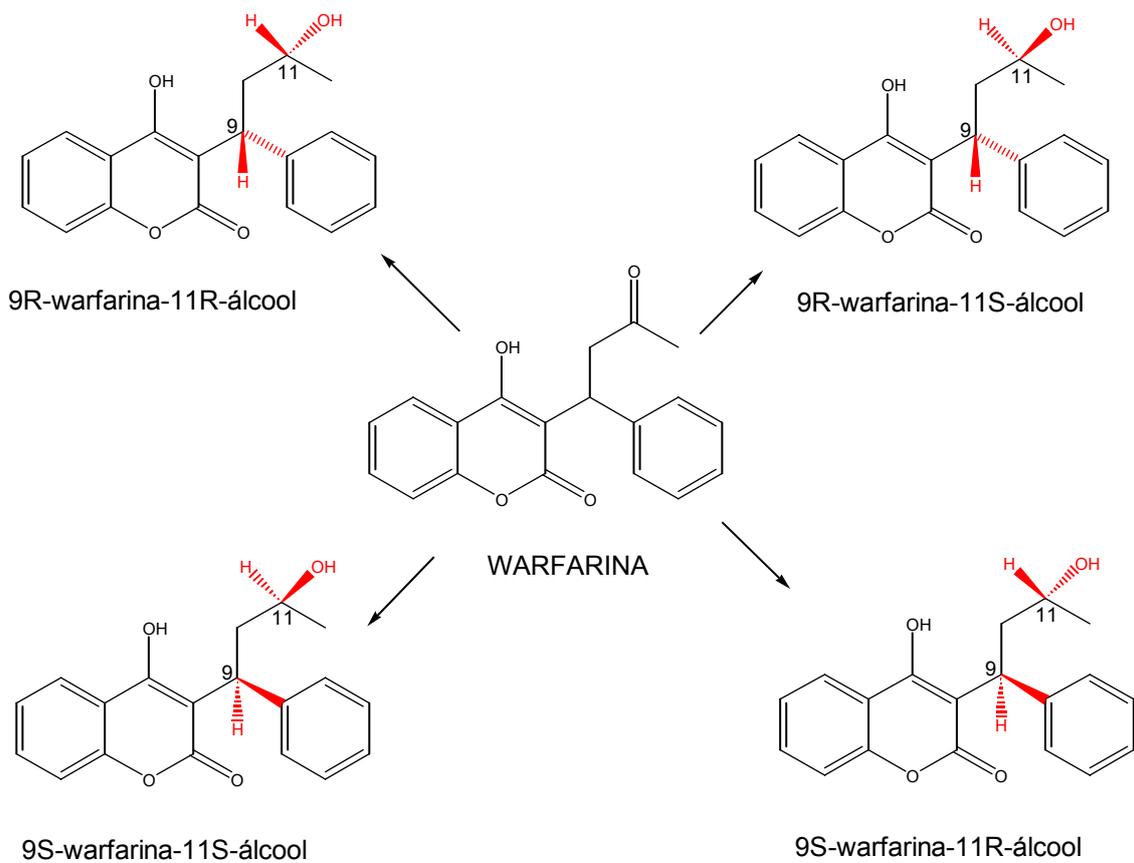


Figura 1.8 – Bioconversão do anticoagulante, warfarina, por *Cunninghamella elegans* (WONG, DAVIS, 1989).

A transformação microbiana de 7,4'-diacetoxidaidzeína, uma isoflavona, por *Aspergillus niger* promoveu a hidrólise nos carbonos 7 e 4' gerando o composto daidzeína como mostra a Figura 1.9 (MIYAZAWA et al., 2004).

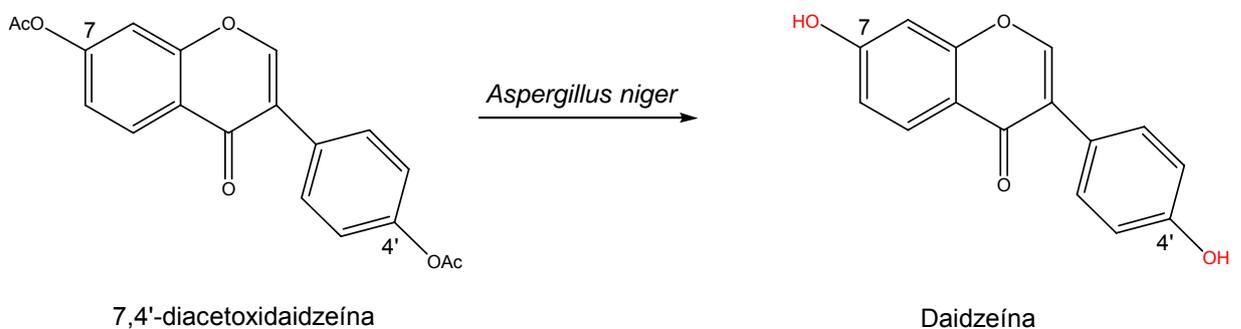


Figura 1.9 - Hidrólise da 7,4'-diacetoxidaidzeína por *Aspergillus niger* levando a produção da daidzeína (MIYAZAWA et al., 2004).

O estudo do metabolismo do agonista colinérgico e noradrenérgico besipirdina por *Cunninghamella elegans* mostrou-se satisfatório para a preparação de metabólitos humanos hidroxilados e/ou dealquilados. A incubação deste composto proporcionou a formação de quatro metabólitos (A, B, C e D), sendo que três deles (A, C e D) tem sido reportados em sistemas animais como mostra a Figura 1.10. A cepa foi utilizada como modelo microbiano do metabolismo animal para geração de metabólitos animais para análises estrutural e toxicológica (RAO, DAVIS, 1997).

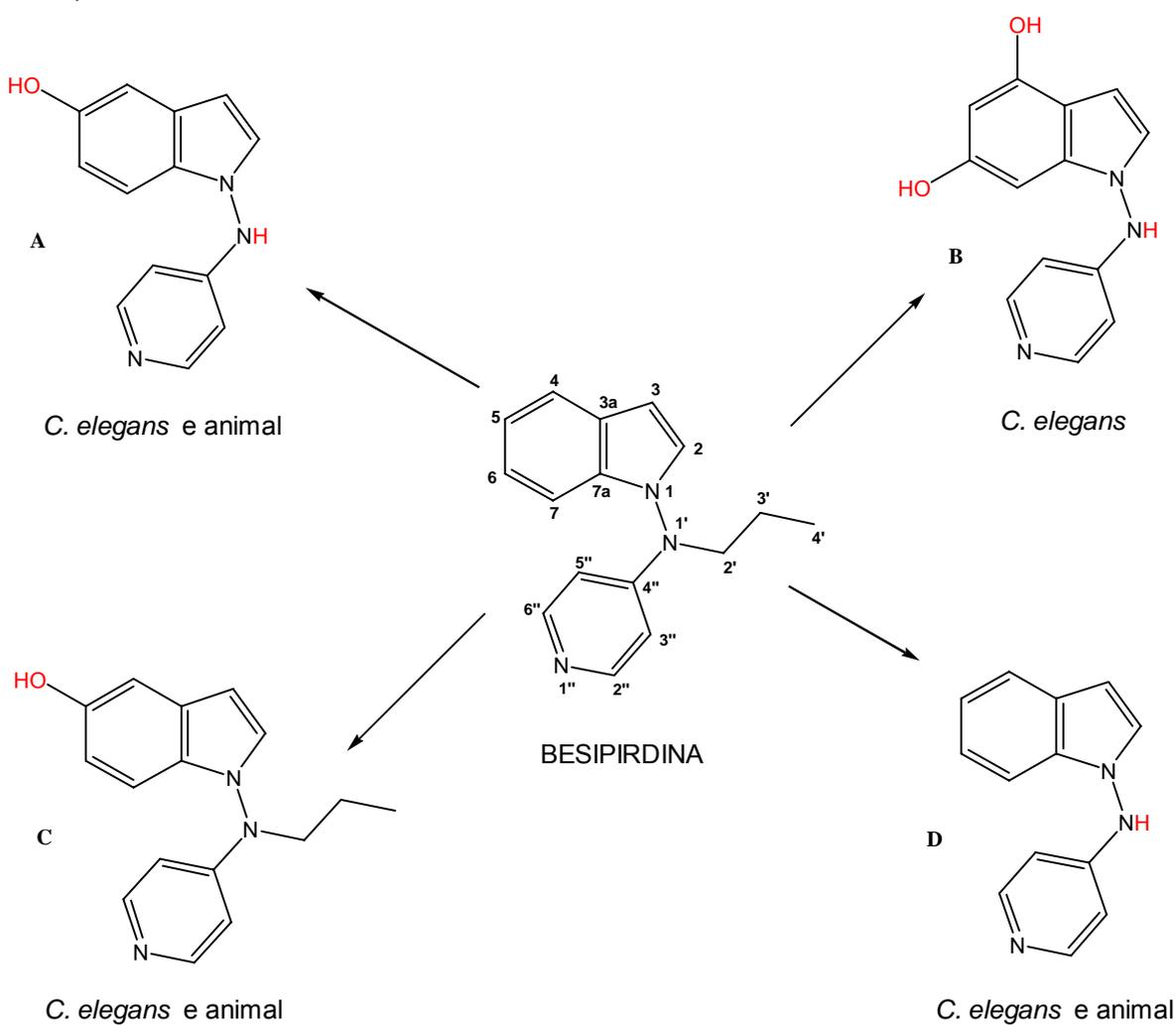


Figura 1.10 – Bioconversão da besipirdina por *Cunninghamella elegans* gerando quatro metabólitos (A, B, C e D), sendo que três deles são encontrados no metabolismo animal (A, C e D) (RAO, DAVIS, 1997).

A atividade metabólica de *Cunninghamella elegans* promoveu a obtenção de metabólitos hidroxilados do inibidor da bomba de prótons, omeprazol. Dos seis metabólitos observados a partir dessa incubação (A, B, C, D, E, F), três

correspondem a metabólitos de eqüinos (A, B, C) como mostra a Figura 1.11(PEARCE, LUSHNIKOVA, 2006).

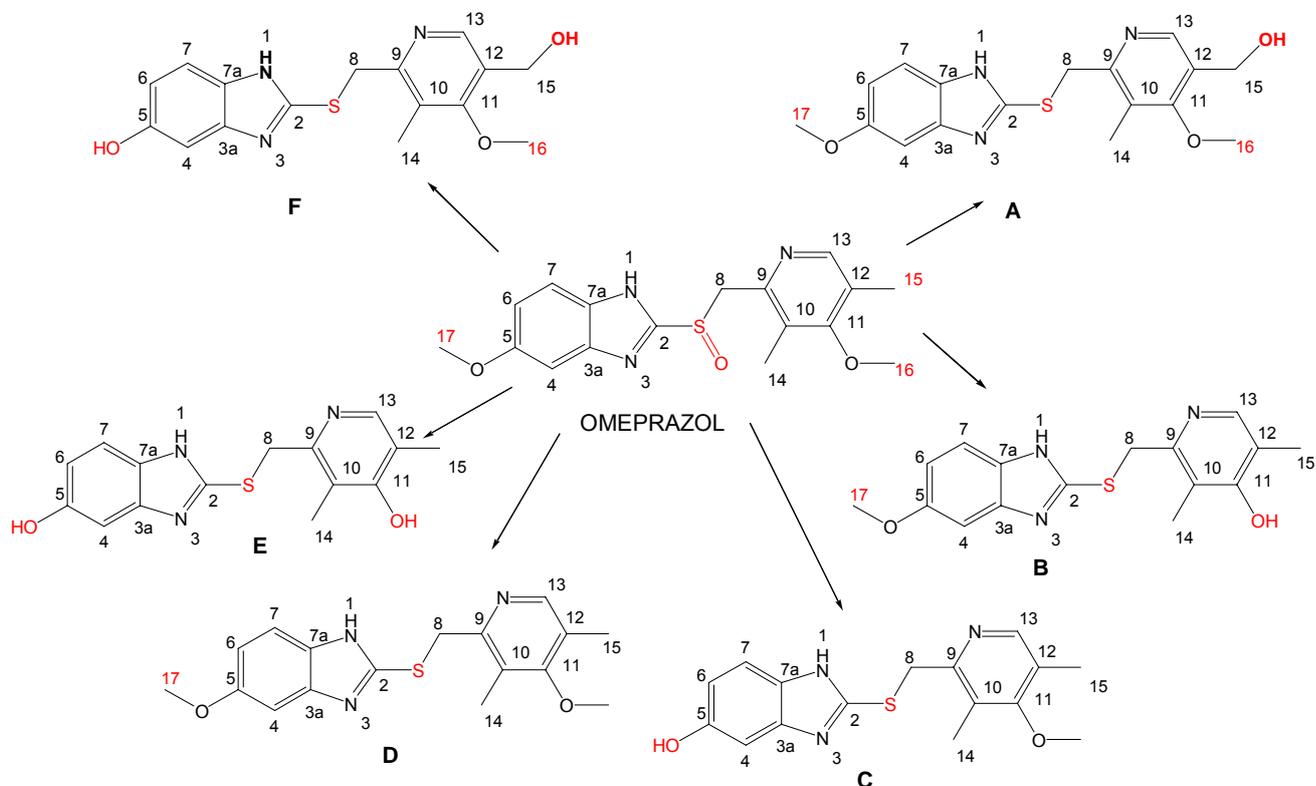


Figura 1.11 – Bioconversão do omeprazol por *Cunninghamella elegans* produzindo seis metabólitos (A, B, C, D, E, F) sendo que três deles correspondem a metabólitos animais (A, B, C) (PEARCE, LUSHNIKOVA, 2006).

As reações de glicosilação podem ser observadas por alguns microrganismos, dentre eles, fungos filamentosos como *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella isabelina*, dentre outros.

Como exemplo de biotransformações Fase I e Fase II realizadas no Laboratório de Bioconversão (LaBioCon), destacam-se a bioconversão do composto LASSBio 939 (NETTO, 2004), um analgésico e antiinflamatório, sintetizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) por *Beauveria bassiana* propiciando a formação de dois metabólitos, LaBioCon 15 (hidroxilado) e LaBioCon 14 (glicosilado) (Figura 1.12) (CIRILO, 2006).

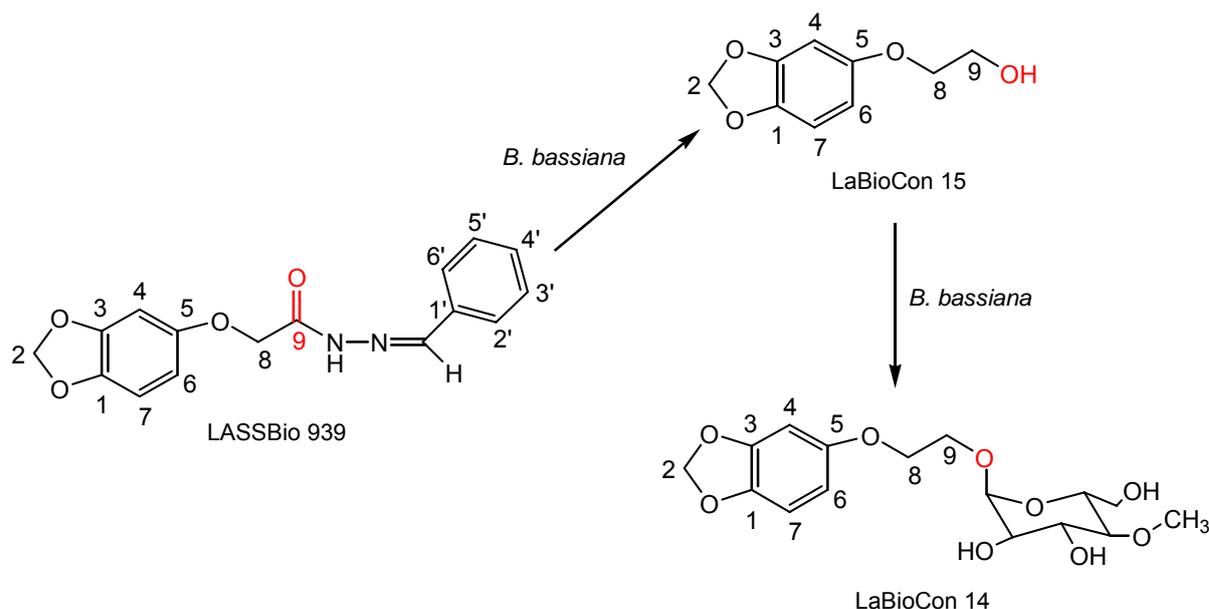


Figura 1.12 – Bioconversão do LASSBio 939 por *Beauveria bassiana* promovendo a obtenção de metabólitos hidroxilado (LaBioCon 15) e glicosilado (LaBioCon 14) (CIRILO, 2006).

Outro exemplo, é a bioconversão do composto *N*-fenilpiperazínico LASSBio 581 (MENEGATTI, 2001), um protótipo de fármaco neuroativo caracterizado por apresentar um anel triazólico em sua estrutura, por *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabelina*, no qual seis produtos foram obtidos (monohidroxilados – LaBioCon 10 e LaBioCon 19, dihidroxilados – LaBioCon 12 e LaBioCon 22, glicosilado – LaBioCon 13 e diglicosilado – LaBioCon 1) (Figura 1.13) (PAZINI, 2006).

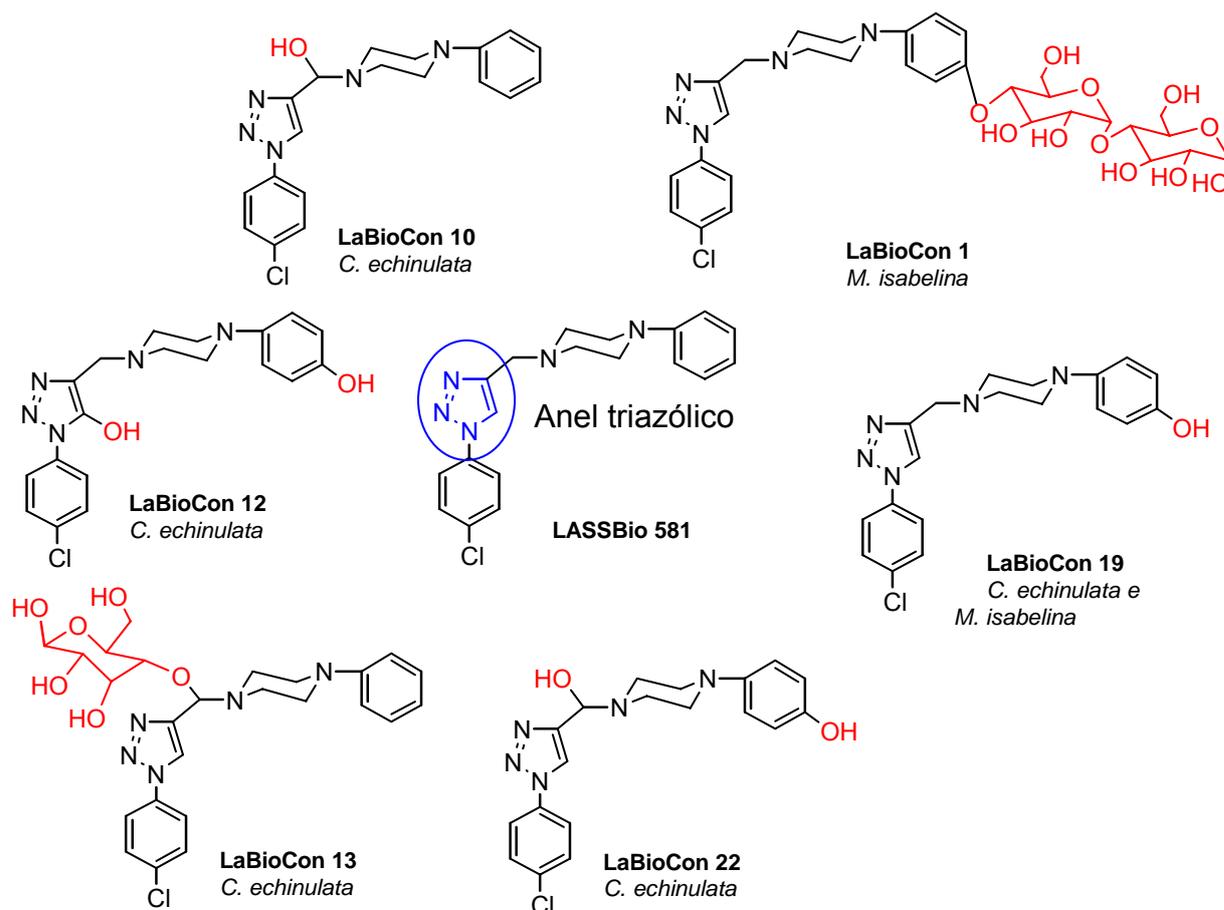


Figura 1.13 – Bioconversão do LASSBio 581 por *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabelina* e obtenção de seis diferentes metabólitos (PAZINI, 2006).

#### 1.4 LASSBIO 579 – POTENCIAL CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACOS

A clozapina é um antipsicótico atípico não-seletivo entre receptores dopaminérgicos  $D_1$  e  $D_2$ , porém com uma alta afinidade por receptores dopaminérgicos  $D_4$ . É capaz de diminuir os efeitos colaterais extrapiramidais da esquizofrenia causados por antipsicóticos clássicos mostrando eficácia nos pacientes resistentes ao tratamento. No entanto, observou-se que a clozapina pode causar graves efeitos hematológicos, como agranulocitose, em cerca de 1-2% dos pacientes (LÜLMANN et al. 2000).

Pelo fato da clozapina ter demonstrado um perfil terapêutico diferenciado dos antipsicóticos clássicos, seu núcleo [8-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-

dibenzo [1-4]diazepina] foi amplamente estudado, buscando obter compostos que apresentassem um perfil terapêutico semelhante, porém, sem os efeitos colaterais.

A partir do emprego de estratégias racionais de modificação molecular sobre a estrutura da clozapina (um antipsicótico atípico), incluindo trocas isostéricas, simplificações estruturais e contrações de anel foi possível hierarquizar as subunidades de maior importância para a atividade central possibilitando a obtenção de novos derivados heterocíclicos (MENEGATTI, 2001).

Para o planejamento desses compostos heterocíclicos foram eleitos dois protótipos ligantes seletivos dos receptores dopaminérgicos, a clozapina, que apresenta restrição conformacional e alta afinidade pelo receptor do subtipo D<sub>4</sub> e o composto L-741, ligante seletivo de receptores do subtipo D<sub>2</sub> que apresenta alta afinidade por esse subtipo de receptor. Dentre os compostos planejados, destaca-se o derivado N-fenil-piperazínico, LASSBio 579, que foi desenvolvido através da hibridização da clozapina e do composto L-741 de modo a manter os grupamentos farmacofóricos necessários para a interação com os receptores dopaminérgicos. Assim, o anel b da clozapina sofreu uma contração a pirazol e recebeu um grupamento aril na posição 1; o anel c foi preservado e um átomo de cloro substituinte na posição para foi introduzido ao anel a. O anel d da clozapina foi transposto para o átomo de nitrogênio distal do anel c piperazina mimetizando a subunidade estrutural **A** presente em L-741. O novo candidato possui o grupamento farmacofórico N-fenilpiperazínico e apresenta núcleo pirazólico, o que o difere do LASSBio 581 citado anteriormente (Figura 1.14) (MENEGATTI et al., 2003).

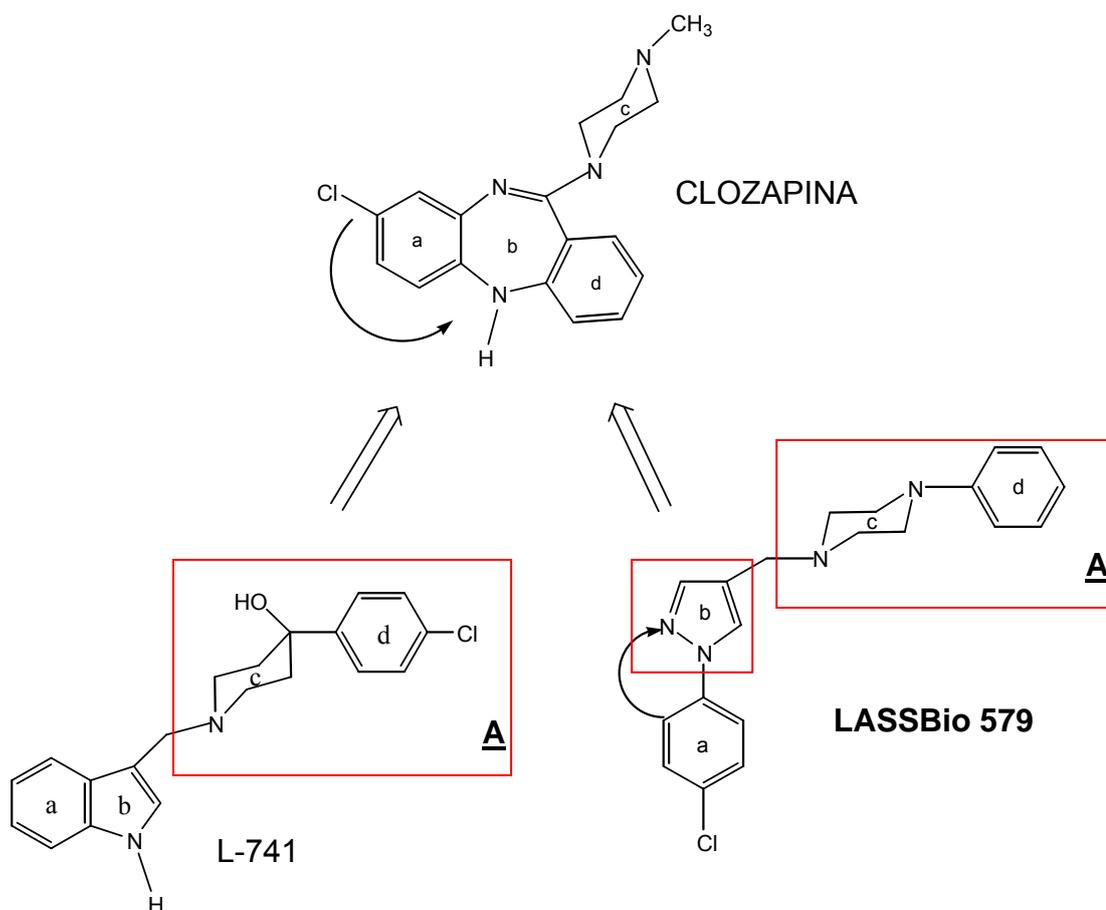


Figura 1.14 - Planejamento estrutural do candidato protótipo a agente anti-psicótico, a partir da clozapina e L-741 (MENEGATTI, 2003).

A Figura 1.15, ilustra a rota sintética empregada na obtenção do intermediário-chave 1-(4-clorofenil)-4-formil-pirazola). O intermediário cloro-fenilhidrazina (52%) foi obtido a partir da diazotação de 4-cloroanilina, com posterior redução empregando cloreto estanho ( $\text{SnCl}_2$ ) em meio ácido. Na etapa seguinte, o intermediário cloro-fenilhidrazina é condensado com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, em etanol sob catálise ácida, logrando no intermediário 1-(4-clorofenil)-1*h*-pirazola (86%). Por fim, o intermediário-chave 1-(4-clorofenil)-4-formil-piperazola (78%) foi obtido a partir da reação de formilação dos intermediário 1-(4-clorofenil)-1*h*-pirazola, via complexo eletrofílico de Vilsmeier-Haack. O LASSBio 579 (77%) foi obtido através da reação do intermediário-chave pirazólico substituído 1-(4-clorofenil)-4-formil-piperazola e da *N*-fenilpiperazina, via aminação redutiva (MENEGATTI, 2001).

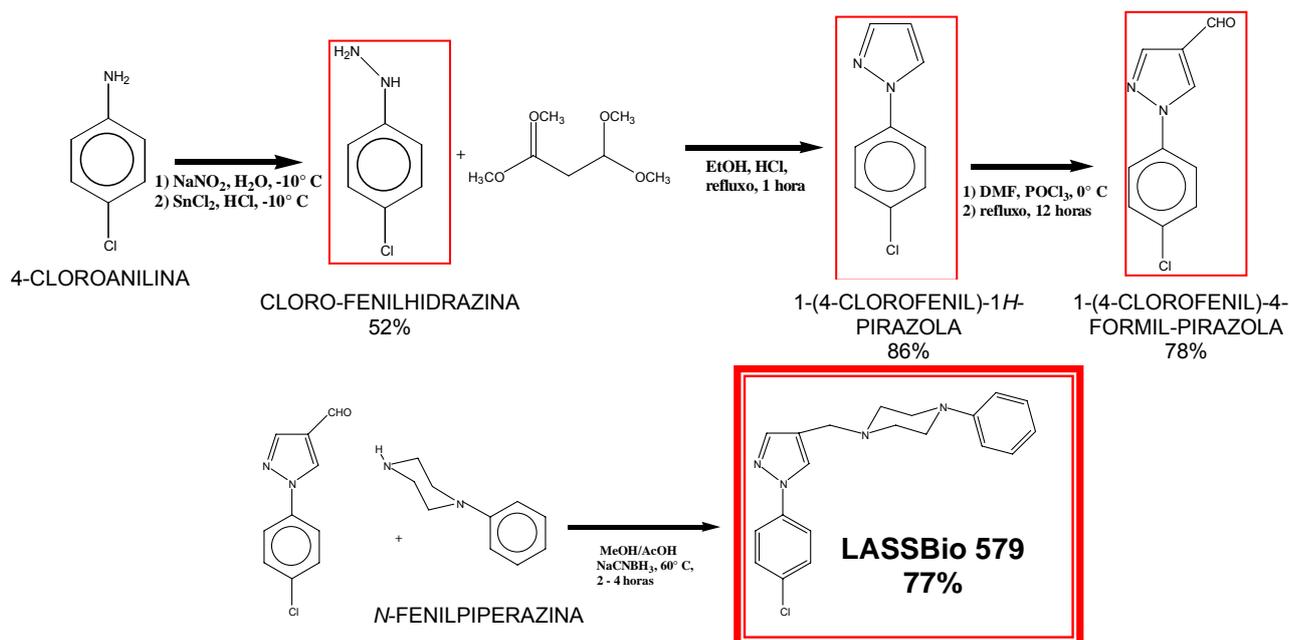


Figura 1.15 - Representação esquemática das etapas da síntese do LASSBio 579 (MENEGATTI, 2001).

O candidato a protótipo de fármacos, LASSBio 579, é um composto pirazólico que após ser sintetizado foi submetido a ensaios farmacológicos preliminares (University of Maryland, Baltimore - USA), com o intuito de avaliar a importância do núcleo pirazólico, bem como seu padrão de substituição na subunidade fenílica, na atividade farmacológica antecipada (MENEGATTI, 2001).

O composto LASSBio-579 foi avaliado no protocolo do ensaio de “binding” sobre receptores muscarínicos, nicotínicos, *N*-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazola-4-propionato (AMPA), gabaérgicos, dopaminérgicos do subtipo  $D_1$  e  $D_2$ , onde observou que o mesmo se apresentou como ligante seletivo para o receptor dopaminérgico do subtipo  $D_2$  (MENEGATTI, 2001).

Isso permitiu caracterizar a capacidade de modular a atividade intrínseca como agonista ou antagonista, em função da manipulação da estrutura química. Este perfil de propriedades indicou que além da atividade antipsicótica, decorrente do antagonismo de receptores dopaminérgicos  $D_2$ , seria possível explorar ações terapêuticas decorrentes do agonismo desse subtipo de receptores, como para o tratamento da disfunção erétil (MENEGATTI, 2001).

Dando continuidade ao estudo do perfil farmacológico do composto sintetizado, o LASSBio-579 foi submetido a ensaios em modelos *in vivo* (Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS), a fim de se obter informações complementares àquelas obtidas *in vitro* (NEVES, 2003). Foram utilizados ratos Wistar machos adultos e camundongos Swiss machos adultos. Os ensaios avaliaram o efeito central (Quadro 1) e os efeitos mediados pelo sistema dopaminérgico (Quadro 2).

Quadro 1 – Ensaio realizados para avaliação do efeito central (NEVES, 2003).

<b>TESTE REALIZADO</b>	<b>O QUE ESTAVA SENDO AVALIADO</b>
<b>Avaliação da atividade locomotora espontânea – teste de exposição ao campo aberto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Número de cruzamento entre os quadrantes</li> <li>• Número de episódios que os animais levantaram o corpo apoiando-se apenas pelas patas traseiras</li> <li>• Número de comportamentos de auto limpeza</li> <li>• Número de bolos fecais.</li> </ul>
<b>Avaliação da coordenação motora</b>	Foi avaliada o desempenho dos animais no rota-rod através dos parâmetros maior tempo de permanência e número de quedas
<b>Teste de potenciação do sono barbitúrico</b>	Foram avaliados os parâmetros latência e duração do sono

Quadro 2 – Ensaio referentes aos comportamentos e efeitos mediados pelo sistema dopaminérgico (NEVES, 2003).

<b>TESTE REALIZADO</b>	<b>O QUE ESTAVA SENDO AVALIADO</b>
<b>Bloqueio da estereotipia anfetamínica</b>	Observar o desenvolvimento de movimentos estereotipados
<b>Indução de catatonia</b>	Tempo de permanência
<b>Teste de natação forçada de Porsolt</b>	Determinação do tempo de imobilidade
<b>Avaliação do efeito pró-erétil</b>	Nº de ereções
<b>Avaliação do efeito sobre a temperatura corporal</b>	Determinação da temperatura corporal
<b>Investigação do mecanismo de ação do efeito hipotérmico de LASSBio 579</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação do efeito da pré-administração de haloperidol sobre a hipotermia induzida pelas substâncias em estudo</li> <li>• Avaliação do efeito de LASSBio 579 no teste de hipotermia apomorfínica</li> </ul>
<b>Avaliação do efeito sobre a velocidade de trânsito intestinal</b>	O efeito do composto sobre o trânsito intestinal

O derivado LASSBio 579 foi capaz de diminuir a locomoção espontânea e afetar a coordenação motora dos animais. Não alterou o tempo de sono barbitúrico, nem foi ativo no Teste de Porsolt. Na dose de 30 mg/kg i.p. bloqueou a estereotipia induzida por anfetamina. Quando administrada pela via intraperitoneal apresentou efeito catatônico dose dependente (15-40mg/kg) e efeito hipotérmico dose dependente (15-60mg/kg i.p. e 30mg/kg v.o). Bloqueou parcialmente a hipotermia induzida por apomorfina e na dose de 30mg/kg v.o apresentou efeito pró-erétil, além de diminuir a velocidade de trânsito intestinal na dose de 30mg/kg i.p (NEVES, 2003).

A habilidade de agonistas dopaminérgicos em induzir ereções penianas é descrita desde 1975 e foi sucessivamente confirmada por um grande número de estudos. Esta investigação teve início a partir da observação da apomorfina, que é um agonista dopaminérgico não-seletivo com afinidade um pouco maior para receptores D2. A principal hipótese para o mecanismo de ação pró-erétil da apomorfina é que sua administração leva à estimulação de receptores D2 no núcleo paraventricular (PVN), a qual dispara uma cascata de eventos bioquímicos intracelulares que levam à ativação da enzima óxido nítrico sintetase e o conseqüente aumento na síntese de óxido nítrico (NO). O aumento da concentração de NO intracelular, por sua vez, estimula a liberação de ocitocina em outras regiões do SNC, como o hipocampo e a medula espinhal, resultando na promoção da ereção peniana (NEVES et al., 2004).

Em estudo recente, avaliou-se o perfil farmacocinético em ratos do derivado *N*-fenilpiperazínico LASSBio 579 nas doses de 10 mg/kg i.v., 30 e 60 mg/kg i.p. e 60 mg/kg p.o., sendo as concentrações plasmáticas determinadas por metodologia analítica CL-EM/EM validada (CONRADO, 2007). O LASSBio 579 apresentou uma baixa disponibilidade, assim como baixa penetração no tecido cerebral, sugerindo que a atividade observada sobre o SNC pode ser decorrente da sua maior afinidade pelos receptores e/ou do seu perfil de distribuição distinto nas diferentes regiões cerebrais (CONRADO, 2006).

## 1.5 MÉTODOS DE MONITORAMENTO APLICADOS AOS ESTUDOS DE BIOCONVERSÃO

Fungos filamentosos apresentam uma enorme habilidade em promover simples reações capazes de produzir grandes modificações estruturais em xenobióticos gerando uma enorme diversidade de compostos. Dessa forma, a metodologia analítica empregada nesses estudos de bioconversão deve ser capaz de distinguir esses compostos, separá-los e identificá-los adequadamente.

O sucesso das bioconversões depende do desenvolvimento de uma metodologia apropriada que consiste na utilização de técnicas tradicionais como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), sendo as duas últimas mais recentemente acopladas ou não à espectrometria de massas (EM).

A CCD é uma técnica muito utilizada na etapa de triagem possibilitando a seleção do microrganismo de interesse de acordo com a produção de cada cepa (RAO; DAVIS, 1997), quanto no monitoramento dos diversos derivados produzidos por uma única cepa (LI et al., 2006).

A grande utilização desta técnica é consequência natural das diversas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, reprodutibilidade e baixo custo. Apesar de todas as vantagens, são necessárias técnicas mais eficientes na separação e identificação dos compostos formados durante o processo de bioconversão.

A CG é uma técnica rápida, com um poder de resolução excelente e uma alta sensibilidade, apesar de ser mais empregada na análise de substâncias voláteis e estáveis termicamente. Pode ser empregada como método único na triagem, monitoramento, separação e caracterização dos derivados, na maioria das vezes acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), o que confere maior eficiência na identificação e caracterização dos produtos formados (PINHEIRO; MARSALOLI, 2007).

A CLAE é amplamente empregada em processos de separação e embora seja menos sensível que a CG, permite a separação de uma grande variedade de compostos, independente da volatilidade ou estabilidade térmica. Essa técnica vem sendo utilizada principalmente no monitoramento das reações,

associadas ou não à CCD (COSTA, 2004; CIRILO, 2006; PAZINI, 2006). Na caracterização dos produtos formados, destaca-se o emprego da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (EM) ou ressonância magnética nuclear (RMN) (ALEXANDRE et al., 2004; PEARCE, LUSHNIKOVA, 2006).

Desde a introdução da ionização da pressão atmosférica (IPA), a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) tem sido grandemente utilizada para determinar fármacos e seus metabólitos para estudos pré-clínicos e clínicos. Em um estudo recente, foi desenvolvido e validado um método por CL-EM/EM para determinação do substrato LASSBio 579 em plasma de ratos utilizando fluconazol como padrão interno. A metodologia bioanalítica foi validada considerando especificidade, linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação. Esse método apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão adequados e foi aplicado para determinação de perfis de concentração-tempo do LASSBio 579 em estudos piloto farmacocinéticos pré-clínicos (CONRADO et al., 2006). Entretanto essa metodologia não foi aplicada nos estudos de bioconversão do LASSBio 579. Uma metodologia específica foi desenvolvida visando o melhor monitoramento dos produtos formados.

## 2 OBJETIVOS

A elevada capacidade bioconversora dos microrganismos pode ser usada para a criação de uma diversidade molecular além da transformação metabólica observada em animais.

Considerando esse potencial catalítico dos microrganismos capazes de mimetizar o metabolismo humano **objetivou-se neste trabalho a aplicação da bioconversão para preparação de novos derivados a partir do composto LASSBio 579 utilizando fungos filamentosos como modelo microbiano do metabolismo animal.**

Mais especificamente, objetivou-se:

- desenvolver uma metodologia analítica para o monitoramento das reações de bioconversão do LASSBio 579.
- aplicar o método desenvolvido para selecionar as cepas capazes de bioconverter o LASSBio 579 em diferentes produtos.
- isolar, purificar e caracterizar os derivados funcionalizados do LASSBio 579 por bioconversão.
- correlacionar o metabolismo fúngico e o metabolismo animal do LASSBio 579.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O substrato utilizado, LASSBio 579 (1-[-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-metil]-4-fenil-piperazina), foi desenvolvido e sintetizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A quantidade total fornecida para este estudo foi de aproximadamente um grama (1,0 g).

#### 3.1 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram metodologias analíticas empregadas no monitoramento de reações de bioconversão para a determinação de derivados funcionalizados a partir do substrato LASSBio 579.

Na CCD foram utilizadas cromatofolhas de alumínio TLC 20x20 cm sílica gel 60 F<sub>254</sub>, espessura da camada de sílica de 0,25 cm (placa analítica) Alugram<sup>®</sup> (Macherey-Nagel, Germany) e as fases móveis acetato de etila/metanol 20:80, acetato de etila/metanol 60:40, acetato de etila/metanol 95:05. As placas cromatográficas foram visualizadas em luz UV a 254 nm e 365 nm e os diferentes valores de R<sub>f</sub>s foram determinados.

Os cromatogramas, apresentando os tempos de retenção dos prováveis derivados formados e do substrato nos sobrenadantes de incubação e após purificação, foram obtidos utilizando as seguintes condições cromatográficas: cromatógrafo líquido da marca Gilson<sup>®</sup>, equipado com duas bombas modelo 321 da Gilson<sup>®</sup>, injetor manual Rheodyne<sup>®</sup> com capacidade de 20 µl, detector UV modelo 152 Gilson<sup>®</sup>, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µ). Foram desenvolvidos e testados seis sistemas cromatográficos para análise do substrato, dentre os quais cinco foram testados para análises do meio de incubação.

As fases móveis para CLAE foram preparadas utilizando água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), metanol grau HPLC (OminSolv, EMD<sup>®</sup>, Canadá), fosfato de potássio monobásico P.A (Synth, São Paulo, Brasil). Os

solventes foram filtrados em membranas Millipore® de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, degaseificados em banho de ultrassom Thornton T7 por 15 minutos, antes do uso.

O substrato LASSBio 579 foi solubilizado em metanol (Omnisolv®, EMD, Canadá) para obtenção de soluções de concentração de 0,01 mg/ml, 0,5 mg/ml e 1,0 mg/ml. A primeira delas foi empregada para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção por espectrofotometria na região do UV/visível, em espectrofotômetro Cintra® 10e UV-visible Spectrometer de 200 a 800 nm.

A análise cromatográfica foi feita para as outras duas soluções de concentração 0,5 mg/ml e 1,0 mg/ml, empregando seis diferentes sistemas cromatográficos:

- **Sistema 1:** sistema gradiente com fase móvel metanol (Bomba A) e mistura de metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M – 65:35 v/v (Bomba B). Fluxo de 1,0 ml/min durante toda a corrida.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Fluxo (ml/min)
0	0	100	1,0
0 a 2	0 a 100	100 a 0	1,0
2 a 4	100 a 0	0 a 100	1,0
4 a 15	0	100	1,0

- **Sistema 2:** sistema gradiente com fase móvel metanol (Bomba A) e mistura de metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M – 65:35 v/v (Bomba B).

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Fluxo (ml/min)
0	0	100	1,0
0 a 6	0 a 100	100 a 0	1,0
6 a 12	100	0	1,2
12 a 15	100 a 0	0 a 100	1,0

- **Sistema 3:** sistema gradiente com fase móvel metanol (Bomba A) e mistura de metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M – 65:35 v/v (Bomba B). Fluxo de 1,0 ml/min durante toda a corrida.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Fluxo (ml/min)
0	0	100	1,0
0 a 6	0 a 100	100 a 0	1,0
6 a 8	100	0	1,0
8 a 10	100 a 50	0 a 50	1,0
10 a 12	50	50	1,0

- **Sistema 4:** sistema gradiente com fase móvel metanol (Bomba A) e mistura de metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M – 65:35 v/v (Bomba B). Fluxo de 1,0 ml/min durante toda a corrida.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Fluxo (ml/min)
0	0	100	1,0
0 a 3	0 a 100	100 a 0	1,0
3 a 8	100	0	1,0
8 a 9	100 a 50	0 a 50	1,0
9 a 10	50	50	1,0

- **Sistema 5:** sistema gradiente com fase móvel metanol (Bomba A) e mistura de metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M – 65:35 v/v (Bomba B).

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Fluxo (ml/min)
0	0	100	1,0
0 a 2	0 a 100	100 a 0	1,0
2 a 7	100	0	0,8
7 a 8	100	0	1,0
8 a 9	100 a 50	0 a 50	1,0

- **Sistema 6:** sistema isocrático com fase móvel metanol/tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M – 65:35 v/v (Bomba B). Fluxo de 0,8 ml/min. Corrida de 15 minutos.

## 3.2 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

### 3.2.1 Microrganismos

Para a realização do “screening” foram selecionados quinze microrganismos procedentes de diferentes coleções:

#### **American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA – ATCC**

- *Absidia blakesleana* ATCC 26617
- *Absidia blakesleana* ATCC 10148b
- *Aspergillus candidus* ATCC 2023
- *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009
- *Beauveria bassiana* ATCC 7149
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245
- *Cunninghamella elegans* ATCC 36112
- *Cunninghamella elegans* ATCC 26169
- *Fusarium roseum* ATCC 14717
- *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a
- *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145

#### **Northern Utilisations Research and Development Division, Peoria-Illions, USA –NRRL**

- *Curvularia lunata* NRRL 2380
- *Mortierella isabelina* NRRL 1757

#### **Laboratoire de Cryptogamie, Museum d’Histoire Naturelle, Paris, França - LCP**

- *Chaetonium indicum* LCP 984200

### 3.2.2 Meios de cultura

#### Ágar Batata

- 39 g de ágar batata (Merck®)
- 1 litro de água destilada

Pesou-se a quantidade do produto indicada pelo fabricante e solubilizou-se em água destilada. O ágar foi mantido em contato com a água por mais ou menos 5 minutos e em seguida levado ao microondas para total solubilização. Distribui-se 7 ml em cada tubo de ensaio, autoclavou-se e os tubos foram deixados inclinado para solidificação do ágar.

#### Meio líquido “Potato Dextrose Soy Medium” – PDSM

- |                                  |          |         |
|----------------------------------|----------|---------|
| • Peptona bacteriológica         | (Synth®) | 5 g     |
| • D-Glicose Anidra (Dextrose)    | (Synth®) | 20 g    |
| • Cloreto de sódio               | (Vetec®) | 5 g     |
| • Fosfato de potássio monobásico | (Synth®) | 5 g     |
| • Extrato de levedura            | (Vetec®) | 3 g     |
| • Lecitina de soja               | (INLAB®) | 5 g     |
| • Água destilada                 |          | 1000 ml |

Pesou-se cada um dos produtos separadamente solubilizando-os em 1000 ml de água. Porções de 100 ml de meio foram distribuídas em Erlenmeyers de 250 ml de boca larga.

Ambos os meios foram esterilizados antes do uso em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

### 3.2.3 Manutenção das cepas

Todas as cepas utilizadas foram mantidas em tubos contendo ágar batata e armazenados a 4 °C em refrigerador. Utilizou-se glicerol (Merck®) 25% como veículo de transporte dos esporos para tubos de ensaio contendo meio sólido ágar batata inclinado e incubados por sete dias a 25 °C em câmara germinativa BOD

(Modelo TE 401, TECNAL<sup>®</sup>) para crescimento de cultura. Ao final desse período, observou-se as características macroscópicas de cada uma das colônias e procedeu-se a inoculação das mesmas nos meios de cultura utilizados. Os tubos empregados na inoculação foram vedados com Parafilm<sup>®</sup> em anaerobiose parcial e armazenados no refrigerador.

### 3.3 TRIAGEM

A triagem (“screening”) foi realizada a fim de escolher cepas capazes de bioconverter o substrato LASSBio 579 em uma maior variedade de derivados ou a produção de alguns deles em maior quantidade.

Quinze microrganismos foram inicialmente cultivados em ágar batata inclinado, mantidos por sete dias a 25 °C em câmara climática para crescimento. Após esse período, inoculou-se uma gota de suspensão de esporos destes crescimentos de sete dias em Erlenmeyers de 250 ml de boca larga, contendo 100 ml de meio líquido PDSM que foram mantidos em incubador rotativo (TE 420, TECNAL<sup>®</sup>) a 27 °C, 200 rpm por no mínimo 65 horas antes da adição do substrato.

O substrato LASSBio 579 foi pesado e solubilizado em uma mistura de etanol (Vetec<sup>®</sup>) e dimetilformamida (Vetec<sup>®</sup>) na proporção de 1:1 para obtenção de uma solução de concentração 10 mg/ml, e após sessenta e cinco horas de incubação e crescimento, os Erlenmeyers foram retirados da incubadora, onde adicionou-se 1 ml de solução de 10 mg/ml de substrato em cada um dos Erlenmeyers inoculado com cada uma das cepas, resultando em uma concentração final do substrato de 0,1gL<sup>-1</sup> de meio reacional.

Os Erlenmeyers retornaram a incubadora rotativa à 27 °C, 200 rotações/min, e alíquotas de 24, 48, 72, 96 horas de incubação foram retiradas do meio reacional em duplicata e assepticamente em fluxo laminar, utilizando pipetas de Pasteur e transferidas para ependorfs. Esses ependorfs contendo as amostras foram centrifugados em micro centrifuga FANEM<sup>®</sup> modelo 243 para obtenção do sobrenadante de incubação. Os sobrenadantes de incubação obtidos para análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foram saturados com cloreto de sódio, extraídos com acetato de etila e aplicados em cromatofolhas de alumínio TLC 20x20

cm sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Os sobrenadantes de incubação do período de 48 horas de todas as cepas foram escolhidos para análise por CLAE.

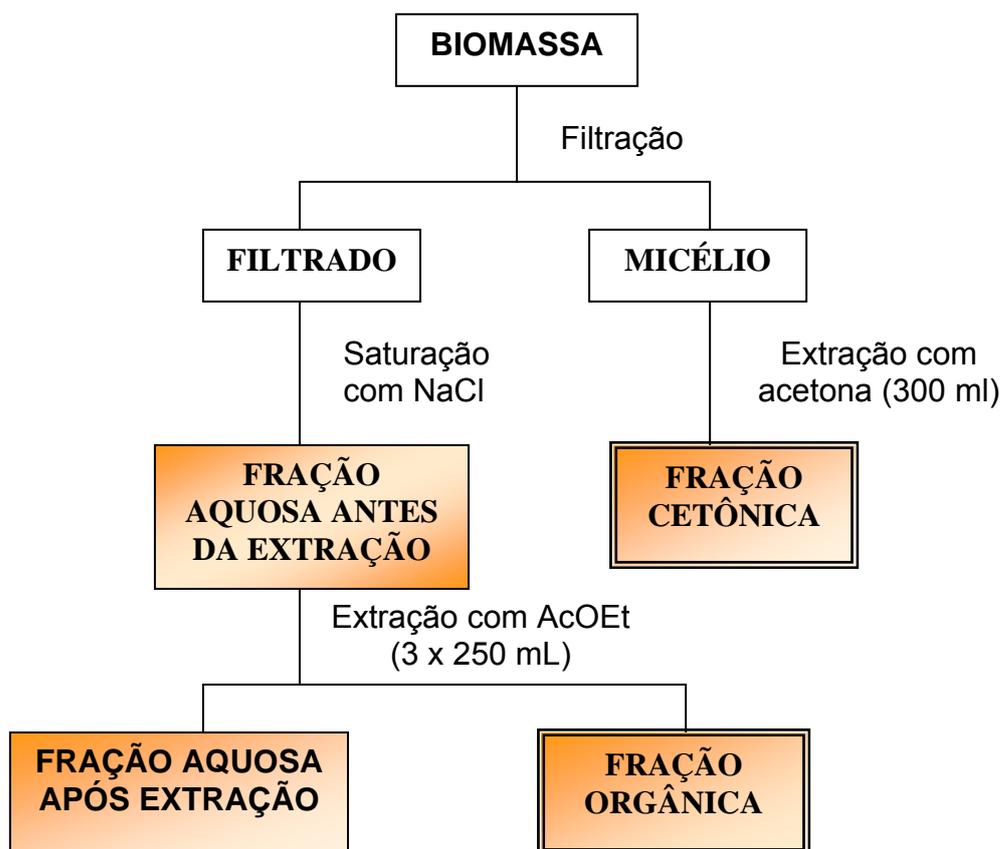
### 3.4 SEMI-PREPARATIVO

Após análises dos sobrenadantes de incubação de todas as cepas por CCD e CLAE, o procedimento descrito para a triagem foi repetido em uma escala semi-preparativa, utilizando Erlenmeyers inoculados com os microrganismos selecionados para o substrato. A quantidade de substrato variou para cada cepa utilizada e será descrito posteriormente.

#### 3.4.1 Filtração e Extração

Ao término do tempo de incubação, a biomassa contida nos Erlenmeyers foi separada por filtração em funil de Büchner com gase sob vácuo. A solução filtrada foi saturada com cloreto de sódio (Vetec<sup>®</sup>) e novamente filtrada em funil de Büchner contendo Celite sob vácuo. Após essa filtração, a solução denominada “Fração aquosa antes da extração” foi transferida para uma ampola de separação e extraída com três partes (250 ml) de acetato de etila para obtenção de duas frações: uma fração aquosa após extração e uma fração orgânica (extrato bruto). A fração aquosa após extração foi mantida em refrigerador e posteriormente descartada. À fração orgânica adicionou-se sulfato de magnésio anidro para eliminar alguma quantidade de água existente e que estivesse misturada a essa fração. Filtrou-se em funil de vidro sinterizado e o solvente foi evaporado sob vácuo resultando em um material seco para posterior separação e purificação dos produtos formados (Esquema 1).

O micélio separado durante a filtração da biomassa foi extraído com acetona (300 ml) sob agitação constante em agitador magnético, por cerca de três horas, sendo posteriormente filtrado em papel de filtro e a solução obtida levada a evaporação sob vácuo, resultando em uma fração cetônica (Esquema 1).

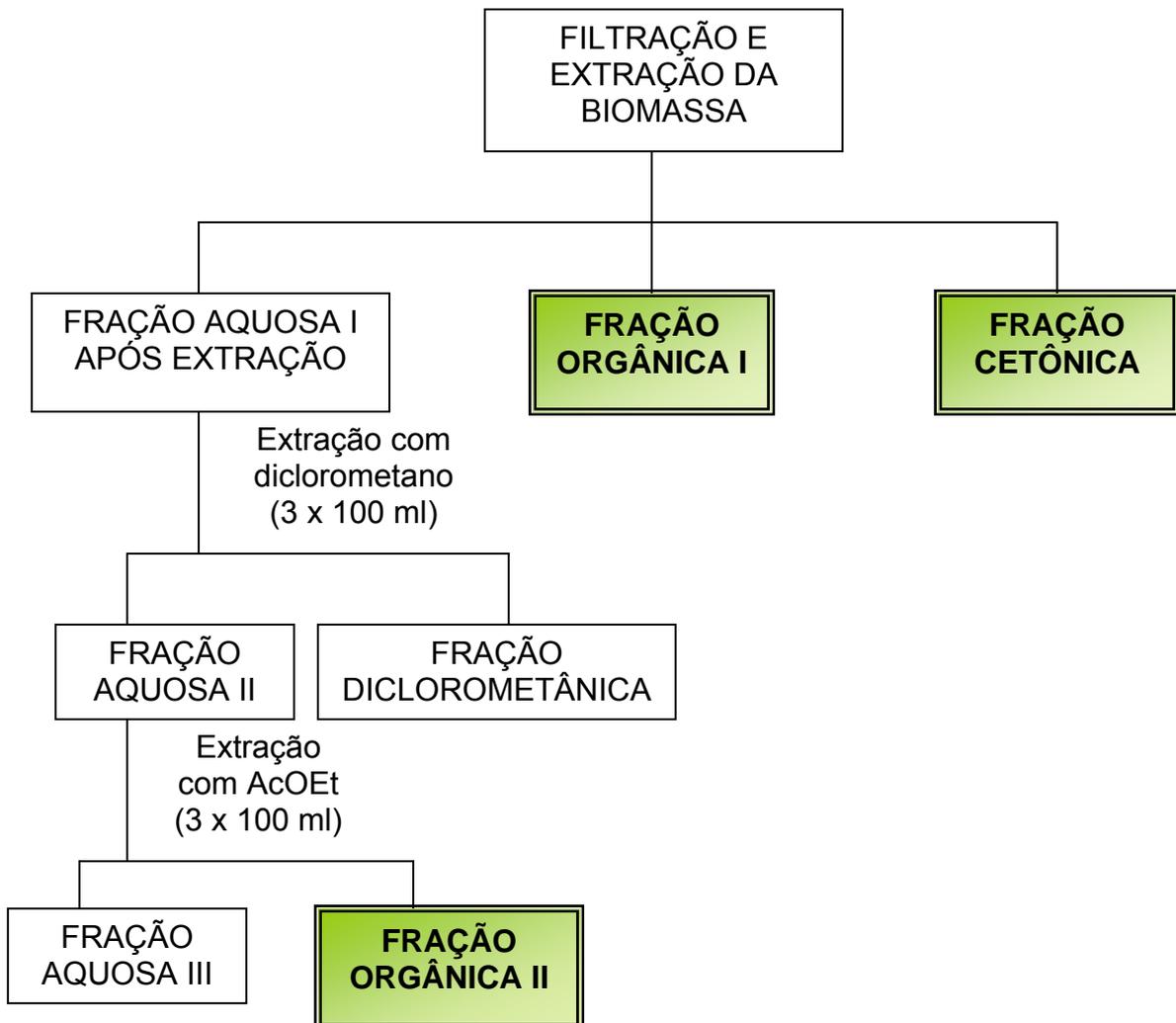


Esquema 1 - Processo de extração dos derivados ao término da incubação.

#### 3.4.1.1 1º Ensaio (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244)

*Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi a primeira cepa escolhida para ensaios em escala semi-preparativa. Oito Erlenmeyers foram inoculados com uma suspensão de esporos. 320 mg do substrato LASSBio 579 foi solubilizado em uma mistura de etanol e dimetilformamida (1:1) obtendo uma solução de concentração 40 mg/ml. Após 65 horas de incubação, foi adicionado 1ml da solução a cada um dos Erlenmeyers (0,4 g L<sup>-1</sup>). Alíquotas foram retiradas nos períodos de 24, 48, 72, 96 horas para monitoramento da reação e construção da cinética de formação dos metabólitos. Após o término da incubação, realizou-se a filtração e extração (item 3.4.1, p. 56) resultando em uma fração orgânica I e uma fração cetônica. A fração aquosa I após extração com acetato de etila foi analisada por CLAE e verificou-se que ainda haviam produtos retidos nessa fase, desta forma, procedeu-se uma segunda extração utilizando três partes (100 ml) de diclorometano (Isosfar®). Após essa extração, adicionou-se sulfato de magnésio anidro à fração diclorometânica,

filtrou-se em funil de vidro sinterizado e evaporou-se o solvente. Após a extração com diclorometano, a fração aquosa II foi saturada com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (cloreto de amônio P.A - Vetec<sup>®</sup>), extraída com três partes (100 ml) de acetato de etila, filtrada e rotaevaporada sob vácuo, resultando na Fração Orgânica II e na Fração Aquosa III (Esquema 2).



Esquema 2 - Processo de extração dos derivados após incubação com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

#### 3.4.1.2 2° Ensaio (Cepa: *Aspergillus candidus* ATCC 2023)

Em um segundo ensaio semi-preparativo, dez Erlenmeyers foram inoculados com suspensão de esporos de *Aspergillus candidus* ATCC 2023. 300 mg do substrato LASSBio 579 foi solubilizado em etanol absoluto (Merck<sup>®</sup>) para a

obtenção de uma solução de 30 mg/ml. A solução foi levemente aquecida e levada para ultrassom para total solubilização. Após 65 horas de crescimento, foi adicionado 1 ml da solução previamente preparada a cada um dos Erlenmeyers (0,3 g L<sup>-1</sup>). O tempo de incubação após adição do substrato foi de 72 horas com retirada de alíquotas para monitoramento da reação a cada 24 horas.

Ao término da incubação, o meio reacional foi filtrado e extraído com acetato de etila e seco por evaporação sob vácuo resultando na fração orgânica. A massa fúngica foi separada do meio reacional e colocada sob agitação com cerca de 300 ml de acetona por aproximadamente 3 horas, filtrado e evaporado sob vácuo (item 3.4.1, p. 56).

### **3.4.2 Isolamento e Purificação dos produtos formados**

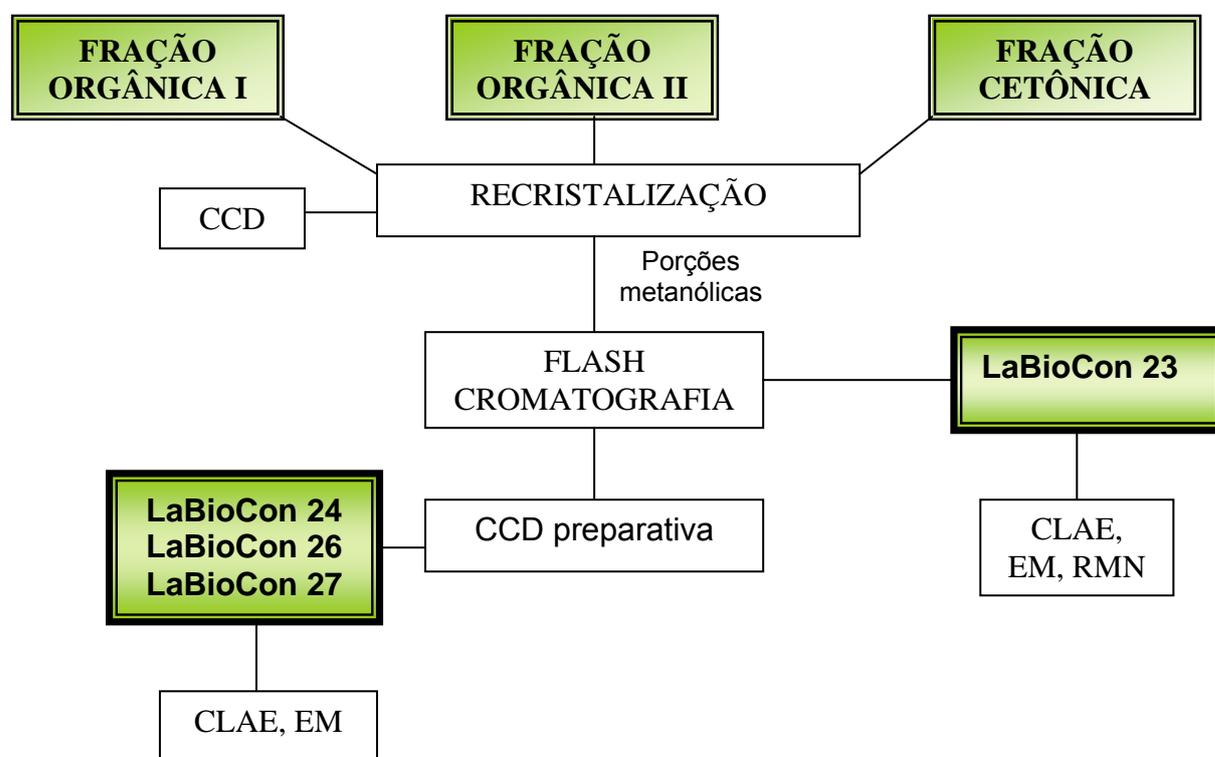
As frações orgânica e cetônica foram analisadas por CCD, utilizando cromatoplaças de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 e revelação na luz UV (254 e 365 nm).

A separação dos produtos formados foi realizada por *flash* cromatografia, usando uma coluna de vidro de 300 x 20 mm, preenchida como fase estacionária sílicagel 60, Vetec<sup>®</sup>, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh) e fase móvel acetato de etila/metanol 95:05, e o monitoramento para acompanhar a separação dos produtos formados foi feito por CCD, usando como fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 e luz UV (254 e 365 nm) como revelador.

A coluna cromatográfica foi colocada em um suporte de metal para iniciar a sua preparação. Primeiramente, colocou-se uma pequena camada de lã de vidro e sobre esta uma camada de areia. Em um Béquer, dissolveu-se a sílicagel para cromatografia em coluna na fase móvel (acetato de etila/metanol 95:05) e transferindo, com auxílio de um funil, toda essa fase estacionária para a coluna de vidro. Posteriormente, fez-se a compactação dessa sílica com vácuo até a formação de uma coluna com cerca de 22 cm. As frações foram aplicadas na coluna e a fase móvel adicionada lentamente e de maneira contínua. As porções foram coletadas em tubos de ensaio e aplicadas em cromatoplaças para o acompanhamento. Os tubos contendo as frações de mesmo R<sub>f</sub>s foram agrupadas e evaporadas.

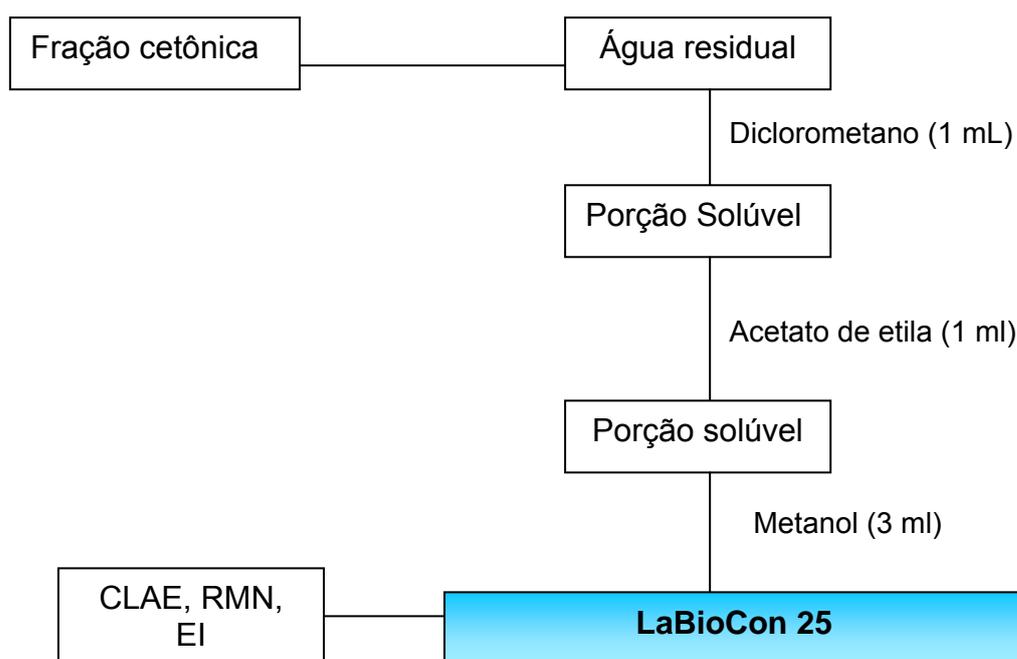
A recristalização também foi empregada na separação e purificação dos derivados, como método único ou adicional à *flash* cromatografia. Solventes de diferentes polaridades como diclorometano, acetato de etila, metanol e água foram utilizados para a separação dos produtos que foram acompanhados por CCD e CLAE.

No primeiro ensaio, realizado com a cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, as frações cetônica, orgânica I e orgânica II foram recristalizadas em metanol e as porções resultantes foram analisadas por CCD. Pela similaridade dos derivados formados as porções metanólicas foram reunidas e purificadas por *flash* cromatografia (acompanhada por CCD). As frações coletadas foram agrupadas de acordo com o fator de retenção apresentado na CCD. A cromatografia em camada delgada preparativa (placas analíticas) foi realizada para purificação adicional de determinados produtos. A fase móvel utilizada foi acetato de etila/metanol 95:05 e para revelação luz UV. Após a corrida, as placas foram visualizadas em luz UV, os produtos eluídos foram marcados e extraídos com acetato de etila, permanecendo sob agitação por aproximadamente 20 minutos (Esquema 3). Os derivados foram denominados como LaBioCon 23, LaBioCon 24, LaBioCon 26, LaBioCon 27.



Esquema 3 - Etapas de purificação após incubação com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

No ensaio com a cepa *Aspergillus candidus* ATCC 2023, a fração cetônica obtida foi evaporada em rotaevaporador sob vácuo, mas uma grande quantidade de água residual permaneceu nesta fração. Essa água foi transferida para outro balão e em seguida rotaevaporado. Com a adição de diclorometano (1 ml) observou-se uma pequena porção insolúvel. A porção solúvel foi rotaevaporada e adicionada de acetato de etila (1 ml), observando-se que nada ocorreu. Ao fim adicionou-se metanol (3 ml) obtendo uma grande quantidade de precipitado branco insolúvel. O metanol foi rotaevaporado e a parte insolúvel permaneceu no balão. Uma pequena quantidade desse precipitado foi retirada e colocado em um tubo de ensaio contendo 0,5 ml de água destilada, onde observou-se a total solubilização do precipitado. O derivado foi denominado LaBioCon 25, analisado por CLAE e caracterizado (Esquema 4).



Esquema 4 - Etapas de purificação da fração cetônica após incubação com *Aspergillus candidus* ATCC 2023.

A fração orgânica foi obtida em pequenas quantidades e por isso não foi possível separar e isolar nenhum produto.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

Uma vez purificados por cromatografia em coluna, recristalização ou CCD preparativa os produtos obtidos foram caracterizados por espectrometria de infravermelho (EI) e/ou ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e/ou espectrometria de massas (EM).

Para as análises de EI as pastilhas de KBr foram preparadas com KBr (Vetec) previamente dessecado em estufa à 120 °C. Posteriormente foram colocados 100 mg do KBr no pastilhador seguido de compressão em prensa hidráulica Perkin Elmer® modelo 4037 com pressão de 10<sup>a</sup> toneladas por 2 minutos, para obtenção das pastilhas finas e transparentes. As análises foram realizadas em aparelho de Infravermelho BX/RX Perkin Elmer® (modelo 60508). O equipamento foi mantido em sala com temperatura e umidade controladas. A faixa espectral utilizada compreendia números de onda entre 4000 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , sendo utilizada resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

As análises de RMN foram realizadas no LRM/IQ da UNB à temperatura ambiente em um espectrômetro Mercury plus da VARIAN (7,05 T), utilizando uma sonda de 5 mm e pulsos de 45.0 para hidrogênio e carbono. Os deslocamentos químicos no RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) foram referenciados aos padrões internos TMS (tetrametilsilano; 0,0 ppm) para os solventes  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{D}_2\text{O}$ . Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz), foram referenciados ao  $\text{CDCl}_3$  (77,0 ppm) e ao  $\text{CD}_3\text{OD}$  (49,0 ppm).

As análises de EM foram realizadas em Espectrômetro de massas MICROMASS QUATTRO LC, trabalhando no modo de Eletronspray positivo operando com energia de cone de 70 V, energia de capilar de 3,5 kV e energia de RFLens de 0.3 V, temperatura de nebulização de 200 °C e fluxo de gás de nebulização (nitrogênio) de 400 L/h. O software utilizado é o Masslynx V3.5.

Na Figura 3.1 está descrito um resumo de toda a parte experimental realizada neste trabalho.

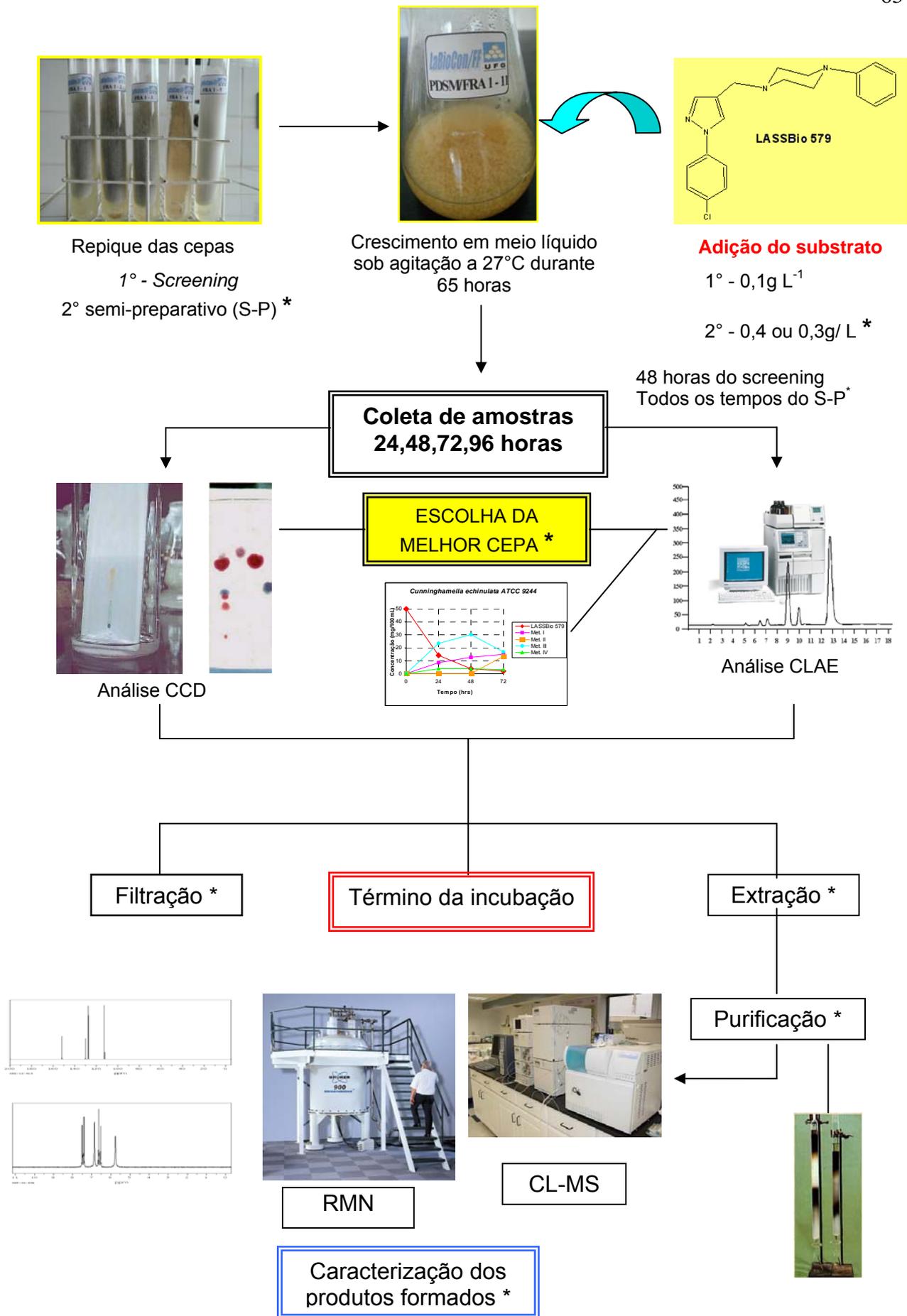


Figura 3.1 - Procedimento experimental

### 3.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS PLASMAS

Por meio de uma parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o substrato LASSBio 579 foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) (volume de injeção de 1 ml/kg de massa corporal) em grupos de ratos Wistar machos adultos pesando entre 200 e 300g (3 grupos: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>) objetivando estabelecer uma correlação com o metabolismo fúngico. O fármaco foi suspenso em salina acrescido ou não de polissorbato 80. Os plasmas foram coletados a 0,5, 2, 6, 12 e 24 horas após a administração intraperitoneal (Figura 3.2).

As amostras de plasma foram recebidas no Laboratório de Bioconversão – FF/UFG onde foram previamente tratadas com a adição de 200µl de metanol e agitadas em vórtex por cerca de 25 segundos seguida de centrifugação a 13000 rpm por 30 segundos em Micro Centrífuga FANEM<sup>®</sup> modelo 243 para desproteíntização. O sobrenadante foi filtrado em sistema Millex HV 0,45µm, MILLIPORE<sup>®</sup> e 20µl foram injetados em cromatógrafo líquido para análise (Figura 3.2).

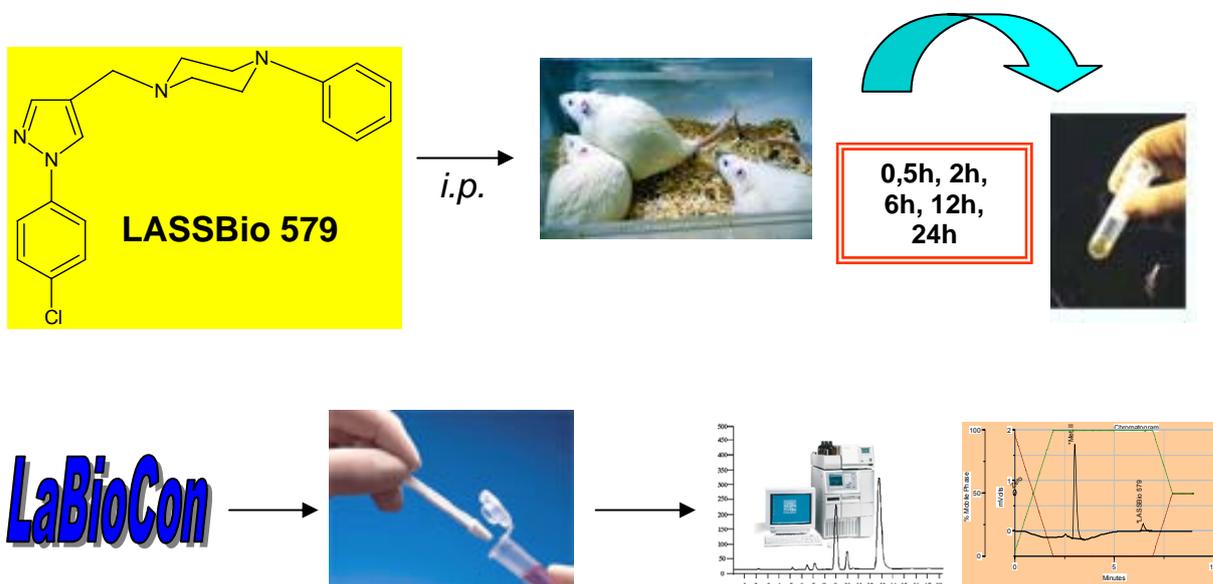


Figura 3.2 – Administração do LASSBio 579 em animais e análise cromatográfica dos plasmas para uma correlação com o metabolismo fúngico.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA MONITORAMENTO DAS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO

O desenvolvimento da metodologia analítica foi realizado inicialmente com o substrato LASSBio 579 empregando sistema cromatográfico constituído de coluna RP18, fase móvel de metanol/metanol:tampão (fosfato de potássio monobásico 0,02 M) – 65:35, com detecção por absorção no ultravioleta. Esse sistema vem sendo utilizado em vários estudos de bioconversão no Laboratório de Bioconversão (LaBioCon) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás proporcionando resultados satisfatórios (CARNEIRO et al., 2005; CIRILO, 2006; PAZINI, 2006). Assim, o substrato LASSBio 579 foi submetido a esse sistema cromatográfico, determinando primeiramente o comprimento de onda de máxima absorção por espectrofotometria na região do UV/Visível.

O espectrograma obtido (Figura 4.1) evidencia o comprimento de onda de 257 nm como o de absorção máxima desse composto.

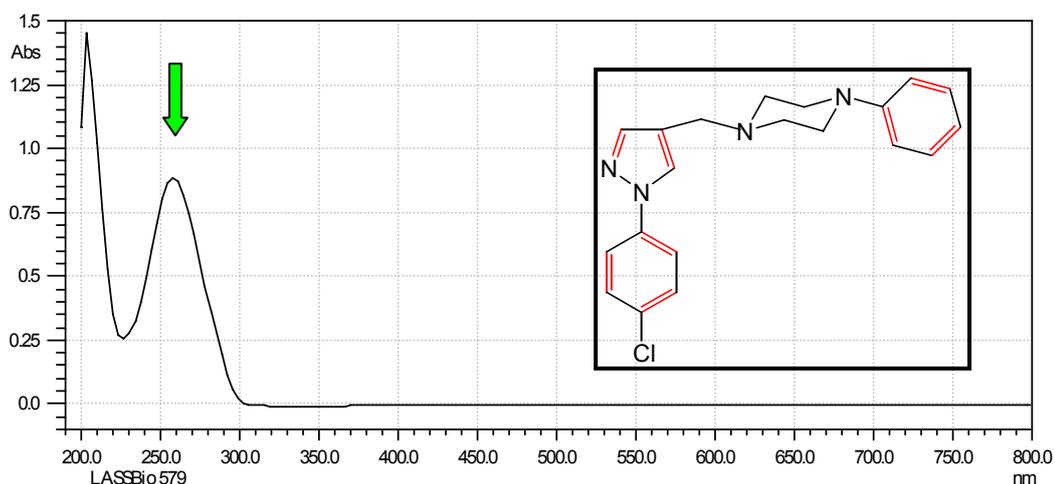


Figura 4.1 - Espectrograma na região do UV/Visível do substrato LASSBio 579 0,01 mg/ml em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 800,0 nm em espectrofotômetro Cintra 10<sup>e</sup> UV-visible Spectrometer. Em vermelho, os grupamentos que permitiram a detecção por UV.

Inicialmente, para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se como fase móvel metanol/metanol:tampão 65:35 em sistema gradiente,

máximo de metanol em dois minutos com diminuição para zero em quatro minutos e manutenção de metanol:tampão 65:35 100% de quatro minutos até final da corrida (quinze minutos), com fluxo de 1,0 ml/min - Sistema 1 (item 3.1, p. 51); comprimento de onda de 257 nm, detector UV e coluna cromatográfica fase reversa Lichrospher 100 RP18. Como o sistema não foi satisfatório para identificação do substrato, novos sistemas foram construídos alterando as quantidades das diferentes fases móveis durante o tempo de corrida.

O segundo sistema - Sistema 2 (item 3.1, p. 51) a ser testado apresentava máximo de metanol em seis minutos num fluxo de 1,0 ml/min, manutenção de metanol 100% até 12 minutos com fluxo de 1,2 ml/min, com diminuição para zero em quinze minutos e aumento de metanol:tampão 65:35 até 100% de doze a quinze minutos com fluxo de 1,0 ml/min. Esse sistema não se mostrou eficaz na separação dos compostos iniciais com tempo de retenção próximo a três minutos, como analisado nas alíquotas retiradas do meio reacional durante o tempo de incubação (24, 48, 72, 96 horas).

Buscando um sistema cromatográfico que proporcionasse boa separação dos derivados com tempo de retenção até três minutos, outro sistema foi criado: máximo de metanol em seis minutos, mantendo 100% até oito minutos, diminuindo metanol a 50% e aumentando metanol:tampão 65:35 até 50% aos nove minutos, permanecendo assim até os doze minutos num fluxo de 1,0 ml/min durante toda a corrida - Sistema 3 (item 3.1, p. 51).

Testou-se também um sistema isocrático – Sistema 6 (item 3.1, p. 52) utilizando-se como fase móvel metanol/tampão 65:35 com fluxo de 0,8 ml/min e corrida de 15 minutos, mas não obteve-se separação satisfatória.

Ainda a fim de buscar uma melhor separação e identificação dos compostos, um novo sistema foi criado, com máximo de metanol em três minutos, mantendo-se assim até os oito minutos, diminuindo a 50% enquanto metanol:tampão 65:35 aumenta 50% aos nove minutos, permanecendo assim até os dez minutos de corrida, num fluxo de 1,0 ml/min - Sistema 4 (item 3.1, p. 52). Este último sistema passou por algumas modificações chegando-se ao Sistema 5 que apresenta máximo de metanol em dois minutos com fluxo de 1,0 ml/min, permanecendo em 100% até os sete minutos com fluxo de 0,8 ml/min, alterando apenas o fluxo para 1,0 ml/min dos sete aos oito minutos, reduzindo o metanol a

50% e aumentando o metanol:tampão 65:35 para 50% até ao final da corrida de nove minutos (item 3.1, p. 52).

O Sistema 5 foi o de escolha para análise das várias amostras coletadas a partir da incubação do LASSBio 579 com quinze diferentes cepas de fungos filamentosos em ensaio de “screening” nos tempos de 48 horas, para ensaios em escala semi-preparativa e para análises dos plasmas de ratos por ter se mostrado satisfatório na separação dos compostos analisados.

Para acompanhamento dos processos de purificação utilizou-se cromatografia em camada delgada, em que três fases móveis foram ensaiadas: acetato de etila/metanol 20:80, acetato de etila/metanol 60:40 e acetato de etila/metanol 95:05 , sendo esta última escolhida por apresentar uma melhor separação dos compostos eluídos.

## 4.2 TRIAGEM

Quinze fungos foram selecionados para o “screening”. Essa seleção foi fundamentada na literatura sobre a habilidade de realizar transformações oxidativas em uma ampla variedade de substratos como diazepam, testosterona, teofilina e varfarina (GRIFFITHS, BEST, JEZEQUEL; 1991). A escolha dos microrganismos foi também em função de um estudo de bioconversão (PAZINI, 2006) utilizando diversas cepas capazes de bioconverterem um outro derivado N-fenilpiperazínico, LASSBio 581.

As cepas selecionadas para o processo de bioconversão foram conservadas em ágar batata inclinado na temperatura entre 2-4 °C, que se mostrou um meio sólido eficaz na manutenção e sobrevivência dos microrganismos.

O meio de cultura PDSM (Potato Dextrose Soy Medium) foi selecionado para a triagem dos microrganismos pelo fato de mostrar-se um meio mais adequado aos processos de bioconversão para as cepas selecionadas conforme demonstrado em estudos anteriores no LaBioCon da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (COSTA, 2004; CIRILO, 2006; PAZINI, 2006;) e pela capacidade de proporcionar um melhor crescimento das cepas durante a incubação, além do menor custo, maior facilidade de preparo e conservação, facilidade de extração dos

produtos formados, melhor expressão das enzimas bioconversoras, capacidade de promover crescimento uniforme.

Em meio líquido PDSM as diferentes cepas ensaiadas apresentaram aspecto morfológico variando desde a formação de “pellets” pequeníssimos a grandes, assim como a formação de massa amorfa, com presença de halo de crescimento na parede do recipiente como pode ser visto no Quadro 3 e na Figura 4.2.

Quadro 3 - Caracterização morfológica macroscópica em meio líquido PDSM das diferentes cepas testadas durante o “screening”: massa amorfa ou “pellets” (seguidos do diâmetro – cm).

Microrganismos	Aspecto morfológico
<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 26617	“Pellets” grandes – 0,5 cm
<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 10148b	“Pellets” grandes – 0,5 cm
<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023	“Pellets” pequenos – 0,1cm
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	“Pellets” pequenos – 0,1cm
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7149	Massa amorfa
<i>Chaetonium indicum</i> LCP 984200	Massa amorfa
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	Massa amorfa
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	Massa amorfa
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	Massa amorfa
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	“Pellets” pequenos – 0,1cm
<i>Curvularia lunata</i> NRRL 2380	Massa amorfa
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	Massa amorfa
<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	“Pellets” pequeníssimos – 0,05 cm
<i>Mucor griseocyanus</i> ATCC 1207a	Massa amorfa
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	Massa amorfa

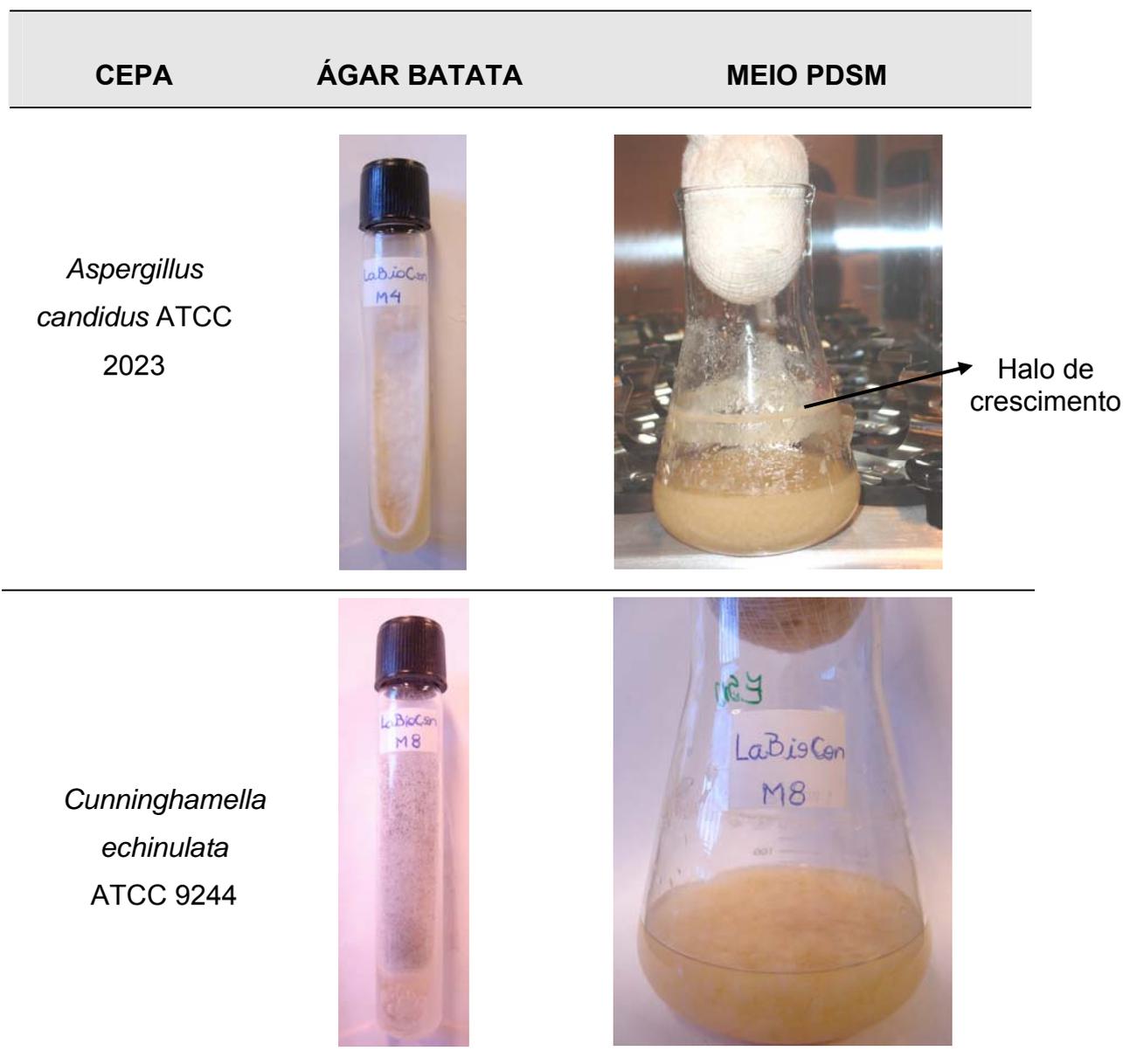


Figura 4.2 - Aspecto macroscópico das colônias em ágar batata e no meio líquido PDSM de *Aspergillus candidus* ATCC 2023 e *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cepas selecionadas para ensaios em escala semipreparativa após 72 horas de incubação a 200 rpm,  $28 \pm 2$  °C.

A agitação empregada, tanto no “screening” como nos ensaios semipreparativos, foi de 200 rpm; o pH permaneceu constante (pH do meio=6,0) ao longo de todos os ensaios realizados e a temperatura empregada foi de 27 °C podendo variar  $\pm 2$  °C.

### 4.3 MONITORAMENTO DAS REAÇÕES DE BIOCONVERSÃO

As reações de bioconversão do composto LASSBio 579 realizadas pelos quinze fungos filamentosos empregados na triagem foram monitoradas por CCD com fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 e CLAE com fase móvel gradiente de metanol/metanol:tampão 65:35 (Sistema 5) e demais condições cromatográficas descritas no item 3.1 (p. 51).

#### 4.3.1 Bioconversão do LASSBio 579

Realizou-se uma triagem com quinze fungos filamentosos durante a qual alíquotas foram retiradas do meio reacional de cada cepa nos tempos de 24, 48, 72, 96 horas aplicando CCD e CLAE para detectar e quantificar a formação de possíveis derivados funcionalizados.

Todos os microrganismos testados foram eficazes na transformação do LASSBio 579. Cinco diferentes produtos foram formados pela incubação do substrato LASSBio 579 com as diversas cepas utilizadas. O metabólito I foi produzido pela maioria das cepas em diferentes quantidades. Os derivados III e V foram produzidos exclusivamente por umas das cepas. *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi a única cepa capaz de produzir os cinco metabólitos observados, sendo dessa forma, escolhida para os estudos iniciais em escala semi-preparativa. O derivado II foi produzido majoritariamente por *Aspergillus candidus* ATCC 2023 que também foi utilizado para posteriores estudos semi-preparativos. O substrato LASSBio 579 foi detectado no sobrenadante de incubação da maioria das cepas, exceto *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 que ao final das 48 horas já havia consumido todo o substrato. A quantidade relativa de cada derivado detectado, para cada microrganismo, no tempo de 48 horas, está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Bioconversão do LASSBio 579 por várias cepas de fungos filamentosos.

Microrganismos	Metabólitos (Rt)					Subst.
	I (2.6)	II (3.1)	III (4.7)	IV (5.0)	V (5.4)	
1 - <i>Absidia blakesleana</i> ATCC 26617	+++	-	-	-	-	++
2 - <i>Absidia blakesleana</i> ATCC 10148b	++	++	-	-	-	++
3 - <i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023	++	+++	-	-	-	+
4 - <i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	++	++	-	-	-	+
5 - <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7149	++	++	-	-	-	++
6 - <i>Chaetonium indicum</i> LCP 984200	++++	+	-	-	-	+
7 - <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	+++	+	+	+	+	+
8 - <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	++++	+	-	+	-	+
9 - <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	++++	+	-	-	-	-
10 - <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	++	+	-	+	-	++
11 - <i>Curvularia lunata</i> NRRL 2380	-	+	-	-	-	++
12 - <i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	++++	-	-	-	-	+
13 - <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	+	-	-	+	-	+++
14 - <i>Mucor griseocyanus</i> ATCC 1207a	++++	-	-	-	-	+
15 - <i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	++	++	-	+	-	+

Legenda: Quantidade relativa dos metabólitos (I, II, III, IV e V) formados no sobrenadante de incubação com respectivos tempos de retenção e substrato (Subst.) não consumido no período de 48 horas e analisados por CLAE (sistema 5): + 1% a 20%; ++ 21% a 60%; +++ 61% a 80%; ++++ > 80%; - ausência.

A partir do “screening” foi possível estabelecer uma correlação entre o número de metabólitos produzidos por diversas cepas testadas para o LASSBio 579, substrato utilizado neste trabalho e o LASSBio 581, utilizado em estudo recente por PAZINI, 2006. Os substratos apresentam uma similaridade estrutural, diferindo apenas pela presença de um anel pirazólico (LASSBio 579) ou um anel triazólico (LASSBio 581). Apesar dessa semelhança os perfis de bioconversão mostraram-se diferentes, onde o LASSBio 581 apresentou uma maior diversidade de produtos formados (trinta metabólitos) enquanto que a bioconversão do LASSBio 579 proporcionou a formação de cinco derivados. O Gráfico 1 mostra o diferente número de metabólitos formados a partir da incubação dos compostos LASSBio 581 e LASSBio 579 no tempo de 48 horas utilizando as mesmas cepas, sob as mesmas condições reacionais e metodológicas.

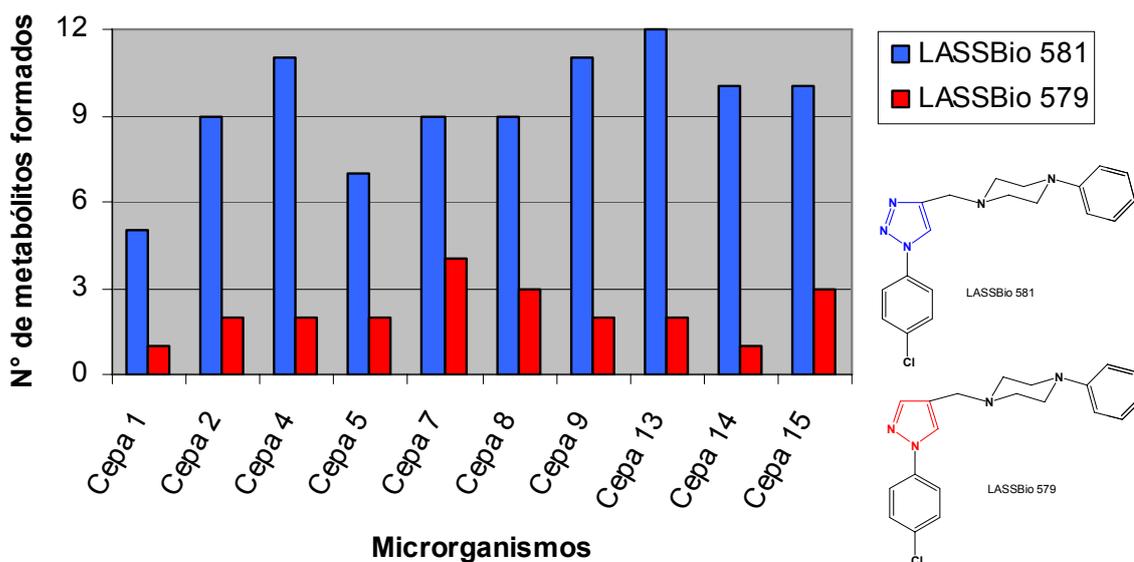


Gráfico 1 - Número de metabólitos formados a partir dos substratos LASSBio 579 e 581, pelas mesmas cepas e sob as mesmas condições reacionais. Cepa 1: *Absidia blakesleana* ATCC 26617; Cepa 2: *Absidia blakesleana* ATCC 10148b; Cepa 4: *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009; Cepa 5: *Beauveria bassiana* ATCC 7149; Cepa 7: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244; Cepa 8: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245; Cepa 9: *Cunninghamella elegans* ATCC 36112; Cepa 13: *Mortierella isabelina* NRRL 1757; Cepa 14: *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a; Cepa 15: *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145.

Observou-se que uma pequena mudança estrutural é capaz de orientar a formação de produtos pelas diversas cepas. Pode-se sugerir que o anel triazólico

presente no LASSBio 581 modifique a interação dessa molécula com o centro ativo da enzima (CYP450) dos microrganismos promovendo uma formação de uma maior variedade de derivados, enquanto que o LASSBio 579 que apresenta um anel pirazólico em sua estrutura (com um átomo de nitrogênio a menos) proporcione uma menor interação com a enzima o que resulta em uma menor variedade de produtos formados. Outra hipótese pode estar relacionada a variedade de isoformas de CYP450 existentes. A molécula pode interagir com uma ou mais isoformas de CYP450 mais ou menos seletivos e produzir maior ou menor variedade de metabólitos (BERNHARDT, 2006).

A análise do substrato LASSBio 579 (0,5 mg/ml em metanol) por CLAE, utilizando o Sistema 5 (item 3.1, p. 51), resultou no cromatograma apresentado na Figura 4.3. Verificou-se a presença de um único pico em 6,5 minutos, identificado como LASSBio 579.

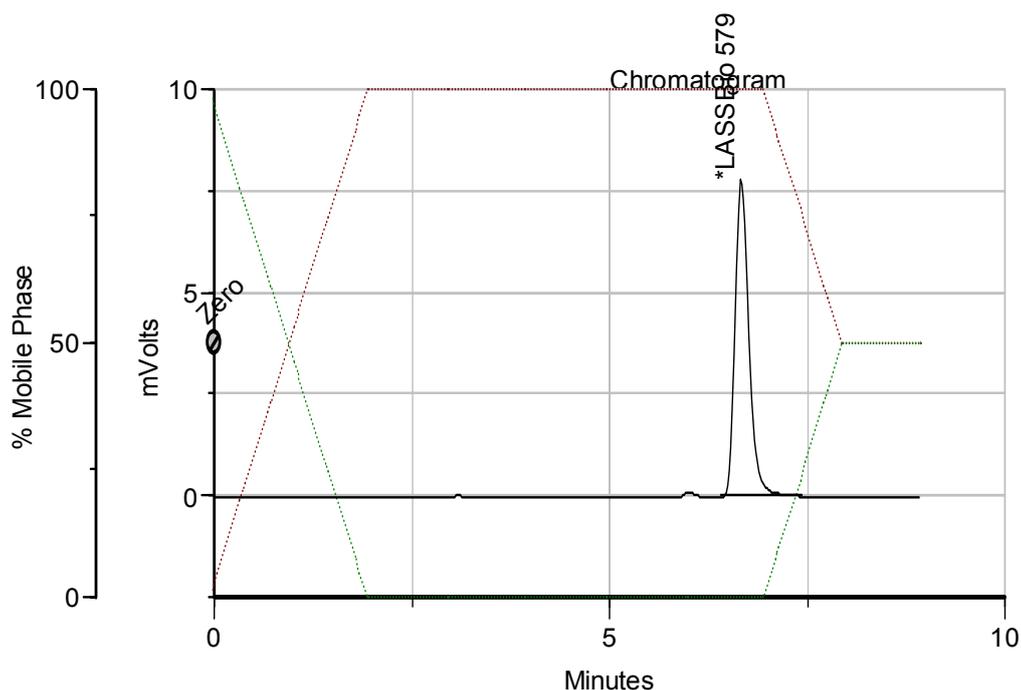


Figura 4.3 - Perfil cromatográfico do substrato LASSBio 579 (0,5 mg/ml em metanol) sistema gradiente (sistema 5) e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; - - - - - metanol).

A análise por CLAE do meio de cultura líquido PDSM contendo substrato resultou no cromatograma apresentado na Figura 4.4. O meio reacional apresentou um pico em 2,2 minutos, identificado como PDSM.

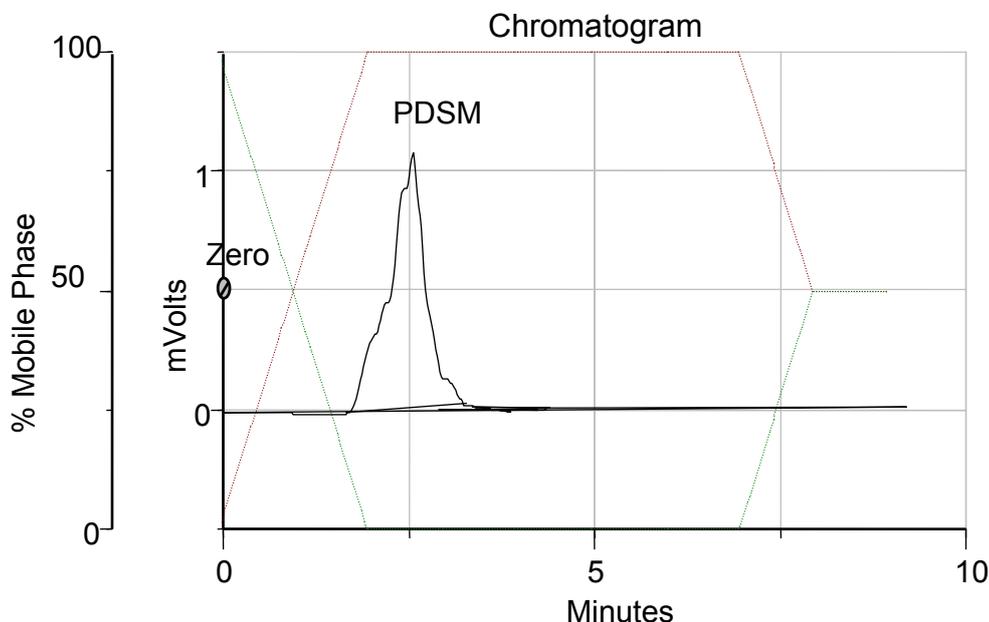
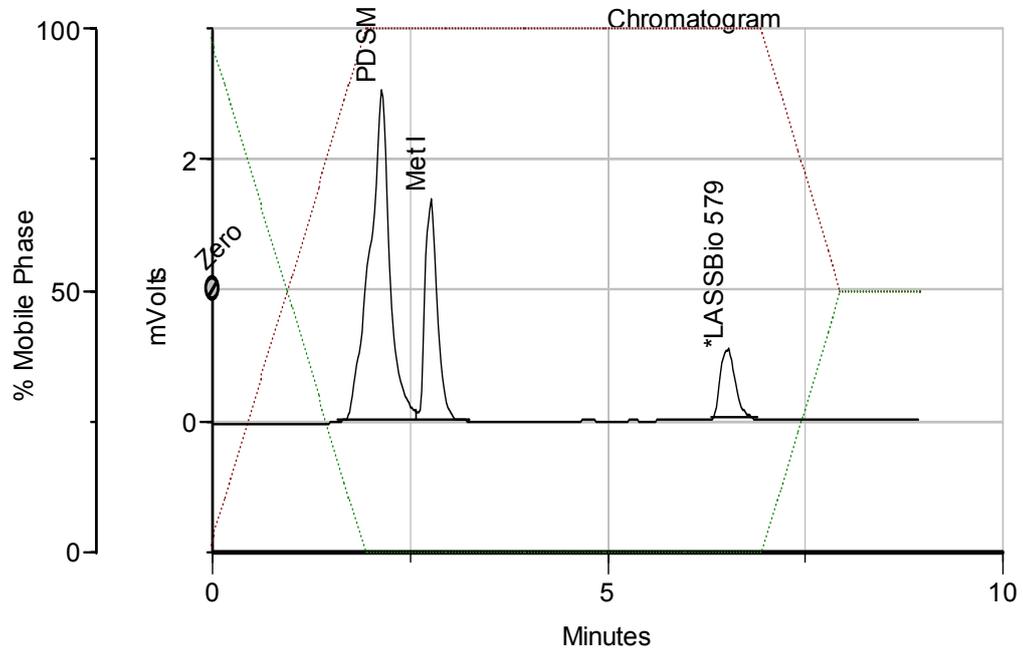
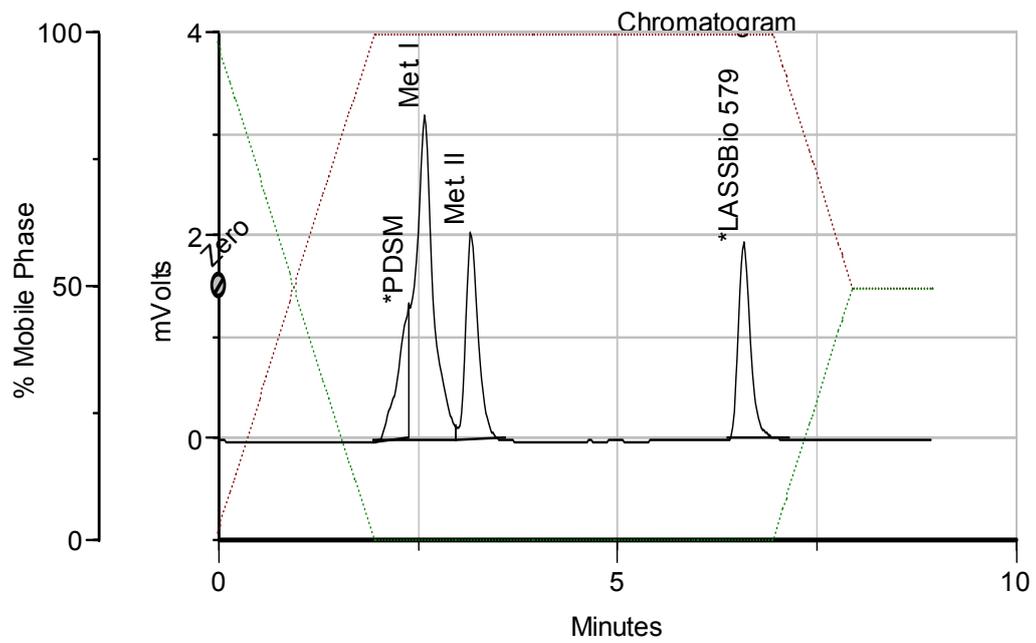


Figura 4.4 - Perfil cromatográfico do meio reacional (PDSM) em sistema gradiente (sistema 5) e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

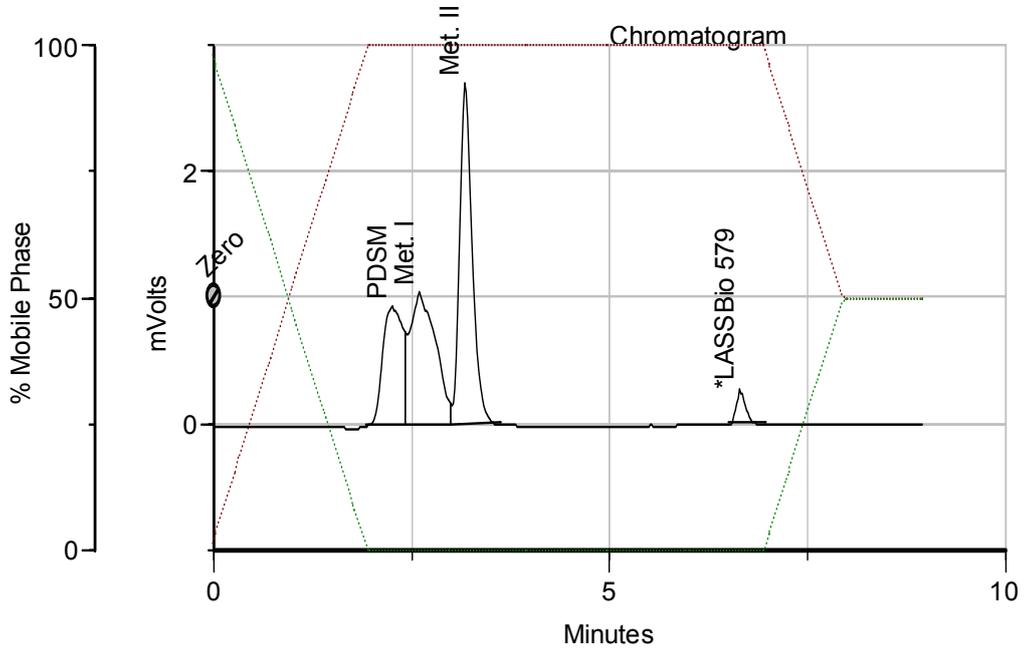
As alíquotas retiradas do meio reacional de cada cepa no tempo de 48 horas foram analisadas por CLAE empregando o sistema 5. Os cromatogramas resultantes foram analisados e os metabólitos produzidos foram enumerados de acordo com o tempo de retenção (Rt).

O consumo de LASSBio 579 e a produção da quantidade dos diferentes produtos gerados foi acompanhada por CLAE em fase reversa (sistema 5).

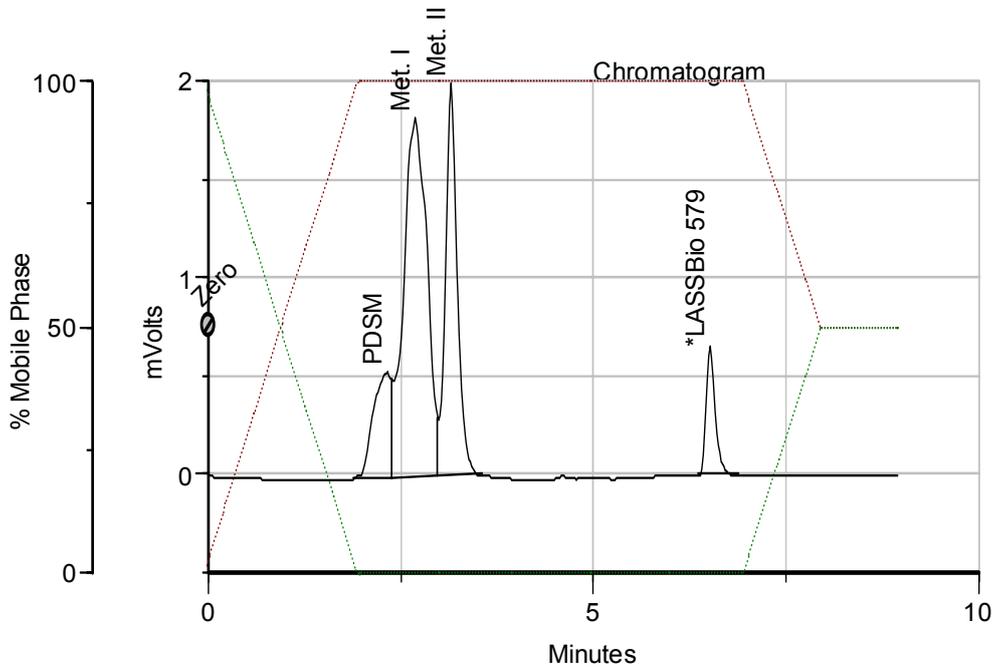
Na Figura 4.5 pode-se observar os perfis cromatográficos de cada uma das cepa testadas, enumeradas de 1 a 15, no período de incubação de 48 horas (páginas 75 a 82).

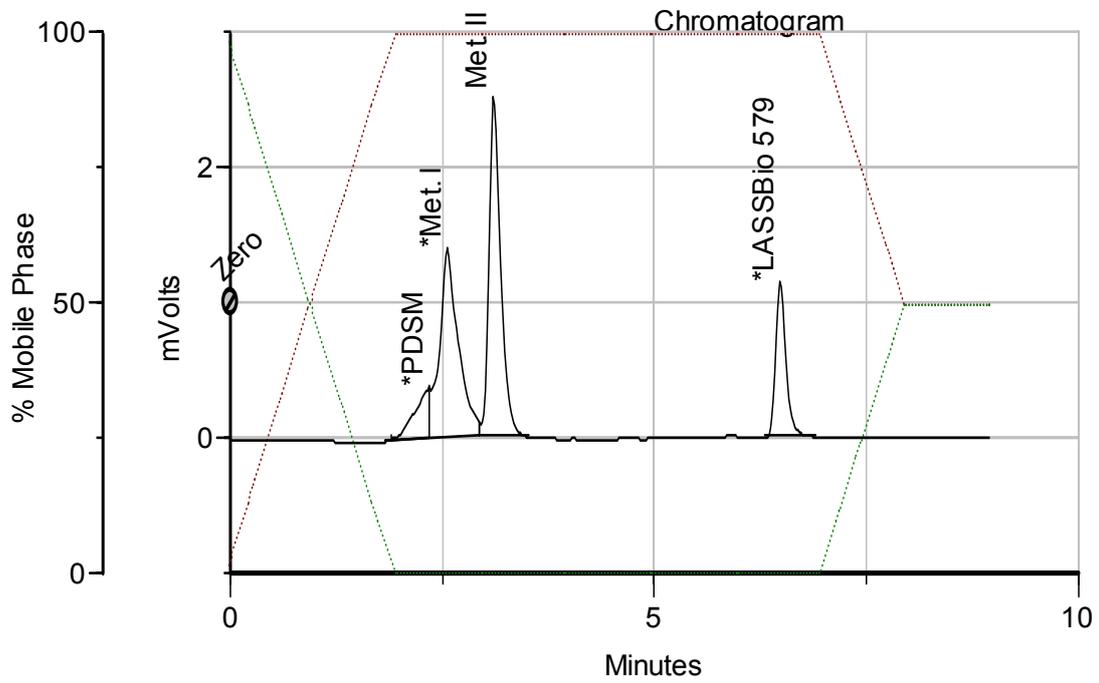
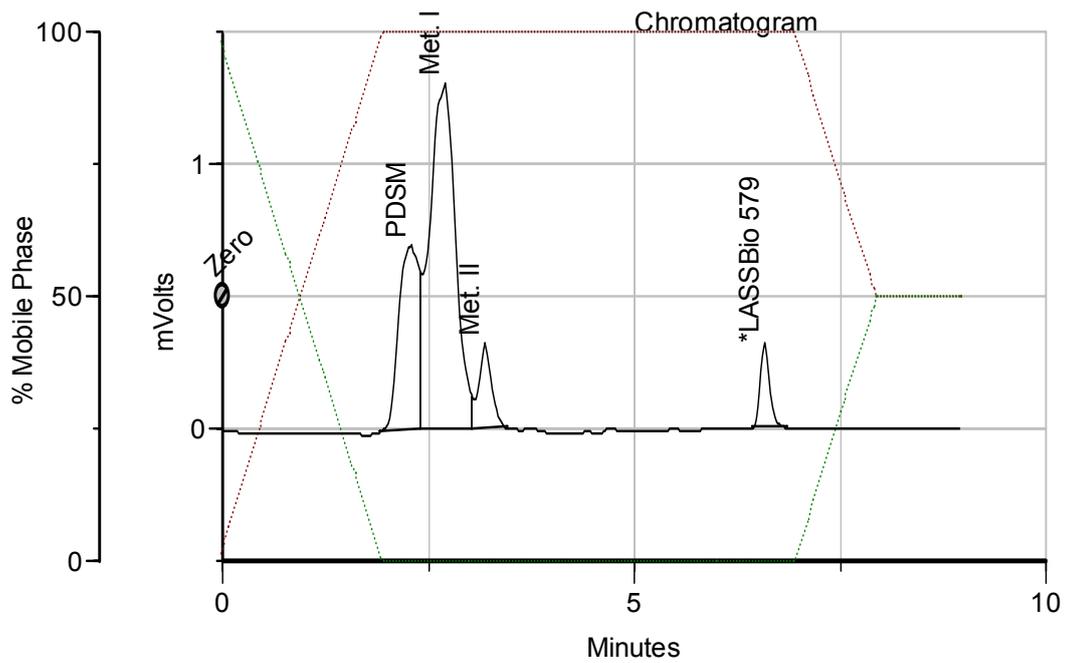
**1 - *Absidia blakesleana* ATCC 26617****2 - *Absidia blakesleana* ATCC 10148b**

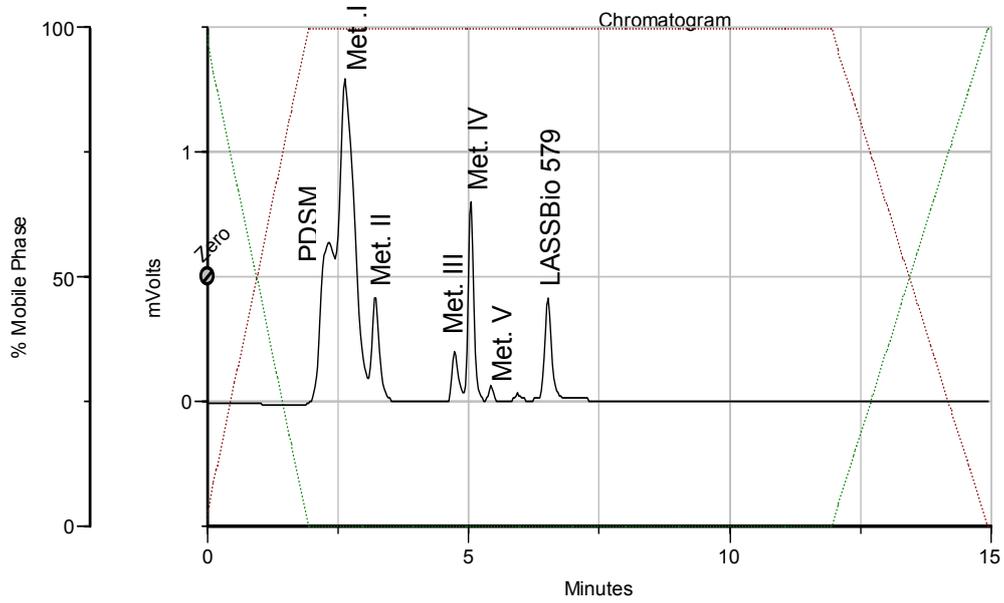
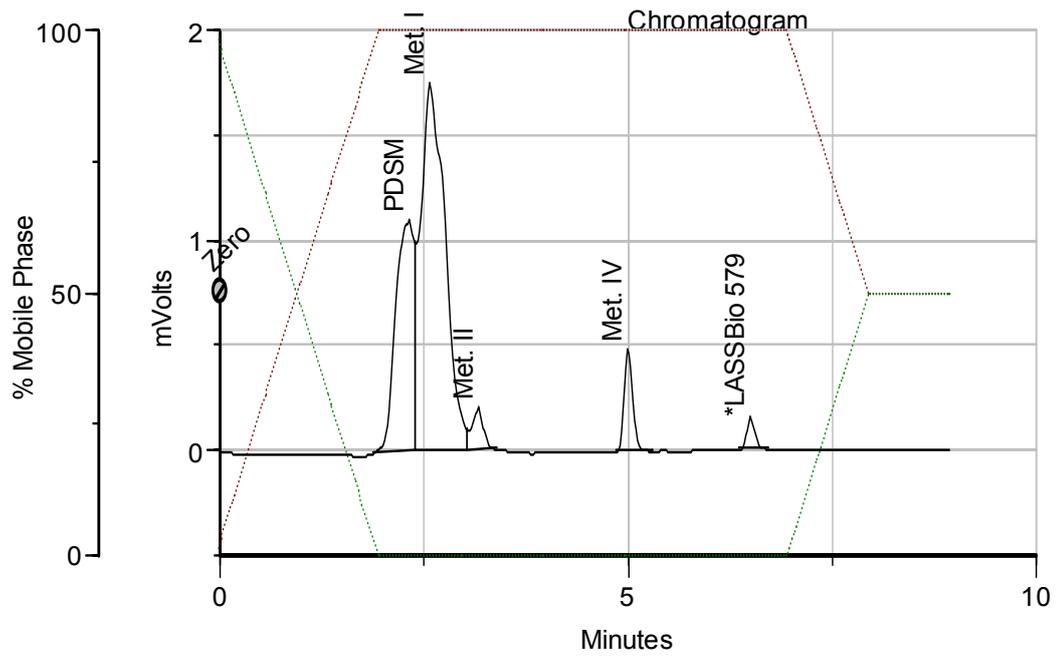
**3 - *Aspergillus candidus* ATCC 2023**

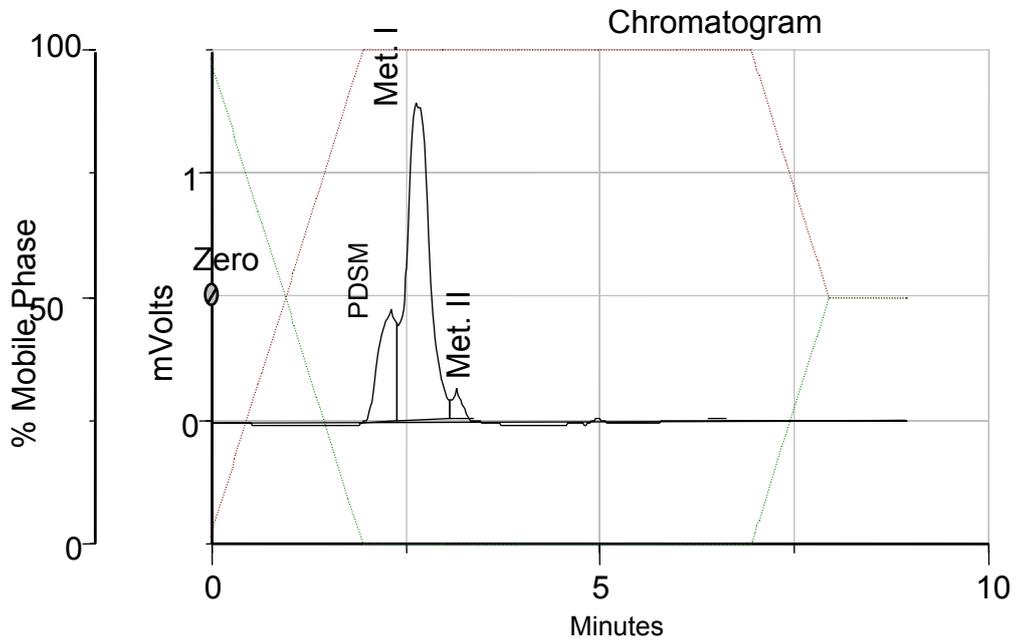
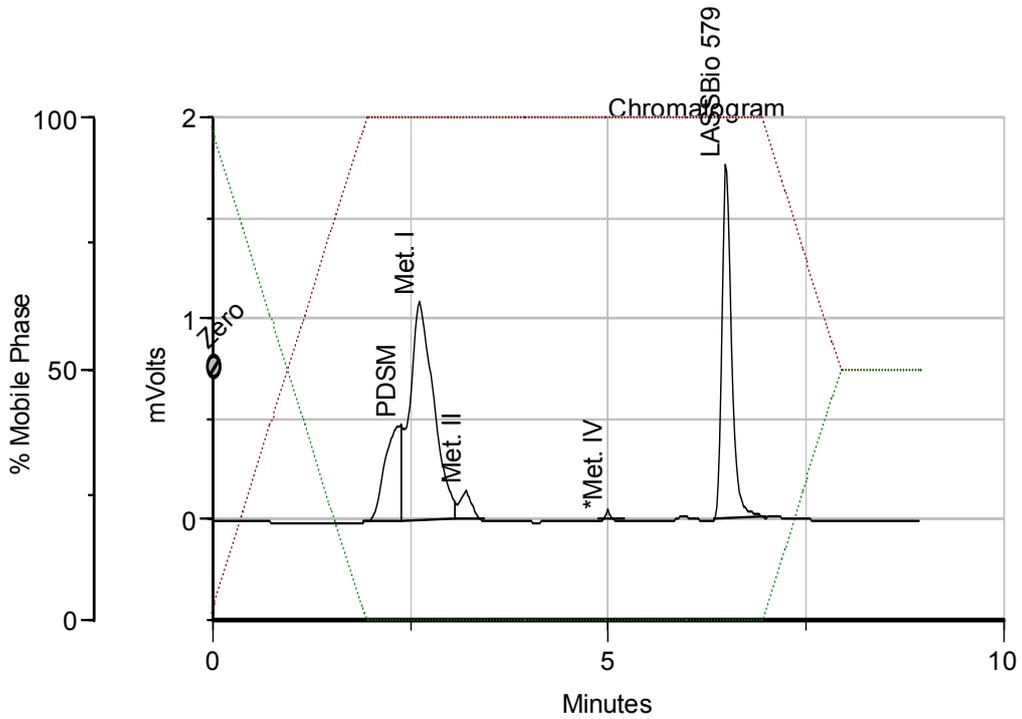


**4 - *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009**

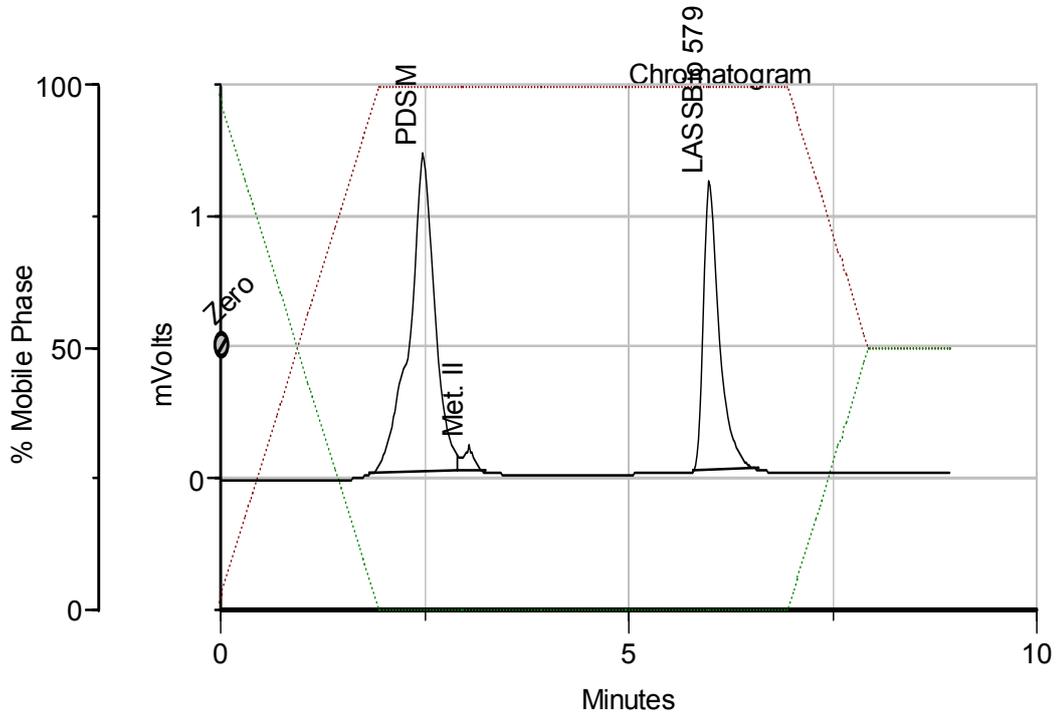


**5 - *Beauveria bassiana* ATCC 7149****6 - *Chaetonium indicum* LCP 984200**

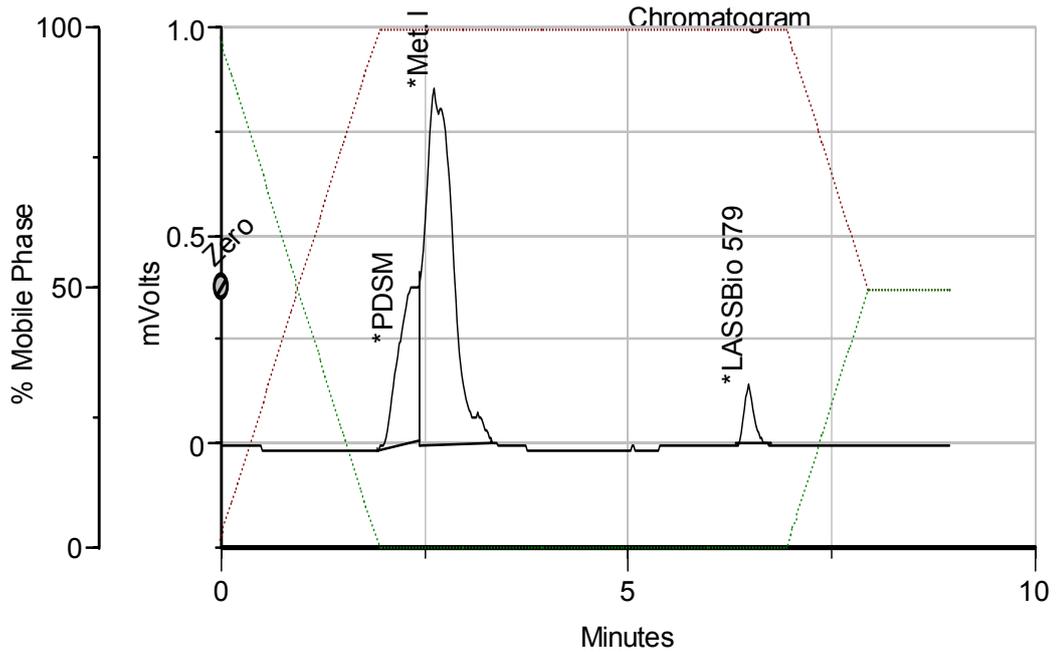
**7 - *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244****8 - *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245**

**9 - *Cunninghamella elegans* ATCC 36112****10 - *Cunninghamella elegans* ATCC 26169**

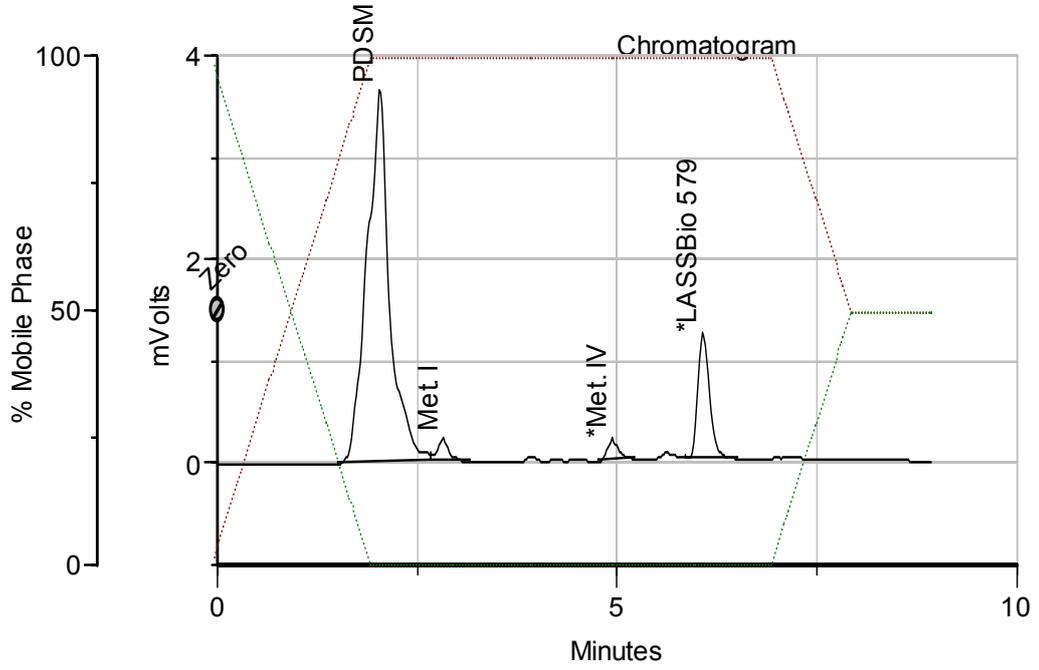
**11 - *Curvularia lunata* NRRL 2380**



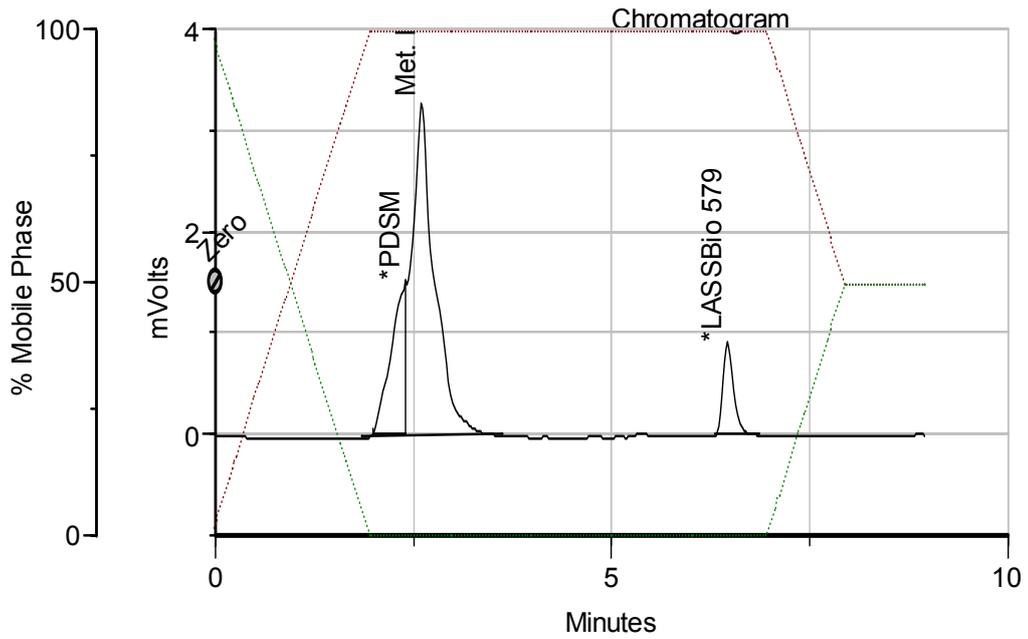
**12 - *Fusarium roseum* ATCC 14717**



**13 - *Mortierella isabelina* NRRL 1757**



**14 - *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a**



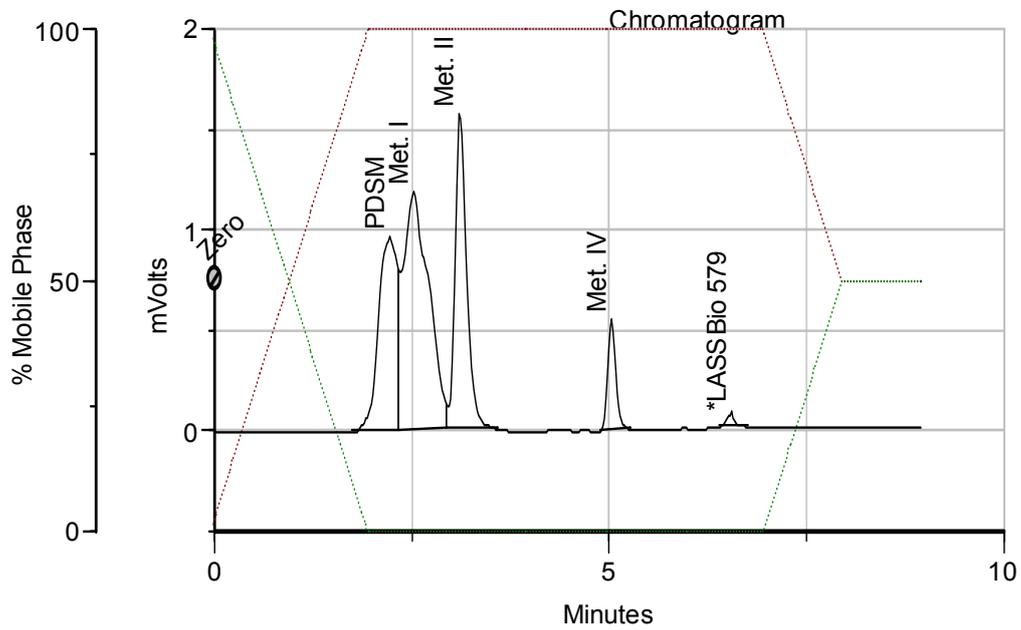
**15 - *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145**

Figura 4.5 - Perfis cromatográficos dos sobrenadantes de incubação do LASSBio 579 com as diversas cepas testadas, enumeradas de 1 a 15, no tempo de 48 horas em sistema gradiente (Sistema 5) e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

A formação do derivado I, produzido pela maioria das cepas e o consumo do substrato pode ser melhor observado no Gráfico 2. *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 (cepa 9) produziu o metabólito I majoritariamente, consumindo todo o substrato no tempo de 48 horas, ao contrário da cepa 11, *Curvularia lunata* NRRL 2380 que não foi capaz de produzir o derivado I.

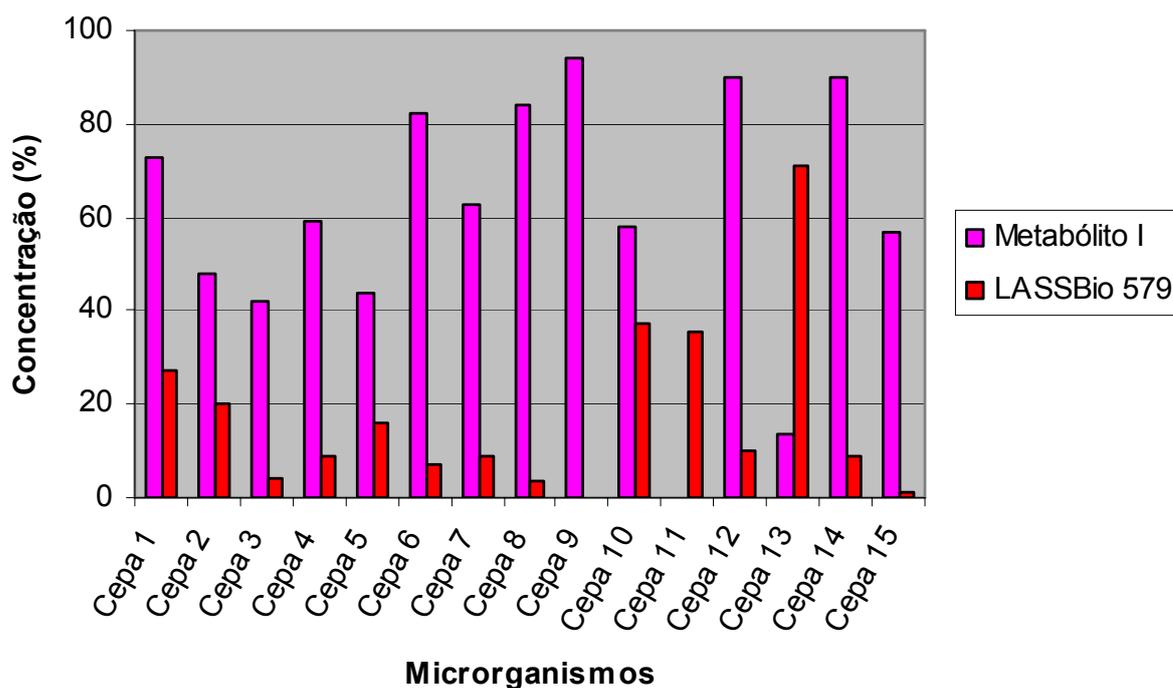


Gráfico 2 - Produção do Metabólito I pelas diversas cepas ensaiadas x consumo do substrato LASSBio 579. Cepa 1: *Absidia blakesleana* ATCC 26617; Cepa 2: *Absidia blakesleana* ATCC 10148b; Cepa 3: *Aspergillus candidus* ATCC 2023; Cepa 4: *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009; Cepa 5: *Beauveria bassiana* ATCC 7149; Cepa 6: *Chaetonium indicum* LCP 984200; Cepa 7: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244; Cepa 8: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245; Cepa 9: *Cunninghamella elegans* ATCC 36112; Cepa 10: *Cunninghamella elegans* ATCC 26169; Cepa 11: *Curvularia lunata* NRRL 2380; Cepa 12: *Fusarium roseum* ATCC 14717; Cepa 13: *Mortierella isabelina* NRRL 1757; Cepa 14: *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a; Cepa 15: *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145.

A formação do metabólito II pode ser observada por alguns dos microrganismos, sendo que *Aspergillus candidus* ATCC 2023 (cepa 3) foi o que apresentou maior capacidade bioconversora para a produção desse derivado e por isso foi escolhida para estudos em escala semi-preparativa. Pode-se perceber também que o substrato apresentou-se em maiores quantidades no sobrenadante de incubação da cepa *Mortierella isabelina* NRRL 1757 (cepa 13) ao final das 48 horas de incubação (Gráfico 3).

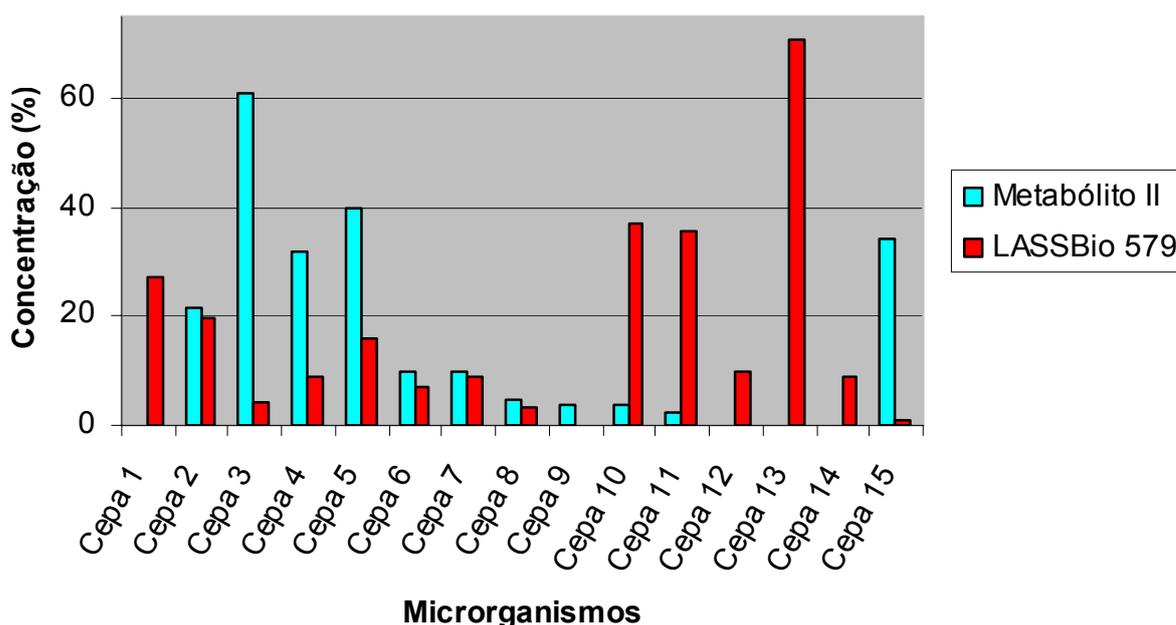


Gráfico 3 - Produção do Metabólito II pelas diversas cepas ensaiadas x consumo do substrato LASSBio 579. Cepa 1: *Absidia blakesleana* ATCC 26617; Cepa 2: *Absidia blakesleana* ATCC 10148b; Cepa 3: *Aspergillus candidus* ATCC 2023; Cepa 4: *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009; Cepa 5: *Beauveria bassiana* ATCC 7149; Cepa 6: *Chaetonium indicum* LCP 984200; Cepa 7: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244; Cepa 8: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245; Cepa 9: *Cunninghamella elegans* ATCC 36112; Cepa 10: *Cunninghamella elegans* ATCC 26169; Cepa 11: *Curvularia lunata* NRRL 2380; Cepa 12: *Fusarium roseum* ATCC 14717; Cepa 13: *Mortierella isabelina* NRRL 1757; Cepa 14: *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a; Cepa 15: *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145

*Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (cepa 7) também foi eficaz na produção dos metabólito III, IV e V como pode ser melhor observado no Gráfico 4.

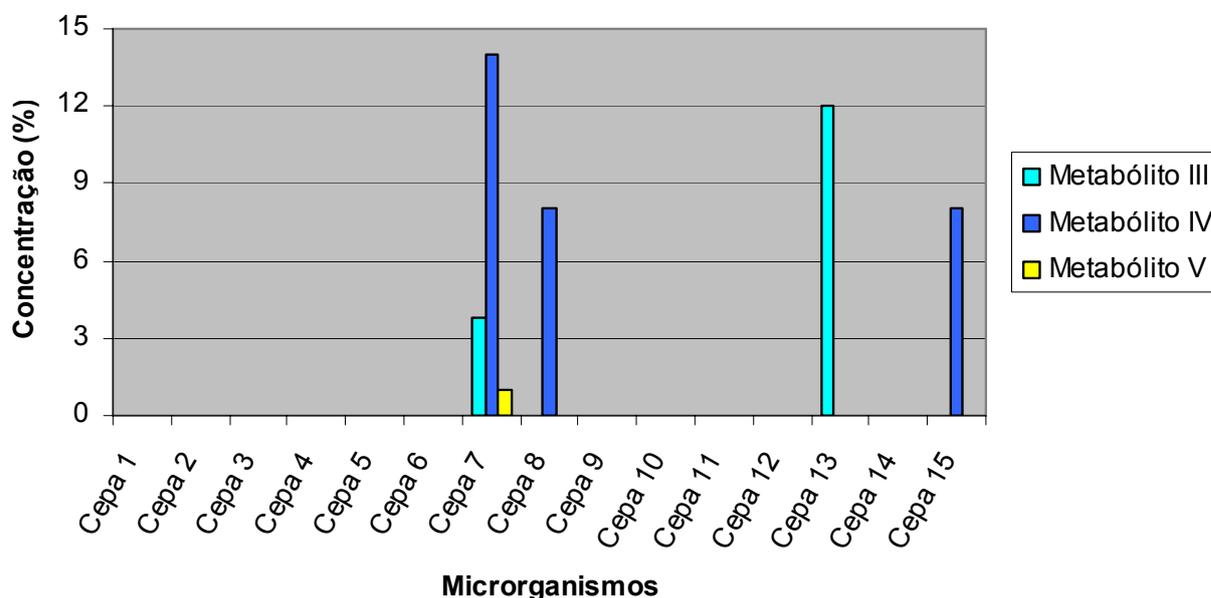


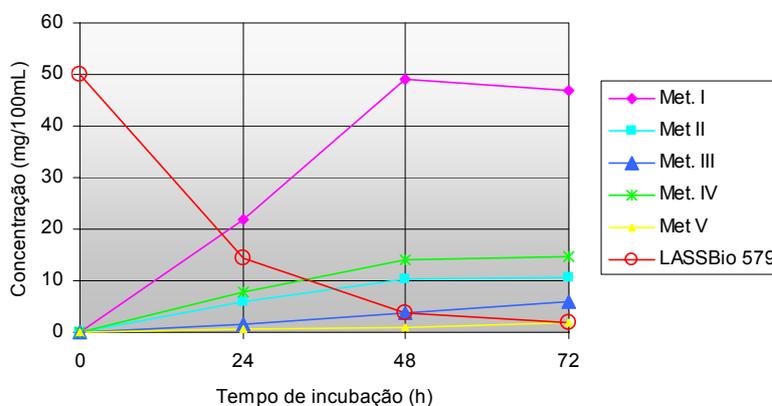
Gráfico 4 - Produção dos Metabólitos III, IV e V pelas diversas cepas ensaiadas. Cepa 1: *Absidia blakesleana* ATCC 26617; Cepa 2: *Absidia blakesleana* ATCC 10148b; Cepa 3: *Aspergillus candidus* ATCC 2023; Cepa 4: *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009; Cepa 5: *Beauveria bassiana* ATCC 7149; Cepa 6: *Chaetonium indicum* LCP 984200; Cepa 7: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244; Cepa 8: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245; Cepa 9: *Cunninghamella elegans* ATCC 36112; Cepa 10: *Cunninghamella elegans* ATCC 26169; Cepa 11: *Curvularia lunata* NRRL 2380; Cepa 12: *Fusarium roseum* ATCC 14717; Cepa 13: *Mortierella isabelina* NRRL 1757; Cepa 14: *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a; Cepa 15: *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145.

#### 4.3.2 Cinética de Bioconversão

A cinética de consumo do substrato LASSBio 579 e de formação dos produtos foi determinada para os dois fungos selecionados para estudos em escala semi-preparativa. A concentração relativa de cada metabólito no meio reacional, em cada tempo, foi calculada de acordo a área sob a curva do derivado em relação a área total do cromatograma. Esses valores foram transferidos para gráficos de concentração (mg/100 mL) em função do tempo (horas) (Gráfico 5).

**Microrganismo**
**Gráfico da cinética**

*Cunninghamella  
echinulata* ATCC 9244



*Aspergillus candidus*  
ATCC 2023

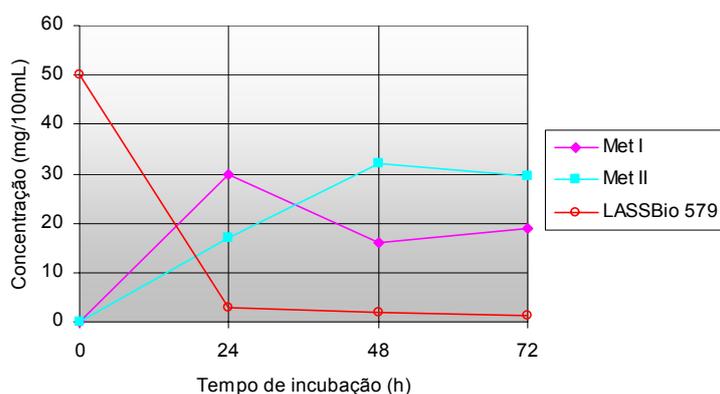


Gráfico 5 - Representação das cinéticas de formação dos metabólitos do LASSBio 579 nos períodos de 24, 48, 72 horas por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Aspergillus candidus* ATCC 2023. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5  $\mu$ ); Sistema 5; detecção a 257 nm.

*Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 mostrou uma capacidade bioconversora superior às demais cepas, com a produção de uma maior diversidade de derivados. A biotransformação do substrato LASSBio 579 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (meio PDSM, agitação 200 rpm, temperatura 27 °C) levou a formação de cinco derivados. Pela análise do gráfico da cinética (Gráfico 5), observou-se uma diminuição do substrato à medida que os produtos eram formados. Houve a formação majoritária do derivado I que atingiu sua concentração máxima em 48 horas com diminuição no tempo de 72 horas. Os derivados II, III e IV

apresentaram-se em maiores quantidades ao final das 72 horas enquanto que o metabólito V foi formado em pequenas quantidades.

*Aspergillus candidus* ATCC 2023 também apresentou uma boa capacidade metabolizadora com a produção de um derivado em maior quantidade (meio PDSM, agitação 200 rpm, temperatura 27 °C) (Gráfico 5). O derivado II foi sendo formado pela cepa à medida que o substrato era consumido e embora também tenha sido produzido por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (em pequena quantidade), mostrou-se de interesse já que no tempo de 48 horas apresentou-se em maior quantidade em relação aos demais produzidos pelas outras cepas.

#### 4.3.3 Produção de derivados em escala semi-preparativa

Dentre as cepas ensaiadas, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (Figura 4.6) e *Aspergillus candidus* ATCC 2023 (Figura 4.7) foram selecionadas para estudos em escala semi-preparativa para obtenção de derivados em maior quantidade.

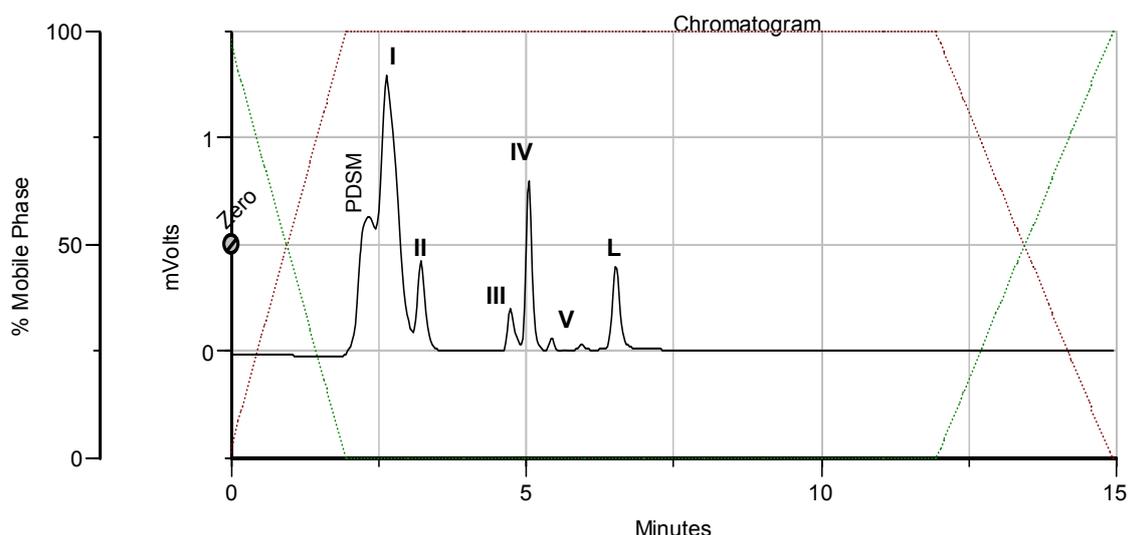


Figura 4.6 – Cromatograma referente ao sobrenadante de incubação do substrato LASSBio 579 com a cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 no período 48 horas. PDSM: meio reacional, Metabólitos: I, II, III, IV, V e substrato LASSBio 579: L. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

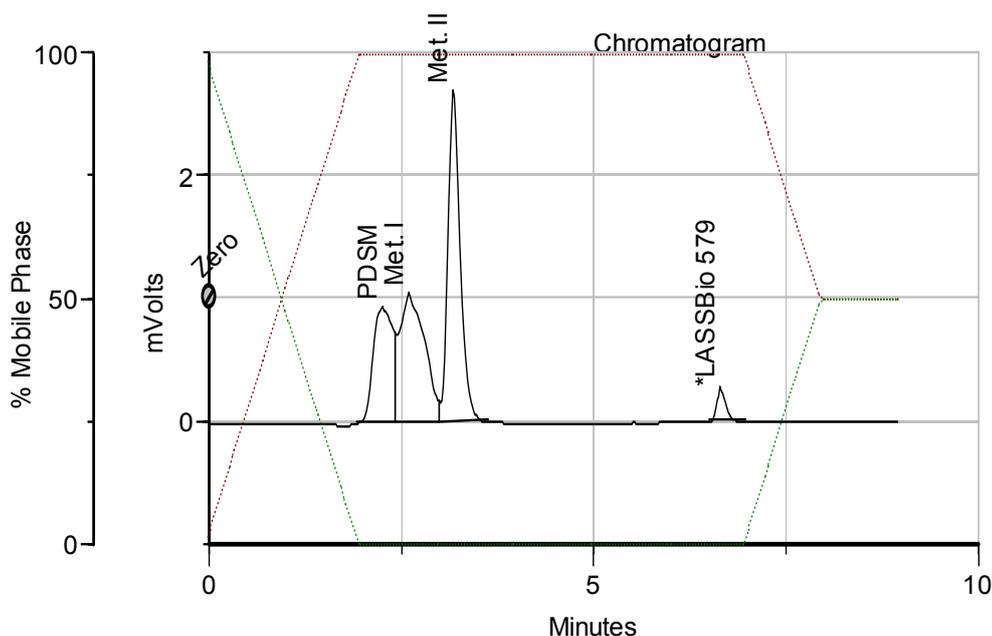


Figura 4.7 – Cromatograma referente ao sobrenadante de incubação do substrato LASSBio 579 com a cepa *Aspergillus candidus* ATCC 2023 no período 48 horas. PDSM: meio reacional, Metabólitos I, II e substrato LASSBio 579. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

#### 4.3.3.1 1° Ensaio (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244)

Após filtração e extração, as frações orgânicas e cetônicas foram recristalizadas em metanol e devido à similaridade dos produtos formados essas porções foram reunidas e purificadas por *flash* cromatografia utilizando uma coluna de vidro de 300 x 20 mm, preenchida como fase estacionária sílicagel 60, Vetec®, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh) e fase móvel acetato de etila/metanol 95:05, e o monitoramento para acompanhar a separação dos produtos formados foi feito por CCD, usando como fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 e luz UV (254 e 365 nm) como revelador. A CCD evidenciou a separação de dois produtos obtidos com a cromatografia em coluna, na qual cada um dos derivados foi separado e obtido puro, porém com rendimentos abaixo de 1%. O primeiro produto obtido com Rf de 0,57, foi denominado LaBioCon 23. O segundo produto apresentou um Rf de 0,18 foi denominado LaBioCon 24. Dessa forma, utilizou-se a CCD preparativa para obter os demais produtos purificados, LaBioCon 26 e LaBioCon 27, entretanto, mesmo aplicando CCD preparativa o produto LaBioCon 27 não foi totalmente purificado o que dificultou as análises para caracterização estrutural. Os valores obtidos de fator

de retenção (Rf) para os produtos coletados estão relacionados aos tempos de retenção obtidos por CLAE e representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de fator de retenção (Rf), tempo de retenção (Rt), rendimentos e revelador utilizado para o substrato e os produtos obtidos após purificação por *flash* cromatografia e CCD preparativa. Fase móvel de acetato de etila/metanol 95:05 v/v.

Amostra	Fator de retenção (Rf)	Tempo de retenção (Rt - min)	Rendimentos	Detector
LASSBio 579	0,75	6,5	-	254 nm
LaBioCon 23	0,57	4,7	1,2 mg	254 nm
LaBioCon 24	0,18	2,6	2,0 mg	254 nm
LaBioCon 26	0,36	5,0	0,9 mg	254 nm
LaBioCon 27	0,45	5,4	-	254 nm

Devido aos baixos rendimentos obtidos não foi possível a caracterização estrutural de todos os produtos.

O derivado LabioCon 23 e o LabioCon 24 tiveram suas estruturas proposta após ser análise por EM e RMN <sup>1</sup>H.

#### 4.3.3.2 2° Ensaio (Cepa: *Aspergillus candidus* ATCC 2023)

A extração do meio reacional incubado com *Aspergillus candidus* ATCC 2023 originou uma fração orgânica e uma fração cetônica que passou por um processo de recristalização com diclorometano, acetato de etila e metanol no qual obteve-se 86mg do produto *N*-metilpiperazina, na forma de pó branco, a partir da fração cetônica insolúvel em metanol e solúvel em água.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

O derivado LaBioCon 23 obtido a partir da bioconversão do LASSBio 579 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi caracterizado por espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). O derivado LaBioCon 24 foi analisado por EM.

Observa-se que as atribuições dos sinais nos espectros de RMN são baseadas em trabalhos prévios do grupo (MENEGATTI,2001). Quando se trata do substrato LASSBio 579, os valores obtidos dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) podem ser observados na Tabela 3 e nos espectros nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10.

Tabela 3 – Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300 MHz) para o substrato LASSBio 579, número de hidrogênios ( $\text{N}^\circ\text{-H}$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm), Multiplicidade (Multiplic.), Constante de acoplamento ( $J$ , Hz).

LASSBio 579				
	$\text{N}^\circ\text{-H}$	$\delta$ (ppm)	Multiplic.	$J$ (Hz)
	H-3	7,73 ppm (1H)	s	-
	H-5	8,22 ppm (1H)	s	-
	H-6	3,60 ppm (2H)	s	-
	H-8, H-12	2,67 - 2,70 ppm (4H)	m	-
	H-9, H-11	3,18 - 3,21 ppm (4H)	m	-
	H-2', H-6'	7,76 ppm (2H)	d	9 Hz
	H-3', H-5'	7,49 ppm (2H)	d	9 Hz
	H-2'', H-6''	6,94 – 6,98 ppm (2H)	m	-
	H-3'', H-5''	7,19 – 7,26 ppm (2H)	m	-
	H-4''	6,81 – 6,86 ppm (1H)	m	-

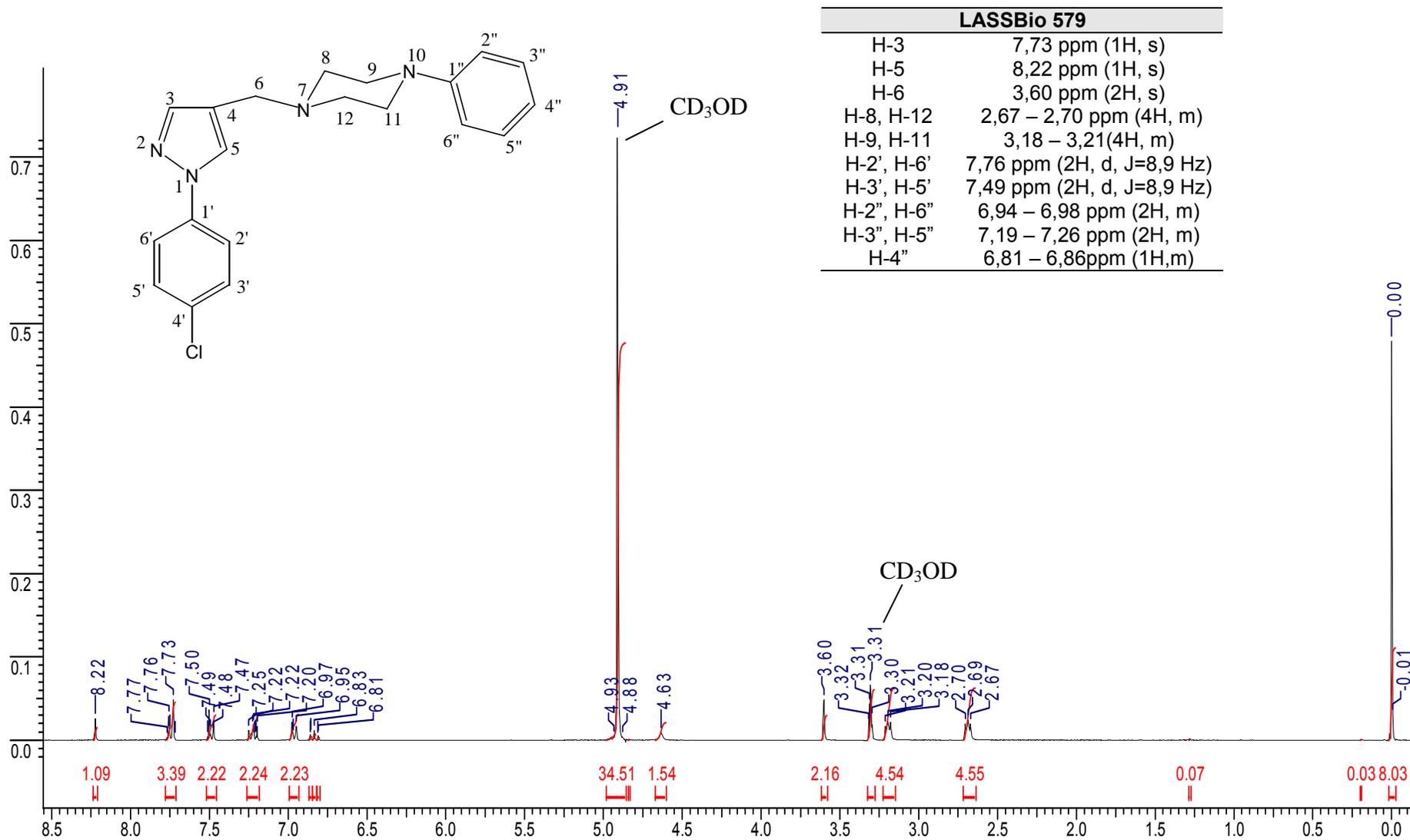


Figura 4.8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do substrato LASSBio 579 ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}/300\text{MHz}$ ).

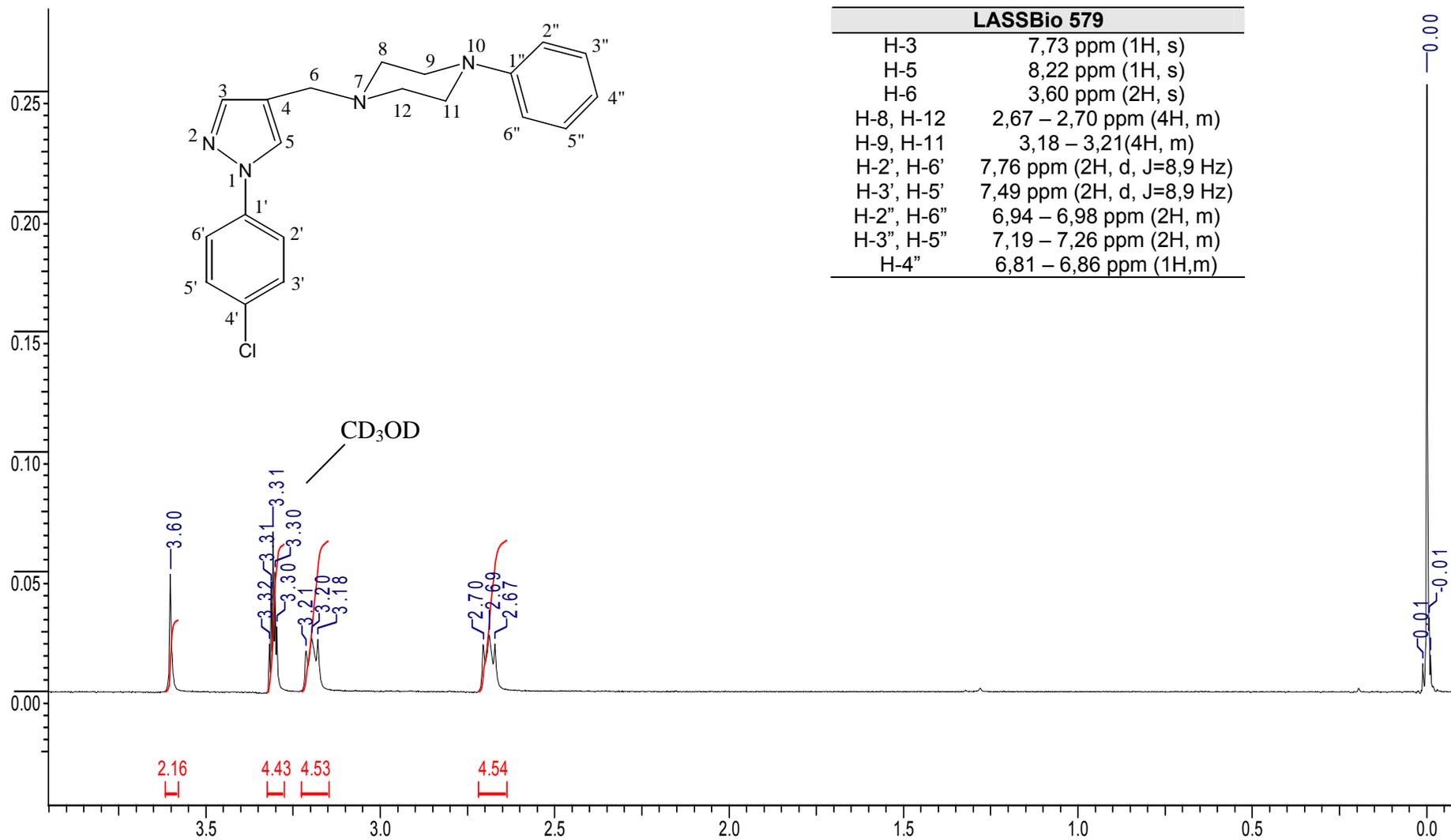


Figura 4.9 – Expansão 1 do espectro de RMN <sup>1</sup>H do substrato LASSBio 579 (CD<sub>3</sub>OD/TMS/300 MHz).

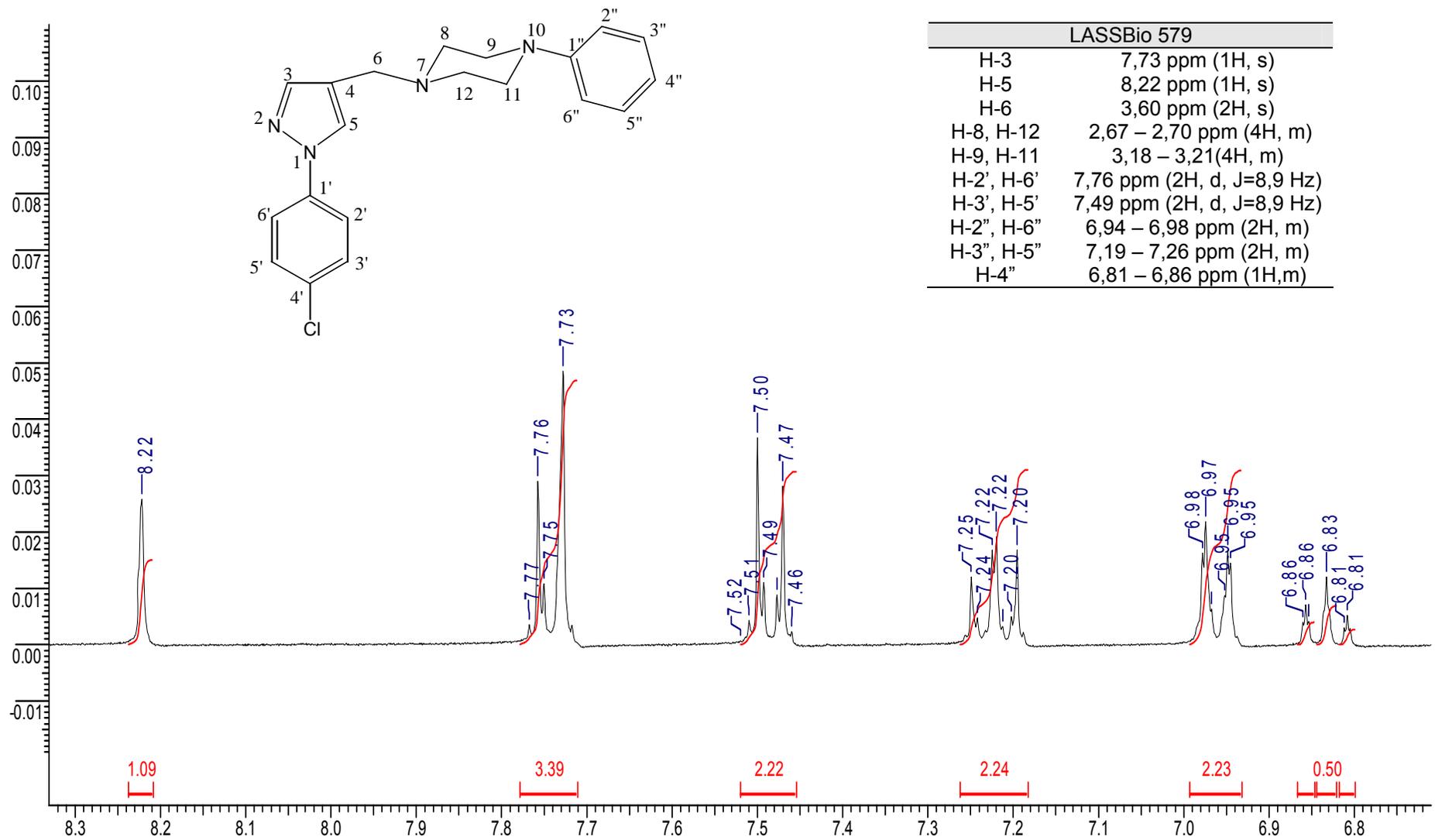


Figura 4.10 – Expansão 2 do espectro de RMN <sup>1</sup>H do substrato LASSBio 579 (CD<sub>3</sub>OD/TMS/300MHz).

#### 4.4.1 LaBioCon 23 (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244)

Pela incubação do LASSBio 579 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 obteve-se o LaBioCon 23, um produto hidroxilado no anel benzênico como está representado na Figura 4.11.

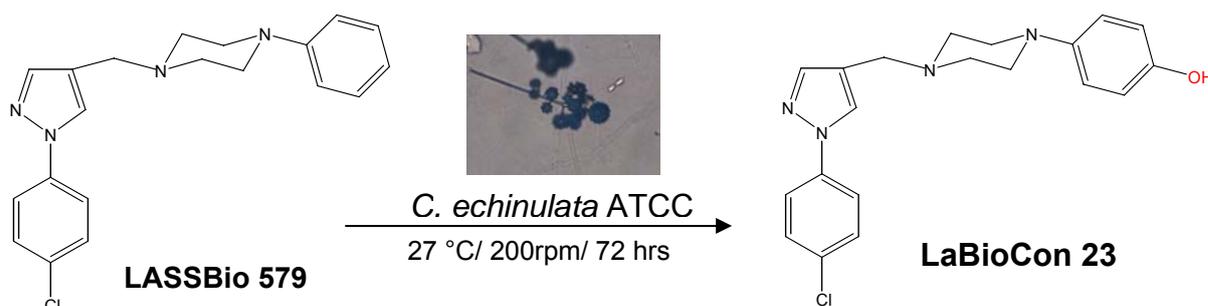


Figura 4.11 – Bioconversão do LASSBio 579 por *Cunninghamella echinulata* formando o produto hidroxilado LaBioCon 23.

A análise por CLAE do produto purificado LaBioCon 23 utilizando o Sistema 5 (item 3.1, p. 52), previamente selecionado, resultou no cromatograma apresentado na Figura 4.12. Foi possível observar um pico majoritário com tempo de retenção de 4,7 minutos, confirmando que o LaBioCon 23 refere-se ao metabólito III (ver Tabela 1, p. 71), sendo portanto o produto detectado no meio reacional de incubação do LASSBio 579 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 nos tempos de 24, 48 e 72 horas, atingindo o máximo de sua concentração em 48 horas, como mostra o gráfico da cinética (item 4.3.2, p. 86).

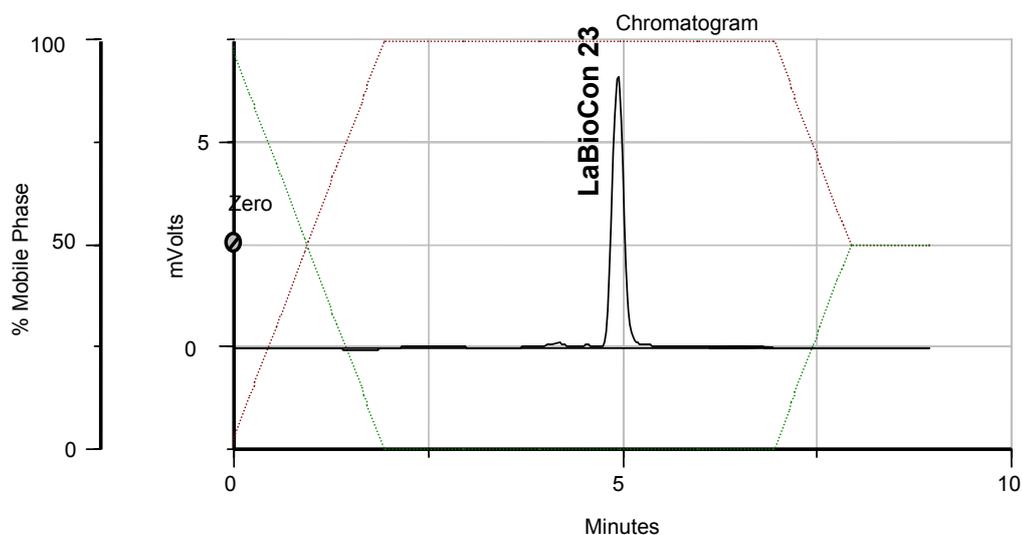


Figura 4.12 – Cromatograma do produto purificado LaBioCon 23. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

O produto foi analisado por EM e RMN  $^1\text{H}$ . O espectro de massas sugere que houve uma provável hidroxilação. Considerando a massa do LASSBio 579 igual ao pico de massa 354,3  $[\text{M}^+ + 2] - \text{OH}$ , inferiu-se que o pico do íon molecular em 370,1 seja  $[\text{M}^+ + 2] + 17 (\text{OH})$ , ou seja, a massa do substrato adicionado da massa de uma hidroxila, resultando no derivado LabioCon 23 que pode ser visto na Figura 4.13. Ainda pode-se observar as massas 192,2 e 178,2 referentes a um fragmento característico do substrato e a um fragmento do substrato acrescido de uma hidroxila, respectivamente. Pode-se observar ainda picos  $\text{M}+2$  com cerca de 30% da intensidade do pico  $\text{M}$  (exemplo 370,1 e 372,3; 192,0 e 194) que pode ser explicado pelo fato do cloro ter outros isótopos e da abundância isotópica de Cl 37,5 ser cerca 30% do Cl 35,5. Isto significa dizer que sempre que houver o átomo de cloro em um fragmento do espectro de massas, obrigatoriamente haverá um pico  $\text{M}+2$  com cerca de 30% da intensidade do pico  $\text{M}$ . (SANTOS et al., 2005)

Dissolvido em Metanol

TCFG-5 1 (0.508)

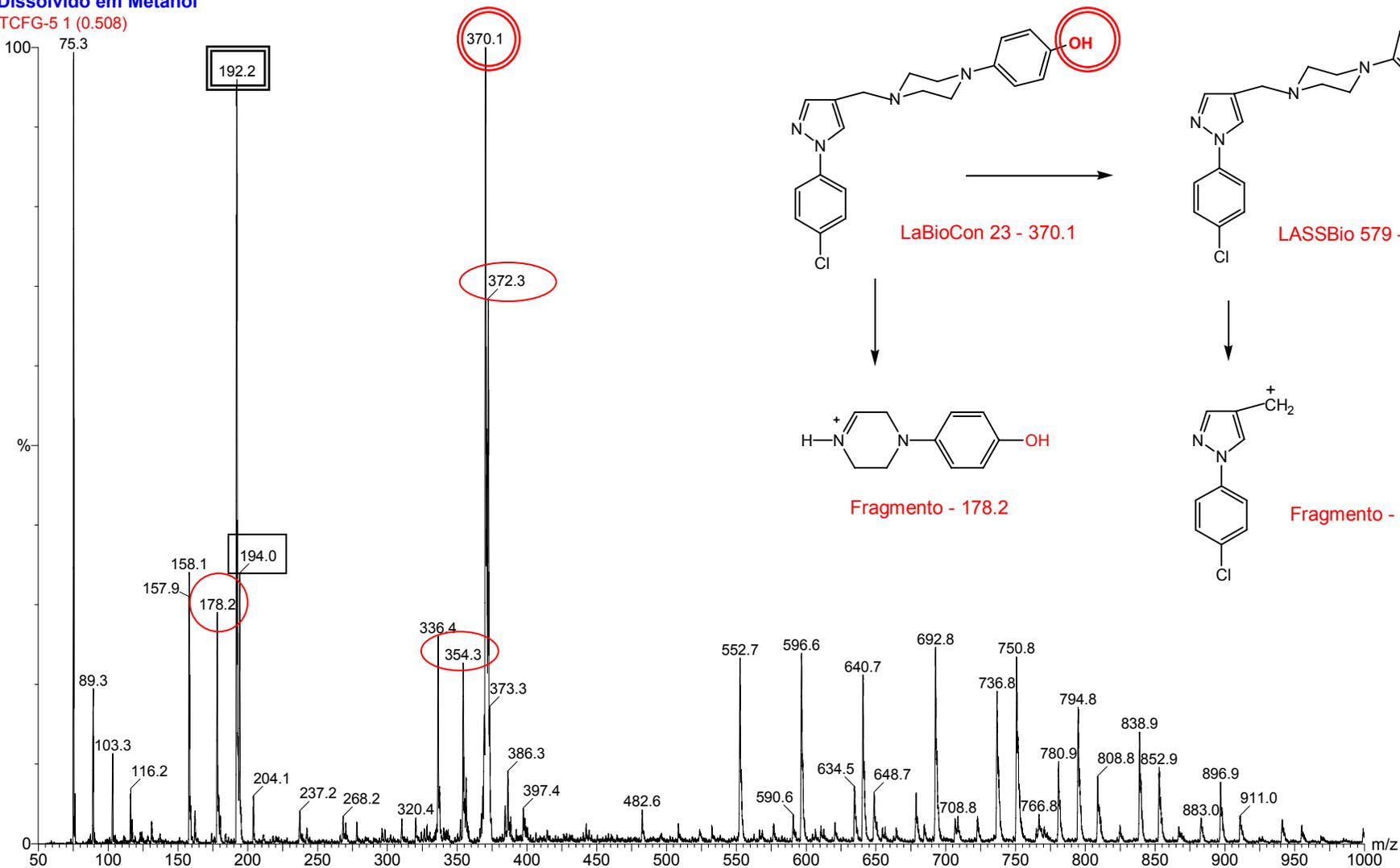


Figura 4.13 - Espectro de massa do derivado LaBioCon 23, destacando o pico do íon molecular e o fragmento do substrato. 8

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz) do derivado LaBioCon 23 e os dados referentes aos espectros estão representados na Figura 4.14.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto LaBioCon 23 evidenciou a presença de um singlete em  $\delta$  7,68 ppm (1H) referente ao H-3 do anel pirazólico, um singlete em  $\delta$  7,94 ppm (1H) referente ao H-5 do mesmo anel, outro singlete em  $\delta$  3,65 ppm (2H) referente ao H-6 da ponte metilênica; dois multipletos em  $\delta$  1,22 – 1,27 ppm e  $\delta$  2,70 – 2,77 ppm, 3,09 – 3,17 ppm referentes aos hidrogênios piperazínicos H-8, H-12 e H-9, H-11, respectivamente. Observa-se ainda um dubleto em  $\delta$  7,63 ppm referente aos H-2' e H-6' e outro dubleto em  $\delta$  7,41 ppm referente aos H-3' e H-5' do anel benzênico que apresenta um cloro na posição 4'. Não foi registrado nenhum sinal referente a hidroxila (muito lábil), no entanto os dubletos em  $\delta$  6,76 ppm e  $\delta$  6,84 ppm referentes aos hidrogênios 2'' e 6''; 3'' e 5'', respectivamente, confirmam uma substituição em *para* no anel benzênico ligado ao anel piperazínico (Tabela 4 e Figura 4.14).

Tabela 4 – Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ; 300 MHz) para o produto LaBioCon 23. Número de hidrogênios (N°-H), deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm), Multiplicidade (Multiplic.), Constate de acoplamento ( $J$ , Hz).

<b>LaBioCon 23</b>				
	<b>N°- H</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm)</b>	<b>Multiplic.</b>	<b><math>J</math></b>
	3	7,68 ppm (1H)	s	-
	5	7,94 pmm (1H)	s	-
	6	3,65 ppm (2H)	s	-
	8 e 12	2,70 – 2,77 ppm (4H)	m	-
	9 e 11	3,09 – 3,17ppm(4H)	m	-
	2' e 6'	7,63 ppm (2H)	d	9 Hz
	3' e 5'	7,41 ppm (2H)	d	9 Hz
	2'' e 6''	6,76 ppm (2H)	d	9 Hz
	3'' e 5''	6,84 ppm (2H)	d	9 Hz

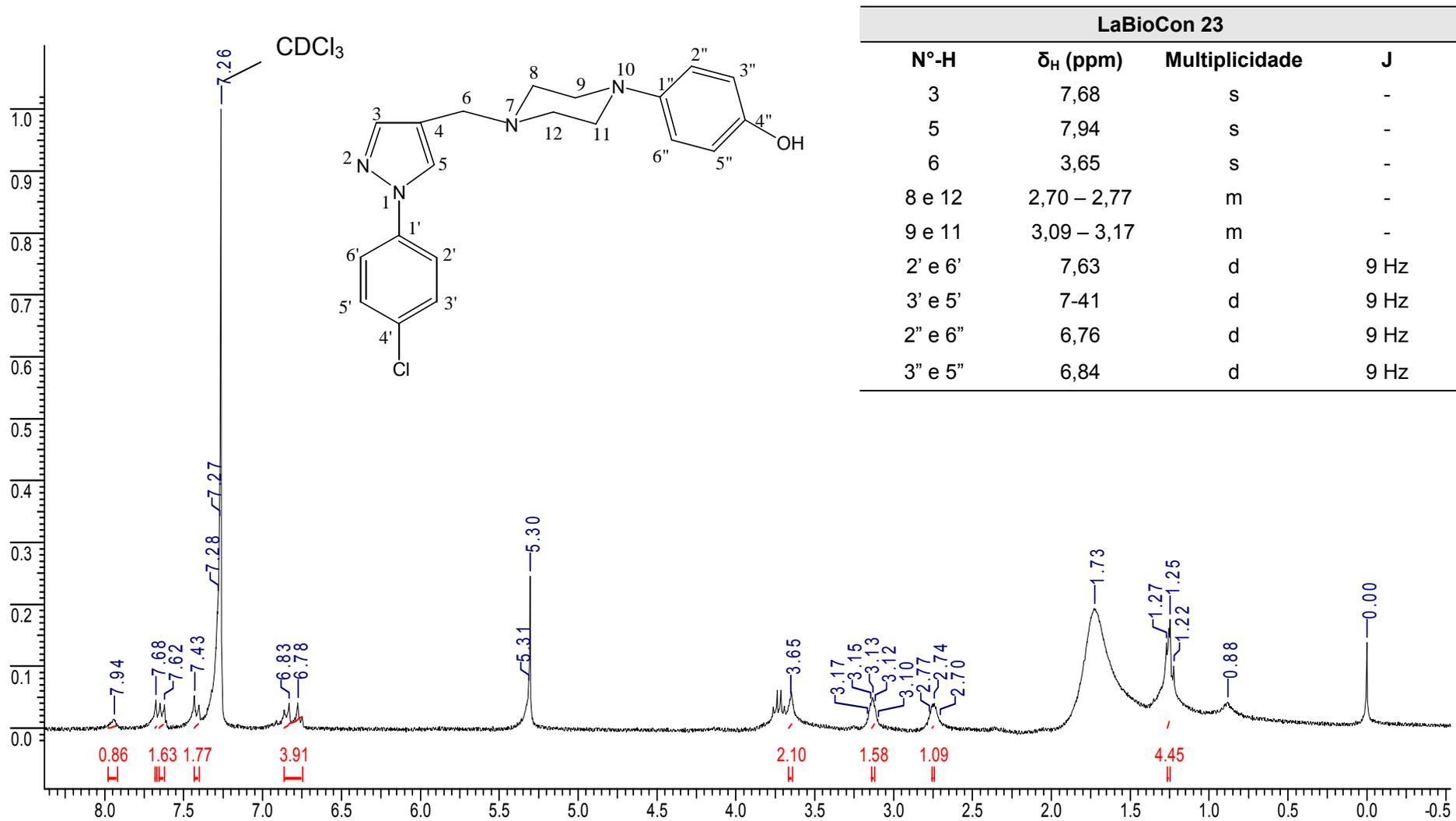


Figura 4.14 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e estrutura química proposta para o produto purificado LaBioCon 23 ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}/300\text{ MHz}$ ) .

#### 4.4.2 LaBioCon 24 (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244)

Ainda pela incubação do LASSBio 579 com *Cunninghamella echinulata* obteve-se o produto glicosilado, LaBioCon 24 (Figura 4.15).

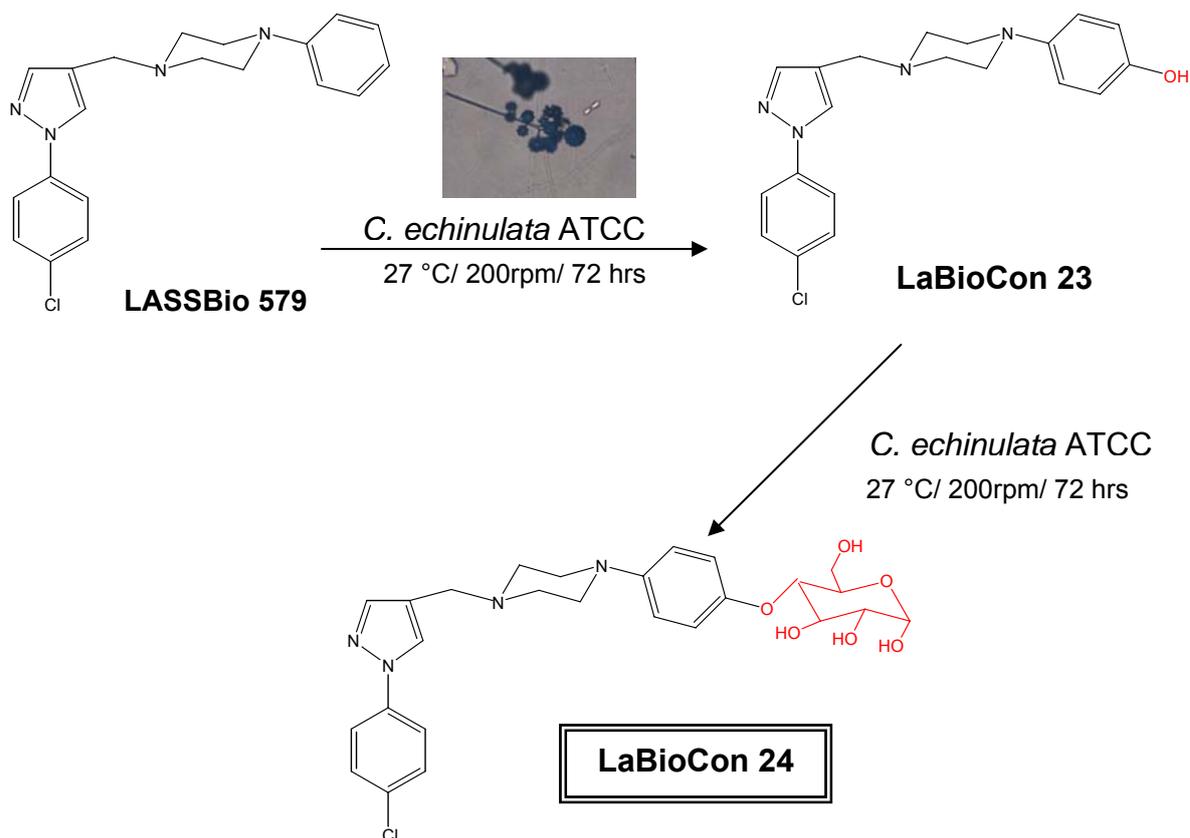


Figura 4.15 – Bioconversão do LASSBio 579 por *Cunninghamella echinulata* formando o produto glicosilado LaBioCon 24.

A análise por CLAE desse produto purificado resultou no cromatograma apresentado na Figura 4.16. Foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 2,6 minutos, confirmando que o LaBioCon 24 trata-se do metabólito I (ver tabela 1, p. 71), sendo o produto detectado em maior abundância no meio reacional de incubação com *C. echinulata* ATCC 9244.

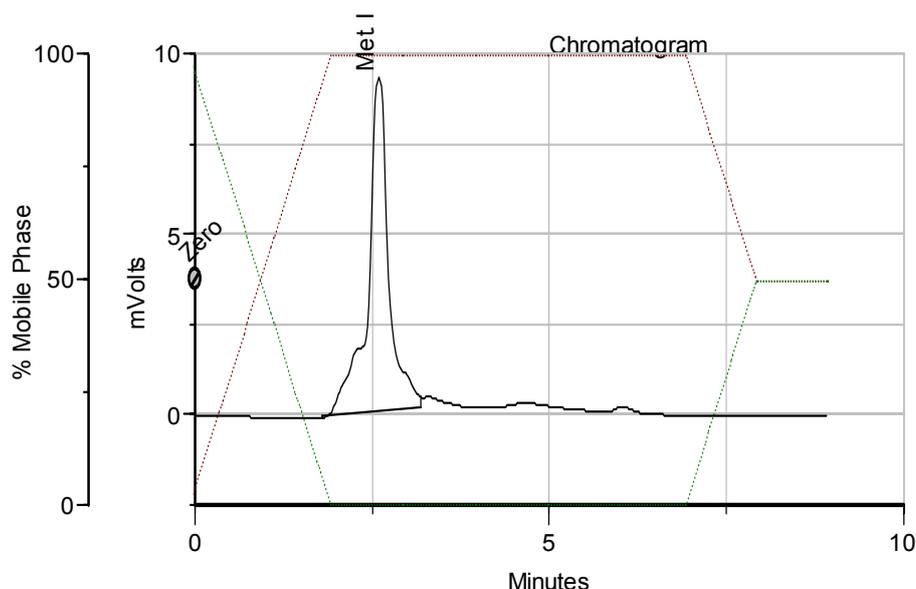


Figura 4.16 – Cromatograma do produto purificado LaBioCon 24. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

O produto foi analisado por EM. O LaBioCon 24 apresenta em seu espectro de massas um pico em  $m/z$  532,5 sugerindo que houve uma provável glicosilação  $[M^+ + 180]$ , considerando a massa do substrato LASSBio 579 igual a 351,3  $[M^+]$  adicionado de 180 correspondente a massa de uma glicose, resultando no derivado LabioCon 24 que pode ser visto na Figura 4.17. O pico de massa 370,3 refere-se ao substrato acrescido de uma hidroxila  $[M^+ + 2] + 17$ . Observa-se também a massa 192,0 referente a um fragmento característico do substrato indicando que não houve a saída do átomo de cloro do anel a do composto de partida (SANTOS et al., 2005).

Dissolvido em Metanol  
TCFG-10 1 (0.508)

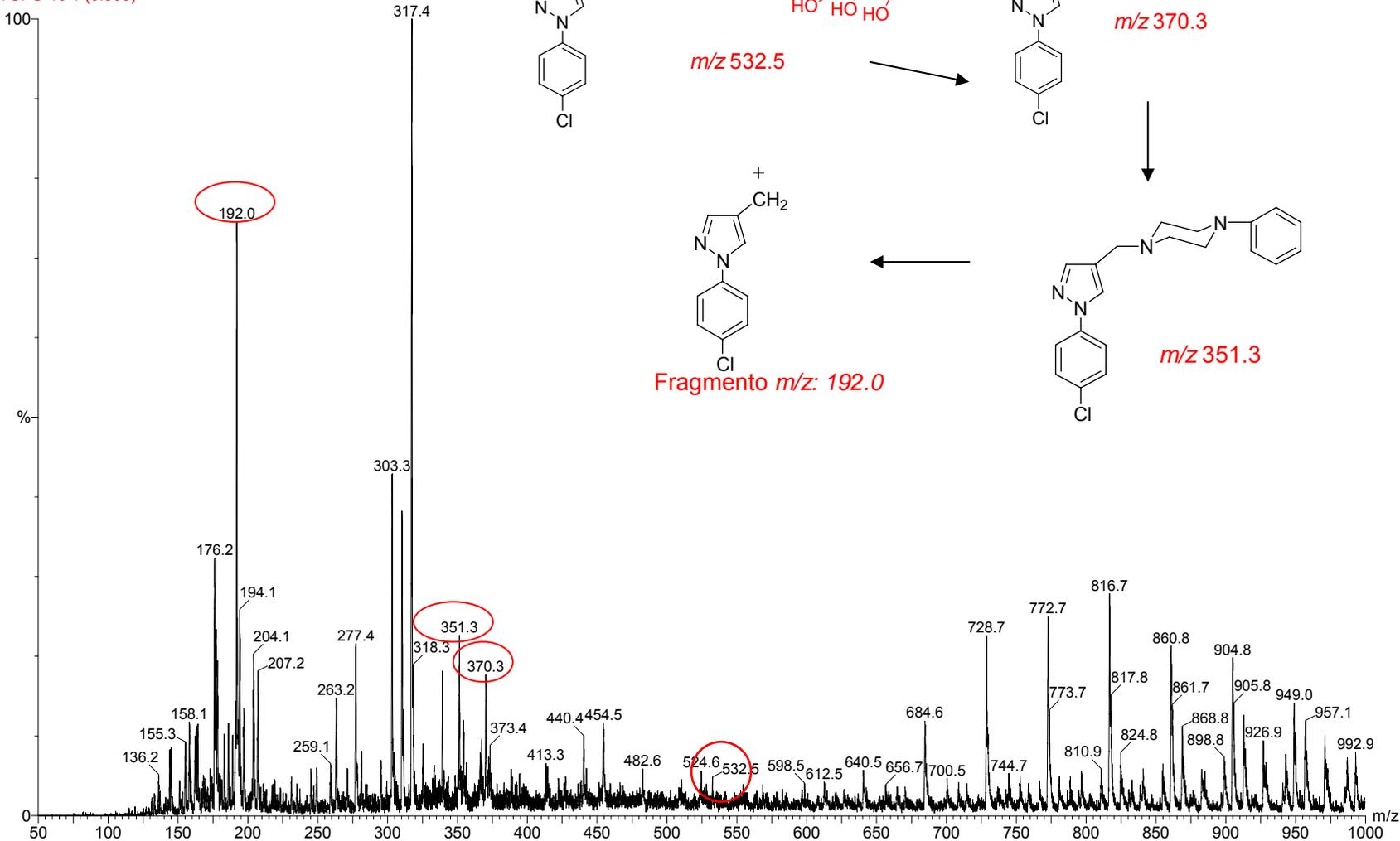


Figura 4.17 - Espectro de massa do derivado LaBioCon 24, destacando o pico do íon molecular e o fragmento do substrato.

#### 4.4.3 LaBioCon 25 ( Cepa: *Aspergillus candidus* ATCC 2023)

Pela incubação do LASSBio 579 com *Aspergillus candidus* ATCC 2023 obteve-se o produto LaBioCon 25. O LASSBio 579 foi primeiramente bioconvertido a um produto hidroxilado, onde uma parte desse derivado foi glicosilado (Metabólito I – LaBioCon 24 – Tabela 1, pg 71) e outra parte dihidroxilado. O LaBioCon 25 seria provavelmente formado pela cisão oxidativa da ligação lábil na ponte metilênica e uma cisão na ligação da porção fenólica do produto dihidroxilado previamente formado, como está representado na Figura 4.18.

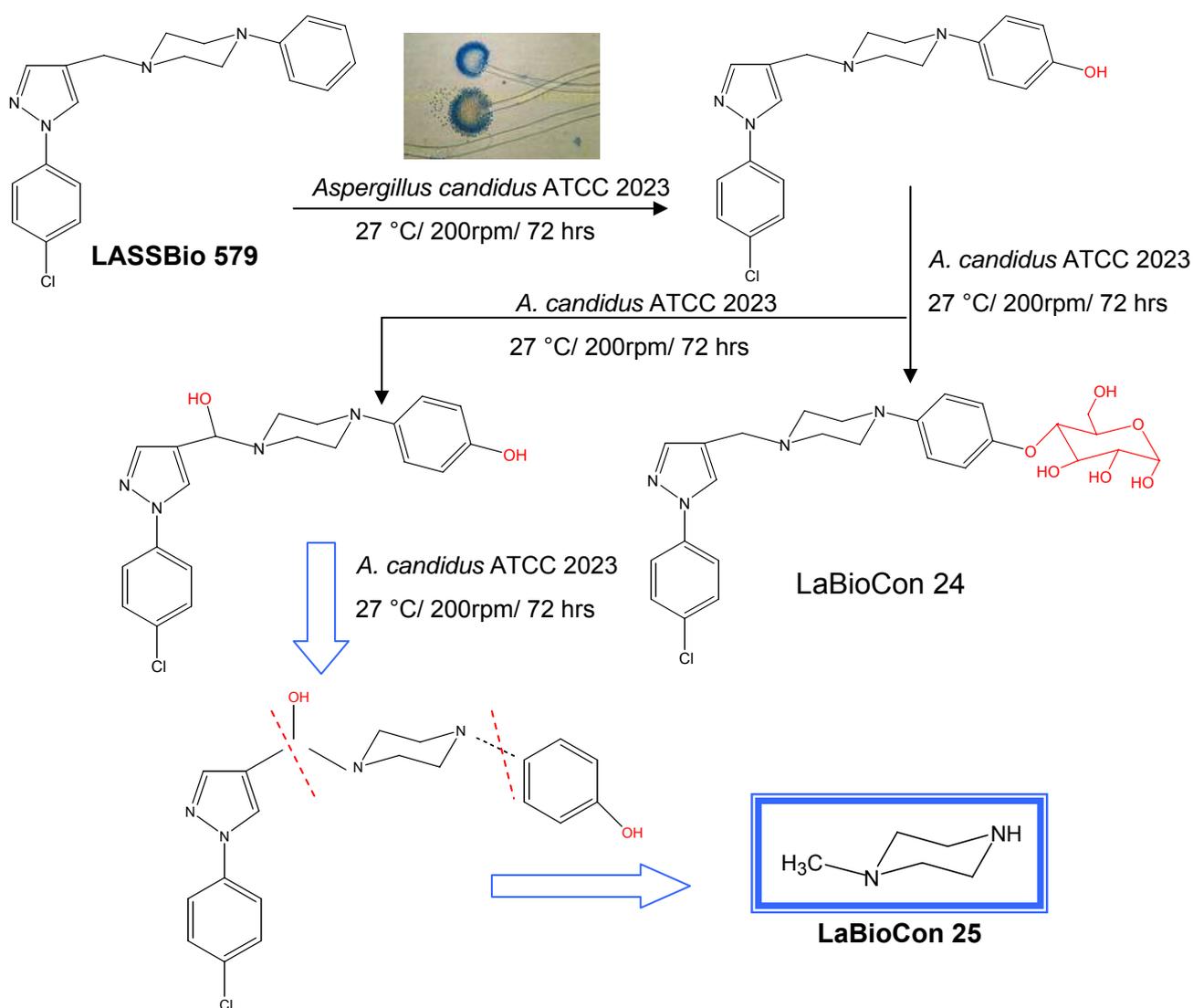


Figura 4.18 - Produto formado, LaBioCon 25, pela cisão das ligações do composto dihidroxilado por *Aspergillus candidus* ATCC 2023.

A análise por CLAE do produto purificado resultou no cromatograma apresentado na Figura 4.19. Foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 3,0 minutos, confirmando que o LaBioCon 25 trata-se do metabólito II (ver Tabela 1, p. 71), sendo o produto detectado em maior abundância no meio reacional de incubação com *Aspergillus candidus* ATCC 2023.

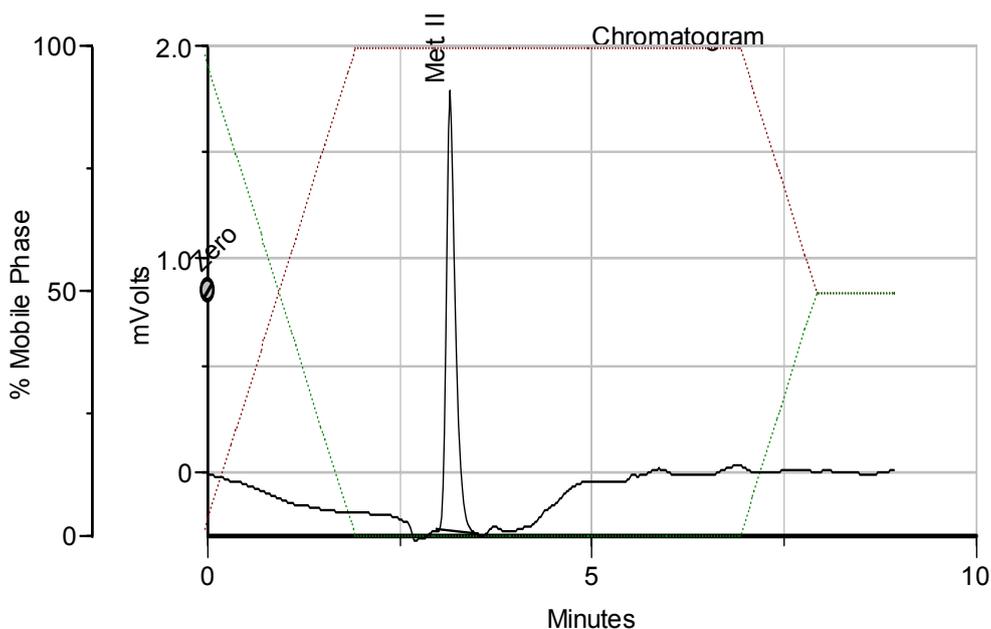


Figura 4.19 - Perfil cromatográfico do derivado, solúvel em água, obtido da fração cetônica. Em Sistema 5 e comprimento de onda 257 nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

A quantidade de produto obtida (86 mg) no ensaio de bioconversão realizado com *Aspergillus candidus* ATCC 2023 permitiu a caracterização por espectroscopia de infravermelho e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 300 MHz).

O espectro de infravermelho do substrato LASSBio 579 indica C-H:  $3111,59\text{ cm}^{-1}$ ; C=C e C=N:  $1598 - 1497\text{ cm}^{-1}$ ; C-Cl:  $1093,92\text{ cm}^{-1}$ ; C-H:  $832,80\text{ cm}^{-1}$ ; C-H:  $759\text{ cm}^{-1}$  que pode ser observado na Figura 4.20.

O espectro de infravermelho do produto LaBioCon25 indica a ausência de hidrogênios aromáticos e bandas características de ligações C-H:  $2935\text{ cm}^{-1}$ ; C-H:  $1463\text{ cm}^{-1}$ ; C-H:  $1377\text{ cm}^{-1}$ ; C-H, C-N:  $1334\text{ cm}^{-1}$ ; C-N:  $1250\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4.21). Como as amostras foram realizadas em KBr e este é higroscópico, as absorções

entre 3250 – 3450  $\text{cm}^{-1}$  de ambos os espectros referem-se a água presente na pastilha.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  evidenciou a ausência de sinais entre 7,0 – 8,0 ppm referente aos hidrogênios dos anéis aromáticos. A presença de um multiplete entre 3,52 – 3,77 ppm indica os hidrogênios referentes ao anel piperazínico – hidrogênios 2, 3, 5, 6. O singlete referente ao metila apresenta-se sobreposto a esse multiplete em 3,66 ppm (Figura 4.22).

Com relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , APT, foi possível observar um sinal em 44,109 ppm referente à presença de um grupamento metil. Os carbonos do anel piperazínico correspondem aos sinais em 50,132 e 51,678 ppm (Figura 4.23).

Os dados espectrais permitiram a proposição da estrutura química representada nas Figuras 4.21, 4.22 e 4.23. Este composto trata-se de uma metilpiperazina, de fórmula molecular  $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2$  e PM igual a 100,119.

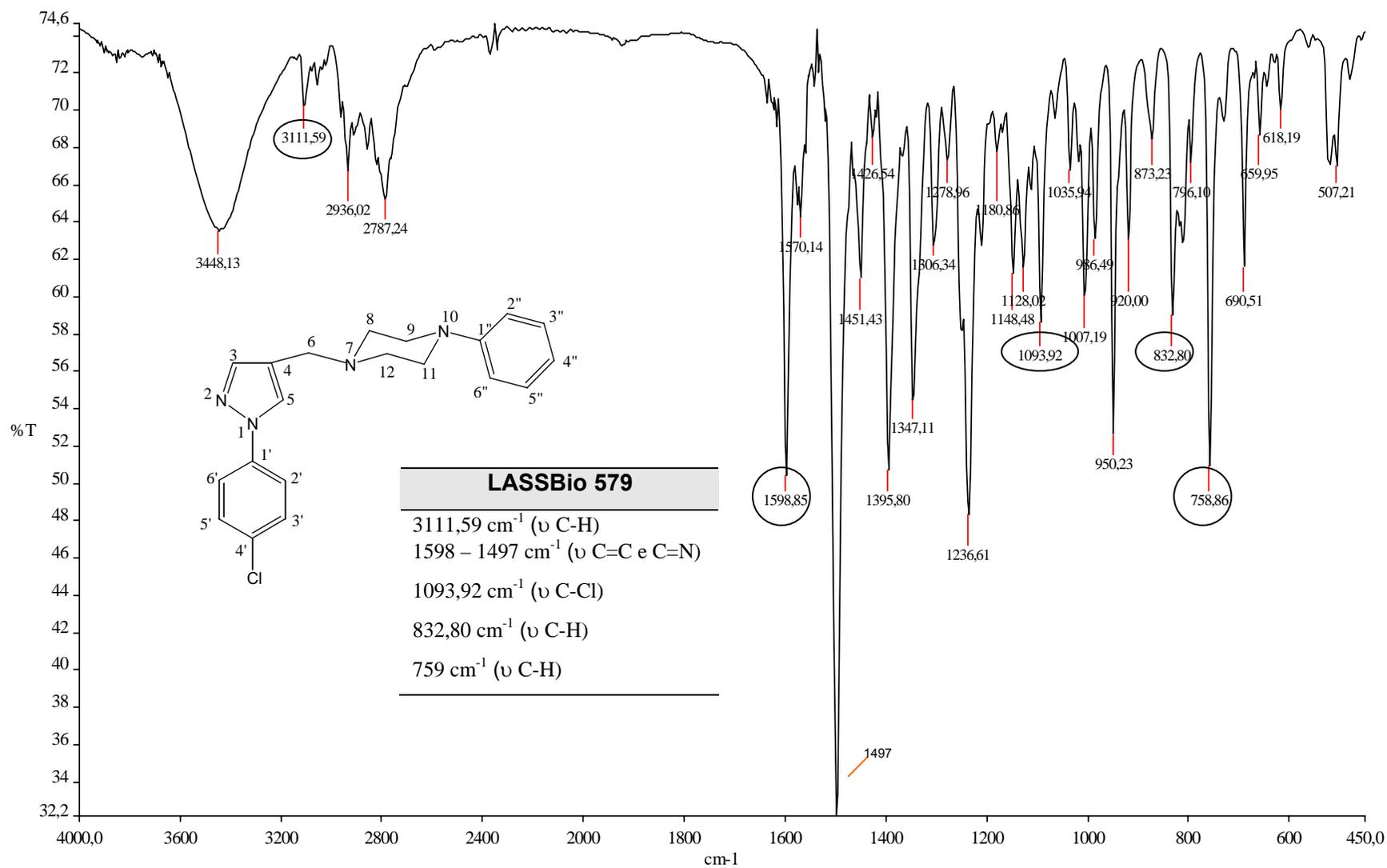


Figura 4.20 - Espectro de Infravermelho do substrato LASSBio 579 (KBr/ 4000 a 450 cm<sup>-1</sup>).

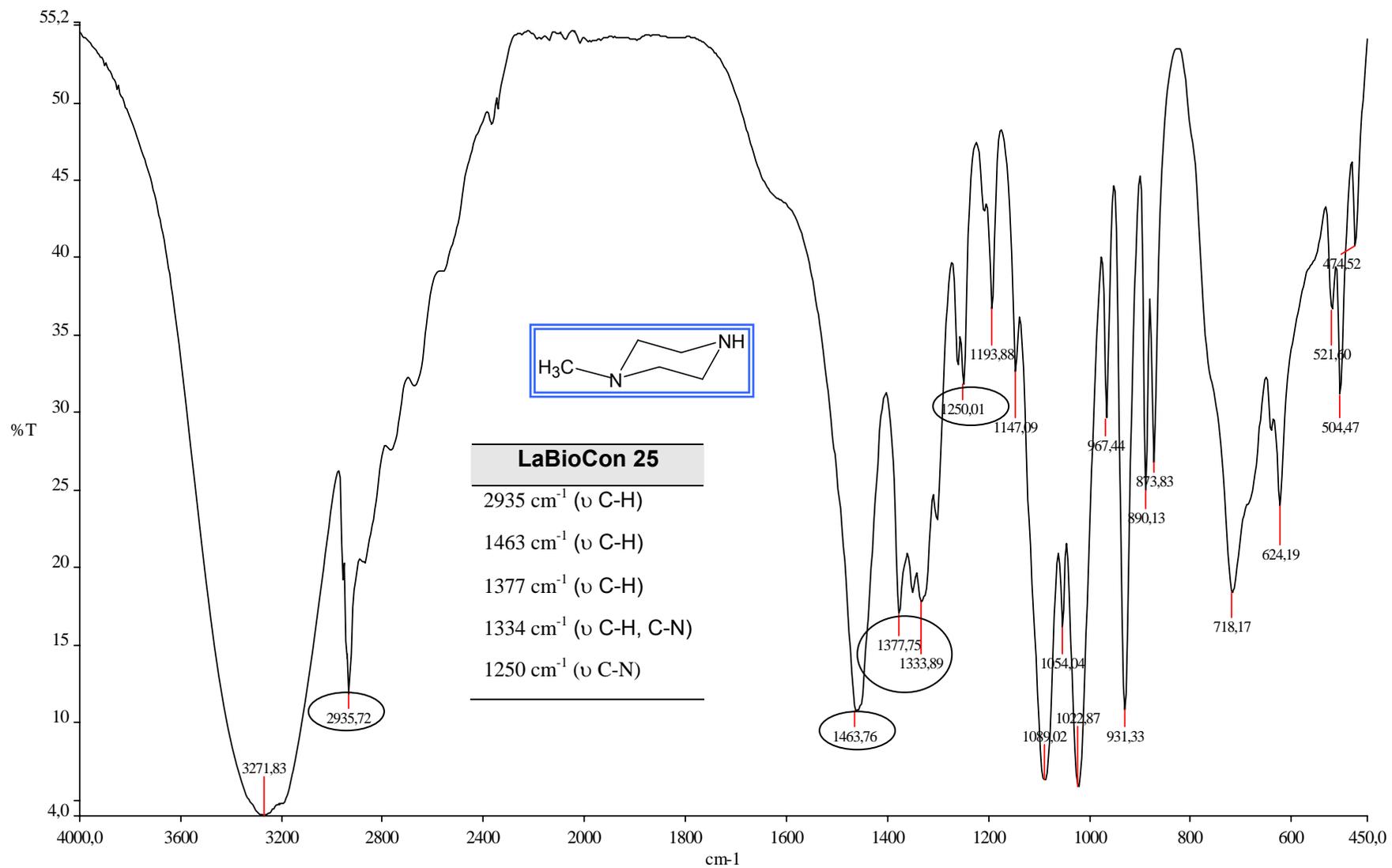


Figura 4.21 – Espectro de Infravermelho do produto LaBioCon 25 (KBr/ 4000 a 450 cm<sup>-1</sup>).

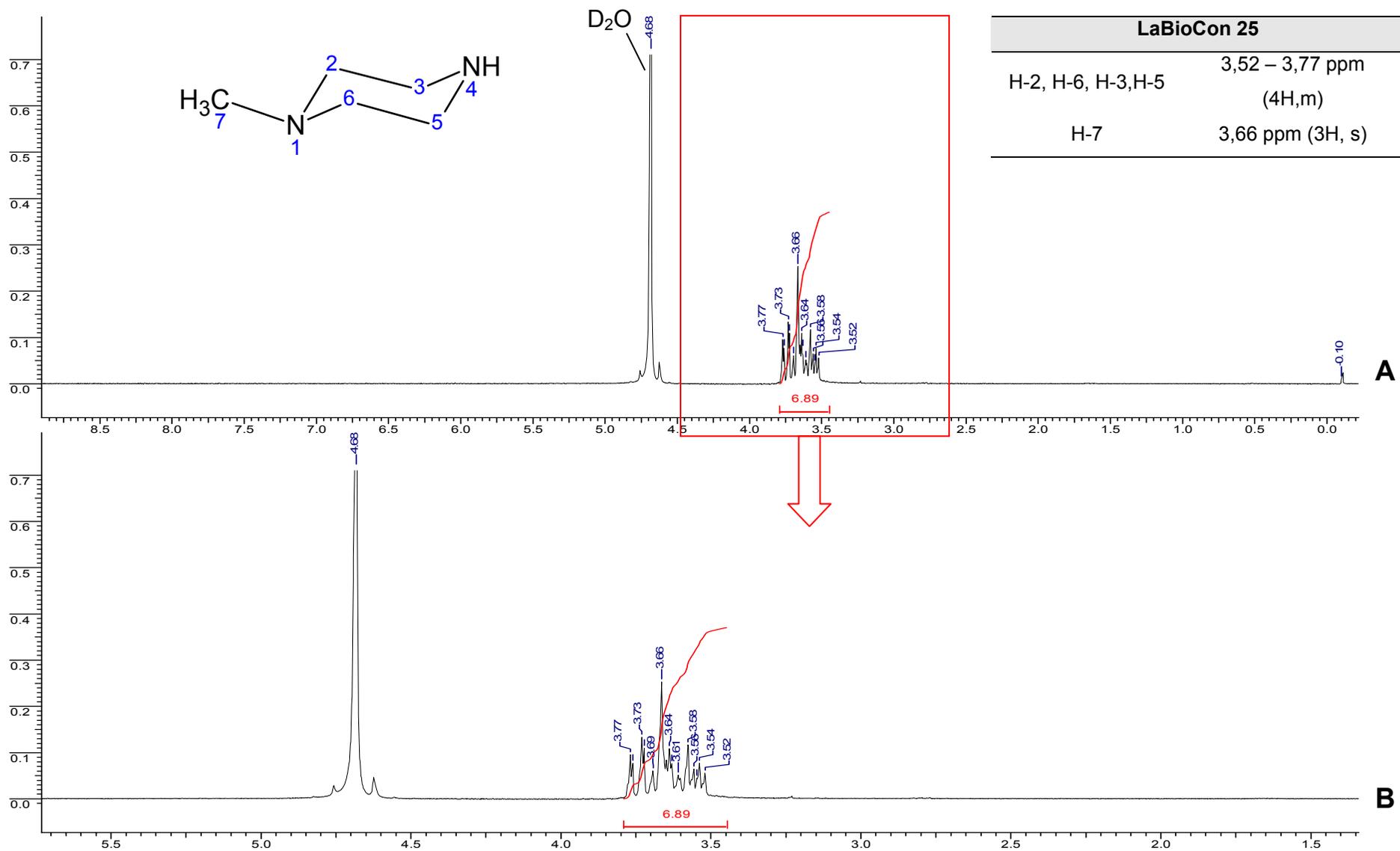


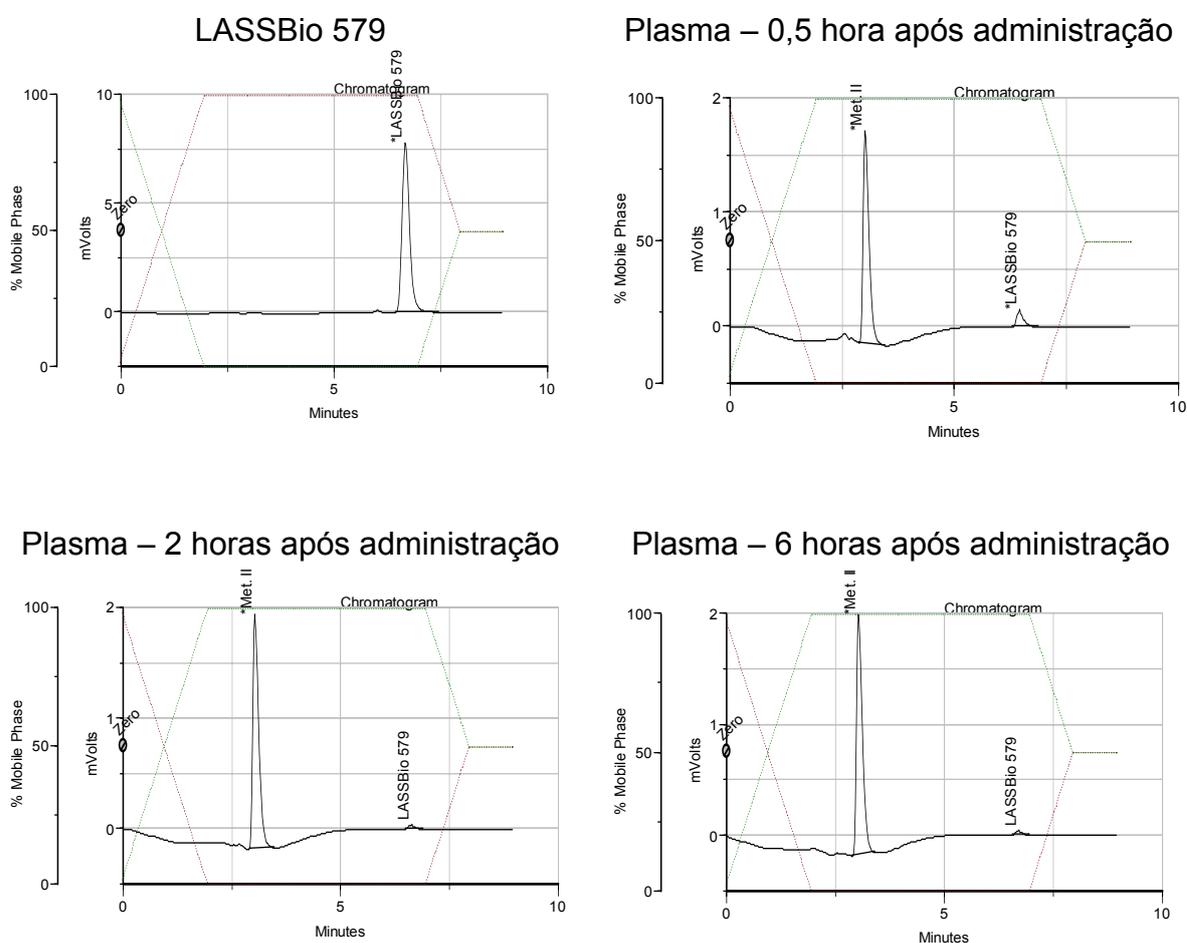
Figura 4.22 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ : A e expansão do espectro: B do produto LaBioCon 25( $\text{D}_2\text{O}/\text{TMS}/300\text{ MHz}$ ).



#### 4.5 ESTUDO DO METABOLISMO ANIMAL

Como uma ferramenta para a identificação dos metabólitos humanos do LASSBio 579, esse substrato foi submetido a estudos *in vivo* (via intraperitoneal (i.p.) (volume de injeção de 1 ml/kg de massa corporal) em grupos de ratos Wistar machos adultos pesando entre 200 e 300g (3 grupos: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>)), para uma correlação do metabolismo animal com o metabolismo fúngico já obtido.

As amostras de plasma de ratos obtidas foram analisadas em método cromatográfico já descrito (Sistema 5, item 3.1, p. 52). O perfil cromatográfico das amostras permitiu determinar a formação de um metabólito com tempo de retenção de aproximadamente 3,0 minutos semelhante ao LaBioCon 25 observado nos modelos microbianos, principalmente por *Aspergillus candidus*. Além disso, foi possível perceber a redução na disponibilidade do substrato ao longo das análises das amostras de 0,5, 2, 6, 12, e 24 horas a medida que o produto ia sendo formado (Figura 4.24).



Plasma – 12 horas após administração      Plasma – 24 horas após administração

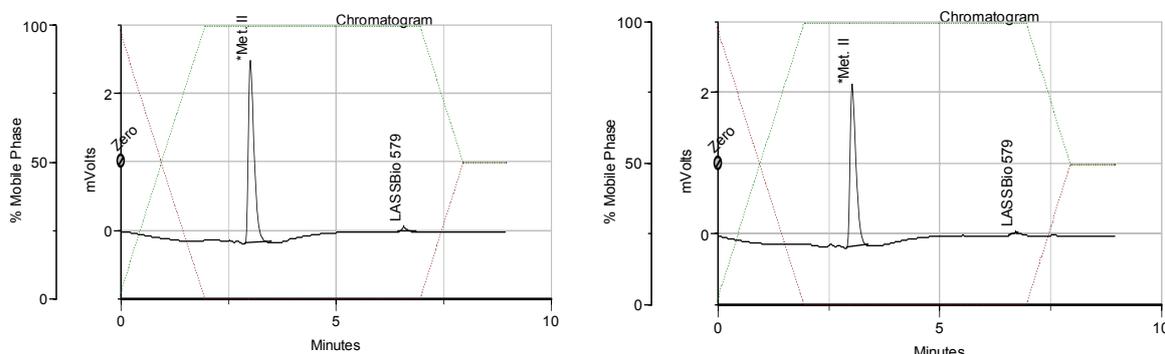


Figura 4.24 - Perfil cromatográfico do substrato LASSBio 579 e das amostras de plasma de ratos coletadas nos tempos de 0,5 h, 2 h, 6 h, 12 h e 24 h após a administração do substrato. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5  $\mu$ ); Sistema 5; detecção a 257 nm.

Com isso, foi possível determinar o tempo de curso de formação do metabólito e consumo do substrato. A concentração relativa do derivado no plasma do rato foi calculada de acordo com a área sob a curva do produto em relação à área total do cromatograma. Os valores encontrados foram plotados em um gráfico de dois eixos de concentração ( $\mu$ l/AU) em função do tempo (horas) (Gráfico6).

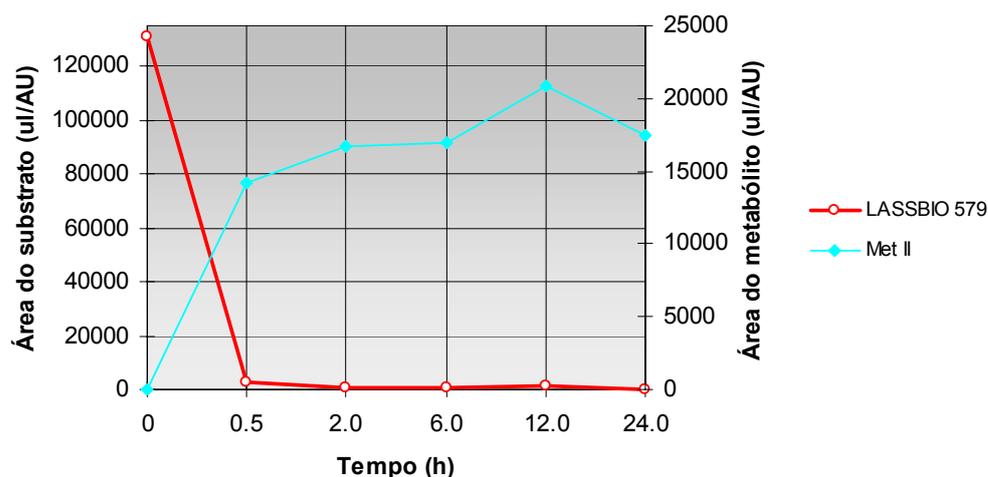


Gráfico 6 – Representação da cinética de formação de metabólitos do LASSBio 579 em plasma de ratos. Gráfico de concentração ( $\mu$ l/AU) em função do tempo (horas).

Após uma correlação do metabolismo animal com o metabolismo fúngico, é possível determinar quais microrganismos utilizados durante a triagem poderão ser empregados como modelo microbiano do metabolismo animal para o LASSBio 579.

Dos quinze microrganismos ensaiados para a bioconversão do LASSBio 579, onze foram capazes de produzir o metabólito II (LaBioCon 25) que pode ser correlacionado ao metabólito animal por apresentarem um mesmo tempo de retenção (Figura 4.25), sendo que *Aspergillus candidus* ATCC 2023 foi a cepa que apresentou maior capacidade bioconversora para esse metabólito produzindo-o em grandes quantidades.

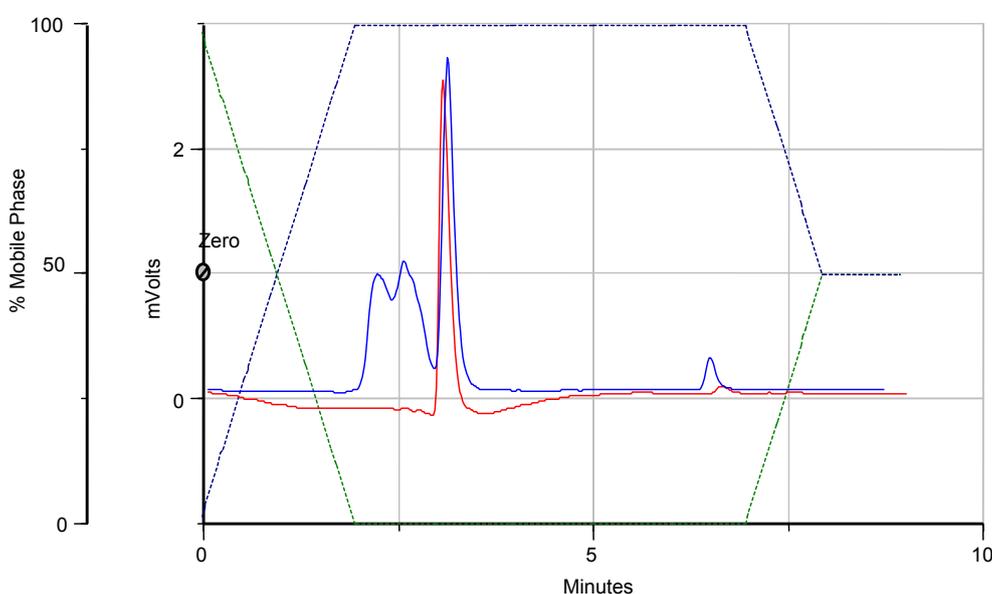


Figura 4.25 - Sobreposição dos cromatogramas da amostra de plasma de 12 horas (\_\_\_\_) e alíquota de incubação de 48 horas de *A. candidus* (\_\_\_\_). Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5  $\mu$ ); Sistema 5; detecção a 257 nm.

*Absidia blakesleana* ATCC 26617, *Fusarium roseum* ATCC 14717, *Mortierella isabelina* NRRL 1757 e *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a não foram capazes de formar o produto LaBioCon 25 e portanto não são as cepas de escolha para estudos do metabolismo animal do LASSBio 579 em amostras de plasmas.

*Cunninghamella* sp. é uma cepa muito empregada em estudos do modelo microbiano do metabolismo animal com formação de metabólitos Fase I e Fase II, como na transformação da ciclobenzaprina (ZHANG et al., 1996), furosemida (HERAZI, DAVIS, 1992), sampangina (ORABI et al., 1998) dentre outros, ao

contrário de *Aspergillus candidus* ATCC 2023 que é pouco encontrado na literatura, principalmente para estudos do metabolismo animal.

Neste trabalho *Aspergillus candidus* ATCC 2023 e *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 poderão ser utilizados como um modelo microbiano do metabolismo animal para a biotransformação do LASSBio 579, confirmando mais uma vez a capacidade desses microrganismos em predizer o metabolismo de mamíferos.

## 5 CONCLUSÕES

- A metodologia analítica desenvolvida mostrou-se eficiente no monitoramento das reações de bioconversão, sendo capaz de separar e identificar os derivados produzidos pelas diversas cepas utilizadas.
- Todas as cepas testadas foram eficazes na metabolização do substrato LASSBio 579 possibilitando a obtenção de cinco diferentes derivados funcionalizados.
- Dos quinze microrganismos ensaiados, onze cepas possibilitam posteriores estudos do modelo microbiano do metabolismo animal por mostrarem-se capazes de mimetizar o metabolismo animal.
- *Aspergillus candidus* ATCC 2023 nas condições analíticas empregadas foi capaz de produzir o metabólito animal em maiores quantidades.
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi capaz de produzir a maior diversidade de metabólitos.
- Foram detectados cinco diferentes derivados do LASSBio 579, dos quais três foram preliminarmente caracterizados (LaBioCon 23, LaBioCon 24 e LaBioCon 25) e um deles foi comparado e identificado como sendo o metabólito animal – LaBioCon 25.

## 6 PERSPECTIVAS

- Otimização das condições analíticas empregadas para a obtenção de maiores quantidades dos produtos caracterizados e elucidação estrutural dos outros metabólitos – LaBioCon 26 e 27.
- Estudos farmacológicos e das propriedades físico-químicas dos novos derivados funcionalizados e suas aplicações no estudo do metabolismo animal do LASSBio 579.
- Estudos de relação estrutura-atividade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 359-374, 1999.

ALEXANDRE, V.; LADRIL, S.; MAURS, M.; AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. Part 5 Microbial preparation of human hydroxylated metabolites of ibesartan. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 29, p. 173-179, 2004.

ANDERSON, R. J.; KUDLACEK, P. E.; CLEMENS, D. L. Sulfation of minoxidil by multiple human cytosolic sulfotransferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 109, p. 53-67, 1998.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In **Advances Biochemical Engineering/Biotechnology (Biotransformations)**, ed. K. Faber, T. Scheper, pp. 169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 128-145, 2006.

BRINK, H. J. M.; GORCOM, R. F. M.; HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, p. 1-17, 1998.

CARNEIRO, E. O.; OLIVEIRA, V.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Microbial models of animal metabolism: application to a study of the metabolismo of LASSBio 873. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 392-392, 2005.

CERNIGLIA, C. E.; FREEMAN, J. P.; MITCHUM, R. K. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1070-1075, 1982.

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

CONRADO, Daniela J. **Avaliação pré-clínica em ratos do perfil farmacocinético da substância LASSBio 579**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

CONRADO, D. J.; PALMA, E. C.; BARREIRO, E.J.; RATES, S. M. K.; COSTA, T. D. Development and validation of a LC-MS/MS method with electrospray ionization for determination of LASSBio-579 in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 677-682, 2007.

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

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Germany, Springer, 2000. 420p.

FOSTER, B. C.; BUTTAR, H. S.; QURESHI, S. A.; MCGILVERAY, I. J. Propranolol metabolism by *Cunninghamella echinulata*. **Xenobiotica**, v. 19, n. 5, p. 539-546, 1989.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 3/4, p. 133-142, 2006.

GUENGERICH, F. P. Human Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. **Cytochrome P450: Structure mechanism and Biochemistry**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1995. Chapter 14.

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

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

HERAZI, M.; DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian metabolism: Furosemide glucoside formation using the fungus *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 21, p. 259-267, 1992.

LERESCHE, J. E., MEYER, H. P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 572-580, 2006.

LI, L.; LIU, R.; YE, M.; HU, X.; WANG, Q.; BI, K.; GUO, D. Microbial metabolism of evodiamine by *Penicillium janthinellum* and its application for metabolite identification in rat urine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 561-567, 2006.

LÜLLMANN, H., MOHR, K., ZIEGLER, A., BIEGER, D. **Color Atlas of Pharmacology**. 2. ed. Thieme Stuttgart · New York · 2000

MENEGATTI, Ricardo. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de agentes anti-psicóticos**. 2001. 175 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A. C.; FERREIRA, V. F.; PEREIRA, E. F. R.; EL-NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A. T.; ALBUQUERQUE, E. X.; NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Design, Synthesis and Pharmacological Profile of Novel Dopamine D2 Receptor Ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p. 4807-4813, 2003.

MIYAZAWA, M.; ANDO, H.; OKUNO, Y.; ARAKI, H. Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger*, as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 91-95, 2004.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, p. 1157-1164, 1999.

NETTO, Heleno José Costa Bezerra. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados 6-nitro-benzodioxola-N-acilidrazônicos, desenhados como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, sintetizados a partir do safrol**. Rio de Janeiro, 2004. 340 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

NEVES, Gilda Angela. **Avaliação farmacológica de novos derivados N-fenilpiperazínicos – LASSBio 579 e LASSBio 581 – candidatos a protótipos de fármacos dopaminérgicos**. 2003. 122 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes Dopaminérgicos e o Tratamento da Disfunção Erétil. **Química Nova**, v. 27, p. 949-957, 2004.

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

ORABI, K. Y.; LI, E.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial transformation of sampangine. **Journal of Natural Products**, v. 22, p. 988-992, 1999.

ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. The mechanism of heme oxygenase. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 221-227, 2000.

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

PAZINI, Francine. **Preparação de derivados funcionalizados do novo protótipo de fármaco neuroativo LASSBio 581 por bioconversão**. 2006.

170 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

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

PINHEIRO, L.; MARSAIOLI, A. J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 78-86, 2007.

RAO, G. P.; DAVIS, P. J. Microbial models of metabolism. Biotransformations of HP 749 (Besipirdine) using *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 6, p. 709-715, 1997.

RITTER, J. K. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 171-193, 2000.

SANTOS, L., S ; MENEGATTI, R. ; PADILHA, M., C.; AQUINO, N., F., R.; PEREIRA, A., S.; FRAGA, C., A., M.; BARREIRO, E., J.; Eberlin, M., N. Electrospray ionization mass and tandem mass spectra of a series of N-pyrazolylmethyl and N-triazolylmethyl N-phenylpiperazines: new dopaminergic ligands with potential antipsychotic properties. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 6, p. 815-820, 2005.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic Hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 161, p. 551-558, 1974.

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

SONO, M.; ROACH, M. P.; COULTER, E. D.; DAWSON, J. H. Heme-containing oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, 1996,

WILLIAMS, D. A. Drug Metabolism. In: **Principles of Medicinal Chemistry**. 5. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 2002. Cap. 8.

WONG, Y. W. J.; DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian metabolism: stereoselective metabolism of warfarin in the fungus *Cunninghamella elegans*. **Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 982-987, 1989.

ZHANG, D.; EVANS, F. E.; FREEMAN, J. P.; YANG, Y.; DECK, J.; CERNIGLIA, C. E. Formation of mammalian metabolites of cyclobenzaprine by the fungus, *Cunninghamella elegans*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 102, p. 79-92, 1996.