

Universidade Federal do Rio de Janeiro

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS
DO NOVO PROTÓTIPO
DE FÁRMACO NEUROATIVO LASSBIO 581 POR BIOCONVERSÃO

Francine Pazini

2006

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS
DO NOVO PROTÓTIPO
DE FÁRMACO NEUROATIVO LASSBIO 581 POR BIOCONVERSÃO

Francine Pazini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro
Profa. Dra. Valéria de Oliveira

Rio de Janeiro
Abril de 2006

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS FUNCIONALIZADOS
DO NOVO PROTÓTIPO
DE FÁRMACO NEUROATIVO LASSBIO 581 POR BIOCONVERSÃO

Francine Pazini

Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro
Profa. Dra. Valéria de Oliveira

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro

Profa. Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda

Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Profa. Dra. Lidia Moreira Lima

Rio de Janeiro
Abril de 2006

Pazini, Francine

Preparação de derivados funcionalizados do novo protótipo de fármaco neuroativo LASSBio 581 por bioconversão/ Francine Pazini. Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2006.

cvi, 164 f.;il.

Orientadores: Eliezer J. Barreiro e Valéria de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2006.

Referências bibliográficas: f.136-142

1. Bioconversão. 2. Fungos filamentosos. 3. Fármacos neuroativos

Resumo

Pazini, Francine. **Preparação de derivados funcionalizados do novo protótipo de fármaco neuroativo LASSBio 581 por bioconversão.** Orientadores: Eliezer J. Barreiro e Valéria de Oliveira. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A utilização de microrganismos como biocatalisadores eficientes é descrita desde civilizações antigas não apenas para produção de hormônios e antibióticos, mas na síntese régio e estéreoeseletiva de fármacos, nos estudos do metabolismo (modelo microbiano do metabolismo animal) e na geração de moléculas com atividade melhorada, diferente ou menos tóxica do que a do composto de partida originadas da biodiversidade enzimática fúngica. Diante da atividade catalítica documentada para diferentes microrganismos, descrevemos neste trabalho a aplicação da bioconversão com fungos filamentosos para preparação de uma série de derivados funcionalizados a partir do novo protótipo de fármaco neuroativo LASSBio 581. *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 foram os fungos filamentosos escolhidos para realização dos ensaios em escala semi-preparativa devido à respectiva capacidade de produzirem um dos derivados em maior quantidade ou um maior número de derivados em relação às demais cepas testadas. As análises dos dados obtidos por ressonância magnética nuclear de prótons e a espectrometria de massas sugerem a formação de compostos hidroxilados e glicosilados nas posições 4' e 4'', metilados e hidroxilados com abertura do anel c, dihidroxilados em 4' e 4'' e diglicosilados em 4''.

Abstract

Pazini, Francine. **Preparation of functionalized derivatives of the new neuroactive lead compound LASSBio 581 by bioconversion**. Orientadores: Eliezer J. Barreiro e Valéria de Oliveira. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The utilization of microorganisms as efficient biocatalysts goes back in time since old civilizations not only for the production of antibiotics and hormones, but also for regio and stereoselective synthesis of drugs or metabolism studies (microbial models of mammalian metabolism) and production of molecules with improved, different or less toxic activity originated by the fungal enzymatic biodiversity. Besides catalytic properties documented for different microorganisms, this work describes the application of bioconversions with filamentous fungi for preparation of a series of functionalized derivatives by the new neuroactive lead compound LASSBio 581. *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 and *Mortierella isabelina* NRRL 1757 were the filamentous fungi choose for carrying out the assays in laboratorial scale due to respective capacity of production one those derivatives in high yields or variety compared to others assayed strains. The analysis of NMR ^1H and MS spectra suggest the formation of hydroxylated and glycosylated derivatives in the 4' and 4'' position, methylated and hydroxylated with opening the ring c, dihydroxylated in 4' and 4'' and glycosylated in 4''.

Agradecimentos

- Aos professores Eliezer J. Barreiro e Valéria de Oliveira pela oportunidade de me orientar nesta dissertação, pela confiança depositada na realização deste trabalho, pelos esclarecimentos, compreensão, presteza e paciência.
- Às professoras Ana Luisa Palhares de Miranda, Teresa Cristina Tavares Dalla Costa e Lidia Moreira Lima por terem aceitado o convite de avaliar meu trabalho e pelos esclarecimentos e correções feitas.
- Aos professores Carlos Alberto M. Fraga e Ana Luisa Palhares de Miranda pela contribuição dada e pela presteza demonstrada.
- Aos meus familiares pelo amor incondicional, por entender os momentos de ausência, pela confiança, amizade, orgulho e companheirismo.
- As amigas Tatiana Caixeta, Érica Núbia Cirilo, Andreza, Elaine e ao Emmanuel Carneiro pelo incentivo, pelos momentos de descontração, pelas conversas, pelo companheirismo, pelos conselhos e pelo carinho.
- Ao Johnathan Santana de Freitas pela amizade, pela credibilidade sempre impulsionada, pelo incentivo, pela colaboração familiar e pelo amor depositado nos momentos necessários.
- Aos colegas do LASSBio por terem me recebido com muita simpatia, pela ajuda prestada e pela boa convivência quando estive no Rio de Janeiro.
- Ao amigo Ricardo Menegatti pelos conhecimentos compartilhados, pela solicitude oferecida e pelas agradáveis conversas.
- A Dona Clélia pela disponibilidade prestada sempre que necessário.

- Aos amigos e professores da Universidade Federal de Goiás pela confiança e pelo carinho.
- Aos alunos com os quais tive oportunidade de compartilhar meus conhecimentos até então adquiridos e com os quais pude aprender muito mais.
- A Deus pela força, sabedoria e presença que me motivaram em todos os momentos.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Bioconversão e síntese de fármacos	1
1.2	Bioconversão e metabolismo de fármacos	5
1.2.1	Reações metabólicas de fase I	8
1.2.1.1	Sistema enzimático citocromo P-450	8
1.2.1.1.1	Natureza do citocromo P450	11
1.2.1.1.2	Localização do citocromo P450	14
1.2.1.1.3	Ciclo catalítico do citocromo P450	15
1.2.1.1.4	Monoxigenases de origem microbiana	17
1.2.1.1.5	Oxidação de heteroátomos	19
1.2.1.2	Redução	30
1.2.1.3	Hidrólise	31
1.2.2	Reações metabólicas de fase II	32
1.2.2.1	Metilação	32
1.2.2.2	Acetilação	32
1.2.2.3	Sulfatação	34
1.2.2.4	Glicosilação	37
1.2.2.5	Glicorunidação	38
1.2.3	Outros modelos para o estudo do metabolismo	40
1.2.3.1	Culturas de células	40
1.2.3.2	Uso de computadores	41

2	OBJETIVOS	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1	Fatores que influenciam o processo de bioconversão	43
3.2	Composição dos meios de cultura	43
3.2.1	Morfologia do crescimento em meio líquido	45
3.2.2	Intensidade de agitação e aeração	49
3.2.3	pH	51
3.2.4	Temperatura	54
3.2.5	Solventes	55
3.2.6	Utilização das bioconversões para biotransformação de agentes psicoativos	56
3.3	Síntese do LASSBio 581	60
3.4	Métodos cromatográficos	63
3.4.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	64
3.4.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	65
3.5	Estudo do metabolismo microbiano do novo derivado heterocíclico n-fenilpiperazínico LASSBio 581	67
3.5.1	Bioconversão do LASSBio 581	67
3.5.2	Monitoramento da bioconversão do LASSBio 581	69
3.5.2.1	<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 10148b	70
3.5.2.2	<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 22617	71
3.5.2.3	<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	73
3.5.2.4	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	74

3.5.2.5	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	76
3.5.2.6	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	77
3.5.2.7	<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	80
3.5.2.8	<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	81
3.5.2.9	<i>Mucor griosyanus</i> ATCC 1207a	84
3.5.2.10	<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	85
3.5.3	Isolamento e purificação por cromatografia líquida em coluna (<i>Flash</i> cromatografia)	87
3.5.4	Determinação das estruturas dos metabólitos formados	87
3.5.4.1	LaBioCon 1	91
3.5.4.2	LaBioCon 9	94
3.5.4.3	LaBioCon 10	97
3.5.4.4	LaBioCon 11	99
3.5.4.5	LaBioCon 12	103
3.5.4.6	LaBioCon 13	104
3.5.4.7	LaBioCon 18	107
3.5.4.8	LaBioCon 19	110
3.5.4.9	LaBioCon 22	112
4	CONCLUSÕES	119
5	MATERIAIS E MÉTODOS	121
5.1	Generalidades	121
5.1.1	Técnicas cromatográficas	121
5.1.2	Técnicas espectroscópicas	123

5.1.3	Técnicas microbiológicas	123
5.2	Resultados experimentais	124
5.2.1	1-[1-(4-clorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetil]-4-fenilhexaidro piperazina	124
5.2.2	Adaptação das cepas ao meio de cultura	127
5.2.3	Triagem	128
5.2.4	Desenvolvimento e validação de metodologias para o monitoramento de bioconversões	129
5.2.4.1	Incubação	129
5.2.4.2	Separação e purificação dos produtos formados	130
5.2.5	Extração dos produtos formados	131
5.2.6	Isolamento e purificação	131
5.2.7	Ensaio em escala semi-preparativa	132
5.2.7.1	1º Ensaio (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 72h)	133
5.2.7.2	2º Ensaio (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, solvente: dimetilformamida, tempo de reação: 96h)	134
5.2.7.3	3º Ensaio (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 190h)	134
5.2.7.4	4º Ensaio (Cepa: <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 168h)	135
5.2.7.5	5º Ensaio (Cepa: <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 96h)	136

5.2.8	Isolamento dos metabólitos	138
5.2.8.1	LaBioCon 1	138
5.2.8.2	LaBioCon 9	139
5.2.8.3	LaBioCon 10	141
5.2.8.4	LaBioCon 11	142
5.2.8.5	LaBioCon 12	143
5.2.8.6	LaBioCon 13	144
5.2.8.7	LaBioCon 18	145
5.2.8.8	LaBioCon 19	146
5.2.8.9	LaBioCon 22	147
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

Índice de Figuras

1.	Esquema proposto para biotransformação do derivado A da tebaína por <i>Cunninghamella echinulata</i> NRRL 1384, com formação de intermediários para síntese da buprenorfina	3
2.	Estruturas químicas dos derivados formados a partir da incubação do fenantreno com <i>Cunninghamella elegans</i>	4
3.	Transformação metabólica de fármacos	6
4.	Participação de diferentes enzimas de fase I envolvidas no metabolismo de xenobióticos	7
5.	Estrutura do citocromo P450 1AKD de <i>Pseudomonas putida</i> com cânfora 5-monoxigenada. A – sítio ativo do grupo heme; Fe – amarelo ; N – azul. O substrato (círculo rosa) se situa cercado pelo grupo heme	9
6.	Estrutura cristalina do citocromo P-450BM-3-FMN. O domínio heme se representa em azul e o domínio de flavina em verde, o FMN em amarelo e o grupo heme em rosa	12
7.	Estrutura cristalina do citocromo P450 1AKD reductas	13
8.	Estrutura molecular do sítio ativo do CYP450 de <i>Pseudomonas putida</i>	13
9.	Localização do sistema enzimático citocromo P450 na membrana do retículo endoplasmático	15

10.	Ciclo catalítico do citocromo P450	17
11.	Estruturas químicas do propranolol e de seus metabólitos fase I, humanos e fúngicos	21
12.	Estruturas químicas da ebastina e seu principal metabólito fase I, carebastina	22
13.	Rota metabólica proposta por Zhang <i>et al.</i> para ciclobenzaprina usando <i>Cunninghamella elegans</i> , caldo Sabouraud e tempo de incubação 72 horas	23
14.	Estruturas químicas dos derivados hidroxilados e glicosilados do lesopitron formados pela incubação com <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	24
15.	Rota metabólica proposta por Moody <i>et al.</i> para doxepina usando <i>Cunninghamella elegans</i> , caldo Sabouraud e tempo de incubação 48 horas	26
16.	Rota metabólica proposta por Moody <i>et al.</i> para mirtazapina usando <i>Cunninghamella elegans</i> , caldo Sabouraud e tempo de incubação 72 horas.	27
17.	Estruturas químicas dos produtos hidroxilados e dihidroxilados formados a partir da incubação do irbesartan com diferentes cepas no período de 7 dias	29
18.	Estruturas químicas dos metabólitos humanos e fúngicos do Rhazilinama	30

19.	Estruturas químicas da warfarina e de seus metabólitos reduzidos	31
20.	Hidrólise de 7,4'-diacetoxidaidzeina em daidzeina por <i>Aspergillus niger</i>	32
21.	Estruturas químicas dos produtos acetilados, formados pela incubação da tranilcipromina com <i>Cunninghamella echinulata</i>	33
22.	Produtos formados pela acetilação da difenidramina por <i>Cunninghamella elegans</i>	34
23.	Estruturas químicas dos derivados sulfatados formados pela incubação do benzopireno com <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	36
24.	Biotransformação do flavonóide naringenina por <i>Cunninghamella elegans</i>	36
25.	Transformação da desacetiltimoxamina por <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Mucor janssenii</i> NRRL 3628 e <i>Actinomucor elegans</i> MMP 2092 com formação de derivado glicosilado	37
26.	Estruturas químicas dos produtos formados pela incubação da sampangina com <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159, <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245 e <i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	38
27.	Síntese da uridina-5'-difosfato- α -D-ácido glicurônico (UDPGA) e glicuronidação de um fenol catalizada por uma glicuroniltransferase	39
28.	Aspectos morfológicos dos fungos filamentosos <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 (superior) e <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757 (inferior) em ágar batata e nos meios líquidos caldo Sabouraud e PDSM.	49

29.	Rota sintética para formação do primeiro intermediário de síntese 4-cloro-azidobenzeno	57
30.	Esquema de síntese da formação do intermediário 1-[1-(4-clorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetil]-4-fenilhexaidropiperazina	58
31.	Etapa final da síntese do derivado N-fenilpiperazínico LASSBio 581	59
32.	Espectro de massa do substrato LASSBio 581 obtido num espectrômetro de massas Quattro LC-Micromass	60
33.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Absidia blakeslceana</i> ATCC 10148b no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm	68
34.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Absidia blakeslceana</i> ATCC 10148b	68
35.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Absidia blakeslceana</i> ATCC 22617 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm	69
36.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Absidia blakeslceana</i> ATCC 22617	70
37.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm	71
38.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	71

39.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm	72
40	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	73
41.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm	74
42.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	74
43.	Perfis cromatográficos do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 nos tempos de 24 e 48 em sistema isocrático e 24horas em sistema gradiente, e comprimento de onda 248nm	76
44.	Cinéticas de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	77
45.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm	78
46.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	79
47.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm	80

48.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	81
49.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Mucor griosyanus</i> ATCC 1207a no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm	82
50.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Mucor griseocyanus</i> ATCC 1207 ^a	83
51.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm	84
52.	Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por <i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	85
53.	Substrato LASSBio 581	86
54.	Estruturas químicas dos cinco derivados funcionalizados formados a partir da incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	87
55.	Estruturas químicas dos dois derivados funcionalizados formados a partir da incubação do LASSBio 581 com <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	88
56.	Expansão da região relativa aos picos dos hidrogênios presentes nas glicoses adicionadas à molécula do substrato LASSBio 581	90

57.	Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 1	90
58.	Estrutura química proposta para o produto diglicosilado LaBioCon 1	91
59.	Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 9	92
60.	Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 9	93
61.	Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 10	94
62.	Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 10	95
63.	Estrutura química proposta para o produto dihidroxilado LaBioCon 12	96
64.	Expansão da região relativa aos picos dos hidrogênios presente na glicose adicionada à molécula do substrato LASSBio 581	97
65.	Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 13	98
66.	Estrutura química proposta para o produto glicosilado LaBioCon 13	98
67.	Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 19	99
68.	Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 19	100
69.	Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 22	101
70.	Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 22	102
71.	Estruturas químicas dos derivados funcionalizados do LASSBio 581 a partir da aplicação de bioconversões com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757, destacando suas	103

	respectivas percentagens de rendimento.	
72.	Estruturas químicas dos derivados funcionalizados do LASSBio 581 a partir da aplicação de bioconversões com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757, representadas em 3D com minimização de energia	108
73.	Representação esquemática da primeira etapa da síntese do LASSBio 581	115
74.	Representação esquemática da segunda etapa da síntese do LASSBio 581	116
75.	Representação esquemática da terceira etapa da síntese do LASSBio 581	116
76.	Representação esquemática da última etapa da síntese do LASSBio 581	117

Índice de Tabelas

1.	Caracterização morfológica macroscópica em meio líquido PDSM e Caldo Sabouraud por 72horas a 27°C ± 2°C a 200rpm. Tamanho dos pellets: Ausência (-), Grandes (0,5cm), Médios (0,3cm), Pequenos (0,1), Pequeníssimos (0,05cm); Produção de massa amorfa: Positivo (+), Negativo (-); Formação de halo: Ausência (-), Em toda parede (++); Em parte da parede (+)	45
2.	Percentual de crescimento fúngico em meio líquido PDSM e Caldo Sabouraud.	46
3.1.	Exemplos de diferentes valores de pH empregados na literatura em bioconversões	52
3.2.	Exemplos de diferentes valores de pH empregados na literatura em bioconversões	53
4.	Bioconversão do LASSBio 581 por várias cepas de fungos filamentosos (triagem), tempo de 24-96horas	65
5.1.	RMN ¹ H dos metabólitos identificados a partir da incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	104
5.2.	RMN ¹ H dos metabólitos identificados a partir da incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	105
5.3.	RMN ¹ H dos metabólitos identificados a partir da incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 e <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	106

6.	Diferentes parâmetros avaliados entre os cinco ensaios em escala semi preparativa	127

Anexos

1.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Absídia blakeslceana</i> ATCC 10148b no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm.	142
2.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Absídia blakeslceana</i> ATCC 22617 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm.	143
3.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm.	144
4.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm.	145
5.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.	146
6.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 no tempo de 24 em sistema isocrático, e comprimento de onda 248nm.	147
7.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244 no tempo de 24 em sistema gradiente, e comprimento de onda 248nm.	148
8.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.	149
9.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm.	150
10.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Mucor griosyanus</i> ATCC 1207a no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.	151

11.	Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com <i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.	152
12.	Espectro de RMN ¹ H (500MHz) do derivado LaBioCon 1	153
13.	Espectro de massa do derivado LaBioCon 1	154
14.	Espectro de RMN ¹ H do composto LaBioCon 9	155
15.	Espectro de massa do derivado LaBioCon 9	156
16.	Espectro de RMN ¹ H do composto LaBioCon 10	157
17.	Espectro de massa do derivado LaBioCon 10	158
18.	Espectro de massa do derivado LaBioCon 12	159
19.	Espectro de RMN ¹ H do composto LaBioCon 13	160
20.	Espectro de RMN ¹ H do composto LaBioCon 19	161
21.	Espectro de massa do derivado LaBioCon 19	162
22.	Espectro de RMN ¹ H do composto LaBioCon 22	163
23.	Espectro de massa do derivado LaBioCon 22	164

Lista de Abreviaturas

IPG - 1,2-O-isopropilideno glicerol

CYP450 - Sistema enzimático citocromo P-450

FMN - Flavina mononucleotídio (forma oxidada)

FMNH₂ - Flavina mononucleotídeo (forma reduzida)

FAD - Flavina adenina dinucleotídio (forma oxidada)

FADH - Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PAHs - Hidrocarbonetos poli aromáticos

CBP - Ciclobenzaprina

UDPGA - Uridina-5'-difosfato- α -D-ácido glicurônico

UDPGT - Glicuroniltransferases

QSAR - Relação estrutura atividade quantitativa

CoMFA - Análise de campo molecular comparativo

PDSM - Potato Dextrose Sucrose Médium

PHM - Metabólitos parahidroxilados

HMM - Metabólitos hidroximetilados

CCD - Cromatografia em camada delgada

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

ATCC - American Type Culture Collection

NRRL - Northern Regional Research Laboratories

RMN ^1H - Ressonância magnética nuclear de prótons

RMN C^{13} - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

MS - Espectrometria de massas

DMF - Dimetilformamida

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOCONVERSÃO E SÍNTESE DE FÁRMACOS

A utilização de microrganismos como biocatalisadores altamente eficientes, é descrita desde civilizações antigas com o aprendizado de fazer o vinho e o queijo. Esta prática não se restringe apenas à utilização de microrganismos para produção de antibióticos e hormônios, mas também a síntese enzimática regio e estereosseletiva de produtos químicos e farmacêuticos (AZERAD, 1995; ABOURASHED *et al.*, 1999). A síntese exclusiva ou preferencial de um estereoisômero, em casos onde a pureza ótica é fundamental, mostra-se essencial para determinação da qualidade dos compostos formados, já que dois enantiomêros podem apresentar ações diferentes nos organismos vivos em relação a ações biológicas e toxicidade (FABER, 1997; OLIVEIRA, 2000).

Inúmeras são as vantagens da utilização de enzimas à catálise química usualmente empregada, principalmente com relação à velocidade das reações catalizadas, às condições de realização dos ensaios, à versatilidade que apresentam como reagentes e a seletividade para reações catalisadas por elas (AZERAD, 1995). A proporção de ocorrência das reações promovidas por enzimas podem ser mais rápidas do que as observadas em catálise química, atuando em condições brandas de análise, como pH entre 5 e 8, temperatura entre 20 e 40°C e solvente aquoso. Além disso, as enzimas apresentam a capacidade de minimizar reações indesejáveis como decomposição, isomerização, racemização ou rearranjos inoportunos que freqüentemente interferem nas metodologias químicas (AZERAD, 1995).

A ação das enzimas em seus substratos naturais é geralmente muito seletiva, especialmente considerando todos os tipos de seletividades químicas possíveis: quimiosseletividade (ação em grupamentos químicos específicos); regio e diastereosseletividade (discriminação entre grupos funcionais idênticos localizados em posições estruturalmente diferentes da molécula do substrato); enantioseletividade (discriminação entre substratos enantioméricos ou grupos enantiotópicos de um substrato pró-quiral). A enantioseletividade de biocatalisadores que podem ser utilizados para discriminação enantiotópica de moléculas pró-quirais podem levar a criação de novos centros quirais, representados por um enantiômero simples, em um rendimento teórico de 100% (ABOURASHED *et al.*, 1999).

A síntese da buprenorfina, um potente agonista parcial de receptores morfínicos subtipo μ , pode ser efetuada a partir de intermediários demetilados, formados a partir do derivado A da tebaína, por reações microbianas regioseletivas de N e O-demetilação com *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384 (Figura 1) (ABEL *et al.*, 2003).

Carboxiesterases microbianas que incluem lipases e esterases catalisam a hidrólise de diversos ésteres naturais e não naturais, freqüentemente apresentando alta enantioseletividade e regioseletividade. 1,2-O-isopropilideno glicerol (IPG) é um importante ligante quiral de bloqueio da síntese de muitos componentes opticamente ativos, tais como glicerofosfolípídeos, β -bloqueadores, prostaglandinas e leucotrienos. Devido ao valor comercial associado às substâncias IPG enantioméricas puras R e S, e ao alto custo associado à síntese química destes compostos, Molinari *et al.* (2005) demonstraram em seus estudos a importância da descoberta de enzimas microbianas que promovessem a hidrólise enantioseletiva de diferentes ésteres IPG racêmicos usando cepas de *Streptomyces* que comprovaram tal atividade, por ensaios de

biotransformação, antes observados em outros microrganismos (*Rhodococcus erythropolis*, espécies de *Bacillus*).

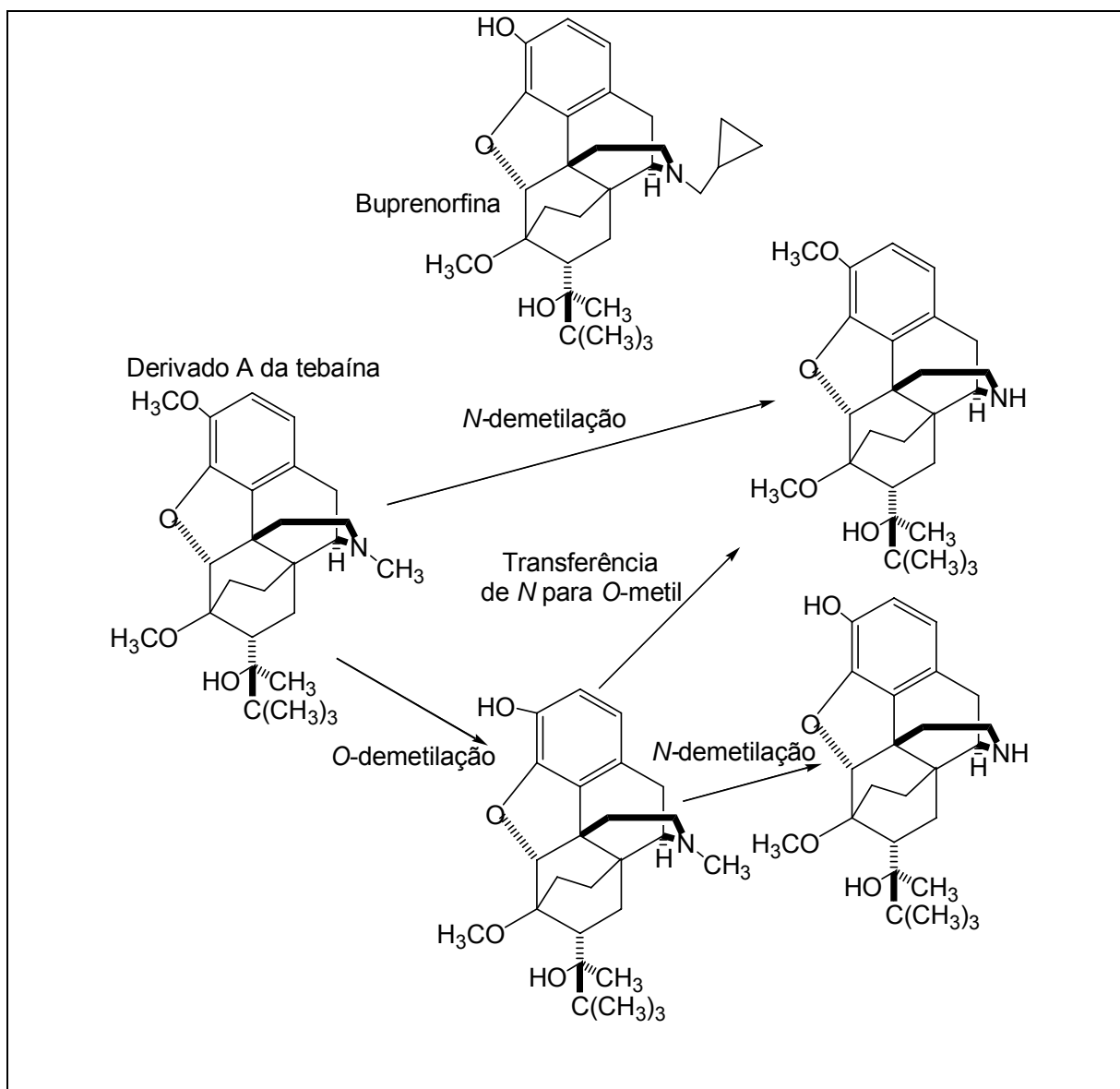


Figura 1. Esquema proposto para biotransformação do derivado A da tebaína por *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384, com formação de intermediários para síntese da buprenorfina (ABEL *et al.*, 2003).

Além da aplicação das bioconversões para síntese regio e estereosseletiva de fármacos, os microrganismos são capazes de gerar uma biodiversidade de compostos

que podem conduzir a novos protótipos de fármacos. Os produtos formados pela ação de fungos filamentosos podem, entre outras vantagens, gerar produtos com ação melhorada, diferente ou menos tóxica que a do composto de partida (CERNIGLIA *et al.*, 1989; HEZARI, DAVIS, 1992; AZERAD, 1995).

O fenantreno, um hidrocarboneto aromático policíclico, apresenta como principais sítios de metabolização em mamíferos a dihidroxidação nas posições 9 e 10 do anel aromático. Bioconversão deste composto por *Cunninghamella elegans*, segundo trabalho de Cerniglia *et al.* (1989), propiciou a formação de produtos diidroxilados nas posições 1,2, 3,4 e 9,10 (metabólito observado em mamíferos) e glicosilado na posição 1 representando a biodiversidade fúngica na geração de novos compostos (Figura 2).

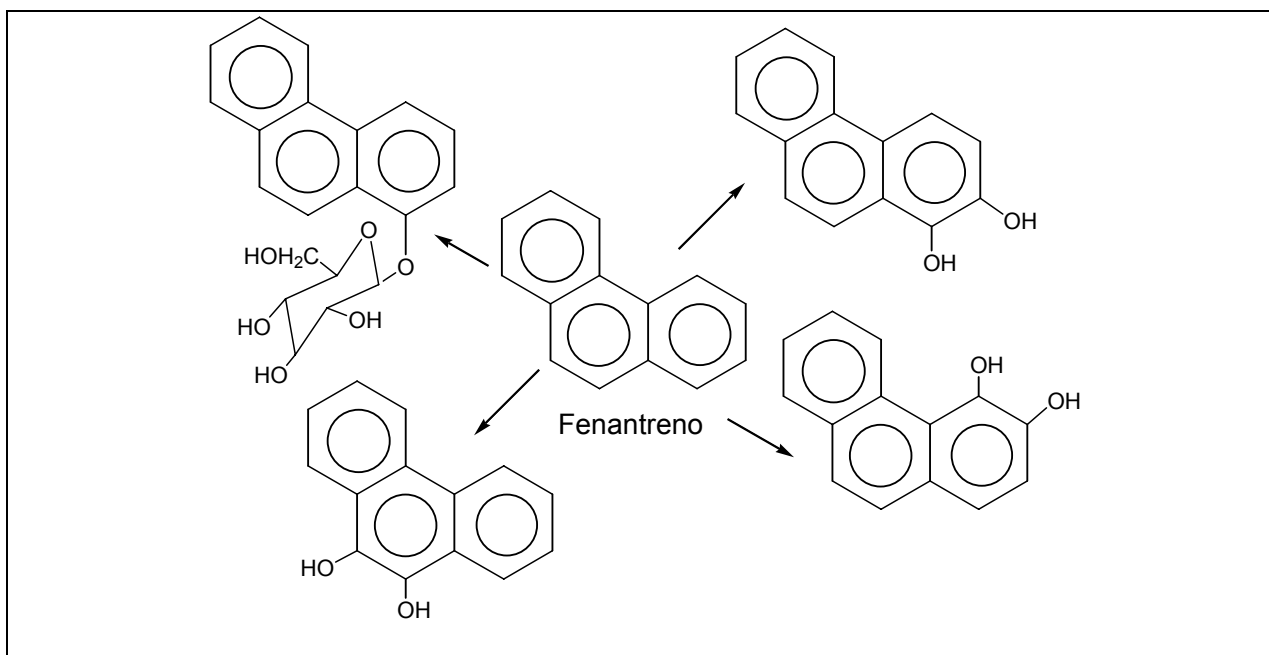


Figura 2. Estruturas químicas dos derivados formados a partir da incubação do fenantreno com *Cunninghamella elegans* (CERNIGLIA *et al.*, 1989).

1.2 BIOCONVERSÃO E METABOLISMO DE FÁRMACOS

A aprovação de um fármaco para uso na terapêutica compreende extensivos estudos que determinem sua eficácia e segurança, sendo a elucidação do metabolismo uma etapa muito importante para esta avaliação (AZERAD, 1999).

O conhecimento sobre a rota metabólica é útil não só no desenho de novos fármacos, mas no aperfeiçoamento daqueles já existentes. Geralmente, o metabolismo de fármacos ocorre através de várias vias, cada uma consistindo numa série de reações que resultam na formação de novos compostos (metabólitos) que também podem ser farmacologicamente ativos. Em vista disso, no desenvolvimento de um fármaco novo é importante documentar o comportamento de seus produtos de metabolismo, assim como o fármaco precursor no organismo (AZERAD, 1999).

O estudo do metabolismo dos fármacos é essencial para o completo conhecimento de fatores farmacocinéticos relevantes ao seu uso adequado e seguro, já que um fármaco têm sua utilidade terapêutica medida em função da ação benéfica que ele exerce sobre um dado sistema biológico (DONATO, O'CONNOR, 2004). A biotransformação de fármacos é geralmente considerada como uma reação de detoxificação, responsável pela conversão de fármacos em outros produtos no organismo antes e depois que eles atinjam seus sítios de ação (AZERAD, 1999).

Os fármacos são metabolizados por processos enzimaticamente catalizados. Várias enzimas encontradas no organismo, específicas ou não, catalisam o metabolismo de xenobióticos e fármacos de forma estereoespecíficas, com o objetivo de converter o fármaco lipofílico em metabólitos mais polares e, portanto mais facilmente eliminados (AZERAD, 1999). Muitos fármacos e outros xenobióticos são metabolizados por enzimas normalmente associadas com o biossíntese e metabolismo

de constituintes endógenos, como esteróides, eicosanóides, vitamina D₃, retinóides e aminas biogênicas (OMURA, 1999; DÍAZ, 2001; WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

O fígado é o principal sítio de metabolização de fármacos, embora outras enzimas metabolizadoras de xenobióticos são encontradas no tecido nervoso, rins, pulmão, plasma e trato gastrintestinal (secreções digestivas, flora bacteriana e parede intestinal) (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002). As reações envolvidas nestes processos são, por conveniência, classificadas em reações de Fase I e Fase II (AZERAD, 1999; WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002; BARREIRO, SILVA, FRAGA, 1996).

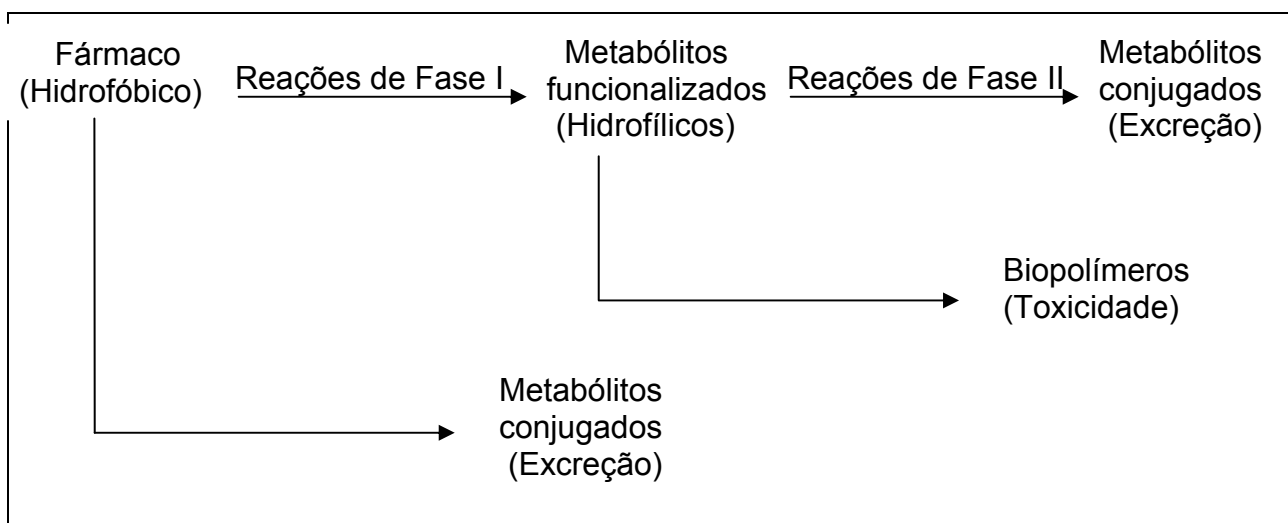


Figura 3. Transformação metabólica de fármacos.

As enzimas de Fase I, em geral, são capazes de transformar inúmeros substratos e catalisar reações diferentes. Trata-se de proteínas catalíticas de natureza diversa, incluindo enzimas com atividade de monoxigenases como o citocromo P-450 ou a flavina monoxigenase, diversas oxidases (álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, amino oxidases, aromatasas), epóxido hidrolases ou esterases e, amidases hepáticas e plasmáticas. Destas o citocromo P-450 é a mais importante e amplamente estudado (Figura 4) (DONATO, 2004; WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

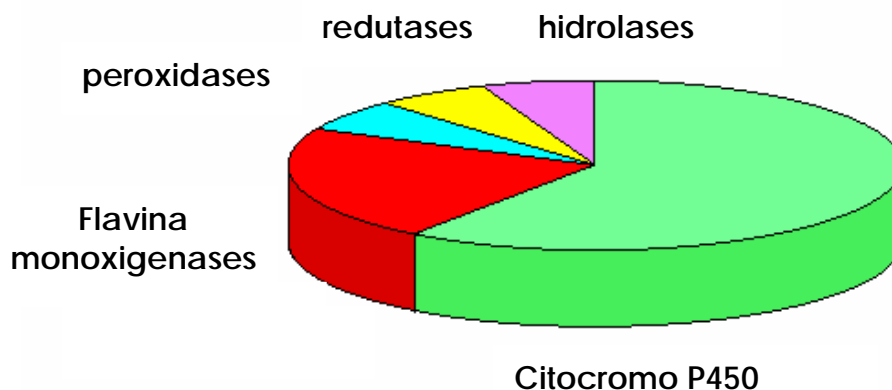


Figura 4. Participação de diferentes enzimas de Fase I envolvidas no metabolismo de xenobióticos (adaptado de DONATO, 2004).

O estudo do metabolismo de fármacos tradicionalmente é realizado em modelos animais, perfusão em órgãos e culturas de células normais ou malignas. Modelos microbianos podem consistir em uma alternativa ou pelo menos um complemento aos estudos em sistemas animais, haja visto que podem imitar o metabolismo de mamíferos e fornecer algumas informações pertinentes sobre o destino metabólico de um fármaco (ROSAZZA *et al.*, 1979; SMITH, ROSAZZA, 1983; SARIASLANI, 1991; ABOURASHED *et al.*, 1999; AZERAD, 1999). As transformações enzimaticamente promovidas na estrutura química dos fármacos podem acarretar profundas alterações na resposta biológica, uma vez que modificações moleculares, ainda que singelas, podem alterar significativamente o farmacóforo, dificultando sua interação com o biorreceptor original, ou ainda, favorecendo novas interações com outras biomacromoléculas, correspondendo a novos e distintos efeitos biológicos, algumas vezes responsáveis pelos efeitos deletérios de um fármaco (BARREIRO, SILVA, FRAGA, 1996).

A utilização de microrganismos como modelo para estudo do metabolismo de fármacos tem sido bem estabelecido desde o conceito primeiramente introduzido por Smith e Rosazza em 1974. O conceito de modelo microbiano segundo estes autores está fundamentado no fato de que tanto os fungos como os mamíferos são organismos eucariotos que apresentam sistema enzimático similar para a maioria das funções fisiológicas e para o metabolismo de xenobióticos (ABOURASHED *et al.*, 1999).

Dentre as vantagens da utilização de sistemas microbianos, pode-se destacar: a fácil preparação e o baixo custo dos meios de cultura; apresentam-se como um método reprodutivo já que os processos envolvidos são de simples repetição e a quantidade dos produtos formados é maior em relação aos modelos animais (maior concentração inicial do substrato é suportada) favorecendo a detecção, identificação e elucidação estrutural; a manutenção das culturas estoques de microrganismos é relativamente simples e barata em relação à manutenção de culturas de células e tecidos ou mesmo animais de laboratório; probabilidade de ocorrer transformações regio e estereosseletivas usando diferentes cepas selecionadas pelo *screening*; possibilidade da descoberta de novos metabólitos com maior atividade e menos toxicidade em relação ao composto original. (ABOURASHED *et al.*, 1999; AZERAD, 1999).

1.2.1 REAÇÕES METABÓLICAS DE FASE I

1.2.1.1 SISTEMA ENZIMÁTICO CITOCROMO P-450 (CYP450)

O citocromo P-450, ao longo de sua história, foi inicialmente identificado como um pigmento ligado ao monóxido de carbono microssomal, que quando reduzido apresentava um pico de absorção único no comprimento de onda de 450nm. Poucos anos depois, contudo, sua natureza hemoprotéica foi elucidada por Omura e Sato e a

partir daí, sua importância como monoxigenase de função mista (BOSSCHE, 1998; OMURA, 1999). O sistema enzimático citocromo P-450 constitui uma superfamília de heme-proteínas, presente em numerosas espécies, desde bactérias onde o citocromo P-450 cam foi o primeiro identificado (Figura 5) a mamíferos, sendo o principal responsável pelo metabolismo oxidativo dos xenobióticos. Estas enzimas catalizam o ataque oxidativo a compostos de natureza orgânica, de maneira regio e estéreo específicas e em temperatura fisiológica (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002; DONATO, 2004). A proporção com que os vários xenobióticos são metabolizados pelo sistema enzimático CYP-450 depende de vários fatores tais como espécie, raça, estado nutricional, tecidos e idade (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

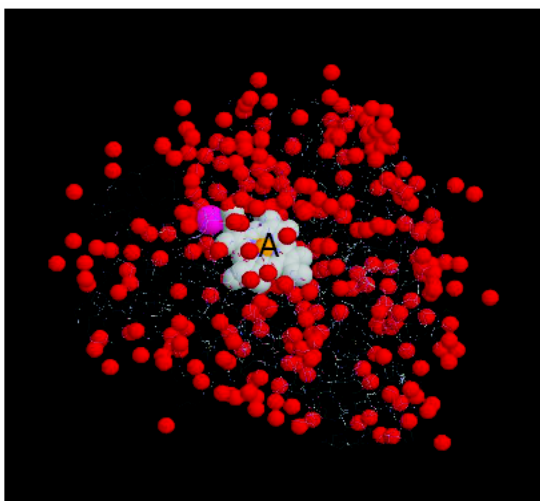


Figura 5. Estrutura do citocromo P450 1AKD de *Pseudomonas putida* com cânfora 5-monoxigenada. **A** – sítio ativo do grupo heme; **Fe** – amarelo ; **N** – azul. O substrato (círculo rosa) se situa cercado pelo grupo heme (VILLAREJO, 2004)

Várias são as reações catalizadas pelo citocromo P-450, sendo elas: a oxidação de alcanos e aromáticos; a epoxidação de alcenos, hidrocarbonetos policíclicos e benzenos halogenados; a dealquilação de aminas secundárias, aminas terciárias e

ésteres; a conversão de aminas para *N*-óxidos, hidroxilaminas e derivados nitrosos; e a dealogenação de hidrocarbonetos halogenados (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002; DONATO, 2004).

Devido a grande diversidade de isoenzimas pertencentes ao sistema enzimático citocromo P-450, estas enzimas foram classificadas em famílias e subfamílias segundo critérios filogenéticos e seqüência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. Para pertencer a uma mesma família as monoxigenases CYP450 devem apresentar uma homologia na seqüência de aminoácidos > 40% e, homologia > 55% para pertencer a uma mesma subfamília. CYP450s foram nomeadas usando como raiz o símbolo CYP seguida por um número arábico que determina a família (CYP1, CYP2, CYP3, etc.), a letra denominando a subfamília (CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E) e outro numeral arábico representando o gene individual (WILLIANS et al., 2002; DONATO, 2004). No metabolismo de xenobióticos, as famílias de CYP450 1, 2 e 3 são as que participam em maior proporção (DÍAZ, 2001).

As enzimas citocrômicas 1A1 e 1A2, pertencentes à família 1 do citocromo P-450 (CYP1), são as que tem participação nos processos de biotransformação, diferindo entre si na capacidade de oxidar compostos aromáticos. Enquanto as enzimas CYP1A1 catalisam o metabolismo de poluentes ambientais, as enzimas CYP1A2 participam da oxidação de fármacos tais como tacrina, clozapina, imipramina, antidepressivos, teofilina, cafeína e naproxeno (DÍAZ, 2001). Aproximadamente 35% do metabolismo de fármacos comumente utilizados, é decorrente da ação da família 2 do CYP450, destacando as enzimas 2A6 (oxidação da nicotina), 2C9 (metabolismo da varfarina, tolbutamida, tamoxifeno e fenitoína), 2C19 (metabolismo da amitriptilina, omeprazol e fenitoína; metabolização de proguanila a cicloguanila), 2D6 (responsável pelo

metabolismo de 20% dos fármacos que sofrem biotransformação pelo CYP450, entre eles imipramina, desipramina, fluoxetina, paroxetina, propranolol, haloperidol, tioridazina, lidocaína e codeína) e 2E1 (metabolismo do acetaminofeno ao produto tóxico *N*-acetil-*p*-iminobenzoquinona e biotransformação de procarcinógenos). Dentre as enzimas citocrômicas, a subfamília 3A (em destaque isoenzimas 3A4 e 3A5) é a que ocupa o lugar de maior importância, sendo responsável pela biotransformação de mais de 50% dos fármacos (eritomicina, claritromicina, indinavir, ritonavir, diazepam, alprazolam, astemizol, terfenadina, sinvastatina, lovastatina e ciclosporina, entre outros) (DÍAZ, 2001).

1.2.1.1.1 NATUREZA DO CYP450

O CYP450 apresenta no mínimo dois componentes protéicos: uma proteína heme chamada citocromo P-450 e uma flavoproteína chamada NADPH-CYP-450 redutase contendo tanto flavina mononucleotídeo (FMN) como flavina dinucleotídeo (FAD) (Figura 6). Destes dois componentes do sistema enzimático, o CYP450 funciona como o sítio de ligação do substrato e do oxigênio, ao passo que CYP450 NADPH redutase atua como transportadora de elétrons do NADPH. No processo de transferência de elétrons do NADPH para o CYP450, a fosfatidilcolina mostra-se essencial, demonstrando grande influência sobre o sistema de monoxigenase CYP450 (WILLIAMS, LEMKE, FOYE, 2002).

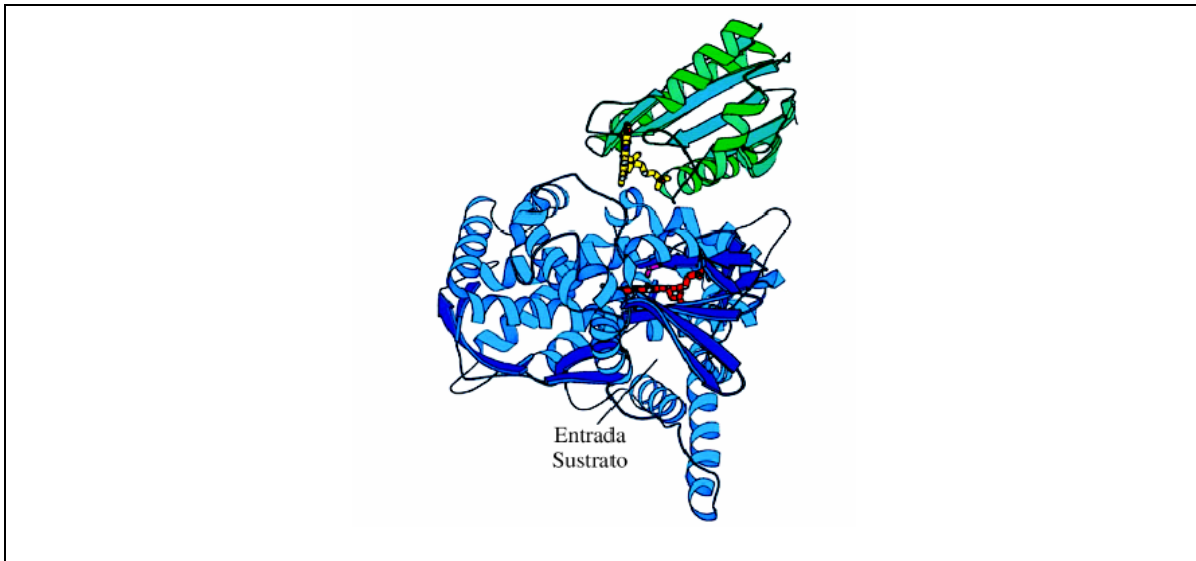


Figura 6. Estrutura cristalina do citocromo P-450BM-3-FMN. O domínio heme se representa em azul e o domínio de flavina em verde, o FMN em amarelo e o grupo heme em rosa (VILLAREJO, 2004).

De forma geral, a molécula da enzima CYP450 é constituída por uma combinação de regiões de α -hélice e de grupos rodeando o grupo heme da proteína, onde as regiões mais variáveis são as de ligação à membrana ou as de união e reconhecimento do substrato (Figura 7). O sítio ativo da CYP450 consiste de um domínio de ligação ao substrato hidrofóbico no qual se encontra o grupo prostético ferro protoporfirinina (grupo heme). O ferro no grupo prostético está ligado a quatro nitrogênios no anel porfirínico. O grupo tiol do aminoácido cisteína, funciona como quinto ligante ao átomo de ferro do grupo heme e uma molécula de água como o sexto ligante (Figura 8) (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002; DONATO, 2004).

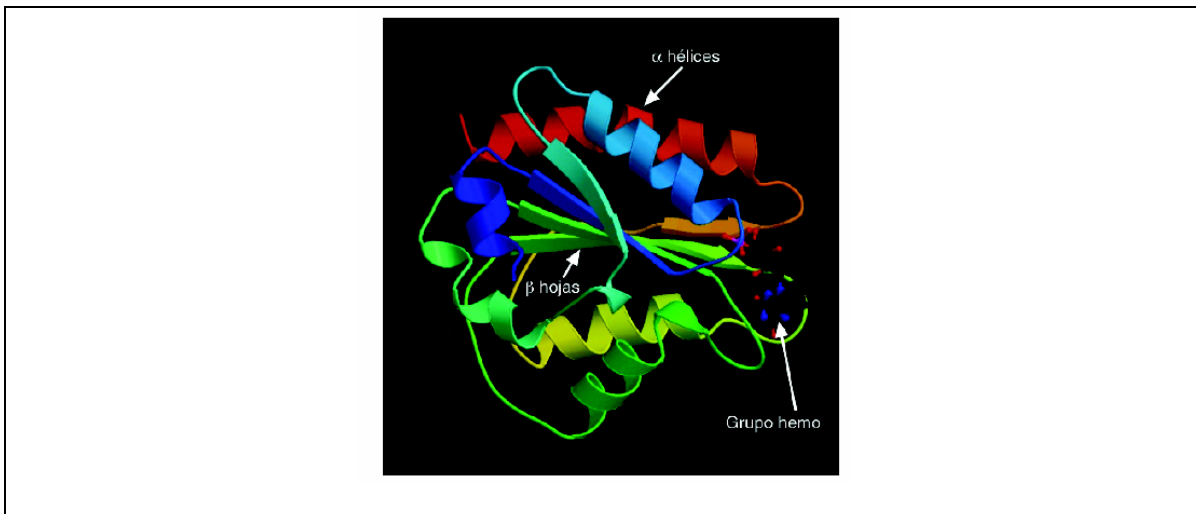


Figura 7. Estrutura cristalina do citocromo P-450 1AKD redutase (VILLAREJO, 2004)

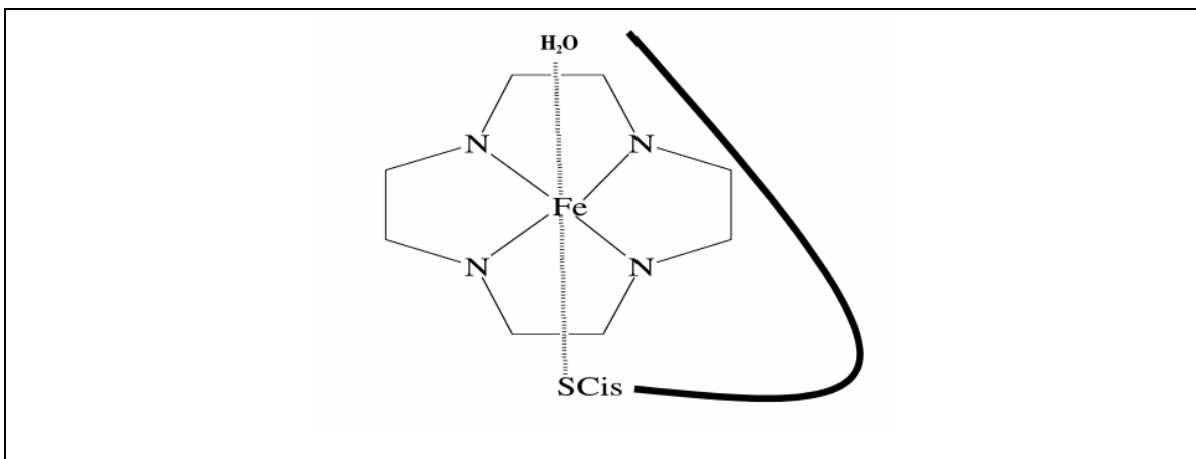


Figura 8. Estrutura molecular do sítio ativo do CYP450 de *Pseudomonas putida* (VILLAREJO, 2004)

Os CYP450s podem ser classificados em quatro classes em função de como os elétrons são transportados do NADPH para o centro catalítico da enzima. Os de classe I utilizam uma redutase que contenha FAD e uma ferro-sulfoproteína (ferridoxina). Os de classe II usam uma cadeia transportadora de elétrons e necessitam de uma redutase do citocromo P-450 que contenha FAD/FMN para transferência de elétrons, são as mais abundantes nos eucariotos. Os de classe III são auto-suficientes e não requerem um

doador de elétrons, e os de classe IV recebem os elétrons diretamente do NADPH (DONATO, 2004).

1.2.1.1.2 LOCALIZAÇÃO DOS CYP450

O citocromo P-450 é uma proteína integral da membrana, onde seus componentes eletrônicos estão localizados no sítio citoplasmático e o sítio ativo hidrofóbico no lúmen do retículo endoplasmático (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

Nos organismos eucariotos, os CYP450 de classe I estão localizados na membrana interna da mitocôndria. Nos mamíferos estes CYP450 catalizam diversas etapas da biossíntese de hormônios esteroidais e vitamina D₃ (DONATO, 2004).

As enzimas de classe II e as CYP450 NADPH redutases não estão associadas, mas ambas estão ancoradas de forma independente na porção externa da membrana do retículo endoplasmático (Figura 9). A atividade de alguns CYP450 são favorecidas pela presença do citocromo b5 que facilita a transferência de elétrons do NADPH. Nos animais, entre as funções fisiológicas desempenhadas estão a biossíntese e o catabolismo de moléculas sinalizadoras, hormônios esteroidais e ácido retinóico (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002; DONATO, 2004).

Os CYP450 de classe III participam da síntese de prostaglandinas em mamíferos. Além das funções biossintéticas, os CYP450 de classe I e de classe II participam da metabolização de xenobióticos tanto de plantas como de animais. São responsáveis pelos processos de metabolização de fármacos e dos processos de detoxificação (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002; DONATO, 2004).

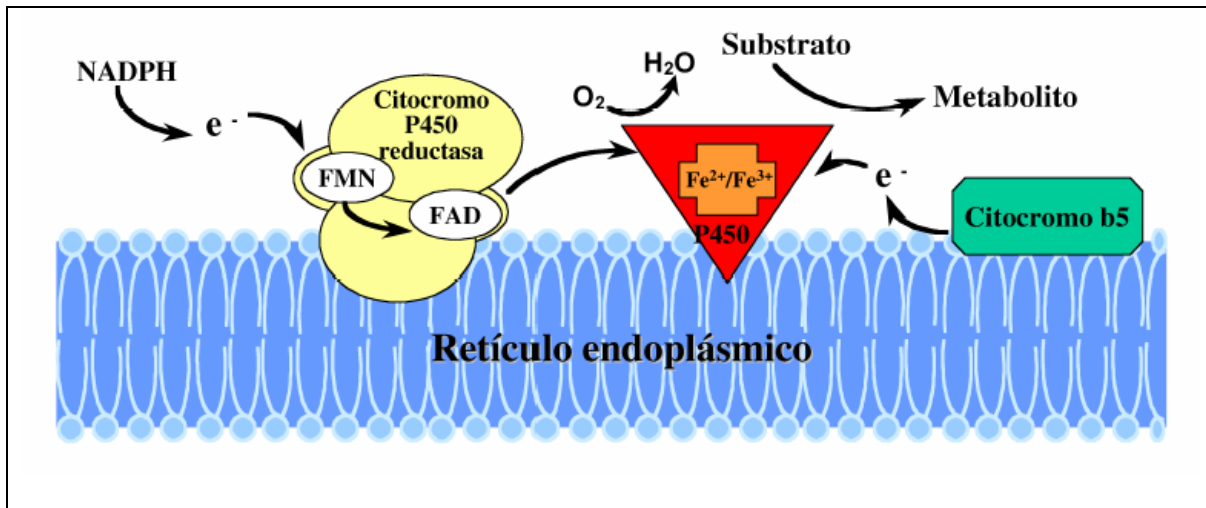


Figura 9. Localização do sistema enzimático citocromo P450 na membrana do retículo endoplasmático (DONATO, 2004).

As enzimas do CYP1A1 encontram-se em maior proporção em tecidos extrahepáticos tais como pulmão, placenta e linfócitos, ao passo que as enzimas CYP 1A2 estão predominantemente no fígado. Dentre as enzimas, com maior participação no metabolismo, pertencentes à família 2 do citocromo P-450, CYP2A6 e CYP2E1 são expressas no fígado. As isoenzimas 3A4 e 3A5, da família 3 do CYP450, estão presentes em tecidos como fígado, trato gastrointestinal, placenta e pulmão (DÍAZ, 2001).

1.2.1.1.3 CICLO CATALÍTICO DOS CYP450

O mecanismo catalítico para as muitas isoformas de CYP450 isoladas mostra-se uniforme, ocorrendo em uma série de etapas e interagindo com moléculas do substrato, doadores de elétrons e oxigênio (Figura 10) (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

Na etapa A, a ligação reversível do grupo heme da enzima CYP450 com a molécula do substrato resulta na formação de um complexo análogo ao complexo enzima-substrato (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

Na etapa B, o complexo férrico formado entre o substrato e o CYP450 sofre redução para formação de um complexo ferroso entre substrato e CYP450 (Fe^{3+} do grupo heme passa para Fe^{2+}). A redução ocorre por um elétron originado do NADPH e transferido pela flavoproteína, NADPH-CYP450 redutase, do complexo $\text{FMNH}_2/\text{FADH}$ e pelo aumento no potencial redox originado na etapa anterior (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002; DONATO, 2004).

O complexo CYP450 reduzido, na etapa C, rapidamente se liga ao oxigênio molecular (O_2) como um sexto ligante ferroso para formar o complexo oxiCYP450 (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

OxiCYP450 sofre auto-oxidação a ânion superóxido, na etapa D do ciclo. Na etapa E, o ânion superóxido férrico sofre adicional redução por um segundo elétron da flavoproteína (ou possivelmente do citocromo b5) para formar o complexo reduzido em dois elétrons, peroxiCYP450. O ciclo pode ser interrompido, a partir da subsequente hidroxilação do substrato nesta etapa. Ocorre desequilíbrio no ânion superóxido causado por xenobióticos, formando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (O_2) regenerando o ponto inicial do ciclo, o complexo substrato-proteína heme férrica (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

O complexo peroxiCYP450 férrico, na etapa F, sofre clivagem heterolítica do ânion peróxido a água e a um intermediário altamente eletrofílico perferril oxenóide ($\text{Fe}^{5+}=\text{O}$) ou a um complexo perferril oxigênio-cisteína-porfirina estabilizado por ressonância. Esta espécie perferril oxigênio representa a espécie cataliticamente ativa da oxigenação (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

Na etapa G, a retirada de um hidrogênio do substrato pela espécie perferril oxigênio transfere o radical hidroxila (OH) periférico para o carbono central, a adição do

radical em ligação π ou a retirada de um elétron de um heteroátomo para formação de um radical cátion centralizado no heteroátomo do intermediário perferril (WILLIAMS, LEMKE, FOYE, 2002).

A subsequente recombinação do radical (religação do oxigênio), na etapa H, ou transferência de elétrons (deprotonação) permite produtos hidroxilados e regeneração do complexo enzimático citocromo P-450 férrico (WILLIAMS, LEMKE, FOYE, 2002).

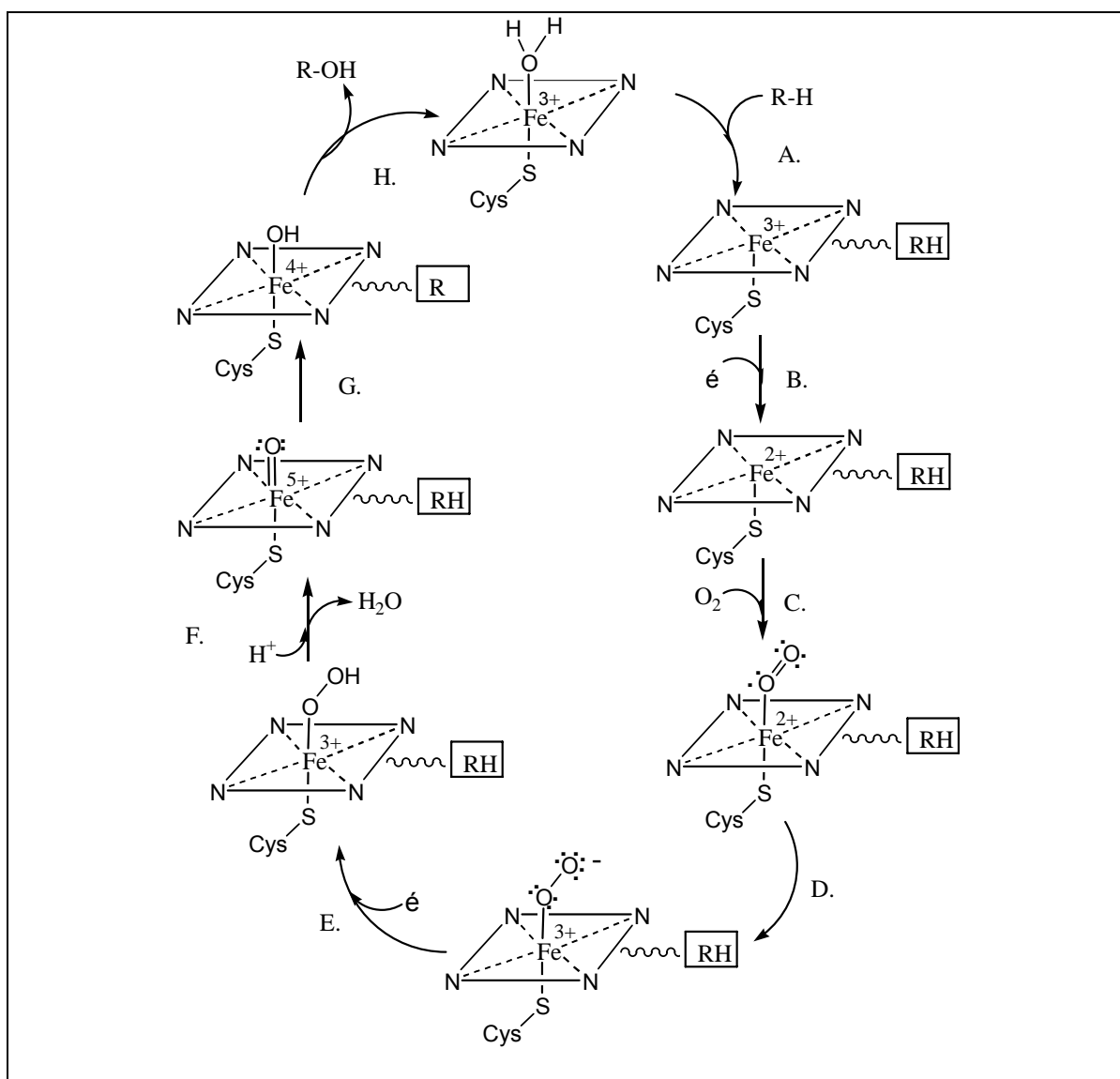


Figura 10. Ciclo catalítico do citocromo P450.

1.2.1.1.4 MONOXIGENASES DE ORIGEM FÚNGICA

A presença de CYP450 em fungos foi descrita desde 1964, em cepas de *Sacharomyces cerevisiae*. Através de estudos em uma grande variedade de espécies, pode-se definir sete diferentes reações enzimáticas associadas com os citocromos P-450 de fungos, incluindo a biossíntese do colesterol, fitosterol e ergosterol, a hidroxilação de cadeias longas de alcanos, a hidroxilação de ácidos graxos, a hidroxilação do ácido oléico e a hidroxilação da progesterona. Na biossíntese do colesterol, fitosterol ou ergosterol, uma etapa fundamental é a 14 α -demetilação do lanosterol em mamíferos, *S. cerevisiae*, *Candida glabrata* e *C. albicans*, catalizada pelo P-450 14DM (P-450 51) (BOSSCHE, KOYMANS, 1998).

A hidroxilação de hidrocarbonetos poli aromáticos (PAHs) por fungos filamentosos como *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *Mortierella isabelina* e *Beauveria bassiana*, assim como o envolvimento das enzimas do CYP450 destas cepas têm sido estudada deste 1982 por Cerniglia *et al.* O envolvimento destas enzimas em muitos destes estudos é concluído de maneira indireta como pelo uso de inibidores específicos do complexo enzimático citocromo P-450, devido a dificuldade de purificação destas enzimas (BRINK *et al.*, 1998).

Outra classe bem estudada de bioconversões catalizadas pelo sistema enzimático citocromo P-450 são as hidroxilações estereo-específicas de esteróides. Frações microssômicas capazes de hidroxilar esteróides *in vitro* tem sido preparadas a partir de vários fungos filamentosos incluindo *Aspergillus ochraceus* (11 α -hidroxilação da progesterona), *Botryosphaeria obtusa* (7 β -hidroxilação), *Cochliobolus lunatus* (11 β -hidroxilação), *Mucor piriformis* (14 α -hidroxilação) e *Phycomyces blakesleeanus* (7 α -hidroxilação). Um envolvimento das enzimas do citocromo P-450 em hidroxilações

sítio-específicas da progesterona foi observado em vários fungos como *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces lilacinus* e *Rhizopus nigricans*, de modo que o envolvimento deste sistema enzimático nas bioconversões pode ser claramente provado em 1995 pela purificação da proteína do sistema enzimático promotor da hidroxilação da progesterona por *P. blakesleeanus* (BRINK *et al.*, 1998).

A *para*-hidroxilação de benzoatos por *Aspergillus niger* e a redução do óxido nítrico por *Fusarium oxysporum* são conversões fúngicas que também envolvem o sistema enzimático citocromo P-450. Na *para*-hidroxilação de benzoatos, o gene do CYP450 envolvido é o *cyp53*, que apresenta genes homólogos em cepas de *Rhodotorula minuta* e *Beauveria bassiana*. Para redução do óxido nítrico, ao contrário, o gene envolvido é o *cyp55*, com sistema comparável no fungo *Cylindrocarpon tonkinense*. O P-450_{foxy}, uma enzima do CYP450, foi isolada do fungo *Fusarium oxysporum* e está envolvida na ω -1- ω -3 hidroxilação de ácidos graxos, assim como a proteína P-450_{BM3} do *Bacillus megaterium* (BRINK *et al.*, 1998).

1.2.1.1.5 OXIDAÇÃO DE HETEROÁTOMOS

A oxidação metabólica de carbonos aromáticos pelo CYP450 depende da isoforma da enzima que catalisa a oxidação e do potencial do componente aromático, de modo que estas hidroxilações ocorrem em posições preditas pelos conceitos de substituição eletrofílica. Componentes aromáticos são comumente convertidos a fenóis por mamíferos, sendo também produzidos como principal metabólito microbiano. Anéis aromáticos ricos em elétrons são facilmente hidroxilados, enquanto sistemas deficientes em elétrons o são escassamente ou nem sofrem oxidação. Em sistemas di- ou tri-substituídos, as hidroxilações são direcionadas a posições preditas pela sumarização

dos efeitos dos substituintes (SMITH, ROSAZZA, 1983; WILLIANS , LEMKE, FOYE, 2002).

A habilidade de fungos filamentosos de promover hidroxilações aromáticas em acetanilida, anilina, benzeno, ácido benzóico, bifenila, clorobenzeno, cumarina, naftaleno, nitobenzeno, tolueno e três isômeros de xilenos foi testada em trabalho realizado por Smith e Rosazza em 1983. Para tal, foram testadas as capacidades metabolizadoras de *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688a, *Aspergillus niger* ATCC 9241, *Aspergillus ochraceous* ATCC 1158w, *Rhizopus stolonifer* NRRL 1477 e *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. A seleção dos substratos em estudo se baseou no fato de cada um destes componentes selecionados já terem sido estudados em mamíferos, permitindo comparação com resultados encontrados pelos modelos microbianos impostos. Com relação aos dados encontrados por Smith e Rosazza (1983), foi detectado um alto grau de paralelismo entre produtos gerados por mamíferos e aqueles formados por fungos filamentosos, demonstrando que o padrão de hidroxilação para os substratos estudados mimetizava a hidroxilação em mamíferos.

Foster *et al.* em 1989 estudou a biotransformação do bloqueador β -adrenérgico propranolol por *Cunninghamella echinulata*, onde os derivados formados foram comparados aos metabólitos humanos. Dois caminhos principais conduzem aos metabólitos humanos de Fase I (4-hidroxiopropranolol, desisopropilpropranolol, ácido-1-naftoxiláctico, propranolol glicol e ácido-1-naftilacético) envolvendo a oxidação da cadeia lateral e a hidroxilação aromática. Todos os cinco metabólitos Fase I encontrados pela biotransformação do propranolol em humanos também foram formados em incubações com *Cunninghamella echinulata*, indicando a importância deste fungo filamentoso em estudos do metabolismo (Figura 11) (FOSTER *et al.*, 1989).

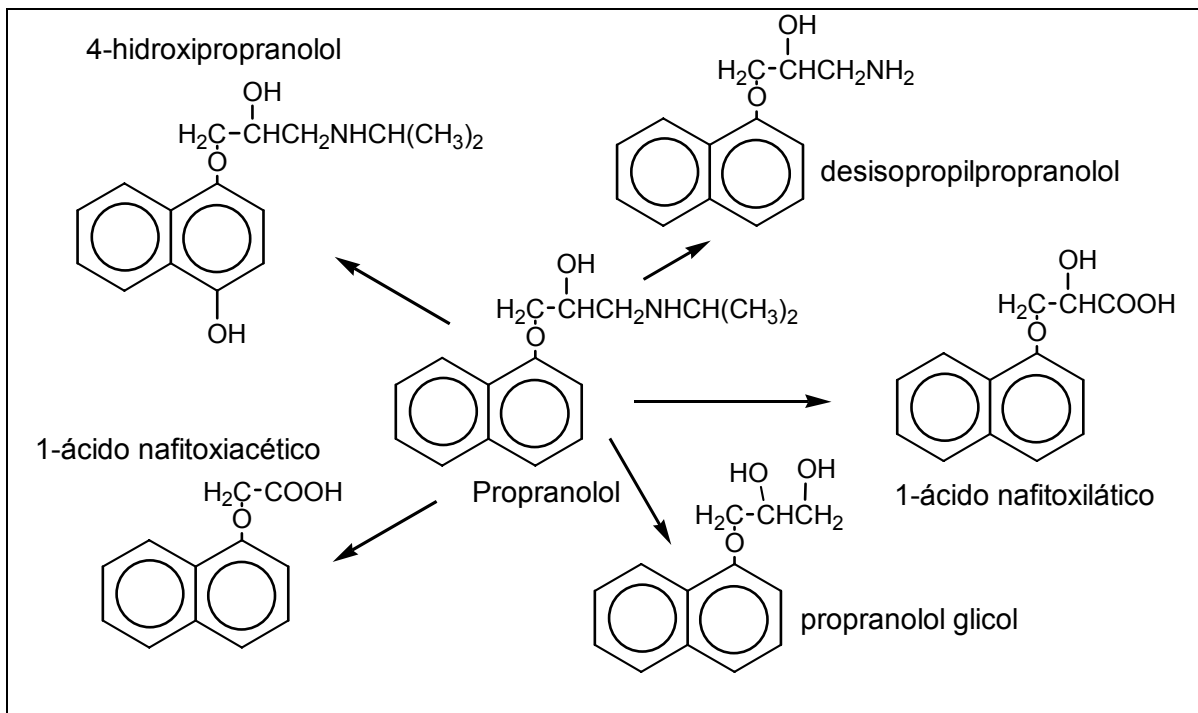


Figura 11. Estruturas químicas do propranolol e de seus metabólitos fase I, humanos e fúngicos (FOSTER *et al.*, 1989).

A biotransformação de ebastina, um anti-histamínico, por *Cunninghamella blakesleeana* levou a formação de carebastina como metabólito principal, e dos intermediários álcool e aldeído. Estudos metabólicos Fase I em humanos, ratos, porcos da Índia, cachorros e macacos também demonstraram a formação de carebastina como principal metabólito estando em concordância com os estudos realizados com o fungo filamentoso *Cunninghamella blakesleeana*. A conversão de ebastina demonstrou desta forma, ser outro exemplo bem sucedido da utilização de microrganismos para estudos do metabolismo de fármacos (Figura 12) (SCHWARTZ *et al.*, 1996).

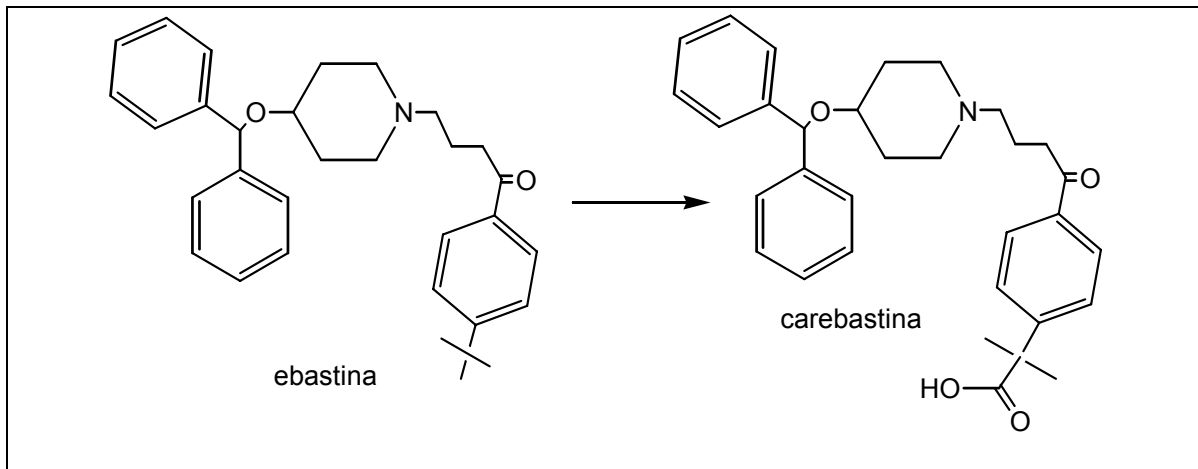


Figura 12. Estruturas químicas da ebastina e seu principal metabólito fase I, carebastina (SCHWARTZ *et al.*, 1996).

Hidroxilação microbiológica do antidepressivo tricíclico ciclobenzaprina (CBP) foi observada por Zhang Donglu *et al.* (1996) com *Cunninghamella elegans*, e os metabólitos fúngicos gerados foram usados como padrão para investigar o metabolismo deste fármaco pelo uso de microssomas de fígado de rato (Figura 13).

Tem sido reportado que a hidroxilação de sistemas aromáticos e não aromáticos com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 é fortemente dependente da existência de um substrato com centro rico em elétrons (amida, sulfonamida, carbamato e outros) que atua como um grupo de ancoragem para o sítio ativo da enzima. Em vista disso, a incubação do lesopitron, um ansiolítico não benzodiazepínico, com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 segundo trabalho de Gotor e Liz (1997), propiciou a formação de um produto hidroxilado na posição 5 da pirimidina (apresentando-se como provável metabólito humano) e um derivado metil glicosilado na mesma posição (Figura 14).

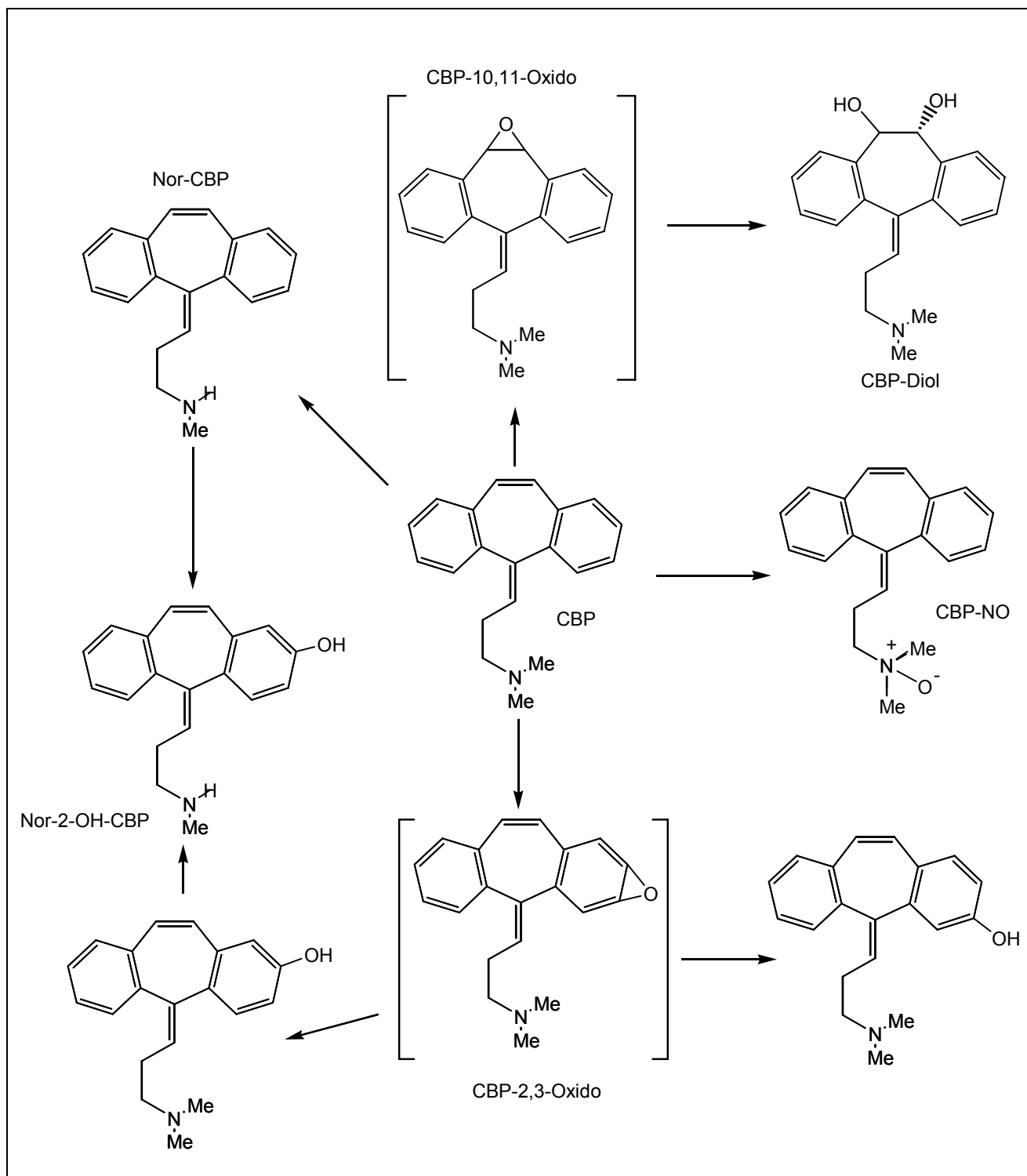


Figura 13. Rota metabólica proposta por Zhang Donglu *et al.* (1996) para ciclobenzaprina (CBP) usando *Cunninghamella elegans*, caldo Sabouraud e tempo de incubação 72 horas.

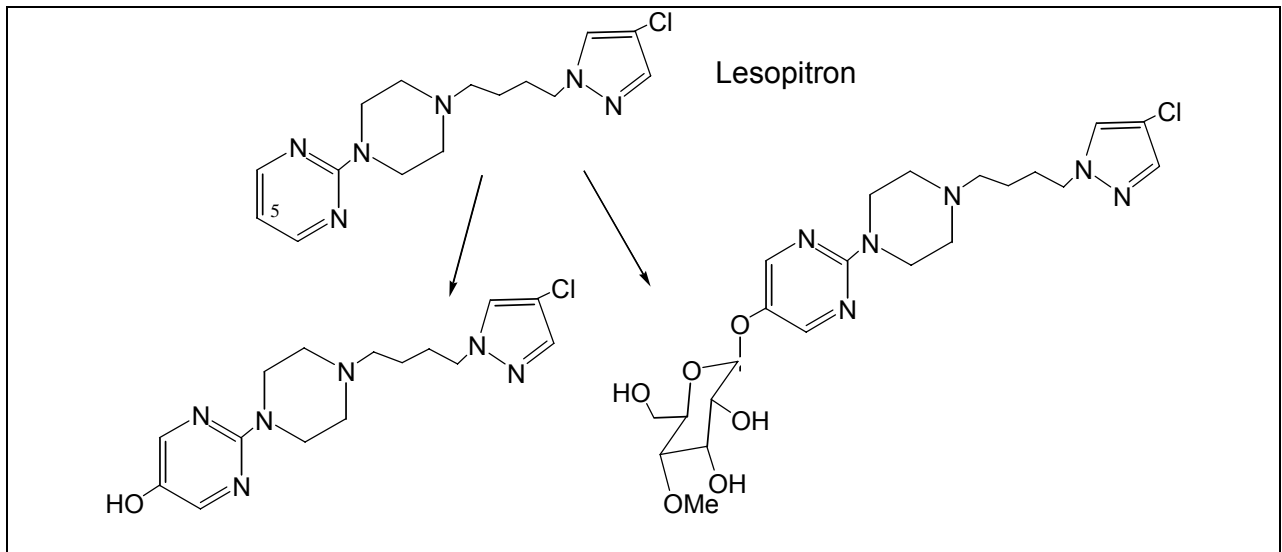


Figura 14. Estruturas químicas dos derivados hidroxilados e glicosilados do lesopitron formados pela incubação com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (GOTOR, LIZ, 1997).

Cunninghamella elegans demonstrou capacidade em metabolizar uma grande variedade de xenobióticos de maneira regio e estereosseletiva similar ao sistema enzimático dos mamíferos (MOODY *et al.*, 1999, 2000). O antidepressivo tricíclico doxepina, após metabolização *in vivo* (humanos), forma os seguintes metabólitos urinários: (*E*)-2-hidroxi-doxepina, (*E*)-2-hidroxi-*N*-desmetil-doxepina, (*Z*) e (*E*)-*N*-desmetil-doxepina, (*Z*) e (*E*)-doxepina-*N*-óxido, (*E*)-2-*O*-glucuronil-doxepina e um amônio quaternário ligado a um glicuronídeo. Os principais metabólitos obtidos pela incubação da doxepina com *Cunninghamella elegans* e que correspondem aos metabólitos encontrados em humanos foram a (*E*)-2-hidroxi-doxepina, (*E*)-2-hidroxi-*N*-desmetil-doxepina, (*Z*) e (*E*)-*N*-desmetil-doxepina, (*Z*) e (*E*)-doxepina-*N*-óxido, demonstrando a alta eficiência desta cepa na produção de metabólitos de antidepressivos tricíclicos e substâncias correlacionadas (Figura 15) (MOODY *et al.*, 1999).

Além da capacidade de promover a hidroxilação da ciclobenzaprina e doxepina, *Cunninghamella elegans* também mostrou-se eficiente em biotransformar o antidepressivo tricíclico mirtazapina. Os metabólitos humanos Fase I e II descritos para este fármaco foram: mirtazapina *N*-óxido, 8-hidroxi-mirtazapina, *N*-desmetil-mirtazapina, mirtazapina *N*-glucuronídeo, mirtazapina *N*-sulfato, 8-hidroxi-mirtazapina glucuronídeo, 8-hidroxi-*N*-desmetil-mirtazapina, 8-hidroxi-*N*-desmetil-mirtazapina glucuronídeo, 8-hidroxi-mirtazapina sulfato e 8-hidroxi-*N*-desmetil-mirtazapina sulfato. 13-hidroxi-mirtazapina foi encontrada em estudos de metabolismo realizados em ratos. Pela incubação da mirtazapina com *Cunninghamella elegans* sete metabólitos foram encontrados, sendo: 8-hidroxi-mirtazapina, *N*-desmetil-8-hidroxi-mirtazapina, *N*-desmetil-mirtazapina, 13-hidroxi-mirtazapina, mirtazapina *N*-óxido, 12-hidroxi-mirtazapina e *N*-desmetil-13-hidroxi-mirtazapina. Como descrito por Moody *et al.* (2000), *Cunninghamella elegans* metabolizou a mirtazapina pelas mesmas rotas reportadas em humanos e animais (sendo: 8-hidroxilação, *N*-oxidação, demetilação e 13-hidroxilação) demonstrando apresentar habilidade de mimetizar o metabolismo de mamíferos, assim como de gerar novos produtos e produzir quantidades úteis para propor o metabolismo humano e síntese química (Figura 16).

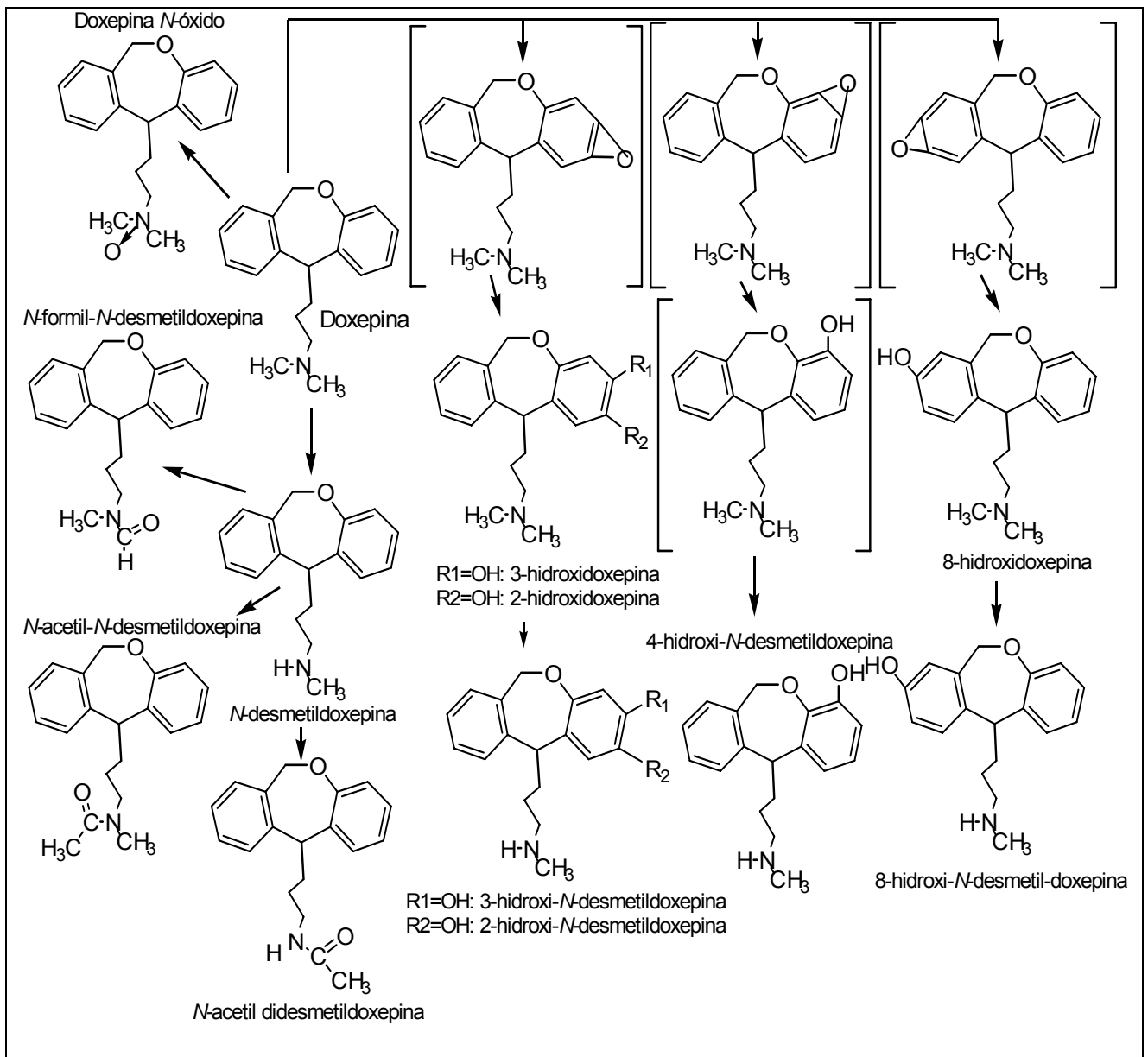


Figura 15. Rota metabólica proposta por Moody *et al.* (1999) para doxepina usando *Cunninghamella elegans*, caldo Sabouraud e tempo de incubação 48 horas.

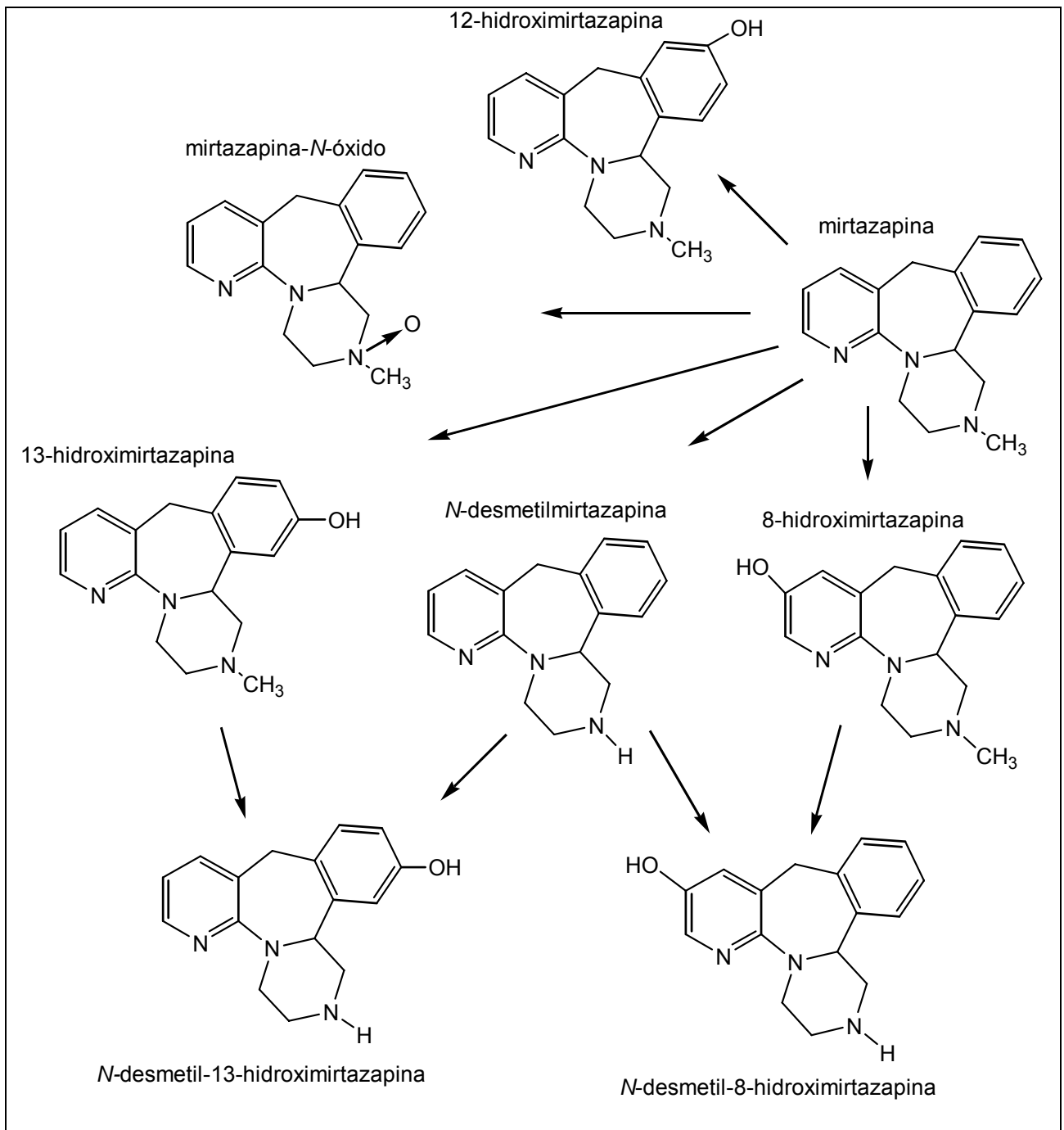


Figura 16. Rota metabólica proposta por Moody *et al.* (2000) para mirtazapina usando *Cunninghamella elegans*, caldo Sabouraud e tempo de incubação 72 horas.

A preparação de metabólitos hidroxilados humanos através do uso de microrganismos, mostrou-se satisfatória no estudo do metabolismo do anti-hipertensivo irbesartan com diferentes cepas de fungos filamentosos e bactérias. Em humanos e

animais, o metabolismo deste fármaco leva a formação de pelo menos oito metabólitos urinários: conjugado tetrazol *N*- β -glicuronídeo; metabólito monohidroxilado na posição ω -1 da cadeia lateral *n*-butila e seu derivado correspondente ceto oxidado; o ácido carboxílico resultante da oxidação do grupo metil terminal da cadeia lateral; dois diferentes metabólitos monohidroxilados resultantes da oxidação do anel espirociclopentano; e dois metabólitos adicionais com oxidações em duas posições. Incubação do ibersantan com cepas de *Absidia*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Mucor* e *Streptomyces* propiciou a formação dos metabólitos hidroxilados A, C, e E, e dos metabólitos dihidroxilados D e F representados na Figura 17, destacando o potencial metabólico destes fungos em estudos do metabolismo humano (ALEXANDRE, MAURS, AZERAD, 2004).

Rhazinilama é um componente natural com propriedades antimetabólicas. Devido a inativação *in vivo* deste composto, Décor *et al.* (2005) realizou estudos de metabolização da rhazinilama para detectar os prováveis motivos desta inativação, assim como sugestões para resolução deste inconveniente. Os metabólitos encontrados tanto em microsomas de fígado humano quanto pela incubação com *Beauveria bassiana* foram formados por oxidação das posições 3 e 5 da rhazinilama (Figura 18). Os dois derivados hidroxilados mostraram em estudos realizados pelo mesmo trabalho, serem muito menos ativos que seu composto de origem e inativos *in vitro*, de modo que a inativação da rhazinilama no organismo pode ser devido a sua rápida metabolização com formação de metabólitos inativos (DÉCOR *et al.*, 2005).

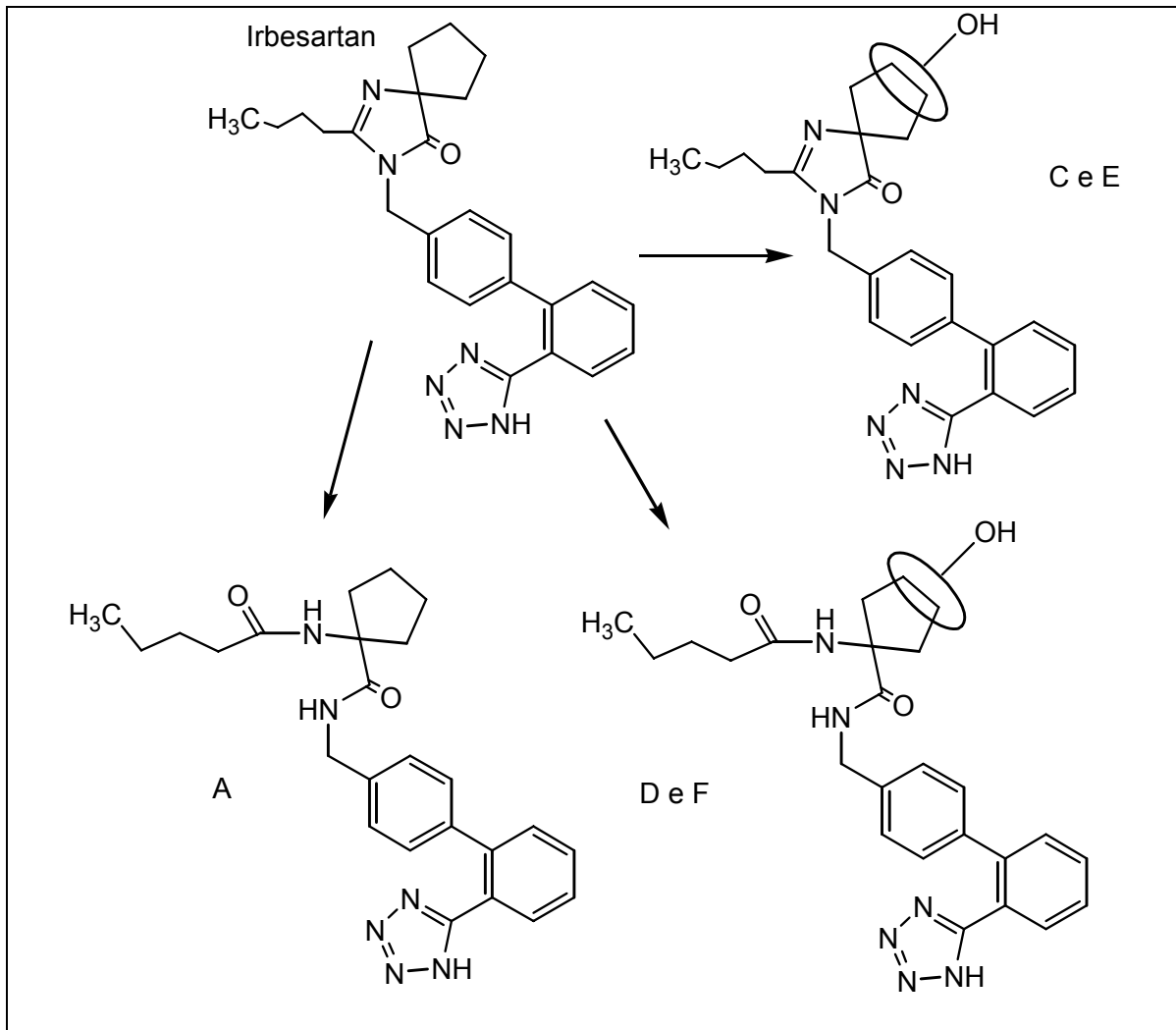


Figura 17. Estruturas químicas dos produtos hidroxilados e dihidroxilados formados a partir da incubação do irbesartan com diferentes cepas no período de 7 dias (ALEXANDRE *et al.* 2004).

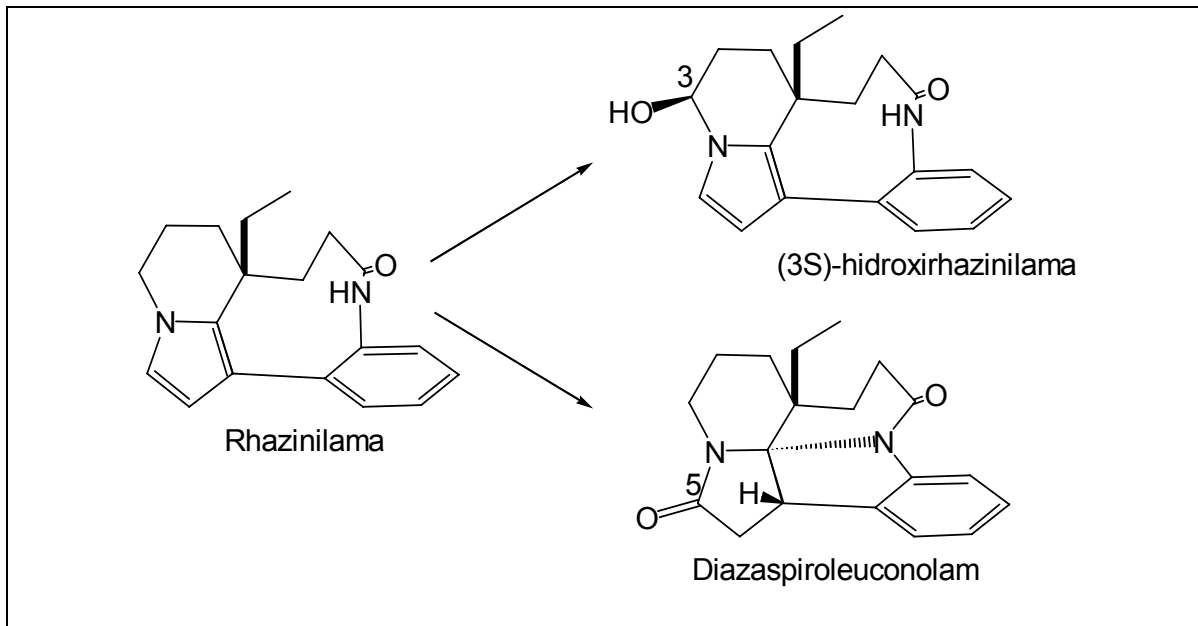


Figura 18. Estruturas químicas dos metabólitos humanos e fúngicos do Rhazinilama (DÉCOR *et al.*, 2005).

1.2.1.2. REDUÇÃO

As principais reações de redução nos átomos de carbono estão relacionadas à redução de aldeídos a álcoois primários, redução de cetonas a álcoois secundários e à redução de duplas ligações. *N*-óxidos, compostos nitro aromáticos, hidroxilaminas e hidrazinas, por sua vez, podem com frequência ser reduzidas a aminas (WERMUTH, 1996).

A biotransformação estereosseletiva da varfarina (anticoagulante oral) foi estudado por Wong e Davis (1989) com *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 como um modelo do metabolismo animal. Em adição ao metabolismo oxidativo mediado pelo citocromo P-450 em humanos, a varfarina também é reduzida na cetona da cadeia lateral formando produtos alcoólicos (9*R*-varfarina-11*R*-álcool, 9*S*-varfarina-11*S*-álcool, 9*R*-varfarina-11*S*-álcool e 9*S*-varfarina-11*R*-álcool). Todos os metabólitos encontrados em humanos, também foram formados pela incubação da varfarina com

Cunninghamella elegans ATCC 36112, demonstrando que a biotransformação por este fungo filamentoso é altamente seletiva como a observada em humanos (Figura 19) (WONG, DAVIS, 1989).

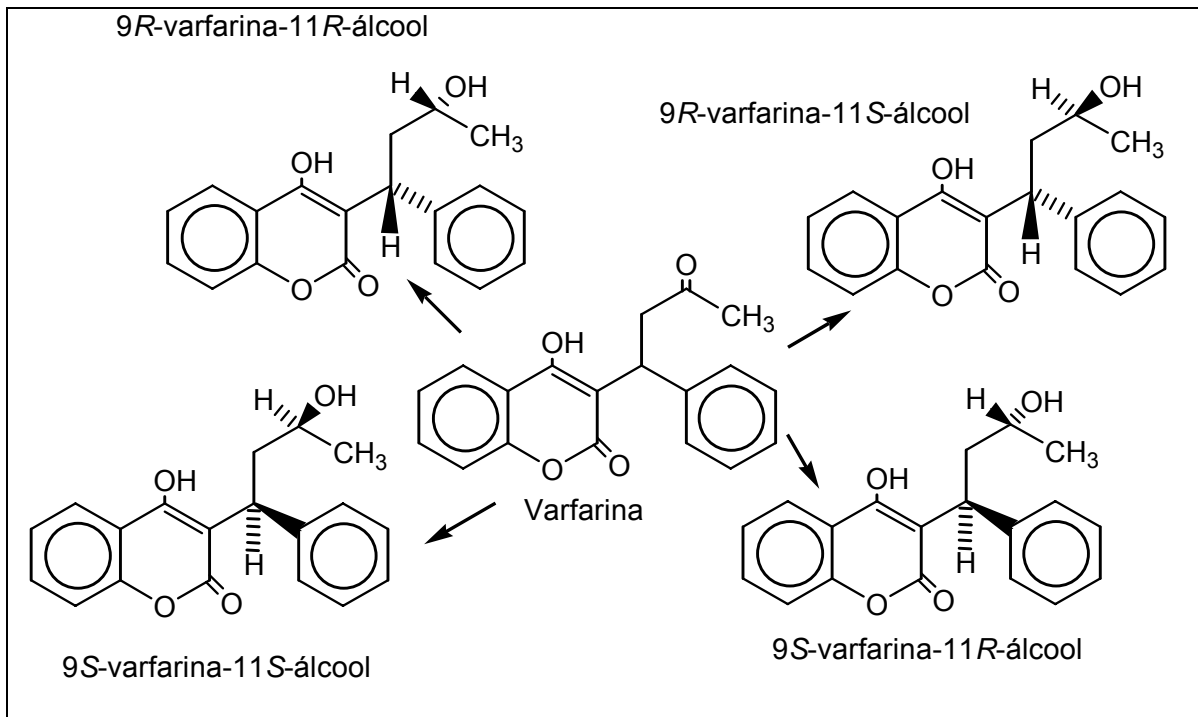


Figura 19. Estruturas químicas da varfarina e dos produtos alcoólicos formadas pela redução da cetona da cadeia lateral deste anticoagulante (WONG, DAVIS, 1989).

1.2.1.3. HIDRÓLISE

As amidas e os ésteres são hidrolizados em humanos por amidases e esterases presentes no sangue, fígado, rins e outros tecidos. Ésteres e certas amidas são hidrolizadas rapidamente por um grupo de enzimas chamadas carboxiesterases. (LACROIX, 1997; WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

A transformação microbiana de 7,4'-diacetoxidaidzeina, uma isoflavona, foi estudada por Miyazawa *et al.* em 2004 com *Aspergillus niger*, embora não haja relatos do metabolismo humano deste flavonóide. Segundo trabalho produzido por estes

autores, 7,4'-diacetoxidaidzeína foi eficientemente hidrolizada nos carbonos 7 e 4' levando a produção do composto daidzeína (Figura 20) (MIYAZAWA *et al.*, 2004).

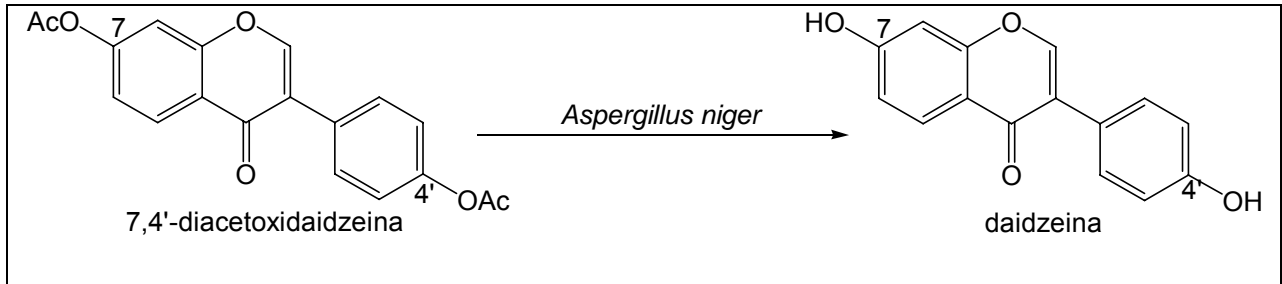


Figura 20. Hidrólise de 7,4'-diacetoxidaidzeína em daidzeína por *Aspergillus niger* (MIYAZAWA *et al.*, 2004).

1.2.2. REAÇÕES METABÓLICAS DE FASE II

1.2.2.1. METILAÇÃO

As reações de metilação resultam principalmente na formação de produtos *O*, *N* e *S* metilados, diferindo dos outros processos de conjugação já que os derivados *O*-metil formados podem em alguns casos apresentar lipofilicidade e atividade farmacológica tão grande ou maior que o substrato de origem. A transferência do grupo metil ocorre a partir do intermediário de metionina, a *S*-adenosilmetionina (SAM), pela ação de metil transferases (exemplos de compostos metil glicosilados - Figuras 14, 26) (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

1.2.2.2. ACETILAÇÃO

Acetilação é principalmente uma reação de grupos amino envolvendo a transferência de acetil CoA para aminas alifáticas primárias e aromáticas, aminoácidos, hidrazinas ou grupos sulfonamidas (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 2002).

A metabolização da tranilcipromina, um inibidor da monoamino oxidase usado no tratamento da depressão, ocorre em mamíferos por *N*-acetilação e hidroxilação do anel. Transformação microbiana com *Cunninghamella echinulata* demonstrou ser um modelo microbiano satisfatório em estudos de Foster *et al.* (1991), onde os compostos formados similares aos humanos foram os produtos acetilados, *N*-acetiltranilcipromina e *N,O*-diacetiltranilcipromina (Figura 21).

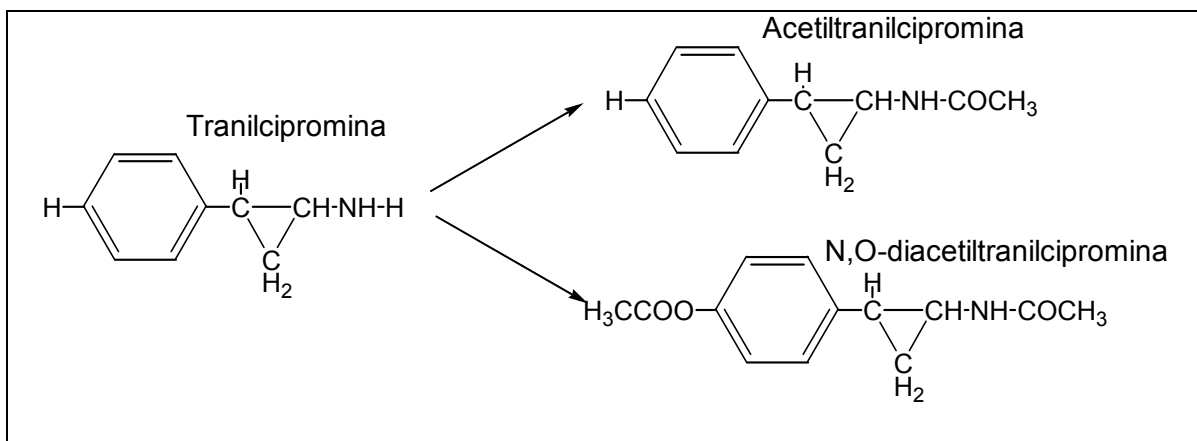


Figura 21. Estruturas químicas dos produtos acetilados, formados pela incubação da tranilcipromina com *Cunninghamella echinulata* (FOSTER *et al.*, 1991).

A difenidramina é um anti-histamínico tipo etanolamina amplamente usado para o tratamento de alergias e náuseas, metabolizado em humanos por *N*-demetilação, *N*-glucuronidação e acetilação. Estudos realizados por Moody *et al.* (2000), usando difenidramina como substrato, *Cunninghamella elegans* e incubação em caldo Sabouraud por 48 horas propiciou a identificação de quatro metabólitos (difenidramina *N*-óxido, *N*-desmetil difenidramina, *N*-acetildidesmetil-difenidramina e *N*-acetil-*N*-desmetil-difenidramina), alguns dos quais já propostos por estudos *in vivo* e *in vitro* em humanos e microsomas de fígados humanos (Figura 22).

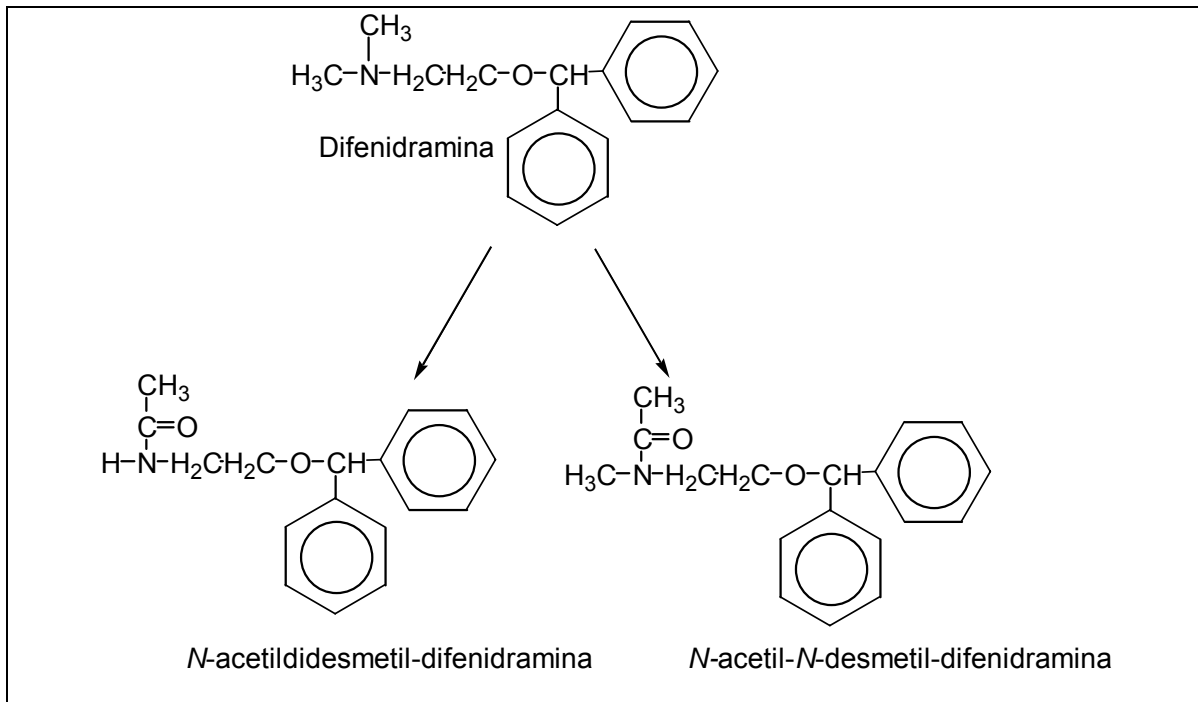


Figura 22. Produtos formados pela acetilação da difenidramina por *Cunninghamella elegans* (MOODY *et al.*, 2000).

1.2.2.3. SULFATAÇÃO

A sulfatação é uma reação importante na biotransformação de hormônios esteróides, catecolaminas neurotransmissoras, tiroxina, ácidos biliares, compostos fenólicos e outros xenobióticos. As sulfotransferases citosólicas estão geralmente associadas com a conjugação de esteróides fenólicos, neurotransmissores e xenobióticos. As sulfotransferases ligadas a membrana estão localizadas no complexo de Golgi de muitas células e são responsáveis pela sulfatação de glicosaminoglicanas, glicoproteínas e grupo tirosinil de peptídeos e proteínas (WILLIAMS, LEMKE, FOYE, 2002).

Devido às ações citotóxicas, carcinogênicas e mutagênicas dos hidrocarbonetos aromáticos em animais de laboratório, tem-se dedicado bastante interesse no estudo do metabolismo destes componentes. Os fungos metabolizam hidrocarbonetos aromáticos

pelo CYP450 e sistemas enzimáticos epóxido hidrolases através de uma seqüência de reações similares às descritas em mamíferos, tornando-se um modelo alternativo para estudo do metabolismo destes compostos. Trabalhos realizados por Cerniglia, Freeman e Mitchum (1982) com fungos, demonstraram ser a sulfatação e glucuronidação as principais rotas metabólicas destes hidrocarbonetos aromáticos hidroxilados. Uma grande variedade de fungos é conhecida por metabolizar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs): *Phanerochaete chrysosporium* por peroxidases extracelulares, *Aspergillus niger* via citocromo P-450, *Crinipellis stipitaria* e *Cunninghamella elegans*.

Para *Cunninghamella elegans* que metaboliza diversos PAHs via CYP450 em diversos derivados menos mutagênicos que o composto original, o caminho metabólico é usualmente direcionado a detoxificação em comparação aos caminhos de bioativação comumente encontrados em mamíferos. A biotransformação do benzopireno por *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, caldo Sabouraud e tempo de incubação 96 horas, levou a formação de derivados sulfatados, hidroxilados e glicosilados segundo trabalho realizado em 1996 por Pothuluri *et al.* (Figura 23).

Flavonóides são produtos naturais de plantas, que são ingeridos em quantidades apreciáveis na dieta humana normal. A conjugação destes componentes com sulfato representa uns dos principais mecanismos de detoxificação fenólica em tecidos animais, e embora a sulfatação com microrganismos seja extremamente rara, *Cunninghamella elegans* mostrou-se eficaz em promover tal modificação, segundo trabalho de Ibrahim (2000) (Figura 24) (IBRAHIM, 2000).

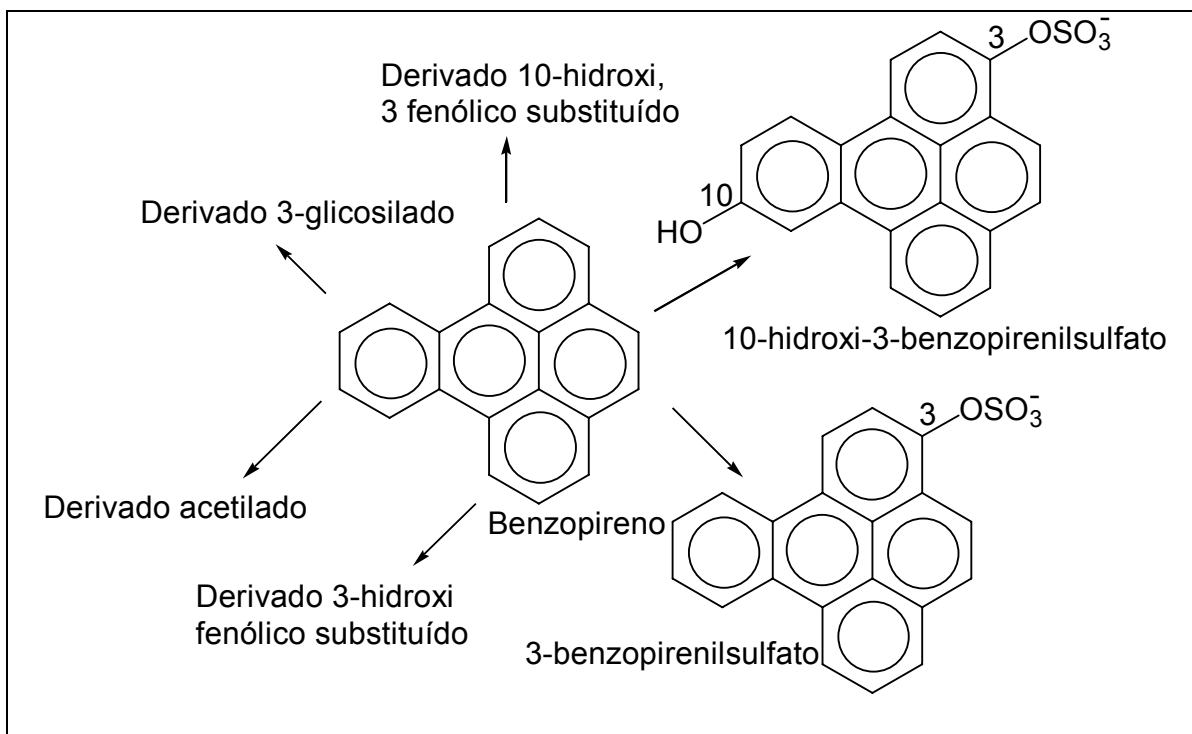


Figura 23. Estruturas químicas dos derivados sulfatados formados pela incubação do benzopireno com *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 (POTHULURI *et al.*, 1996).

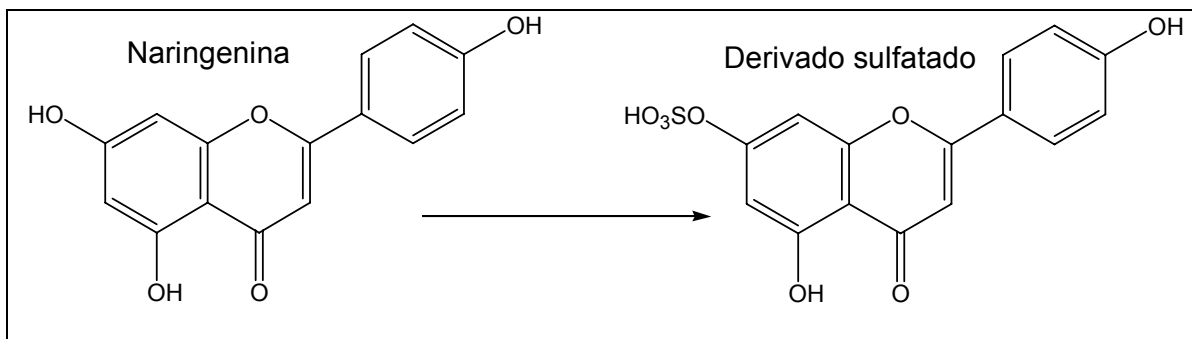
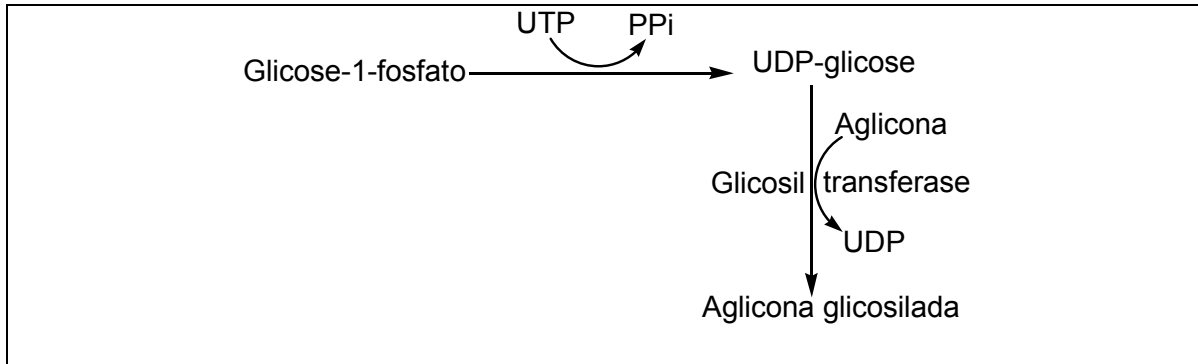


Figura 24. Biotransformação do flavonóide naringenina por *Cunninghamella elegans* (IBRAHIM, 2000).

1.2.2.4. GLICOSILAÇÃO

As reações de glicosilação são efetuadas pela ação de glicosil transferases, utilizando a UDP-glicose como fonte de açúcar.



Mucor hiemalis, *Mucor janssenii* NRRL 3628 e *Actinomucor elegans* MMP 2092, em estudo realizado por Moussa *et al.* (1997), demonstraram sua capacidade em metabolizar a desacetiltimoxamina com formação de produtos glicosilados. Desacetiltimoxamina é o fármaco ativo, formado a partir do pró-fármaco timoxamina que é um agente bloqueador α -adrenérgico, onde a formação do composto glicosilado pelas cepas citadas acima pode mostrar a versatilidade enzimática dos caminhos metabólicos de detoxificação encontrados nos microrganismos (Figura 25).

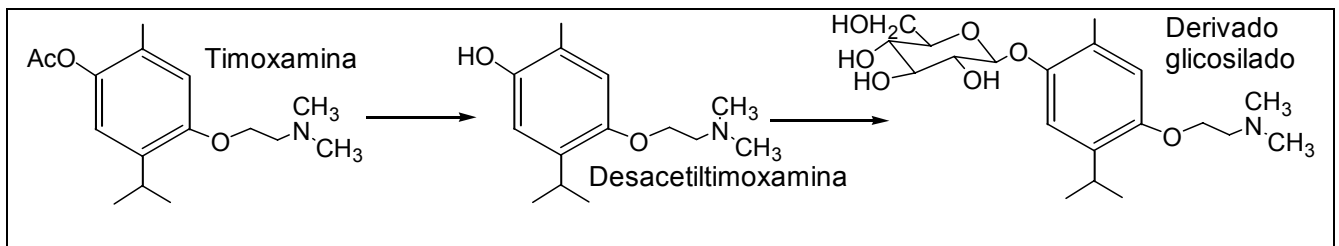


Figura 25. Transformação da desacetiltimoxamina por *Mucor hiemalis*, *Mucor janssenii* NRRL 3628 e *Actinomucor elegans* MMP 2092 com formação de derivado glicosilado (MOUSSA *et al.*, 1997).

O alcalóide antifúngico sampangina quando biotransformado por *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 e *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 produz dois compostos glicosilados. A concentração inibitória mínima do composto metil glicosilado (formado pela incubação com *Beauveria bassiana* ATCC 7159) é 0,2µg/mL similar à da sampangina contra *Cryptococcus neoformans*, diferentemente do metabólito glicosilado formado pela incubação com *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 e *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 que se mostrou inativo contra criptococcosis em ensaios com ratos (Figura 26) (ORABI *et al.*, 1999).

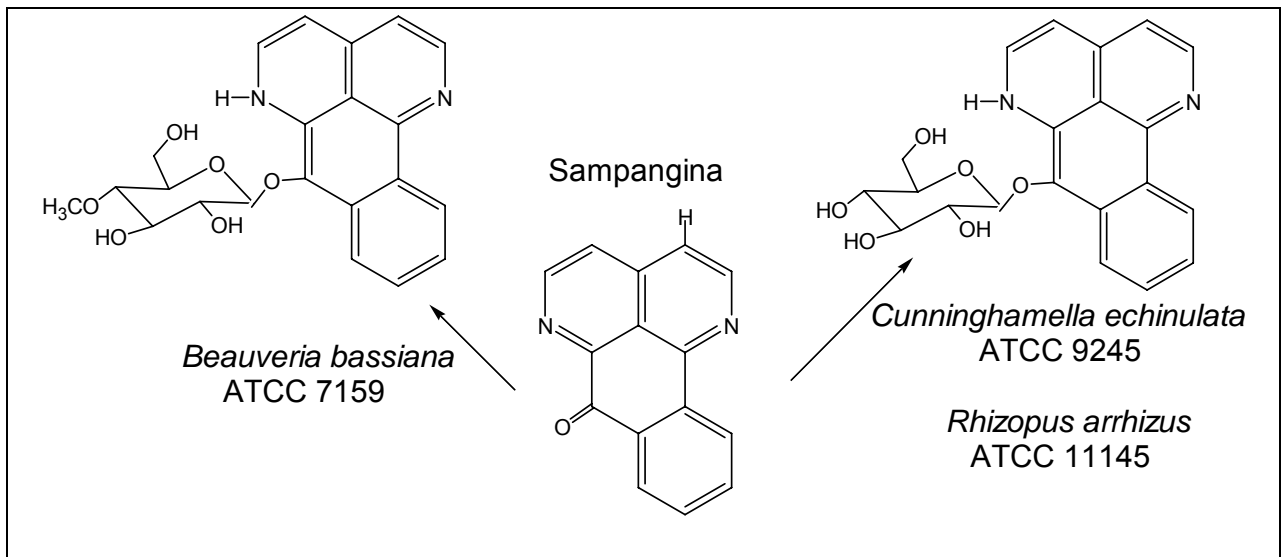


Figura 26. Estruturas químicas dos produtos formados pela incubação da sampangina com *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 e *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 (ORABI *et al.*, 1999).

1.2.2.5. GLICURONIDAÇÃO

Na glicuronidação, uma molécula de ácido glicurônico é transferido para o substrato a partir da uridina-5'-difosfato- α -D-ácido glicurônico (UDPGA), um cofator que é sintetizado da glicose 1-fosfato via uridina trifosfato. Estas reações são catalizadas pelas glicuroniltransferases (UDPGT), enzimas que consistem em um número de

produtos da superfamília de genes UGT (Figura 27) (WERMUTH, 1996; WILLIANS , LEMKE, FOYE, 2002).

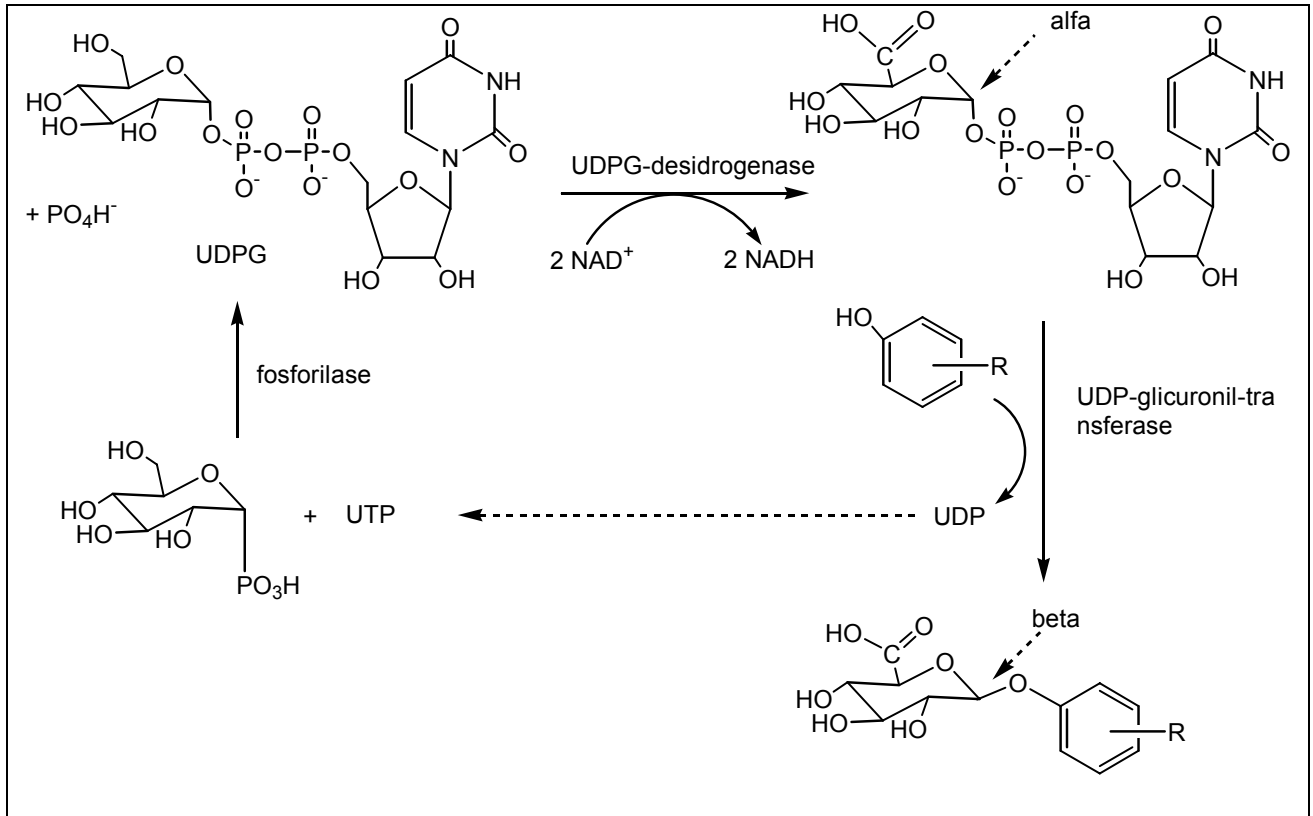


Figura 27. Síntese da uridina-5'-difosfato- α -D-ácido glicurônico (UDPGA) e glicuronidação de um fenol catalizada por uma glicuroniltransferase (WERMUTH, 1996).

A formação de glicuronídeos ocorre em uma grande variedade de substratos (alquilaminas, arilaminas, hidroxilaminas, carbamatos, uréias, tiouréias e sulfonamidas) e com diferentes grupamentos químicos funcionais (átomos de O, S, N e C). Glicuronidação de alquilaminas e arilaminas podem ocorrer em aminas primárias, secundárias e terciárias, levando a formação de *N*-glicuronídeos (Hawes, 1998).

1.2.3. OUTROS MODELOS PARA O ESTUDO DO METABOLISMO

1.2.3.1. CULTURA DE CÉLULAS

Devido as diferenças no sistema enzimático citocromo P-450 entre as espécies, faz-se necessário a busca por modelos hepáticos *in vitro* que representem fidedignamente o metabolismo humano de xenobióticos. Diante disto, hepatócitos humanos e de animais, em suspensão ou culturas de células em monocamada, tem sido utilizado para predizer rotas metabólicas *in vivo* de novos candidatos a fármacos (O'BRIEN, CHAN, SILBER, 2004; LECLUYSE, 2001; GAD, 2002). Culturas de hepatócitos em monocamada apresentam vantagens em relação as mesmas células em suspensão já que consistem de células viáveis e podem ser mantidas por longo período de tempo (GAD, 2002) .

Há relatos de que a atividade das enzimas Fase I e II diminuem significativamente com o decorrer do tempo de incubação e que estas culturas não são afetadas por algumas das variáveis que influenciam estudos *in vivo* como a absorção e distribuição. Além disso, estas células apresentam potencial para gerar e examinar a toxicidade de metabólitos Fase I e II às células do fígado e outros órgãos alvos, e mostram-se como um mecanismo para examinar o potencial de diferentes espécies no metabolismo de candidatos a fármacos para estudos *in vivo* (GAD, 2002).

A escolha da espécie animal apropriada para estudos do metabolismo *in vivo* pode se basear em dados obtidos a partir de culturas de hepatócitos primários das diversas espécies. O isolamento destas células dos fígados de pequenos animais como camundongos, *hamsters*, porcos da Índia e ratos é geralmente realizado *in situ*. Para animais maiores como coelhos, cachorros e macacos e em tecidos humanos, ao contrário, o isolamento ocorre por perfusão de amostras do fígado (Gad, 2002).

1.2.3.2. USO DE COMPUTADORES

Há muitos fatores que são importantes na predição do destino metabólico de fármacos, como a medida da capacidade do fármaco de alcançar o sistema enzimático responsável por sua biotransformação. O entendimento das interações enzima-substrato são de extrema importância para o conhecimento da biotransformação de xenobióticos, contudo, fatores como a indução e inibição enzimática e mecanismos de interação entre fármacos também devem ser considerados. Modelos de homologia dos citocromos de mamíferos tem sido construídos incorporando as estruturas de citocromos de procariotos, e tem auxiliado na expansão de conhecimentos a cerca de estudos de relação estrutura atividade quantitativa (QSAR) clássica, na pesquisa do metabolismo de xenobióticos pelos conhecimentos adquiridos em experimentos de docking com o substrato. Técnicas como análise de campo molecular comparativo (CoMFA) e modelização farmacofórica do substrato são úteis na interpretação e entendimento dos sítios ativos das enzimas, complementando os métodos tradicionais de screening *in vitro* (SOFFERS *et al.*, 2001; LANGOWSKI, 2002).

A vantagem das tecnologias *in silico* é que as propriedades das moléculas podem ser medidas a partir do conhecimento de suas estruturas químicas em duas ou três dimensões (SOFFERS *et al.*, 2001; LANGOWSKI, 2002).

2. OBJETIVOS

A busca de novos compostos que tenham atividade farmacológica desejada, melhoradas em relação a seus protótipos, atividade farmacológica diferente do composto original ou aprimoramento das propriedades físico químicas facilitando processos de absorção e distribuição dos fármacos, é uma prática bastante discutida e de grande interesse em determinadas linhas de pesquisa.

Diante desta incessante tarefa e a partir do conhecimento da capacidade catalítica dos microrganismos, o objetivo deste trabalho é **aplicar a bioconversão com fungos filamentosos para preparar uma série de derivados funcionalizados a partir do novo protótipo de fármaco neuroativo LASSBio 581.**

A utilização de fungos filamentosos para síntese regio e estereosseletiva de fármacos, assim como para preparação de prováveis metabólitos humanos e, sobretudo para produção de uma gama de produtos diferentes ilustrando a biodiversidade enzimática destes microrganismos, é bem documentada na literatura desde tempos antigos até a atualidade.

A escolha da bioconversão em relação à síntese química nestes estudos, além de ser justificada pela capacidade catalítica específica e diversidade das reações, também está fundamentada nas grandes quantidades formadas facilitando ensaios posteriores da atividade farmacológica e da toxicidade, na rapidez e reprodutibilidade do método e no fato de que as enzimas são catalisadores que não agredem o ambiente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fatores que influenciam o processo de bioconversão

Os processos de bioconversão em escala analítica desde que conduzidos de modo a garantir a sua reprodutibilidade, estão menos sujeitos à influência de vários fatores, como a forma morfológica dos fungos e a natureza da viscosidade dos meios líquidos. A lise das células (morte por rompimento devido a fatores intrínsecos ou extrínsecos) pode ser ocasionada pela intensidade de agitação (estresse mecânico), aeração, pH durante o processo, temperatura, tempo de incubação e déficit de nutrientes.

Embora os resultados de um estudo detalhado dos parâmetros envolvidos no processo de bioconversão não tenham sido apresentados por se tratar de um estudo em escala analítica, estes parâmetros foram monitorados ao longo do tempo no laboratório de forma a possibilitar a transposição das reações desenvolvidas para escala preparativa (bioreator).

3.1.1 Composição dos meios de cultura

Para a seleção do meio de cultura que proporcionasse um melhor crescimento das cepas durante as incubações, foram testados dois meios líquidos diferentes, Caldo Sabouraud e PDSM (Potato Dextrose Sucrose Medium). A seleção dos meios de cultura adequados a melhor adaptação das cepas foi baseada nas seguintes características: menor custo; maior facilidade de preparo e conservação; menor probabilidade de contaminação por culturas secundárias; facilidade de extração dos

produtos formados; cinética de formação dos derivados em períodos de tempos compatíveis com a rotina laboratorial e com a possibilidade de transposição para escala industrial; melhor expressão das enzimas bioconversoras; ausência de lise e conseqüentemente de morte celular; conservação das características do substrato, não causando degradação; capacidade de promover crescimento uniforme.

Os aspectos morfológicos observados durante o processo de escolha foram: a formação de pellets ou massa amorfa, o tamanho dos pellets quando formados e a presença de halo de crescimento na parede do Erlenmeyer. O meio líquido PDSM, por ser um meio mais nutritivo que o caldo Sabouraud mostrou-se mais adequado aos processos de bioconversão para as cepas selecionadas, conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2 (MIRANDA, 2003; SIQUEIRA, 2004).

A utilização de caldo Sabouraud nos ensaios de *screening* e escala semi preparativa foi observada em estudos desenvolvidos por Cerniglia, Freeman e Mitchum em 1982, justificando sua escolha para seleção de um meio que proporcionasse melhor crescimento dos fungos selecionados (CERNIGLIA, FREEMAN, MITCHUM, 1982). Na biotransformação do agente imunomodulador HR325 (LACROIX, BITON, AZERAD, 1997) e do irbesartan (ALEXANDRE *et al.*, 2004) foi observado a utilização de meios líquidos enriquecidos contendo trigo, glicose, fosfato de potássio monobásico e dibásico, sulfato de magnésio heptaidratado, cloreto de potássio, nitrito de sódio e sulfato (FeSO_4) heptaidratado. Diferentemente, nos ensaios com LASSBio 581 utilizou-se como meio líquido enriquecido o PDSM que varia em composição em relação ao anteriormente descrito, contendo peptona bacteriológica, dextrose, lecitina de soja, fosfato de potássio monobásico, cloreto de sódio e extrato de levedura.

As cepas selecionadas para produção de derivados funcionalizados a partir do substrato LASSBio 581 foram conservadas em ágar batata inclinado na temperatura entre 2-4°C. Este meio sólido mostrou-se eficaz para manutenção e sobrevivência dos microrganismos através de repiques, com periodicidade de 3 meses, e formação de esporos em quantidades suficientes para inoculação em meio líquido e crescimento satisfatório.

3.1.2 Morfologia do crescimento em meio líquido

Sabendo que a morfologia dos microrganismos em meio líquido pode interferir no desempenho dos processos biotecnológicos, a formação de pellets e/ou massa amorfa e o percentual de crescimento geral foi observado para algumas das cepas testadas nos diferentes meios selecionados.

Tabela 1. Caracterização morfológica macroscópica em meio líquido PDSM e Caldo Sabouraud por 72 horas a 27°C ± 2°C a 200rpm. Tamanho dos pellets: Ausência (-), Grandes (0,5cm), Médios (0,3cm), Pequenos (0,1), Pequeníssimos (0,05cm); Produção de massa amorfa: Positivo (+), Negativo (-); Formação de halo: Ausência (-), Em toda parede (++); Em parte da parede (+).

Microrganismos	Meio líquido PDSM			Caldo Sabouraud		
	Tamanho pellets	Massa amorfa	Halo	Tamanho pellets	Massa amorfa	Halo
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	-	+	++	-	+	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	-	+	-	++++	-	-
<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	+	-	++	+	-	++
<i>Mucor griosyanus</i> ATCC 1207a	-	+	-	-	+	-
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	-	+	++	-	+	+

Tabela 2. Percentual de crescimento fúngico em meio líquido PDSM e Caldo Sabouraud.

Microrganismos	Meio líquido PDSM (%)	Caldo Sabouraud (%)
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	95	85
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	90	85
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	45	15
<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	45	55
<i>Mucor griosyanus</i> ATCC 1207a	85	75
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	95	40

Podemos observar, que em meio líquido PDSM a maioria das cepas testadas apresentou formação de massa amorfa com halo em toda parede do recipiente. Além disso, o percentual de crescimento em meio líquido PDSM mostrou-se superior ao caldo Sabouraud na grande maioria dos fungos filamentosos. *Mortierella isabelina* NRRL 1757 ao contrário das demais cepas, não formou massa amorfa, apresentou formação de *pellets* pequeníssimos e percentual de crescimento pouco inferior ao caldo Sabouraud. O aspecto morfológico para os diferentes microrganismos em caldo Sabouraud mostrou-se bastante variado e diversificado, observando-se desde a formação de *pellets* pequeníssimos a grandes, assim como a formação de massa amorfa e ausência ou presença de halo de crescimento na parede do recipiente (em parte ou em toda parede).

A forma morfológica dominante dos fungos é relevante devido a sua grande influência nas propriedades físicas dos meios de incubação. Suspensões de micélios dispersos (massa amorfa) são geralmente viscosas e comportam-se de maneira não

Newtoniana (i.e.: a proporção entre a lise por estresse e a taxa de lise não é constante). Este comportamento não Newtoniano é causado por interações entre os filamentos em suspensão, como entrelaçamento e ligações de hidrogênio aumentando a estrutura do micélio e conseqüentemente a viscosidade do meio. *Pellets* em suspensão são menos viscosos que micélios, já que geralmente comportam-se como esferas discretas e exercem pouca influência nas propriedades de fluxo (GIBBS, SEVIOUR, SCHMID, 2000).

Dependendo do objetivo das biotransformações, a formação de *pellets* ou massa amorfa pode apresentar vantagens ou desvantagens para os processos de síntese enzimática. Como mencionado por Gibbs, Seviour e Schmid (2000), a produção de metabólitos por alguns fungos é reduzida com o crescimento na forma de *pellets*. Uma possível razão para redução da produção de metabólitos, quando houver formação de *pellets*, é o estabelecimento de um gradiente de nutrientes, pois enquanto o fluido de fermentação está bem aerado e rico em nutrientes, as células do interior dos *pellets* poderão estar estressadas devido à limitação de transporte nutricional. Esta deficiência nutricional é especialmente detectada em *pellets* compactos, onde a difusão molecular não ocorre livremente e seus centros são ocos devido à autólise hifal. Informações sobre a morfologia dos *pellets* produzidos é importante para se ter uma estimativa dos rendimentos. Maiores rendimentos são esperados com a formação de *pellets* pequenos, já que oferecem uma menor barreira para difusão de O₂ e outros nutrientes em relação a *pellets* compactos (GIBBS, SEVIOUR, SCHMID, 2000).

A vantagem de se obter *pellets* é a de possuir uma maior superfície de contato externa facilitando reações de hidroxilação. No caso da produção de massa amorfa,

melhor rendimento é encontrado em modificações de compostos por reação de redução ou outras mais demoradas (SIQUEIRA, 2004).

O trabalho realizado por Freitag *et al.* demonstrou a importância da composição do meio de cultura para biossíntese de metabólitos *para*-hidroxilados (PHM) e hidroximetilados (HMM) do substrato RAC-mexiletina. Os meios testados por estes autores foram: caldo extrato de levedura (extrato de levedura, cloreto de sódio, sucrose, fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico); caldo ácido casamino (ácido casamino, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico); caldo peptona (peptona, cloreto de sódio, sucrose, fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico); caldo de soja tripticase (hidrolisado de caseína, hidrolisado de soja, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico e dextrose); caldo Sabouraud dextrose (neopeptona e dextrose); caldo extrato de malte (extrato de malte, fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico); caldo Czapek dox (sucrose, nitrato de sódio, fosfato de potássio dibásico, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e cloreto de ferro). Foi demonstrado por este estudo que a composição do meio utilizado tinha um efeito dramático no metabolismo, de modo que o caldo extrato de levedura foi o que mostrou a biossíntese máxima dos metabólitos *para*-hidroxilados e hidroximetilados, com formação 21% maior para HMM e 25% maior para PHM quando comparado com caldo Czapek dox. Caldo de soja tripticase, demonstrou produção estereosseletiva de PHM e HMM quando comparada à tampão fosfato, demonstrando que o suporte nutricional é essencial para o aumento da biossíntese de metabólitos (FREITAG *et al.*, 1997).

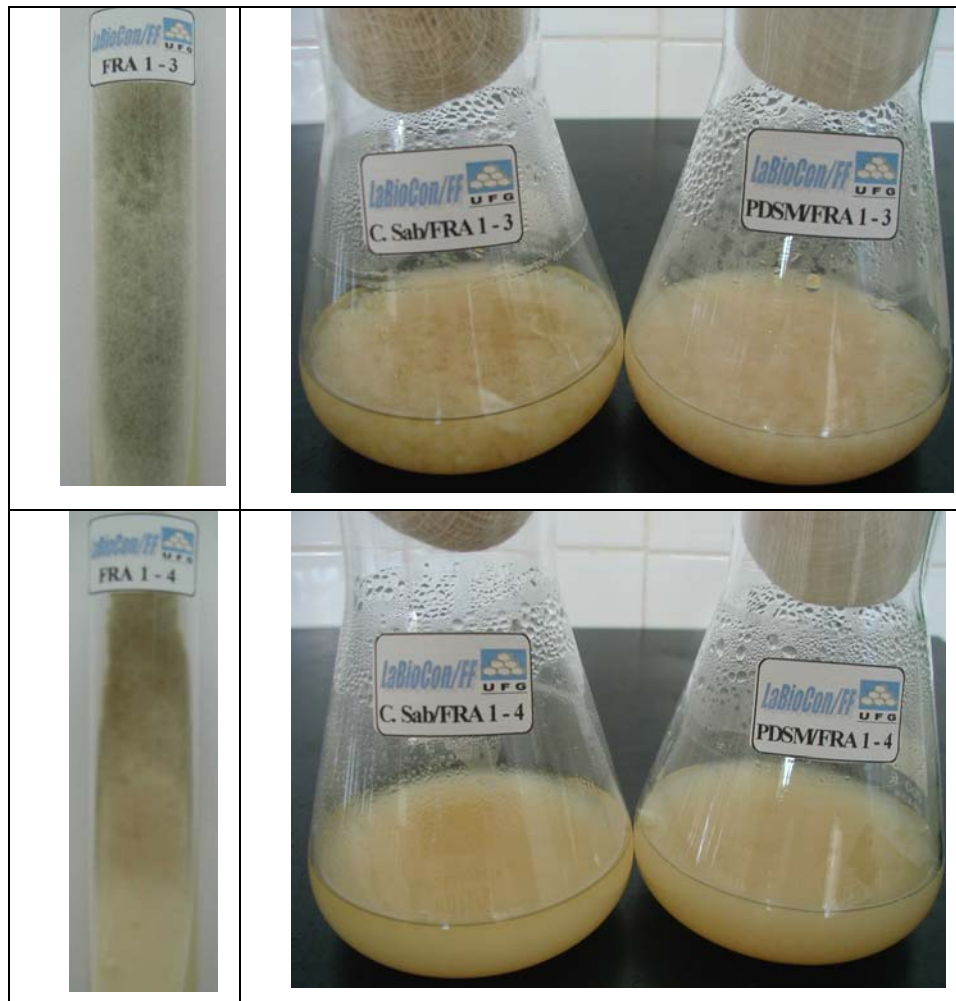


Figura 28. Aspectos morfológicos dos fungos filamentosos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (superior) e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 (inferior) em ágar batata e nos meios líquidos caldo Sabouraud e PDSM.

3.1.3 Intensidade de agitação e aeração

A agitação empregada nos ensaios de *screening* e escala semi-preparativa foi de 200 rpm.

Embora nem todos os microrganismos se comportem de uma mesma maneira, estudos relatam que o aumento da intensidade de agitação pode ocasionar diminuição do comprimento hifal e aumento da frequência de ramificações. O aumento da

freqüência de ramificações poderia tornar o meio mais viscoso, assim como as interações entre as hifas poderiam aumentar. Diferentemente, a redução no comprimento hifal, como fato isolado, resultaria em diminuição da viscosidade aparente (GIBBS, SEVIOUR, SCHMID, 2000).

Com relação à concentração de O_2 dissolvida no meio reacional durante os processos de bioconversão, pouca influência é observada na morfologia das hifas. Contudo, alterações nas taxas de O_2 podem influenciar drasticamente nos rendimentos dos metabólitos produzidos. Com relação aos *pellets*, análises inovadoras com micro eletrodos de oxigênio mostraram que a estratificação dos *pellets* grandes (camada externa com crescimento hifal ativo, duas camadas de células progressivamente menos ativas e um centro oco) foi causada pela queda na concentração de O_2 abaixo dos níveis críticos (GIBBS, SEVIOUR, SCHMID, 2000).

A produção de CO_2 em grandes quantidades é comum em algumas fermentações aeróbias como consequência da atividade respiratória das células fúngicas, de modo que a presença de CO_2 influencia na morfologia de diversos fungos filamentosos aumentando a freqüência das ramificações. Estudos descritos por Gibbs, Seviour e Schmid (2000), mostraram que CO_2 dissolvido no meio reacional estimula a síntese de quitina da parede da célula subapical, sendo este um fator associado ao aumento das ramificações e a maleabilidade das paredes das células fúngicas. Foi sugerido (embora sem nenhum suporte experimental), que o efeito morfológico da presença de CO_2 está associado com outros fatores tais como a limitação de nutrientes.

3.1.4 pH

Nos ensaios realizados em escala laboratorial ou semi-analítica, este parâmetro permanece constante com eventualmente pequenas variações, mas sua observação torna-se importante no momento de transpor para o bioreator, pois em maior volume a quantidade de metabólitos fúngicos secundários pode diminuir ou aumentar o pH.

Diferentes valores de pH de crescimento podem ser observados durante a incubação e estar relacionados ao transporte de nutrientes, a solubilização dos nutrientes, às reações enzimáticas e/ou a fenômenos de superfície. A composição do meio pode afetar o pH inicial e a velocidade de variação deste valor durante o crescimento dos fungos. Meios fracamente tamponados contendo sais de amônio provavelmente se tornarão mais ácidos durante o crescimento, enquanto meios contendo nitratos se tornarão mais alcalinos. Altas concentrações de íons, tais como fosfatos são requeridos para se alcançar pH estáveis, sobretudo quando se deseja medir a atividade biológica como crescimento e atividade enzimática (PAPAGIANNI, 2004).

Tabela 3.1. Exemplos de diferentes valores de pH empregados na literatura em bioconversões

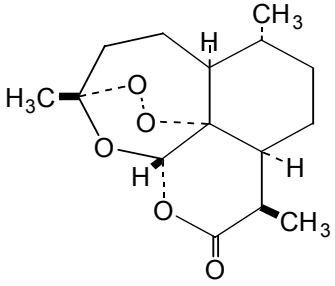
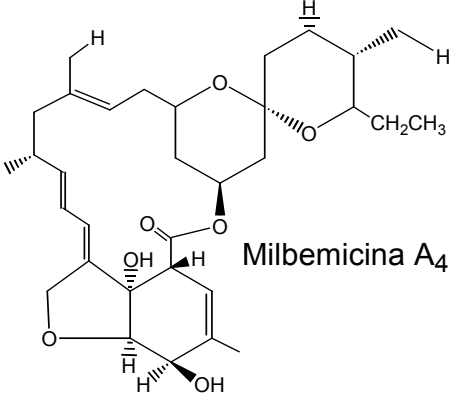
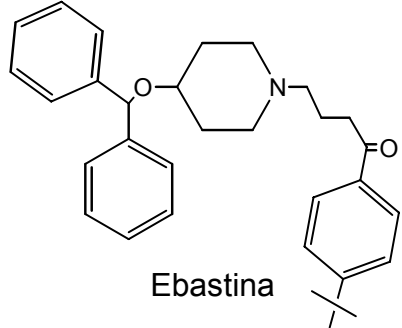
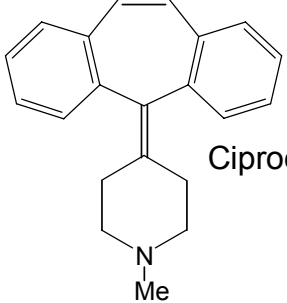
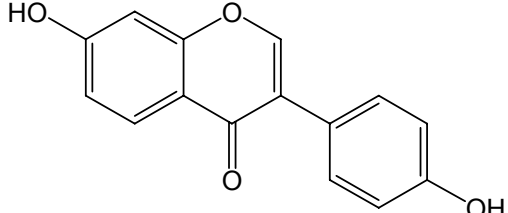
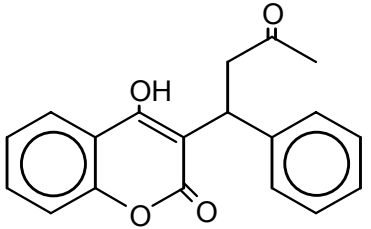
Substrato	Microrganismo	pH	Meio de cultura
 <p>Artemisinina</p>	<p><i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245</p>	<p>6,5</p>	<p>Sabouraud dextrose, sucrose, peptona, água deionizada (PARSHIKOV <i>et al.</i>, 2004)</p>
 <p>Milbemicina A₄</p>	<p><i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244</p>	<p>6,3≈ 6,5</p>	<p>Glicose, polipetona, extrato de levedura, extrato de malte (NAKAGAWA, MIYAKOSHI, TORIKATA, 1991)</p>
 <p>Ebastina</p>	<p><i>Cunninghamella blakesleeana</i></p>	<p>5,0</p>	<p>Peptona, soja, extrato de levedura, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, glicose (SCHWARTZ <i>et al.</i>, 1996)</p>

Tabela 3.2. Exemplos de diferentes valores de pH empregados na literatura em bioconversões

Substrato	Microrganismo	pH	Meio de cultura
 <p>Ciproceptadina</p>	<p><i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9245 e ATCC 36112</p>	5,6	<p>Caldo Sabouraud dextrose (ZHANG DONGLU <i>et al.</i>, 1997)</p>
 <p>Daidzeina</p>	<p><i>Aspergillus niger</i></p>	7,2	<p>Sacarose, glicose, polipetona, sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de potássio, fosfato de potássio dibásico, FeSO₄ heptahidratado (MAATOOQ, ROSAZZA, 2005)</p>
 <p>Varfarina</p>	<p><i>Cunninghamella elegans</i></p>	7,0	<p>Dextrose, farinha de soja, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, extrato de levedura, água destilada (WONG, DAVIS, 1989)</p>

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

Embora a importância da influência do pH seja pouco discutida na literatura, existem estudos que demonstrem ser este um parâmetro importante para o processo de bioconversão, pois afeta a morfologia fúngica. Segundo Gibbs, Seviour, Schmid (2000), trabalhos de Read e Seviour (1984) com *Acremonium diospyri* mostrou sensibilidade desta cepa à mudanças de pH, variando sua morfologia de fragmentos esporulados miceliais pequenos e grossos em pH 3,0 para grupos miceliais ramificados em pH 6,0. Neste mesmo estudo, ainda observou-se modificação adicional na morfologia, para filamentos não ramificados longos e finos em pH 9,0 (GIBBS, SEVIOUR, SCHMID, 2000). Mudanças na morfologia fúngica, também foram observada no trabalho de Freitag *et al.* (1997) com RAC-mexiletina, onde o aumento do pH de 5,5 para 8,0 mudava a morfologia hifal de *pellets* pequenos, densos e individuais em pH 5,5 para micélios difusos em pH 8,0.

3.1.5 Temperatura

As temperaturas empregadas durante a execução dos ensaios realizados variaram de 27 a 30°C.

Variações na temperatura de incubação podem provocar mudanças simultâneas em variáveis como: taxa de crescimento, pH e oxigênio dissolvido. Um aumento na temperatura de incubação dentro da faixa fisiológica aumenta a taxa de crescimento, diferentemente da tensão do oxigênio dissolvido que varia de maneira inversa ao aumento da temperatura. Segundo Braun *et al.* (1991) e Schügerl *et al.* (1998), estudos realizados em incubadoras com velocidade de rotação constante revelaram variação no volume celular e nas formas morfológicas fúngicas quando a temperatura foi variada entre 25 e 35°C. Células maiores foram obtidas em 25°C, onde somente *pellets* foram observados. Com variação da temperatura para 30°C, os *pellets* inicialmente formados foram decompostos com formação de massa amorfa (depois de 50 horas de incubação) e em 35°C observou-se principalmente massa amorfa com poucos *pellets* e agregados. Estes autores sugerem que em altas temperaturas o suplemento de oxigênio às células torna-se inadequado, com formação de massa amorfa em 30°C e de agregados em 35°C devido ao alto estresse (PAPAGIANNI, 2004).

3.1.6 Solventes

Para adição do substrato LASSBio 581 foi utilizado mistura de etanol/dimetilformamida 1:1 ou somente dimetilformamida.

Etanol foi inicialmente o solvente de escolha na tentativa de solubilizar o substrato LASSBio 581, tendo sua utilização já demonstrada em diversos trabalhos

como na biotransformação de flavonas (IBRAHIM *et al.*, 1997) e do irbesartan (ALEXANDRE *et al.*, 2004). Como LASSBio 581 não foi totalmente solúvel em etanol (temperatura ambiente), testes de solubilidade foram realizados. Dimetilformamida mostrou-se solvente adequado para solubilização do substrato. A utilização de dimetilformamida como solvente em biotransformação já havia sido descrita por Smith *et al.* (1974) para solubilização de acetanilida, anilina, benzeno, clorobenzeno entre outros; para solubilização do agente antiprotozoário CGP-291 por Jürgens e Clark (1990); por Ibrahim (2000) para naringenina; e para solubilização de mirtazapina por Moody *et al.* (2002). Ensaio em escala semi preparativa com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 foram realizados solubilizando o LASSBio 581 em dimetilformamida, onde o substrato foi incorporado em meio líquido PDSM e vários produtos foram formados. Mesmo diante da total solubilização em dimetilformamida, optou-se em ensaios iniciais e em um último ensaio em escala semi preparativa (meio líquido PDSM), solubilizar o LASSBio 581 em mistura de dimetilformamida e etanol 1:1. Tanto com a solubilização em dimetilformamida ou na mistura de dimetilformamida/etanol 1:1 as cepas selecionadas mostraram-se eficazes na biotransformação do substrato ensaiado com a formação de diversos produtos funcionalizados.

3.2 Síntese do LASSBio 581

Para obtenção do substrato a ser ensaiado, foi realizado a síntese do composto LASSBio 581. O método escolhido foi determinado segundo o trabalho desenvolvido por Menegatti (2001).

Na primeira etapa da síntese, procederam-se reações de diazotação e substituição nucleofílica aromática. A reação entre 4-cloro-anilina e nitrito de sódio em meio ácido permitiu a formação do intermediário de síntese 4-cloro-azidobenzeno (óleo castanho escuro) conforme esquematizado na Figura 29.

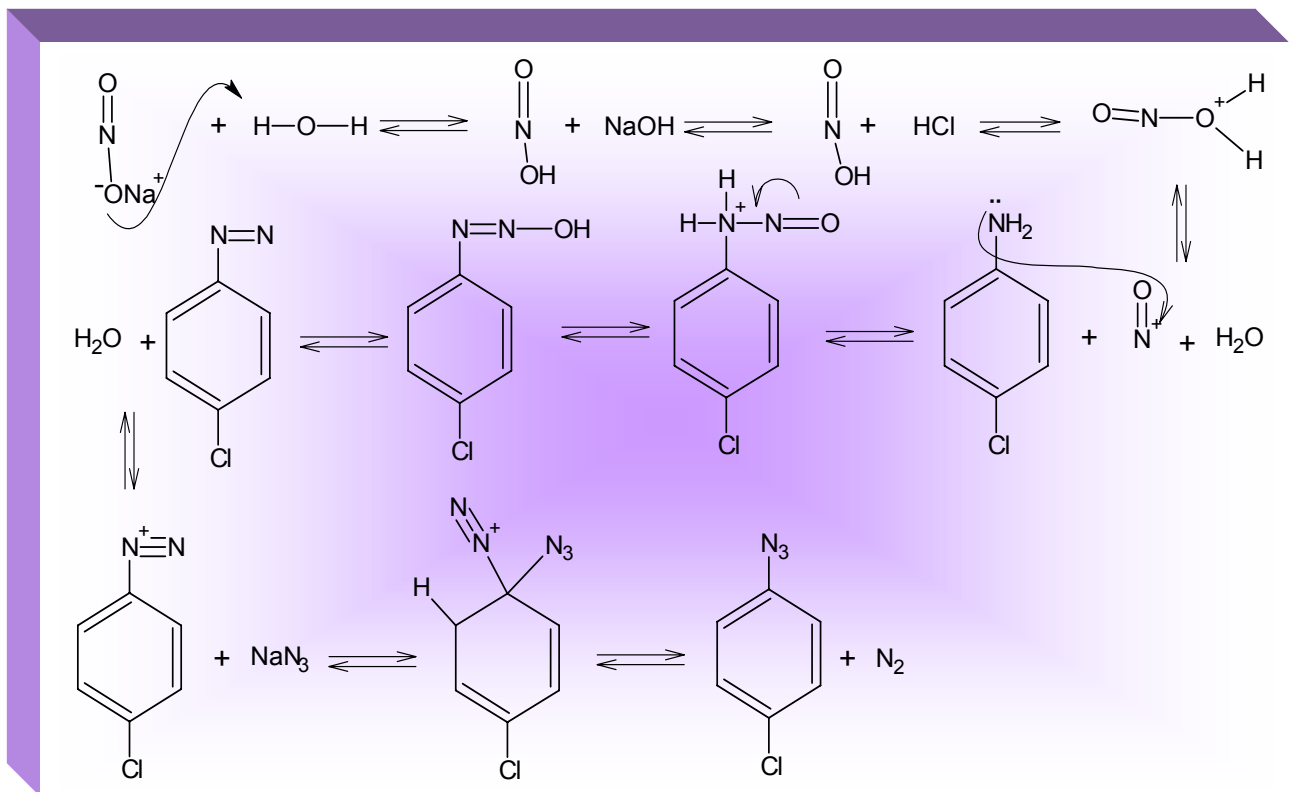


Figura 29. Rota sintética para formação do primeiro intermediário de síntese 4-cloro-azidobenzeno

A formação do segundo intermediário sintético, 1-[1-(4-clorofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilmetil]-4-fenilexaidropiperazina (cristais amarelos) procedeu-se pela reação inicial entre 4-cloro-anilina, álcool propargílico e tolueno com formação de mistura isomérica de 1-benzil-4-fenilexaidropiperazina (óleo escuro), e reação secundária da mistura obtida com dióxido de manganês e diclorometano (Figura 30).

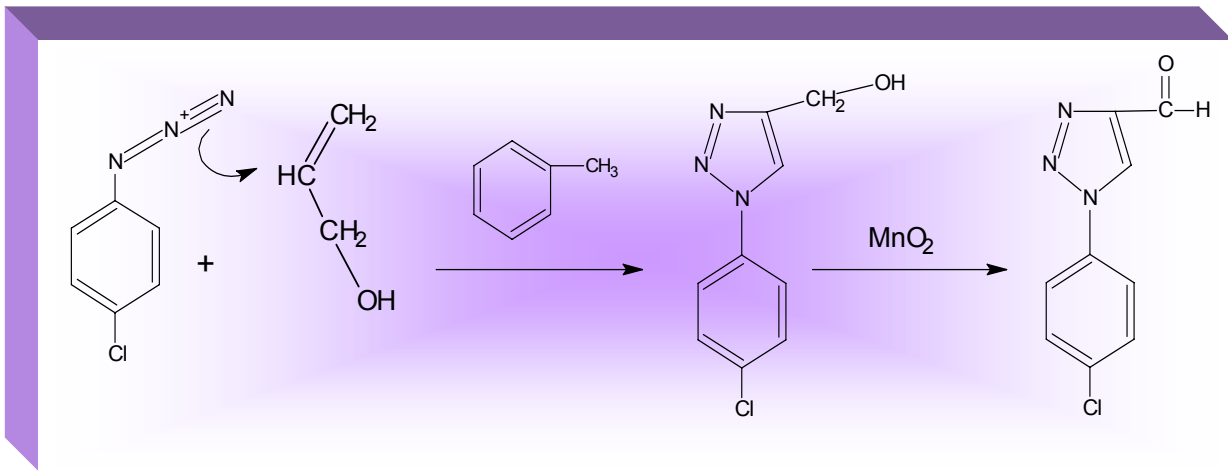


Figura 30. Esquema de síntese da formação do intermediário 1-[1-(4-clorofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilmetil]-4-fenilexaidropiperazina

O produto 1-[1-(4-clorofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilmetil]-4-fenilexaidropiperazina foi finalmente reagido com *N*-fenilpiperazina em metanol e Pd/C 10% para obtenção do derivado 1-[1-(4-clorofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilmetil]-4-fenilexaidropiperazina (Figura 31) na forma de cristais brancos.

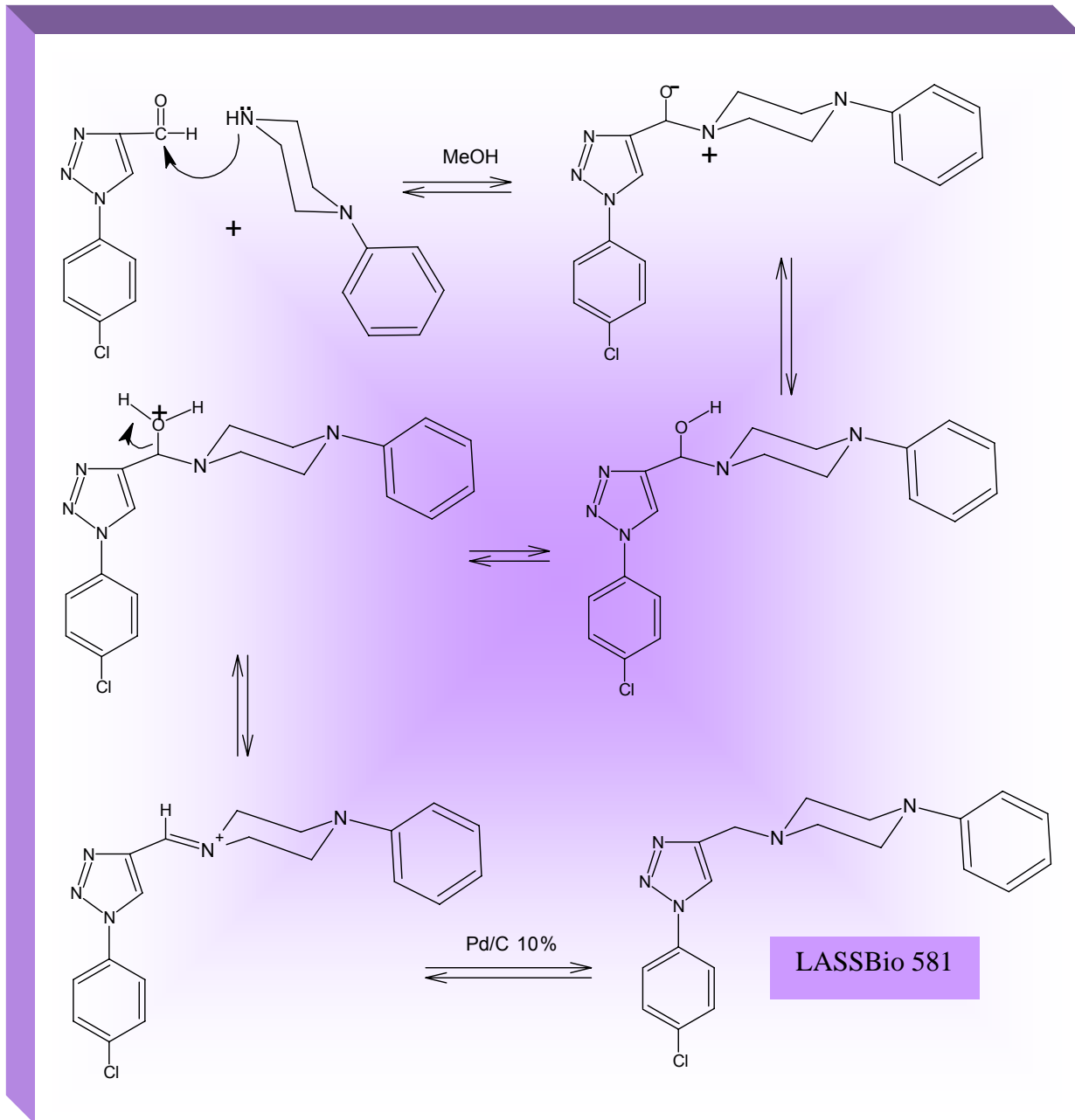


Figura 31. Etapa final da síntese do derivado *N*-fenilpiperazínico LASSBio 581

O substrato assim obtido foi submetido a metabolização por vários microrganismos.

Na análise por espectrometria de massas do LASSBio 581, pode-se observar pico em 354,3 referente a massa do substrato e pico em 320,4 ($M - 35,5$) indicando a perda do átomo de Cl presente no anel a do substrato LASSBio 581 (Figura 32).

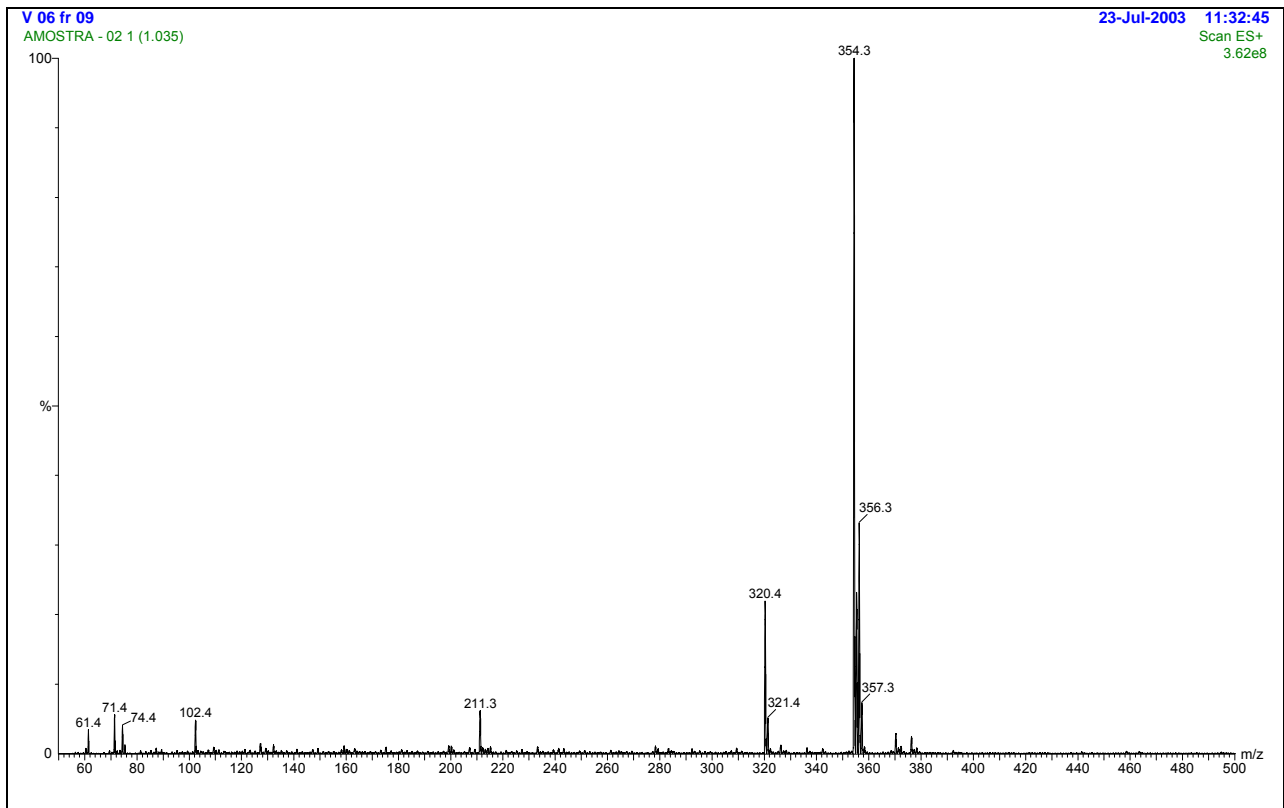


Figura 32. Espectro de massa do substrato LASSBio 581 obtido num espectrômetro de massas Quattro LC-Micromass

3.3 Métodos cromatográficos

Os métodos de cromatografia em camada delgada, *flash* cromatografia e cromatografia líquida de alta eficiência foram aplicados para acompanhamento das reações de bioconversão, separação e purificação dos derivados formados. Seu desenvolvimento e padronização auxiliaram a otimização destes métodos analíticos e do processo de biotransformação.

3.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para obtenção das melhores condições de separação e acompanhamento dos processos de purificação, quatro fases móveis foram ensaiadas: acetato de etila; acetato de etila/metanol 70:30; acetato de etila/metanol 90:10; e acetato de etila/metanol 95:05.

Acetato de etila, como fase móvel, proporcionou boa separação dos diferentes produtos formados, contudo aqueles com Rfs inferiores ao do LASSBio 581 quando separados nestas condições apresentaram valores muito próximos da linha de base. Esta fase móvel apresentava como vantagem em relação às outras, a boa separação entre os compostos eluídos antes e após o substrato LASSBio 581. Para aumentar os valores de Rfs dos derivados eluídos após LASSBio 581, adicionou-se metanol ao acetato de etila em três diferentes proporções.

Apesar da fase móvel acetato de etila/metanol 70:30 promover um aumento nos valores de Rfs dos compostos formados, não foi capaz de executar boa separação, sendo necessário diminuição da quantidade de metanol para preparação de nova fase móvel. Ao diminuir a quantidade de metanol de 30 para 10 (acetato de etila/metanol 90:10) observou-se boa separação e aumento nos valores de Rfs dos produtos eluídos após LASSBio 581. Na tentativa de aprimorar o processo de separação, diminuição adicional da quantidade de metanol de 10 para 5 foi realizada. A fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 por proporcionar melhor separação em relação ao acetato de etila/metanol 90:10 e maiores valores de Rfs para os produtos localizados inferiormente ao substrato LASSBio 581, em relação ao acetato de etila, foi a fase móvel de escolha.

3.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Inicialmente, para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se como fase móvel metanol/tampão 65:35 em sistema isocrático, comprimento de onda de 248nm, detector luz UV e coluna cromatográfica fase reversa segundo descrito por Tasso *et al.*, 2003. A fase estacionária utilizada foi uma coluna Lichrospher 100 RP 18, variando-se a fase móvel para que os produtos formados, mais polares que o LASSBio 581, fossem eluídos mais rapidamente com menor tempo de retenção em relação ao substrato ensaiado. Tempo de corrida de trinta minutos, mostrou-se adequado para detecção e identificação dos derivados produzidos.

Embora a análise cromatográfica em fase reversa em sistema isocrático (condições descritas acima) tenha se mostrado um bom método para identificação e caracterização dos diferentes produtos formados, compostos iniciais com tempos de retenção de até 3,0 minutos apresentaram dificuldades de separação, como observado pela análise cuidadosa dos cromatogramas das alíquotas retiradas do meio reacional em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas, ou ainda 120, 144, 168 e 190 horas). Na busca de um método cromatográfico que proporcionasse boa separação dos derivados com tempo de retenção até 3,0 minutos, assim como dos demais compostos e do substrato LASSBio 581, seis novos métodos com manutenção da fase estacionária, comprimento de onda e detector foram criados, variando as quantidades das fases móveis metanol e metanol/tampão 65:35 durante o tempo de corrida (25 ou 35 minutos) e o fluxo (mL/min).

Inicialmente testou-se metanol e metanol/tampão 65:35 em sistema gradiente, máximo de metanol em 4 minutos com diminuição para zero em 6 minutos e

manutenção de metanol/tampão 65:35 100% de 6 minutos até final da corrida, com fluxo de 0,8 mL/min até 10 minutos e 1 mL/min de 10 minutos em diante. Como esta fase móvel não foi eficiente para separar os produtos iniciais (tempo de retenção até 3,0), alterou-se o fluxo a partir dos 10 minutos para 1,5 mL/min. A alteração do fluxo para 1,5 mL/min ainda não foi uma modificação eficiente, sendo necessário modificação adicional do método. Novo sistema foi construído, alterando o fluxo inicial de 0,8 mL/min para 0,5 mL/min até os três primeiros minutos da corrida e a partir daí mantendo em 1,5 mL/min. Como a modificação do fluxo não foi um fator suficiente para promover separação eficaz dos compostos iniciais (tempo de retenção até 3,0), novos métodos foram criados alterando as quantidades das diferentes fases móveis durante o tempo de corrida. As condições de corrida passaram então para máximo de metanol em 2 minutos com diminuição para zero em 4 minutos e manutenção de metanol/tampão 65:35 de 4 minutos até o final da corrida, e fluxo fixo de 1 mL/min. Com fluxo de 1 mL/min detectou-se boa separação dos produtos iniciais (tempo de retenção até 3,0 minutos), contudo, ao final de 25 minutos não foram observados todos os compostos formados devido à alta velocidade de eluição e pouco tempo de corrida. O tempo de corrida foi então aumentado para 35 minutos. Para otimização destes dois últimos métodos e diminuição do tempo de corrida, o fluxo foi alterado para 0,8 mL/min resultando em diminuição do tempo de corrida para 25 minutos e boa separação de todos os derivados formados. Este foi o método de escolha para análise das várias amostras coletadas a partir da incubação do LASSBio 581 com dez diferentes cepas de fungos filamentosos em ensaio de *screening*, ou das duas cepas selecionadas para ensaio em escala semi preparativa, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas ou ainda em 120, 144, 168 e 190 horas.

3.4 Estudo do metabolismo microbiano do novo derivado heterocíclico *N*-fenilpiperazínico LASSBio 581

3.4.1 Bioconversão do LASSBio 581

Uma triagem com uma dezena de microrganismos (fungos filamentosos), aplicando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para detectar e quantificar a formação de derivados, foi realizada. Cerca de trinta diferentes produtos foram formados, segundo a cepa utilizada, de modo que uma das atividades metabólicas encontradas para a maioria das cepas levou a formação de produtos hidroxilados e glicosilados.

Os diversos compostos formados pelas diferentes cepas foram nomeados e estão representados na Tabela 5.

Dentre as cepas testadas, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 foram selecionadas para ensaio em escala semi-preparava, visando obtenção de maior quantidade de alguns dos derivados formados.

Tabela 4. Bioconversão do LASSBio 581 por várias cepas de fungos filamentosos (triagem), tempo de 24-96horas

Microrganismos	Derivados																														
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XA	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII	XXVIII	XXIX	XXX
<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 10148b	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 22617	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>Mucor griosyanus</i> ATCC 1207a	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-

Bioconversão do LASSBio 581 por dez cepas de fungos filamentosos (screening), 24-96 horas, análise HPLC: Lichrospher 100- RP-18 e detecção 248nm, Metanol/Tampão 65:35). – ausência; + até 15%; ++ 15 a 30%; +++ 30 a 45%; ++++ > 50%

Cunninghamella echinulata ATCC 9244 foi selecionada devido a sua capacidade já descrita na literatura de promover hidroxilação e por produzir quase que exclusivamente o metabólito XXVII (nos ensaios prévios de *screening*) comparado aos demais produtos, em determinado tempo reacional (exceção do metabólito IV que está presente na grande maioria das cepas e em grande quantidade, e do metabólito VI que tem tempo de retenção 2,17 minutos).

Mesmo não observando descrição na literatura da capacidade do fungo filamentoso *Mortierella isabelina* NRRL 1757 de formar derivados glicosilados, este microrganismo foi escolhido devido a grande variedade de produtos formados em relação às demais cepas nas condições de análise determinadas.

3.4.2 Monitoramento da bioconversão do LASSBio 581

No processo de triagem para seleção dos microrganismos capazes de produzir maiores quantidades de determinados derivados e para determinação do tempo final de incubação para cada uma das cepas, foram retiradas alíquotas do meio reacional a cada 24 horas após adição do substrato LASSBio 581. A diminuição de LASSBio 581 e o aumento da quantidade dos diferentes produtos gerados foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa (solventes metanol e metanol/tampão 95:05 em sistema isocrático ou gradiente, 248 nm, segundo descrito em 5.1.1.). Os gráficos das cinéticas de biotransformação determinados por CLAE foram construídos considerando a quantidade inicial (quantidade de LASSBio 581 adicionada ao meio de cultura inoculado com esporos das cepas características) do substrato como ponto de partida (tempo 0). Assim, os derivados, pelas análises de suas

diferentes percentagens de área do pico foram quantificados. Embora as cinéticas de biotransformação sejam semi-quantitativas (dependentes do valor teórico inicial de 50mg/mL do LASSBio 581), mostraram-se eficazes para o acompanhamento das reações de bioconversão, assim como para determinação do tempo final de incubação e do número de derivados formados.

O derivado IV, formado por todas as cepas (tempo de retenção de aproximadamente 2,15) apresenta-se sempre em maior quantidade (quantidade aproximada) aos demais por estar em sobreposição ao pico de determinado componente do meio de cultura, apresentando dificuldade de separação e purificação.

3.4.2.1 *Absídía blakeslceana* ATCC 10148b

Nove produtos foram formados pela incubação do LASSBio 581 com *Absídía blakeslceana* ATCC 10148b (meio líquido PDSM, agitação de 200 rpm, temperatura de 27°C). Nas primeiras 24 horas após a adição do substrato, observou-se total consumo de LASSBio 581 com predominância do derivado IV em 24, 48 e 72 horas. Em 96 horas, o produto formado em maior quantidade foi o composto VII, demonstrando ser o de maior interesse, já que das dez cepas ensaiadas a *Absídía blakeslceana* ATCC 10148b é a principal envolvida na produção deste derivado. No tempo de 72 horas destaca-se ainda o aparecimento do composto XVII, produzido em maior quantidade por este fungo filamentoso em relação aos demais produtores (Tabela 8).

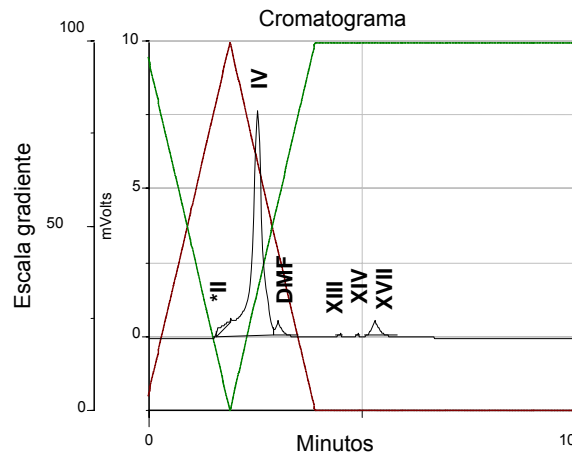


Figura 33. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Absidia blakesleana* ATCC 10148b no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

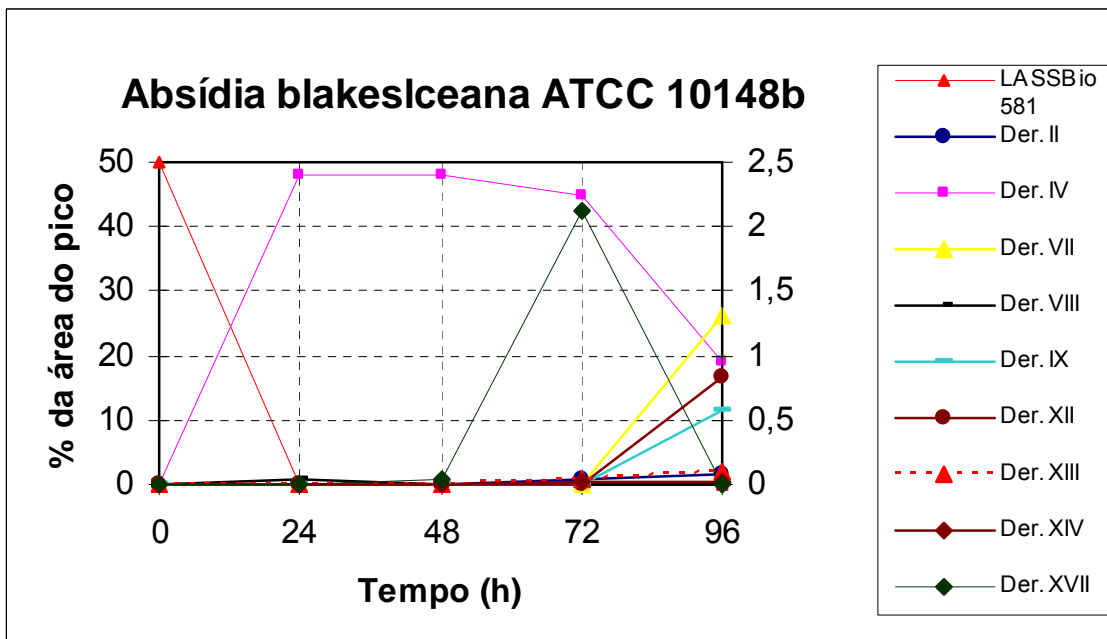


Figura 34. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Absidia blakesleana* ATCC 10148b correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e do derivado IV; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados II, VII, VIII, IX, XII, XIII, XIV e XVII) com o tempo de incubação em horas.

3.4.2.2 *Absidia blakesleana* ATCC 22617

Foram detectados cinco produtos pela biotransformação do LASSBio 581 com *Absidia blakesleana* ATCC 22617 (meio líquido PDSM, agitação de 200rpm, temperatura de 27°C). O derivado formado em maior quantidade foi o IV, e o substrato foi totalmente consumido no tempo de 72 horas. O composto XXX que apresenta tempo de retenção superior ao do substrato ensaiado foi formado exclusivamente em 48 horas.

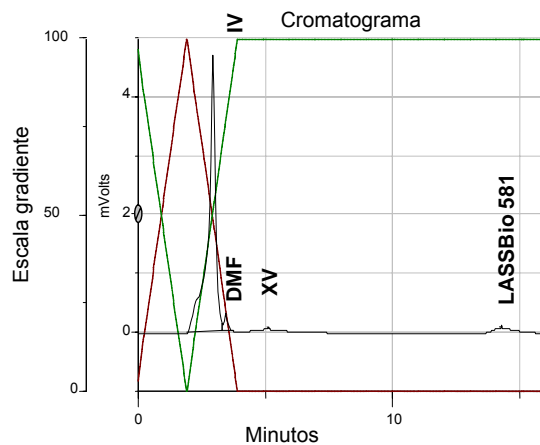


Figura 35. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Absidia blakesleana* ATCC 22617 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

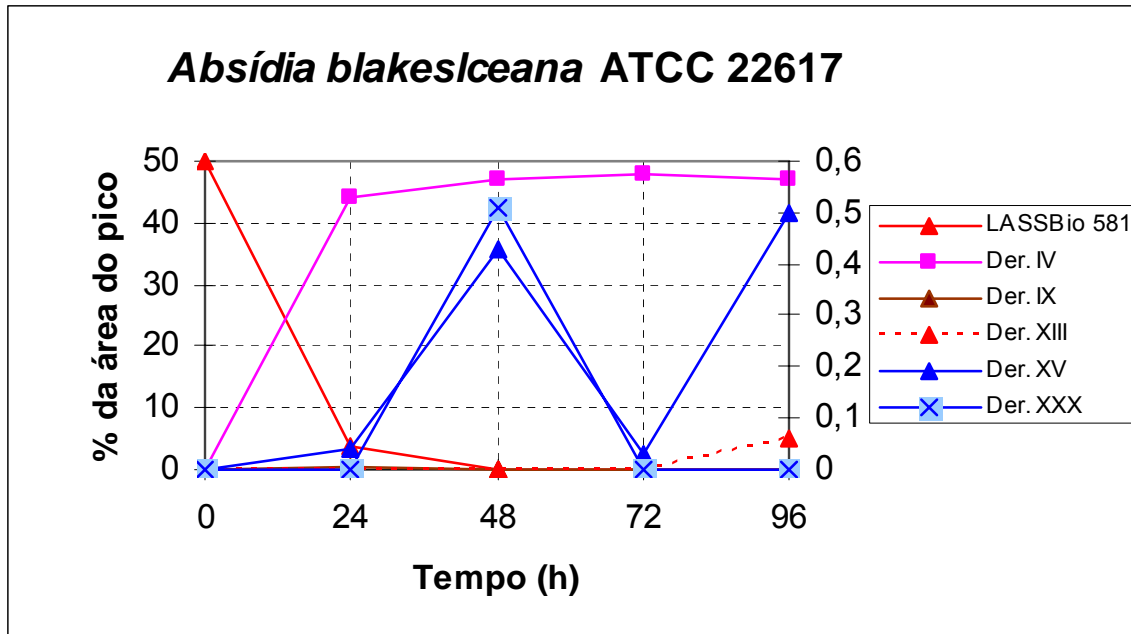


Figura 36. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Absidia blakesleana* ATCC 22617 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e do derivado IV; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados IX, XIII, XV e XXX) com o tempo de incubação em horas.

3.4.2.3 *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009

A incubação do LASSBio 581 com *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009, levou a obtenção de onze derivados (meio líquido PDSM, agitação de 200rpm, temperatura de 27°C). O substrato foi totalmente consumido nas primeiras 24 horas de reação, e o composto formado em maior quantidade foi o IV. O produto III formado no tempo de 48 horas foi o de maior interesse, já que é produzido exclusivamente por esta cepa.

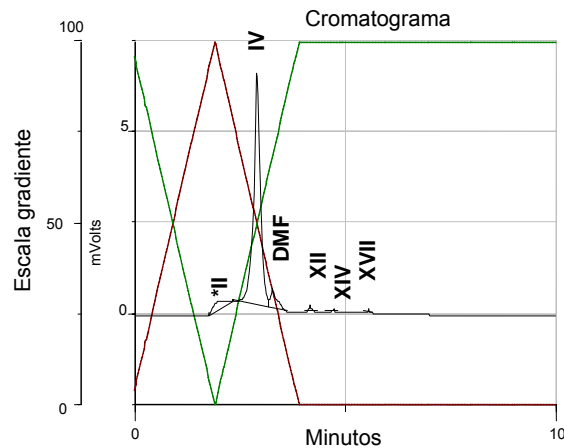


Figura 37. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

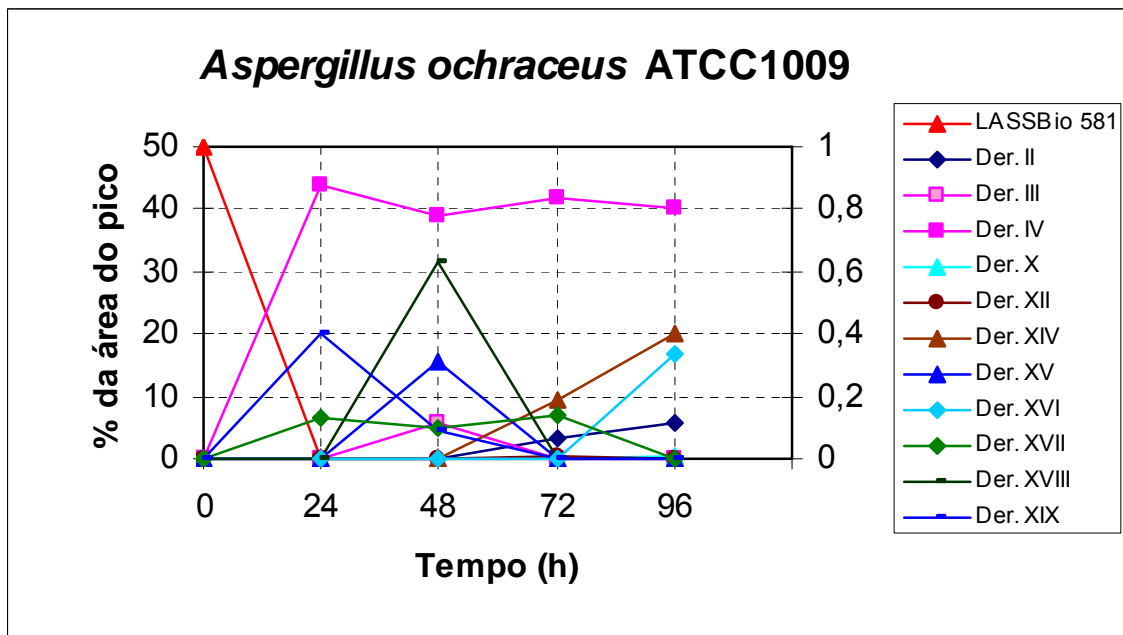


Figura 38. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e do derivado IV; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados II, III, X, XII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII e XIX) com o tempo de incubação em horas.

3.4.2.4 *Beauveria bassiana* ATCC 7159

O fungo filamentososo *Beauveria bassiana* ATCC 7159 em incubação com LASSBio 581 determinou a formação de sete derivados (meio líquido PDSM, agitação de 200rpm, temperatura de 27°C). O composto IV, ao contrário das demais cepas estudadas, só apresentou quantidade significativamente maior no tempo de 96 horas, tendo nos tempos anteriores formação praticamente constante. O produto V formado nos tempos de 48 e 72 horas, foi produzido exclusivamente por este microrganismo, sendo o de principal interesse para estudo deste fungo filamentososo.

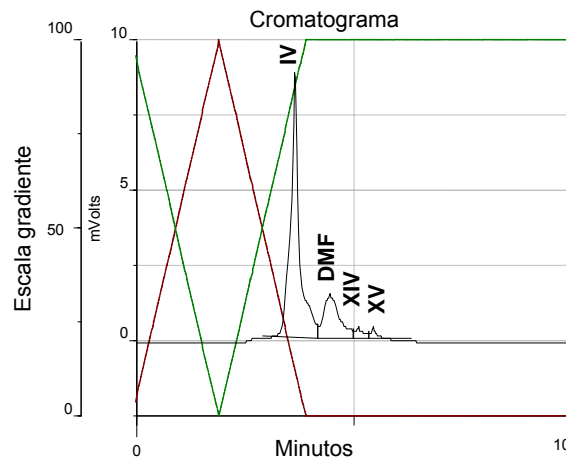


Figura 39. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

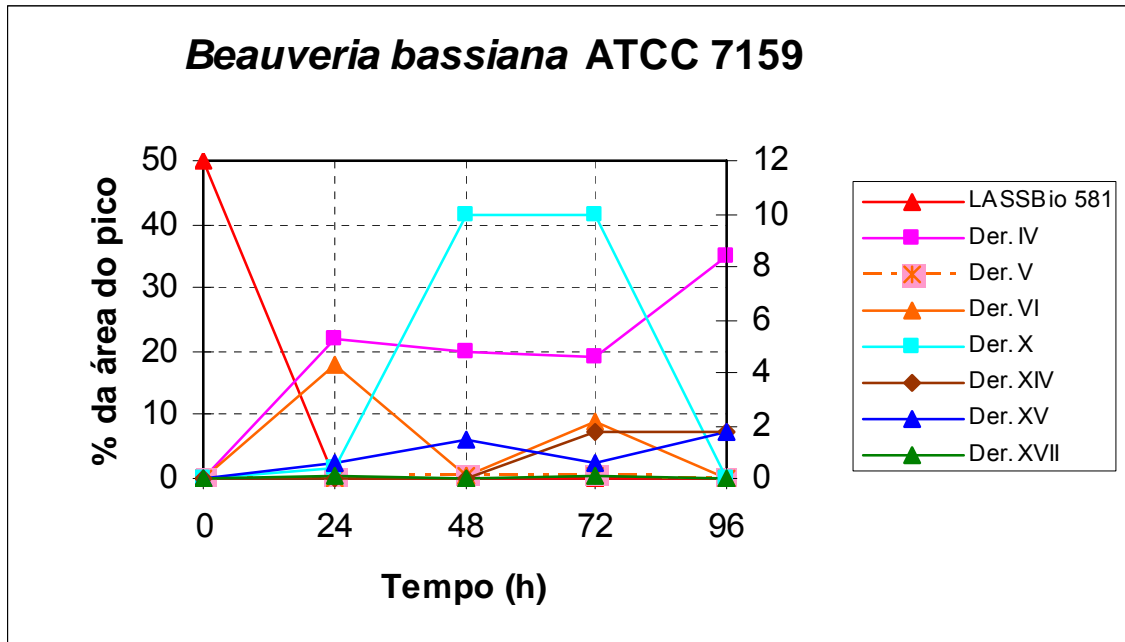


Figura 40. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e dos derivados IV e VI; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados V, X, XIV, XV, XVII) com o tempo de incubação em horas.

3.4.2.5 *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245

A incubação de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 com LASSBio 581 (meio líquido PDSM, agitação de 200rpm, temperatura de 27°C) levou a formação de nove derivados e consumo total do substrato no período de 96 horas. O produto formado em maior quantidade foi o IV, durante todo o tempo de incubação, contudo não é o de maior interesse já que é formado em grande quantidade por todas as cepas ensaiadas, sendo de difícil separação e purificação. O composto XA é formado exclusivamente por esta cepa e em grande quantidade, no tempo de 48 horas, em relação aos demais produtos formados por este fungo filamentosos.

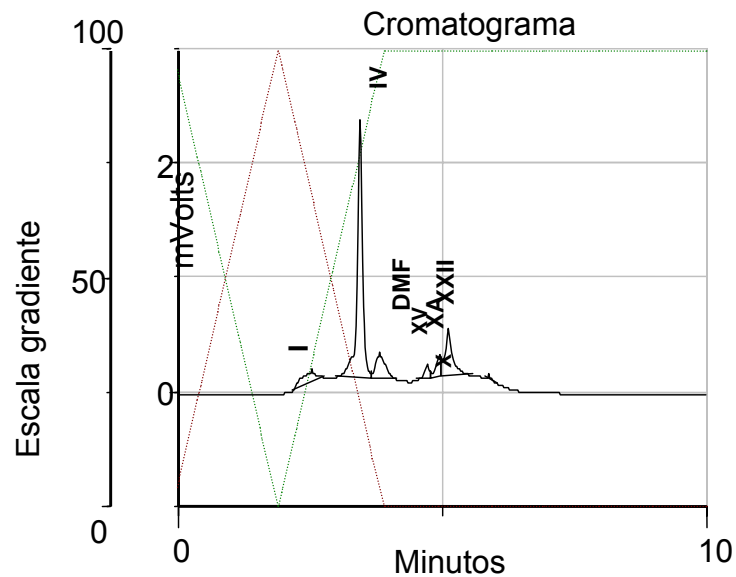


Figura 41. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

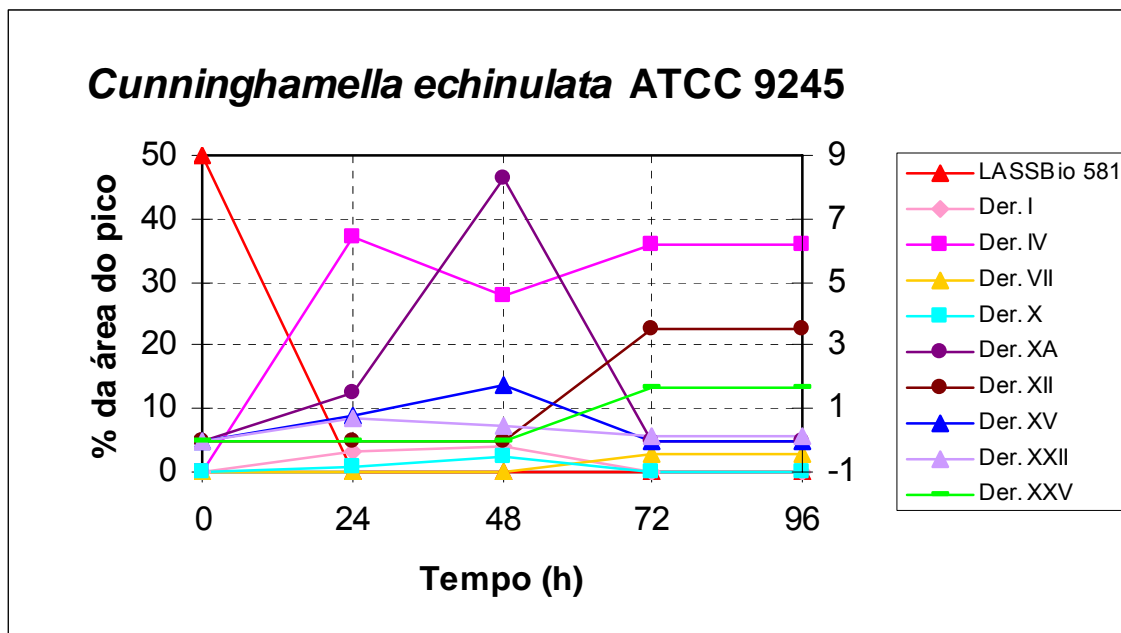


Figura 42. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e do derivado IV; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados I, VII, X, XA, XII, XV, XXII, XXV) com o tempo de incubação em horas.

3.4.2.6 *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244

A biotransformação do substrato LASSBio 581 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (meio líquido PDSM, agitação de 200rpm, temperatura de 27°C), levou a formação de nove derivados. No tempo de 96 horas pode-se observar metabolização total do substrato ensaiado, assim como nos tempos de 168 e 190 horas. O composto formado em maior quantidade foi o IV, durante todo tempo da reação, contudo não foi o de maior interesse por ser formado por todas as cepas em grande quantidade (sobreposição com pico de algum componente do meio de cultura). Altas quantidades, também foram observados para o composto VI nos tempos de 24 e 48 horas. O produto XXVII, embora também tenha sido produzido por *Mortierella isabelina* NRRL 1757, mostrou-se o de maior interesse já que no tempo de 48 horas apresenta-se em maior quantidade em relação aos demais (com exceção do derivado IV e VI).

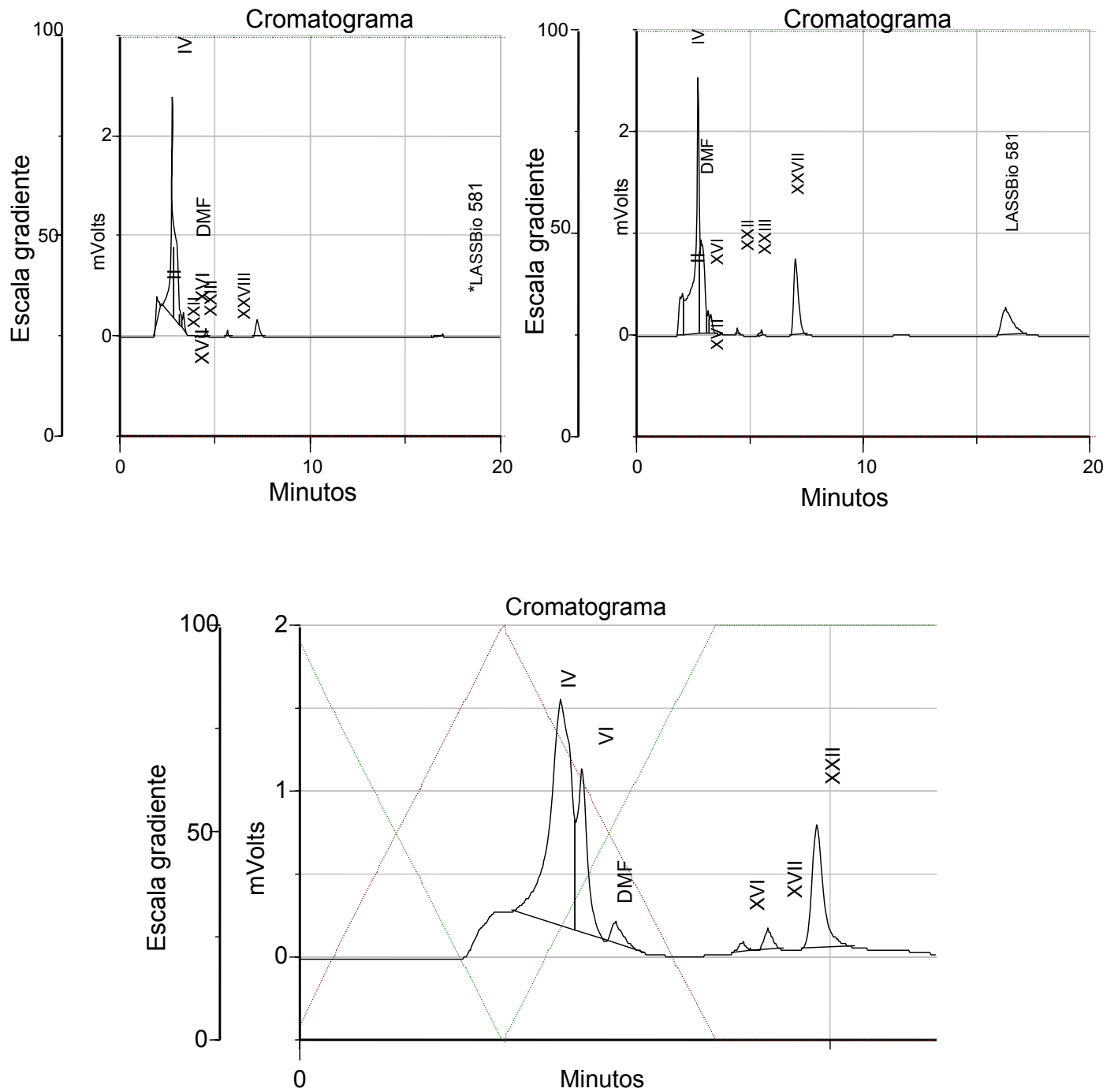


Figura 43. Perfis cromatográficos do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 nos tempos de 24 e 48 em sistema isocrático (cromatogramas superiores) e 24 horas em sistema gradiente (cromatograma inferior), e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; ----- metanol).

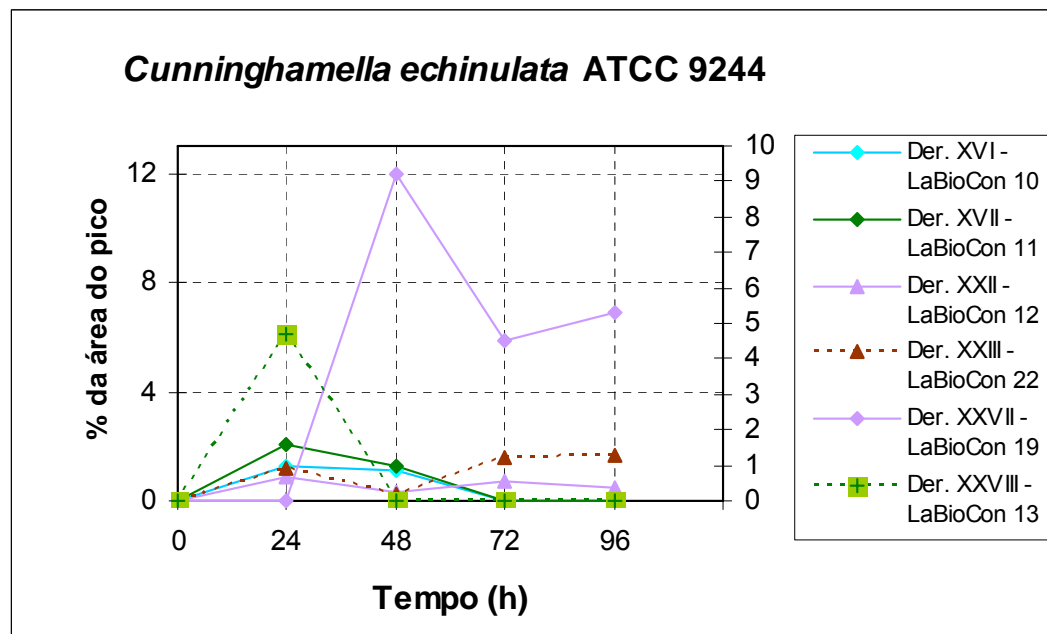
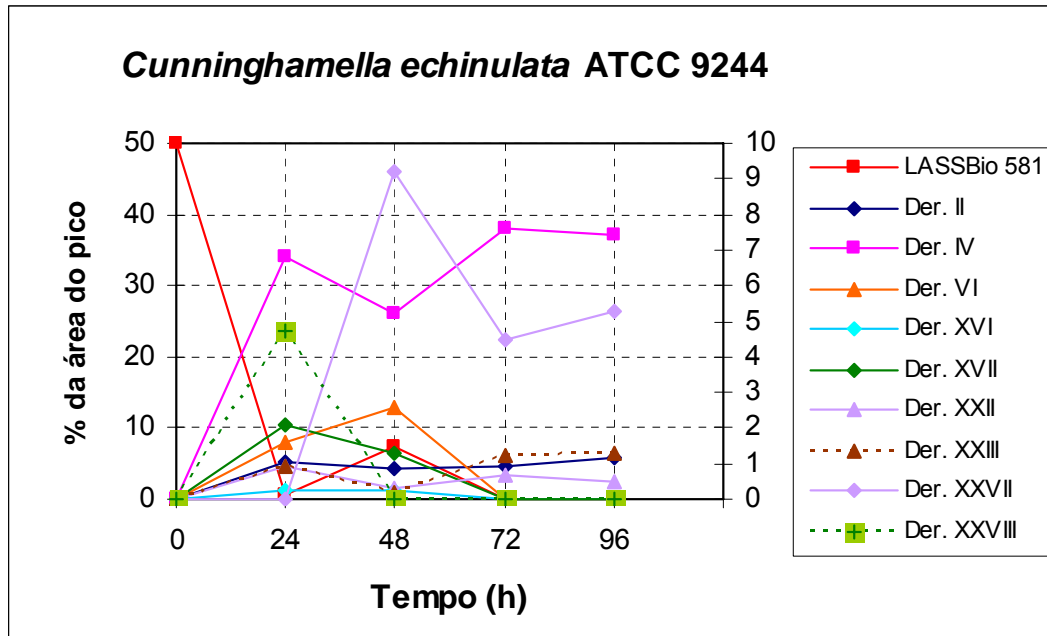


Figura 44. Cinéticas de biotransformação do LASSBio 581 por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e dos derivados IV e VI; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados II, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXVII, XXVIII) com o tempo de incubação em horas (gráfico superior). Gráfico inferior: cinética destacando os derivados formados pela incubação com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 que tiverem suas estruturas químicas sugeridas pelas análises de RMN ^1H e MS.

3.4.2.7 *Cunninghamella elegans* ATCC 36112

A incubação de *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 com LASSBio 581 (meio líquido PDSM, agitação de 200 rpm, temperatura de 27°C) ocasionou a formação de onze derivados e consumo total do substrato no tempo de 96 horas. O composto formado em maior quantidade foi o IV. Se considerarmos a pequena quantidade com que os demais produtos foram formados em relação ao IV, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 seria uma boa escolha para isolamento do composto IV em 48 horas, mesmo sendo este um derivado de difícil separação dos componentes do meio de cultura. O derivado XI foi produzido exclusivamente por esta cepa no tempo de 24 horas, tendo isolamento rápido devido ao seu tempo de formação, contudo pouca quantidade é obtida.

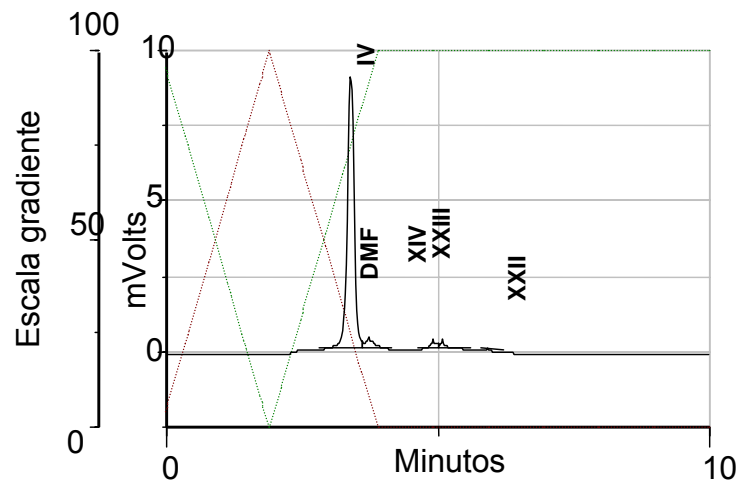


Figura 45. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; - - - - - metanol).

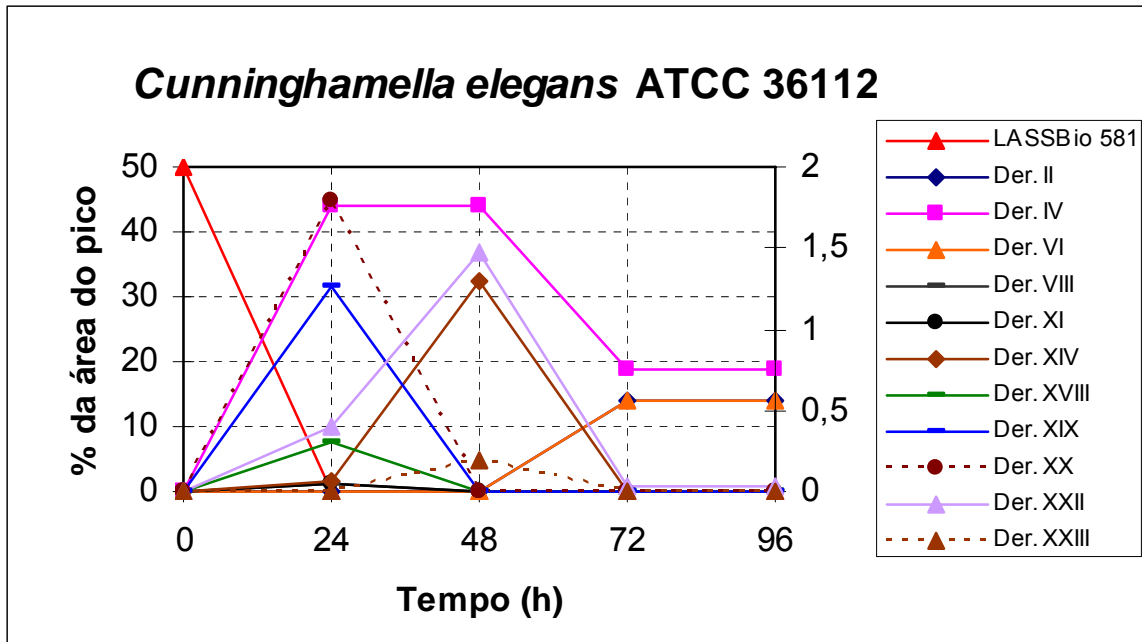


Figura 46. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e dos derivados II, IV e VI; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados VIII, XI, XIV, XVIII, XIX, XX, XXII, XXIII) com o tempo de incubação em horas.

3.4.2.8 *Mortierella isabelina* NRRL 1757

Doze derivados são formados pela metabolização do LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757 (meio líquido PDSM, agitação de 200 rpm, temperatura de 27°C). No tempo de 96 horas o substrato foi consumido totalmente e maiores quantidades são observadas dos produtos XVI, XXII, XXIV e XXIX. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas, o composto formado em maior quantidade é o IV. Diferentemente, no tempo de 96 horas, o produto que se forma em maior quantidade é o XXII.

O composto X é encontrado somente no tempo de 24 horas, enquanto que os produtos XV e XXVIII são formados somente em 48 horas. O derivado XII é formado nos tempos de 72 e 96 horas, e o XIII nos tempos de 24, 72 e 96 horas em quantidades

equivalentes. Maior quantidade do composto XVII é encontrada em 24 horas do que em 72 horas. O derivado XXIII é formado em maior quantidade em 96 horas, e em menor quantidade em 72 horas. Para obtenção do produto XXIX, deve-se manter incubação até 96 horas, tempo em que é formado.

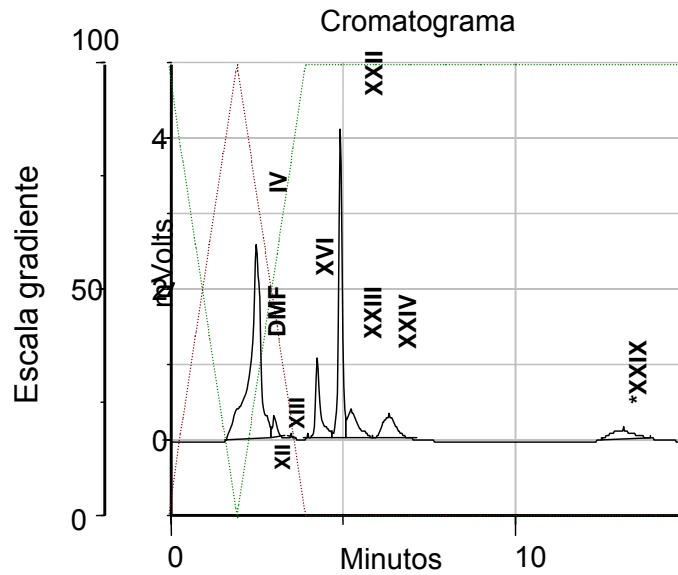


Figura 47. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; - - - - - metanol).

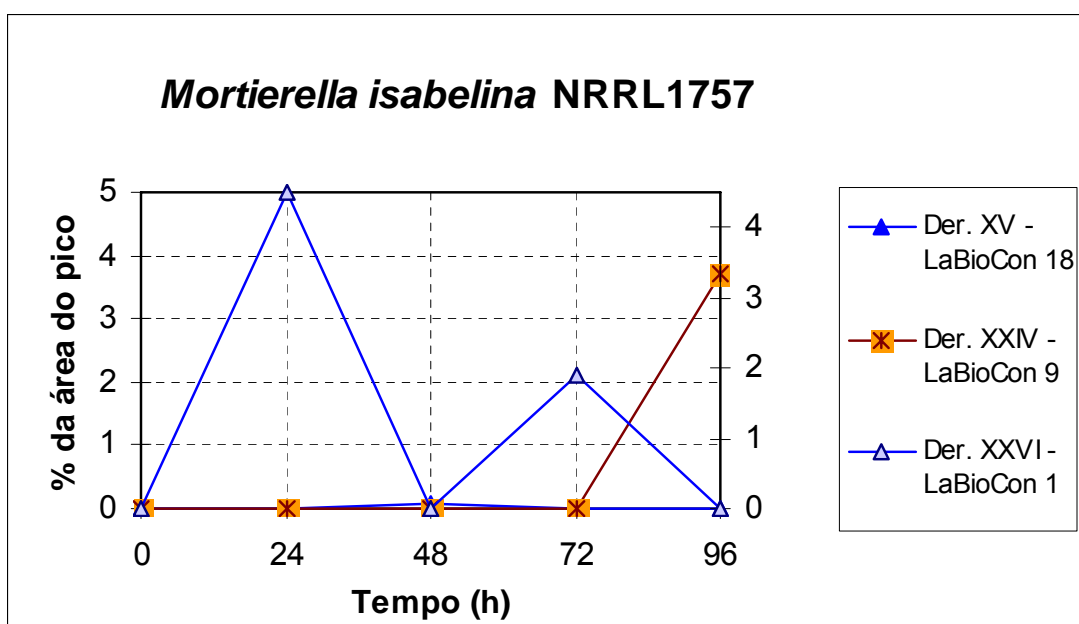
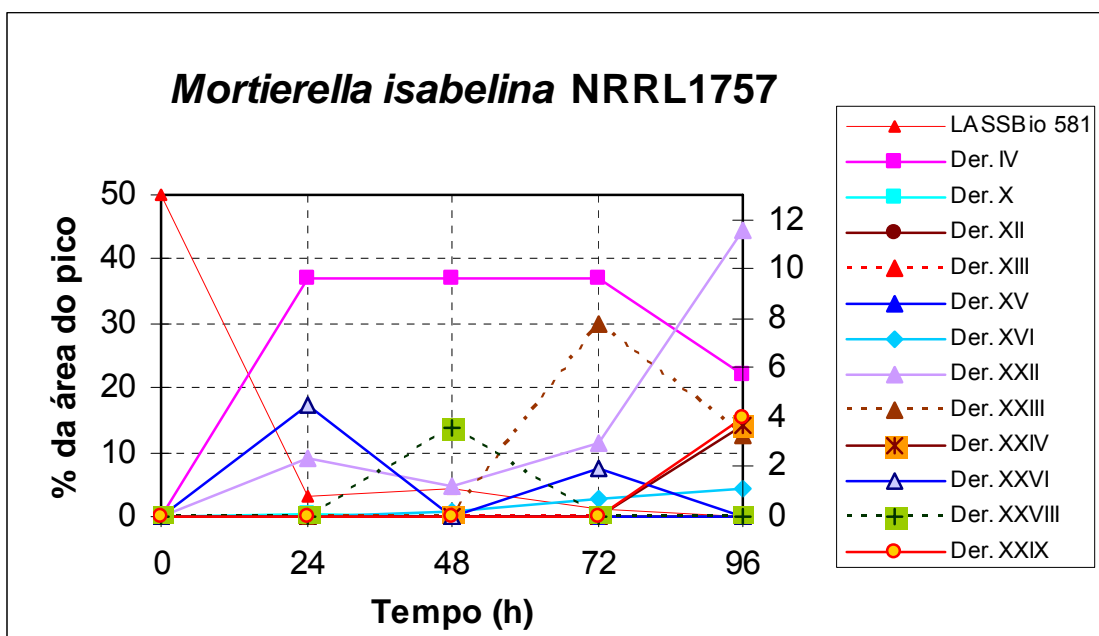


Figura 48. Cinéticas de biotransformação do LASSBio 581 por *Mortierella isabelina* NRRL 1757 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e do derivado IV; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados X, XII, XIII, XV, XVI, XXII, XXIII, XXIV, XXVI, XXVIII, XXIX) com o tempo de incubação em horas (gráfico superior). Gráfico inferior: cinética destacando os derivados formados pela incubação com *Mortierella isabelina* NRRL 1757 que tiverem suas estruturas químicas sugeridas pelas análises de RMN ^1H e MS

3.4.2.9 *Mucor griosyanus* ATCC 1207a

Dez produtos foram encontrados na incubação do LASSBio 581 com *Mucor griosyanus* ATCC 1207a (meio líquido PDSM, agitação de 200 rpm, temperatura de 27°C). O derivado IV teve sua maior formação no tempo de 48 horas com diminuição nos tempos de 72 e 96 horas. O substrato foi consumido inteiramente nas 24 horas iniciais, e no tempo de 72 horas pode-se observar a formação do composto II em quantidades razoáveis.

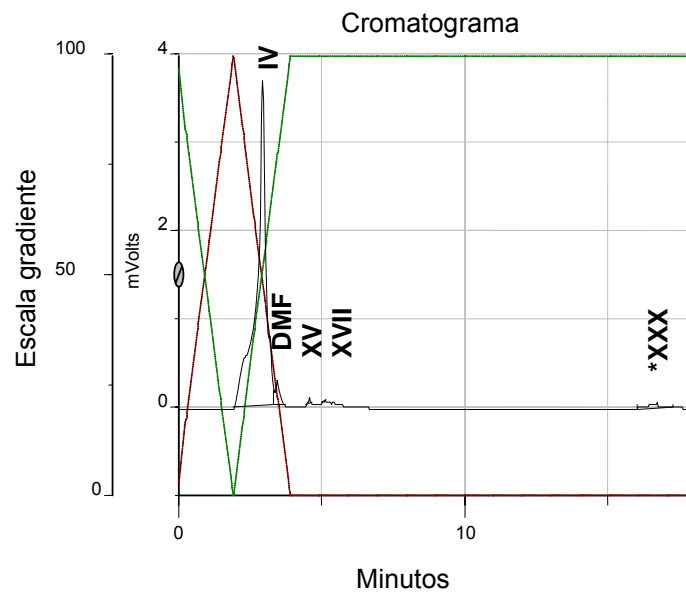


Figura 49. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Mucor griosyanus* ATCC 1207a no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; - - - - - metanol).

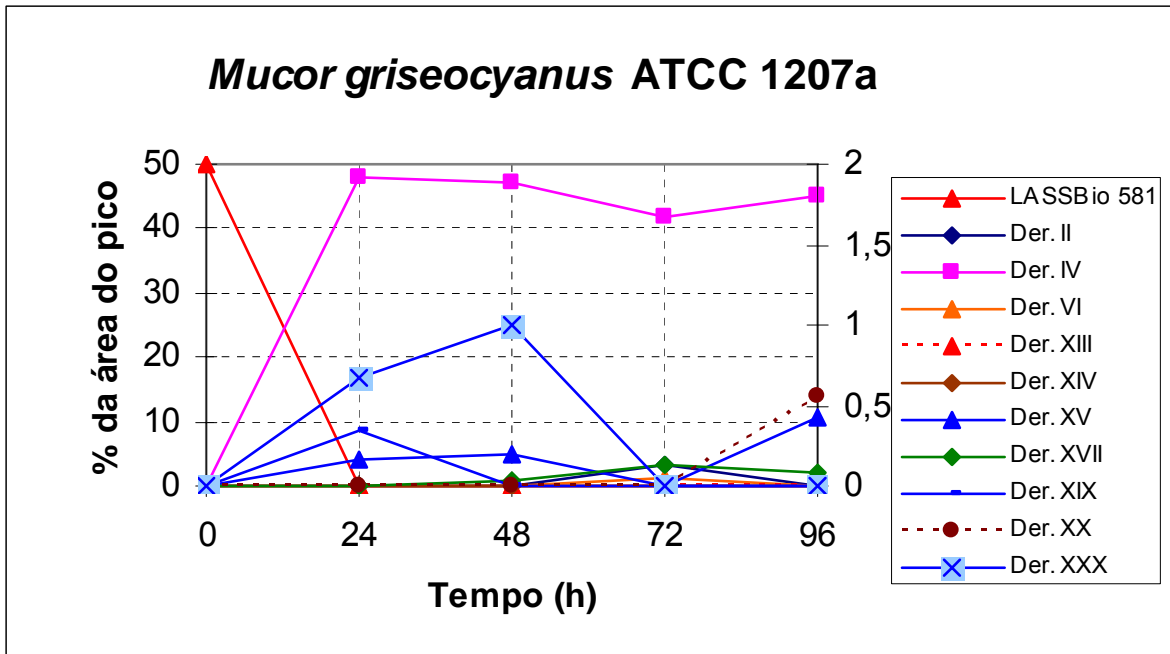


Figura 50. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e do derivado IV; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados II, VI, XIII, XIV, XV, XVII, XIX, XX, XXX) com o tempo de incubação em horas.

3.4.2.10. *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145

Dez produtos foram formados pela incubação do LASSBio 581 com *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 (meio líquido PDSM, agitação de 200 rpm, temperatura de 27°C). O composto aparentemente formado em maior quantidade foi o IV, em todos os tempos de análise da reação estudada, contudo não foi o de maior interesse, pois não se pode interferir na formação relativa deste composto visto que nas condições cromatográfica empregadas tem-se sobreposição com o tempo de retenção de alguns componentes do meio nutricional. Os derivados XXI e XXVI são produzidos exclusivamente por esta cepa nos tempos de 48 e 72 horas respectivamente. O composto I foi encontrado nos

tempos de 24 horas em maior quantidade e 48 horas. O produto IX é formado somente no tempo de 48 horas, diferente de XVII que se forma somente em 24 horas.

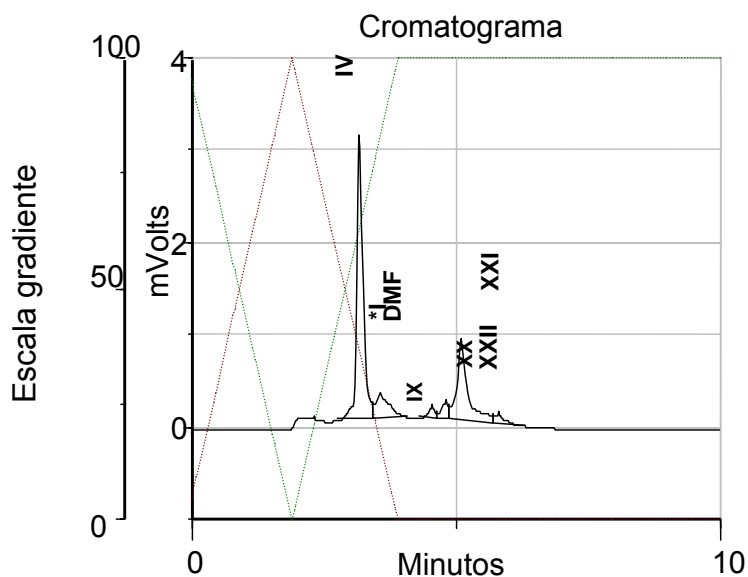


Figura 51. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm (----- metanol/tampão 65:35; - - - - - metanol).

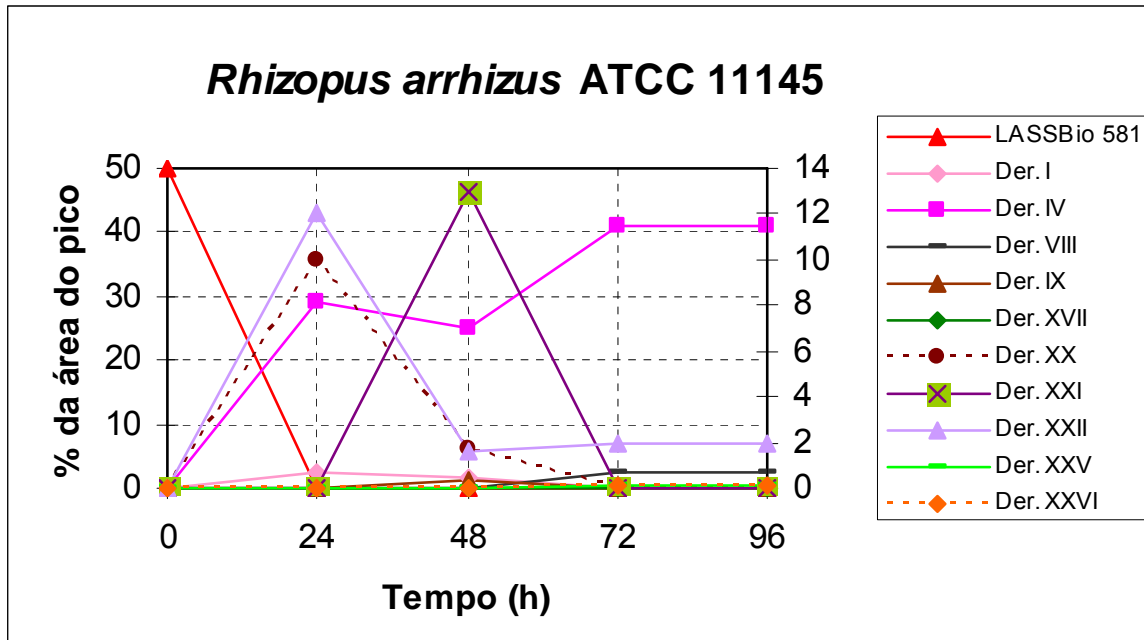


Figura 52. Cinética de biotransformação do LASSBio 581 por *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 correlacionando a percentagem da área do pico dos diferentes compostos em relação a todos os outros picos observados no cromatograma em comprimento de onda de 248nm (eixo da esquerda relacionado as áreas do substrato LASSBio 581 e do derivado IV; e eixo da direita relacionado as áreas dos picos dos derivados I, VIII, IX, XVII, XX, XXI, XXII, XXV, XXVI) com o tempo de incubação em horas.

3.4.3. Isolamento e purificação por cromatografia líquida em coluna (Flash cromatografia)

Para separação e purificação dos compostos formados, *flash* cromatografia usando fase estacionária Silicagel 60 (70 – 230 mesh) e comprimento da coluna 30 cm foi realizada. Para fase móvel, acetato de etila/metanol 95:05, acetato de etila/metanol 70:30, acetato de etila/metanol 50:50 e/ou metanol puro foram ensaiados. A fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 foi a de escolha para a maioria dos ensaios realizados já que proporcionou boa separação dos diferentes derivados observados inicialmente nos processos cromatográficos em camada delgada. Na 4ª incubação em escala semi-

preparativa utilizou-se como fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 em um estágio inicial, aumento da quantidade de metanol para 30 (acetato de etila/metanol 70:30) a partir de tubo coletado de número 25, alteração para 50 mL de metanol do tubo 32 ao 36 e metanol puro de 36 até o final. Nenhum benefício foi observado nas condições analíticas obtidas pela variação das quantidades de acetato de etila e metanol durante o processo de cromatografia de adsorção.

3.4.4. Determinação das estruturas dos metabólitos formados

As quantidades dos metabólitos obtidos nos cinco ensaios de bioconversão permitiram a realização das análises de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H .

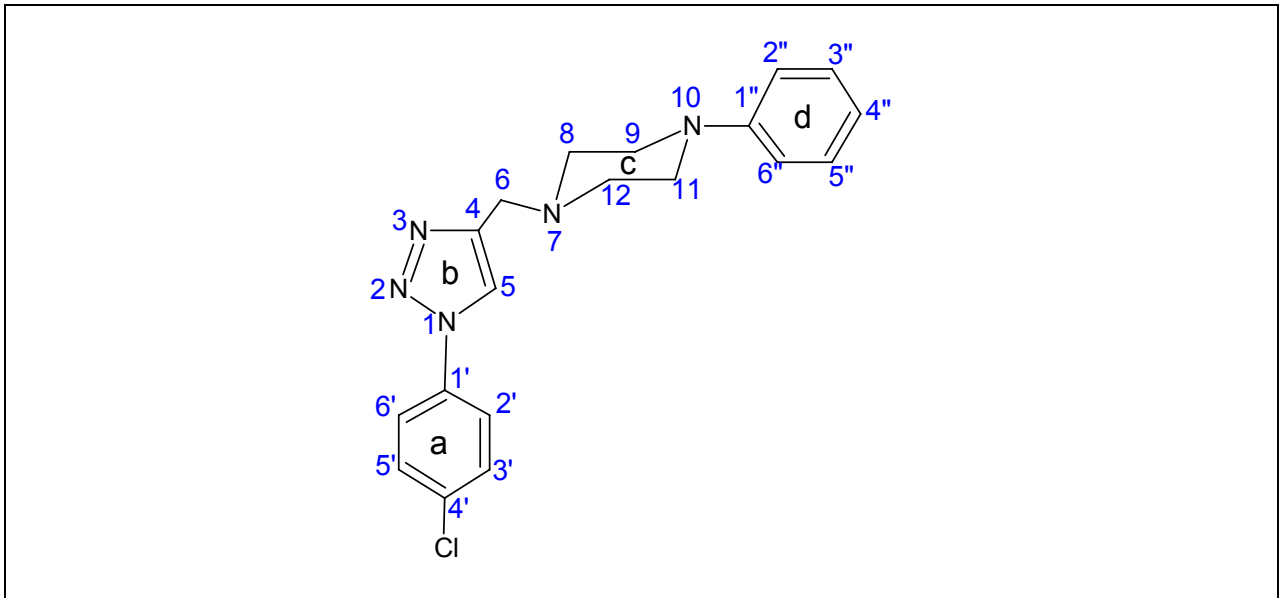


Figura 53. Substrato LASSBio 581

Pela incubação do LASSBio 581 (Figura 53) com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, cinco derivados (hidroxilados, dihidroxilados, e glicosilados em diferentes

posições) tiveram suas estruturas sugeridas pelas análises dos espectros de massa e ressonância magnética nuclear de hidrogênios (Figura 54).

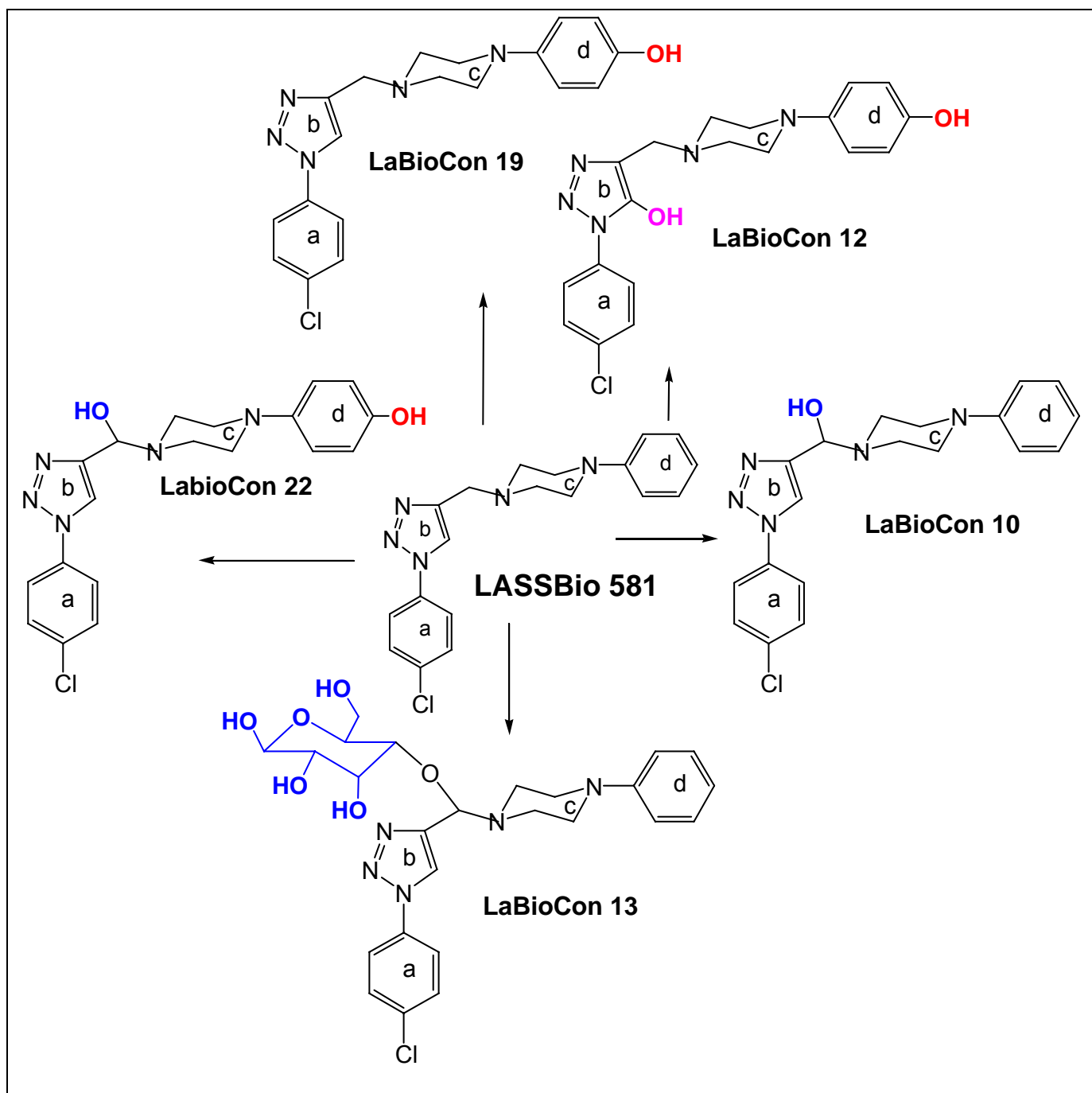


Figura 54. Estruturas químicas dos cinco derivados funcionalizados formados a partir da incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

Dois derivados (hidroxilado e diglicosilado no anel d) obtidos pela incubação do LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757 tiveram suas estruturas químicas sugeridas segundo análises de massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênios (Figura 55).

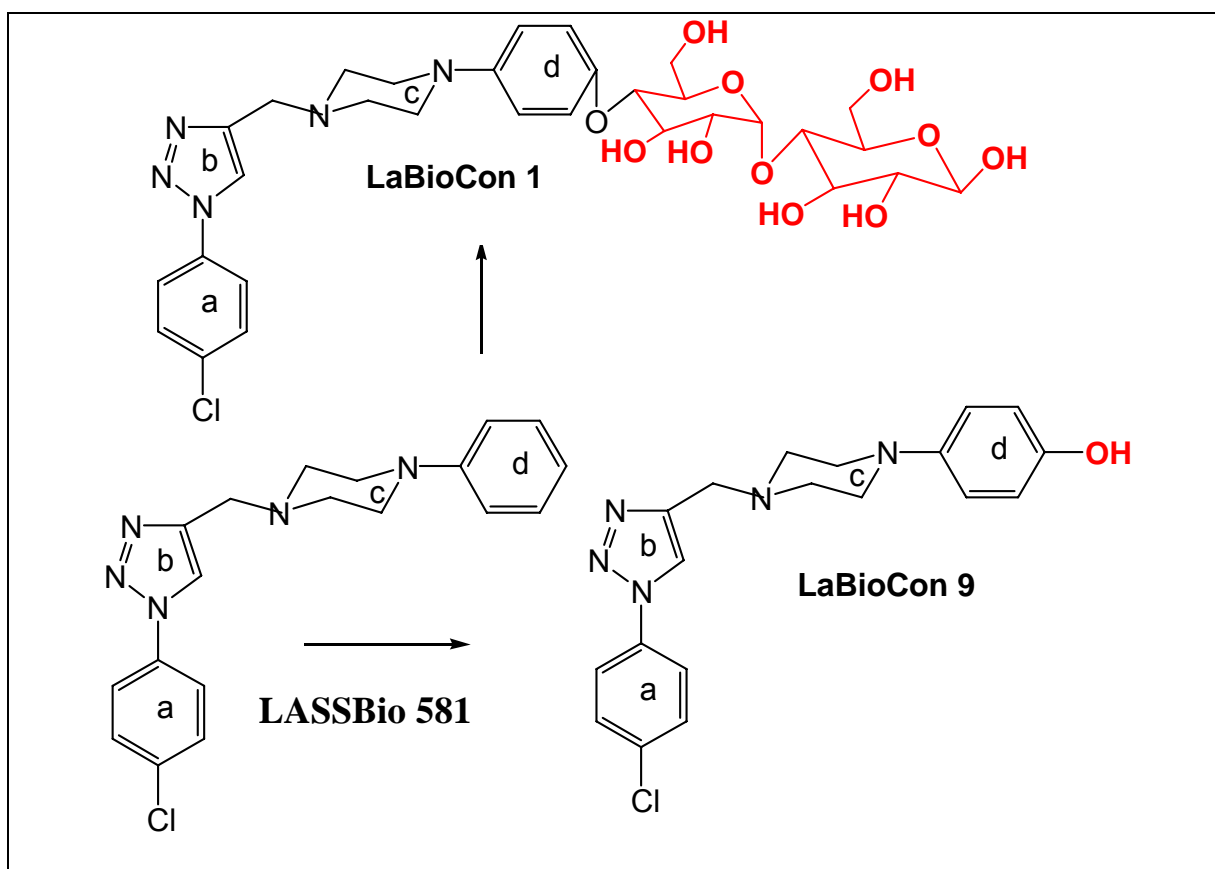


Figura 55. Estruturas químicas dos dois derivados funcionalizados formados a partir da incubação do LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757.

3.4.4.1 LaBiocon 1

O espectro de RMN ^1H indica glicosilação (Espectro 12, página 153), com sinais entre as regiões 3,48 e 5,35ppm. O aparecimento de um multipletto entre 1,28-1,32ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 8 e 12 presentes no anel c. Os quatro hidrogênios referentes aos carbonos 11 e 9 do anel c estão distribuídos no multipletto entre 3,21 e 3,25 ppm. Os dois hidrogênios da ponte metilênica, que liga anel b ao anel c, foram identificados no singletto em 3,29 ppm. Dois hidrogênios foram identificados nos multiplétos em 3,49 e 3,65 ppm referentes aos carbonos 21 e 25 da glicose. Cinco singletos identificados nas regiões 3,78, 3,80, 3,99, 4,20 e 4,23 ppm correspondem a 7 hidrogênios referentes aos carbonos 34, 32, 22, 15 e 14 das glicoses. Dois multiplétos em 4,27 e 4,28 ppm correspondem a dois hidrogênios referentes aos carbonos 26 e 18 das glicoses, respectivamente. Oito hidrogênios, referentes às hidroxilas e ao carbono 19 da glicose, estão presentes no singletto em 4,35 ppm. O singletto em 5,34 ppm indica um hidrogênio referente ao carbono 24, e o singletto em 5,11 ppm ao hidrogênio do carbono 17 ambos presentes nas glicoses. Um dubleto entre 6,71-6,73 ppm ($J=7,2$) indica a presença dos dois hidrogênios dos carbonos 6'' e 2'', enquanto um dubleto entre 6,89-6,91 ppm ($J=7,2$) indica os dois hidrogênios dos carbonos 5'' e 3'', presentes no anel d. Os quatro hidrogênios referentes aos carbonos 3' e 5' e carbonos 2' e 6' do anel a foram identificados no dubleto em 7,63 ppm ($J=7,0$) e no dubleto 7,89 ppm ($J=7,0$) respectivamente. O aparecimento de um singletto em 8,71ppm indica a presença de um hidrogênio referente ao carbono 5 presente no anel b (Figuras 56 e 57).

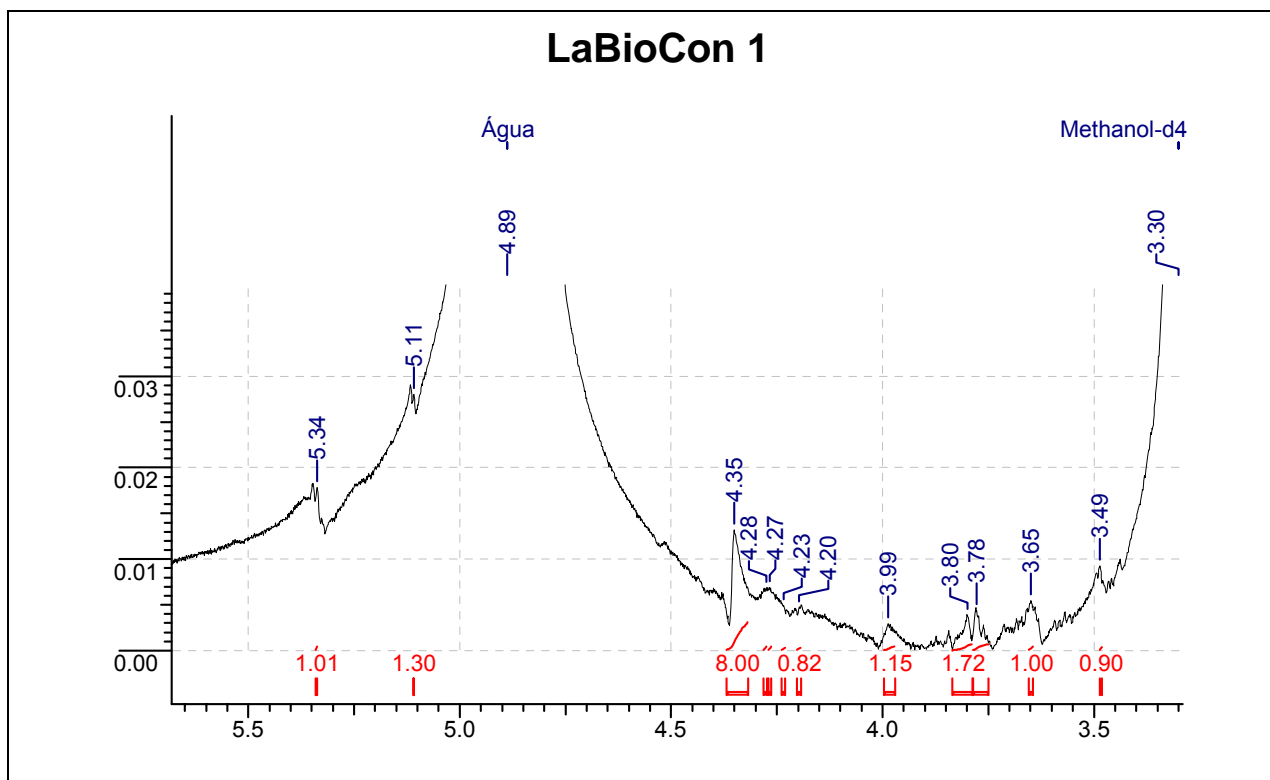


Figura 56. Expansão da região relativa aos picos dos hidrogênios presentes nas glicoses adicionadas à molécula do substrato LASSBio 581

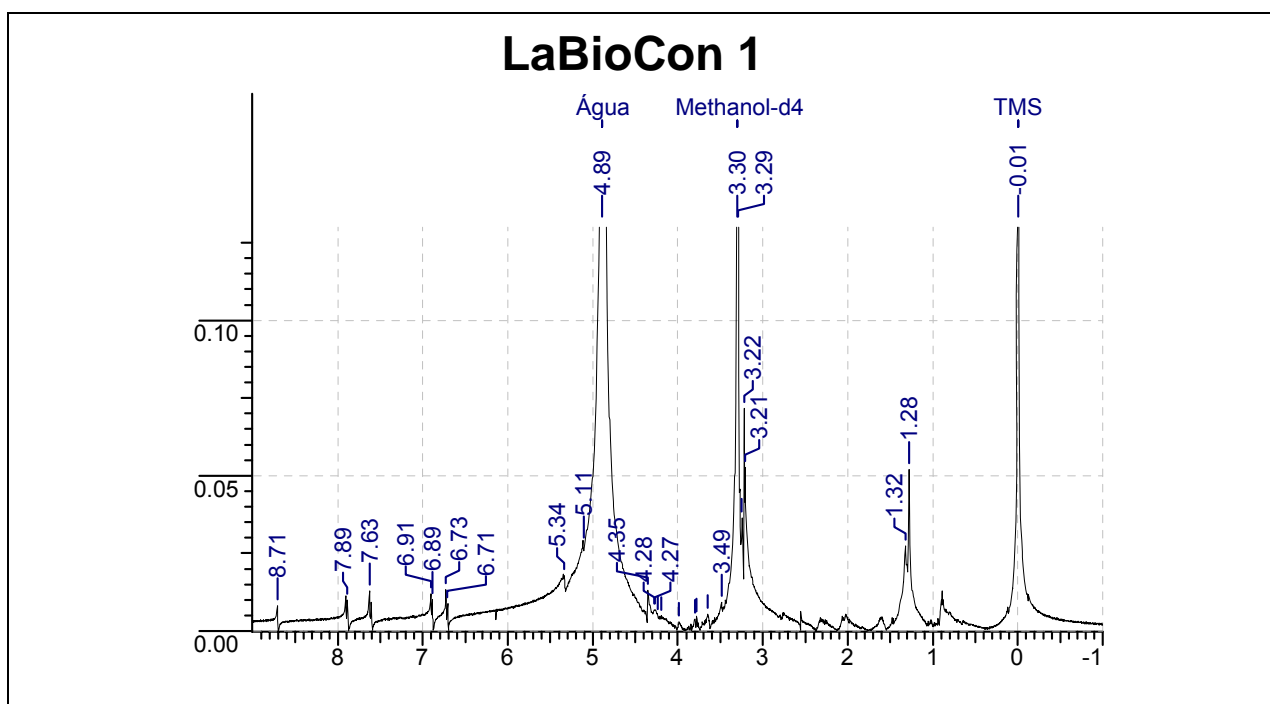


Figura 57. Espectro de RMN ¹H do composto LaBioCon 1

O espectro de massa do produto LaBioCon 1 apresenta pico do íon molecular em m/z 680,6 e pico do íon base em m/z 352, 58 ($M-328$). Em 354,58 (M^+) tem-se o pico de massa referente ao peso molecular do substrato LASSBio 581 e em 680,6 tem-se a massa do composto intacto, portanto $M^+ + 326$ ($C_{12}H_{21}O_{10}$), indicando diglicosilação sem a saída do átomo de cloro do anel a do composto de partida (Espectro 13, página 154).

A estrutura proposta para o LaBioCon 1 foi o produto diglicosilado no anel d.

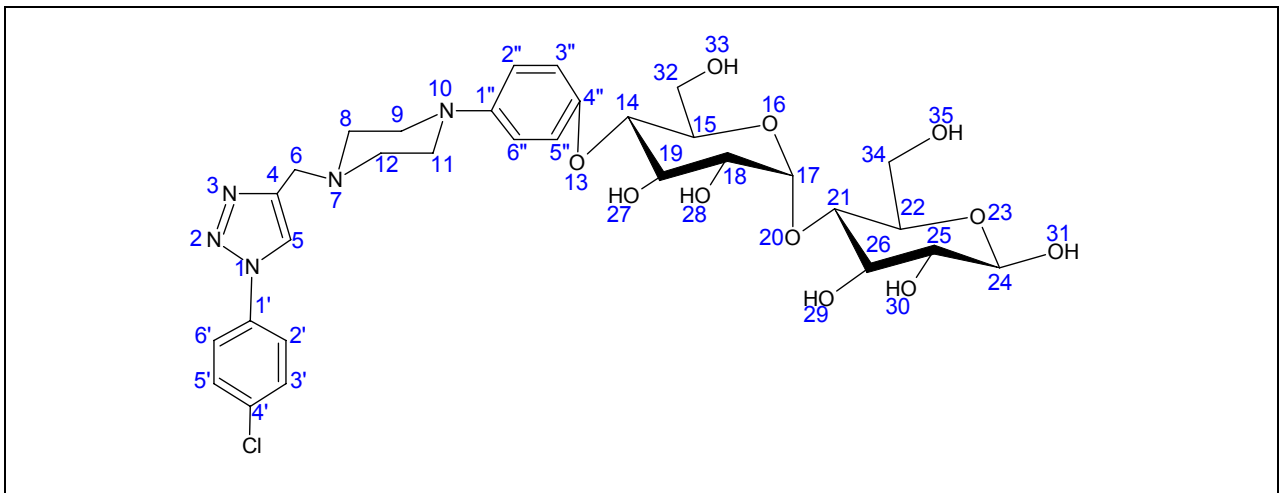


Figura 58. Estrutura química proposta para o produto diglicosilado LaBioCon 1

3.4.4.2 LaBiocon 9

O aparecimento de um singlete em 4,29 ppm indica a presença de hidroxilação (Espectro 14, página 155). Um multiplete entre 1,27-1,29 ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 8 e 12 presentes no anel c. O aparecimento de um multiplete entre 3,21 e 3,25 ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 11 e 9 do anel c. Os dois hidrogênios da ponte metilênica, que liga anel b ao anel c, foram identificados no singlete em 3,29ppm. Os dois dubletos entre 6,71-6,72 ppm ($J=7,0$) e 6,88-6,90 ($J=7,0$) indicam a presença de quatro

hidrogênios, dois referentes aos carbonos 6" e 2" e dois aos carbonos 5" e 3" respectivamente. Dois hidrogênios referentes aos carbonos 5' e 3' estão distribuídos no dubleto entre 7,60-7,62 ppm ($J=7,0$). Dois hidrogênios referentes aos carbonos 2' e 6' do anel a foram identificados no dubleto entre 7,89-7,90 ppm ($J=7,0$). O aparecimento de um singlete em 8,70ppm indica a presença de um hidrogênio referente ao carbono 5 presente no anel b.

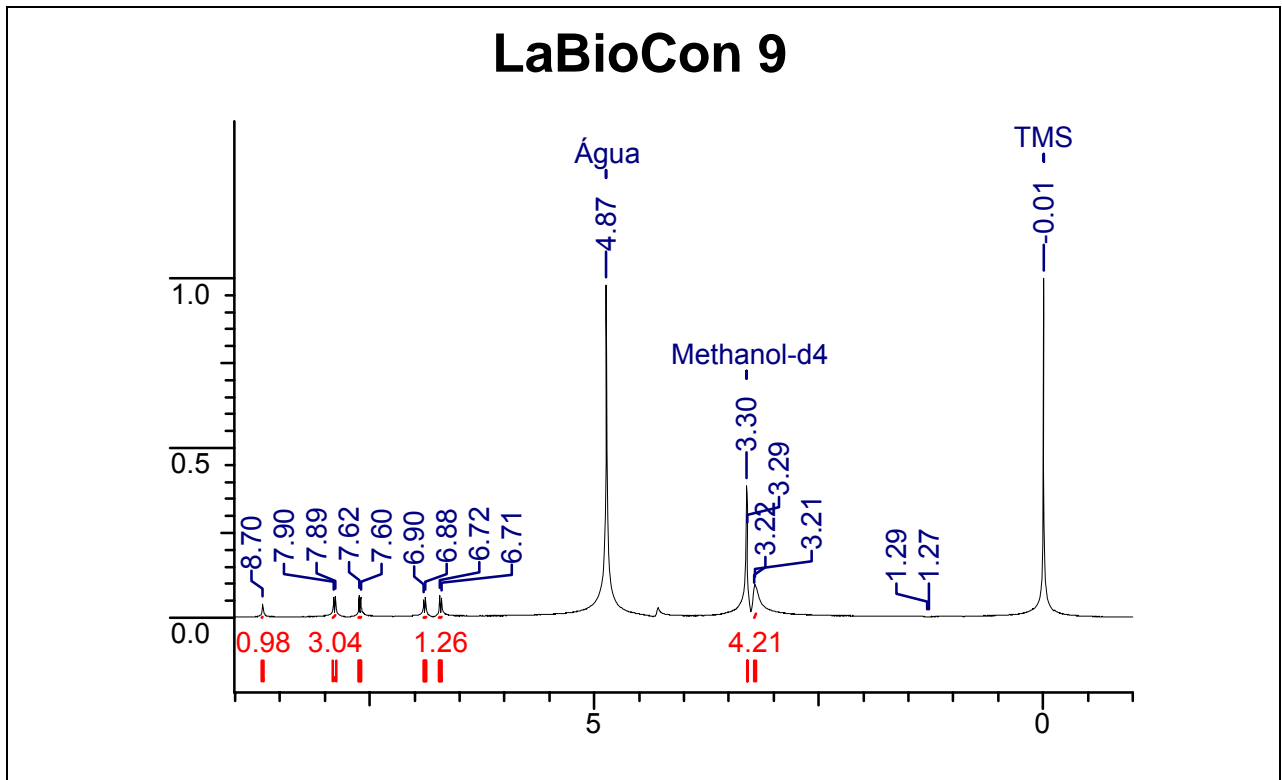


Figura 59. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 9

LaBioCon 9 apresenta, em seu espectro de massa, pico do íon molecular em m/z 370,41 e pico do íon base em m/z 352, 58 ($M-17,83$). Em 354,58 (M^+) tem-se o pico de massa referente ao peso molecular do substrato LASSBio 581 e em 370,41

tem-se a massa do composto intacto, portanto $M^+ + 17$, indica hidroxilação sem a saída do átomo de cloro do anel a do composto de partida (Espectro 15, página 156).

A estrutura proposta para o LaBioCon 9 foi o produto hidroxilado no anel d.

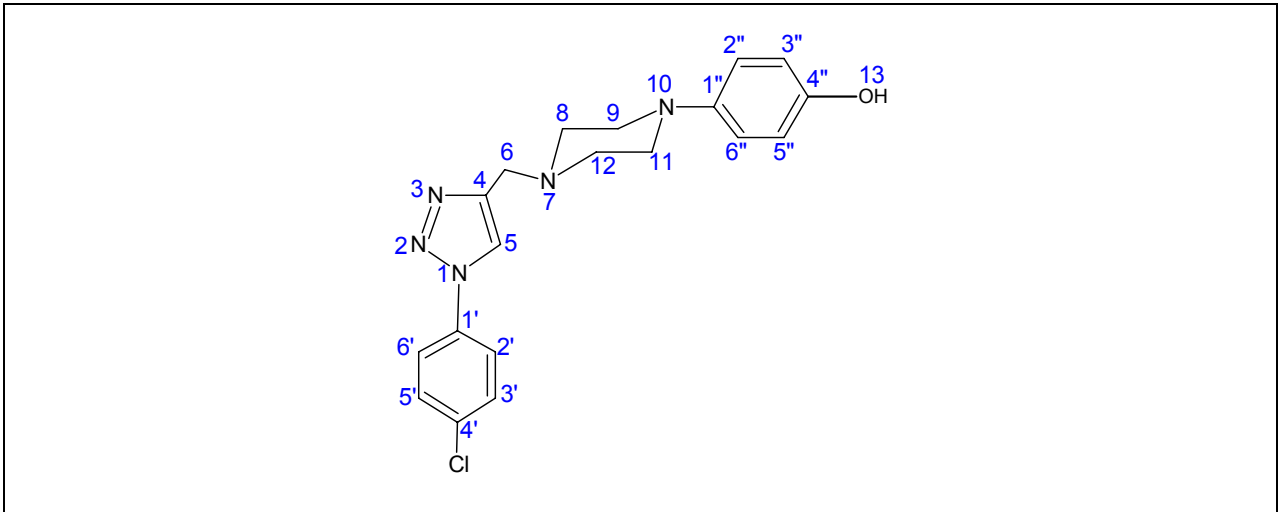


Figura 60. Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 9

3.4.4.3 LaBiocon 10

O aparecimento de um singleto em 3,74 indica a presença de hidroxilação (espectro 16, página 157). Um multipletto entre 2,67-2,70 ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 8 e 12 presentes no anel c. Um multipletto entre 3,12 e 3,15 ppm indica a presença de quatro hidrogênios dos carbonos 11 e 9 do anel c. O hidrogênio da hidroxila ligada a ponte metilênica está distribuído no singleto em 3,74 ppm. O dubleto em 6,78-6,76ppm ($J=8,0$) indica a presença de um próton referente ao carbono 4''. O dubleto entre 6,90-6,88 ppm ($J=8,0$) indica a presença de dois hidrogênios referentes aos carbonos 5' e 3'. Os dois hidrogênios referentes aos carbonos 2'' e 6'' estão distribuídos no dubleto entre 7,51-7,49 ppm ($J=8,0$). O dubleto

entre 7,15 e 7,17ppm ($J=8,0$) correspondem aos dois hidrogênios dos carbonos 5" e 3". O dubleto em 7,80-7,78 ($J=8,0$), indica a presença dos dois hidrogênios dos carbonos 2' e 6'. O aparecimento de um singlete em 8,44ppm indica a presença de um hidrogênio referente ao carbono 5 presente no anel b.

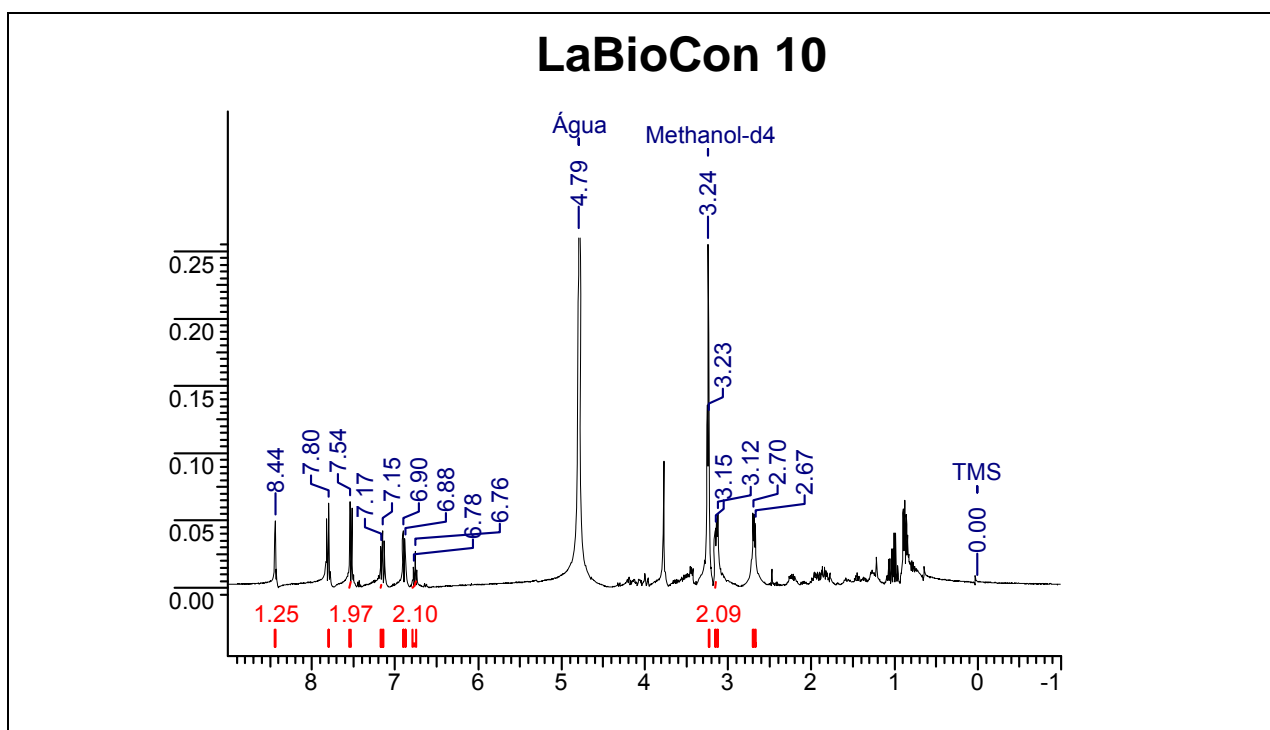


Figura 61. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 10

O espectro de massa para o derivado LaBioCon 10, apresenta pico do íon molecular em m/z 370,4. Em 354,3 (M^+) tem-se o pico de massa referente ao peso molecular do substrato LASSBio 581 e em 370,4 tem-se a massa do composto intacto, portanto $M^+ + 17$ (espectro 17, página 158).

A estrutura proposta para o LaBioCon 10 foi o produto hidroxilado na ponte metilênica.

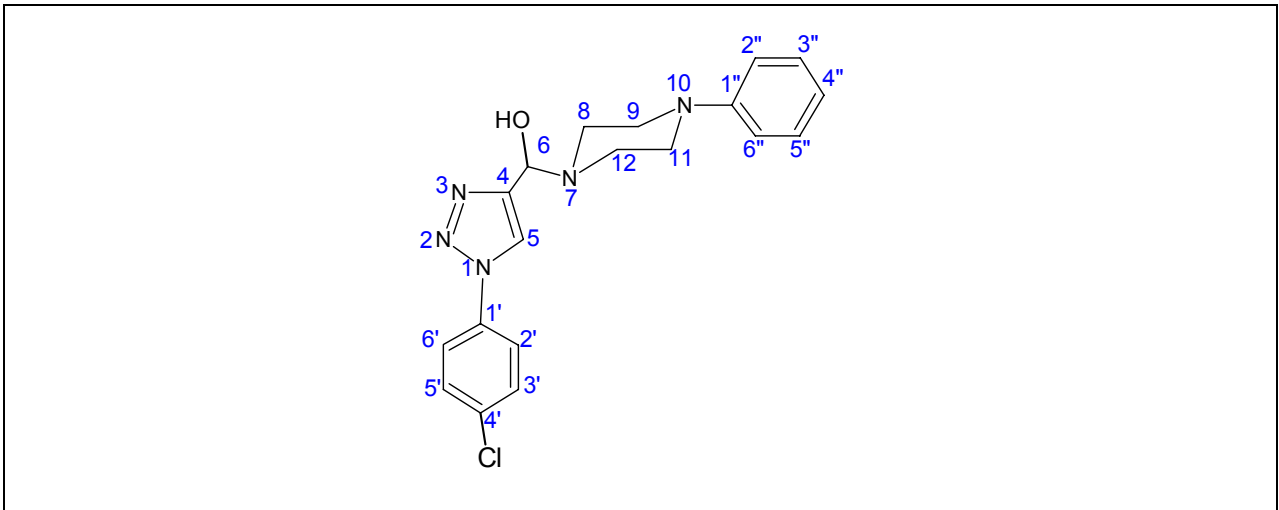


Figura 62. Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 10

3.4.4.4 LaBiocon 12

No espectro de massa do derivado LaBioCon 12, observou-se pico do íon molecular em m/z 386,3. Em 352,4 (M^+) tem-se o pico de massa referente ao peso molecular do substrato LASSBio 581 e em 386,3 tem-se a massa do composto intacto, portanto $M^+ + 34$, indicando dihidroxilação (espectro 18, página 159) .

A estrutura proposta para o LaBioCon 12 foi o produto dihidroxilado no anel d e b.

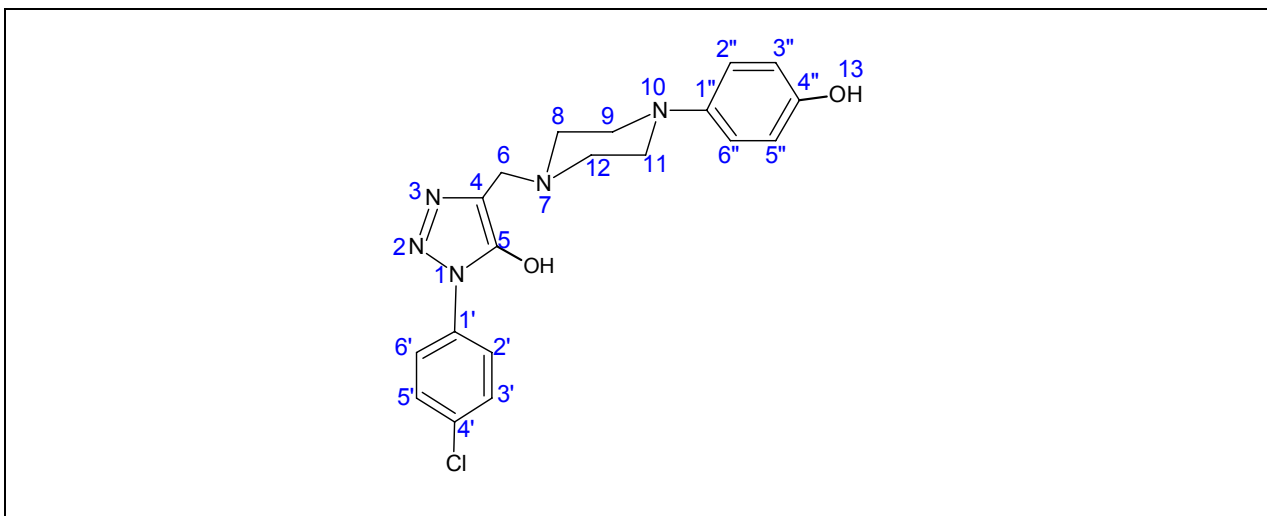


Figura 63. Estrutura química proposta para o produto dihidroxilado LaBioCon 12

3.4.5.5 LaBiocon 13

O espectro de RMN ^1H indica glicosilação, com sinais entre as regiões 3,62 e 5,39ppm (espectro 19, página 160). O aparecimento de um multipletto entre 2,74-2,77 ppm indica quatro hidrogênios referentes aos carbonos 8 e 12 presentes no anel c. Os quatro hidrogênios dos carbonos 11 e 9 do anel c estão distribuídos no multipletto entre 3,22 e 3,19ppm. Dois hidrogênios relacionados aos carbonos 9' e 11' da glicose estão presentes no multipletto em 3,62ppm. O multipletto em 3,75ppm está relacionado a um hidrogênio presente no carbono 10' da glicose. O hidrogênio do carbono 12' da glicose está representado no multipletto em 4,02ppm. Dois singletos em 4,08 e 4,38ppm, indicam a presença dos dois hidrogênios do carbono 14' da glicose. Os quatro hidrogênios das hidroxilas ligadas à molécula de glicose estão distribuídos no multipletto em 4,58ppm. O hidrogênio do carbono 8' da glicose está presente no triplete em 5,39ppm. O hidrogênio do carbono 4'' está localizado no dubleto em 6,83 ppm ($J=8,0$). O dubleto em 6,95-6,97 ppm ($J=8,0$) indica a presença dos dois hidrogênios dos

carbonos 3' e 5'. Os dois hidrogênios dos carbonos 6" e 2" do anel d foram identificados no dubleto em 7,22-7,20 ppm ($J=8,0$). O dubleto em 7,59-7,61 ppm ($J=8,0$) indica os dois hidrogênios dos carbonos 5" e 3", presentes no anel d. O aparecimento de um dubleto em 7,89 e 7,87 ppm ($J=8,0$) indica a presença de dois hidrogênios referentes carbonos 2' e 6' do anel a. No singlete presente em 8,51 ppm está distribuído um hidrogênio do carbono 5 presente no anel b.

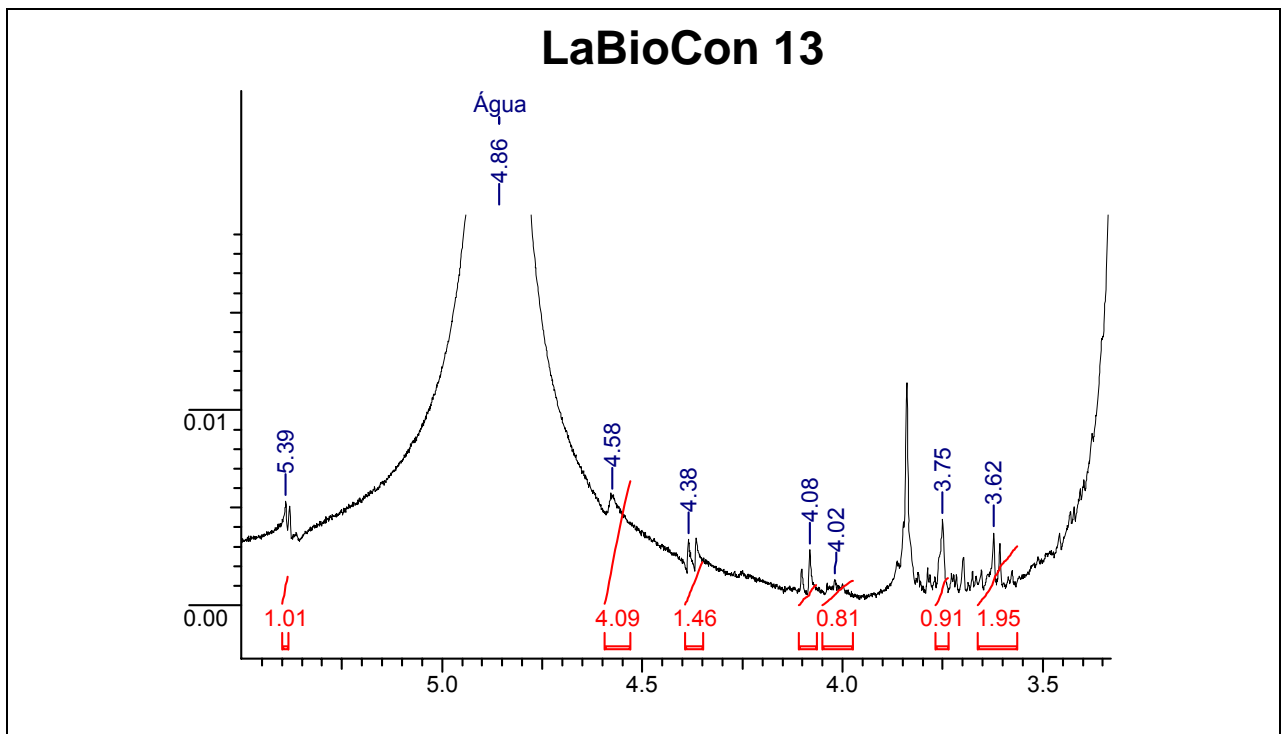


Figura 64. Expansão da região relativa aos picos dos hidrogênios presente na glicose adicionada à molécula do substrato LASSBio 581.

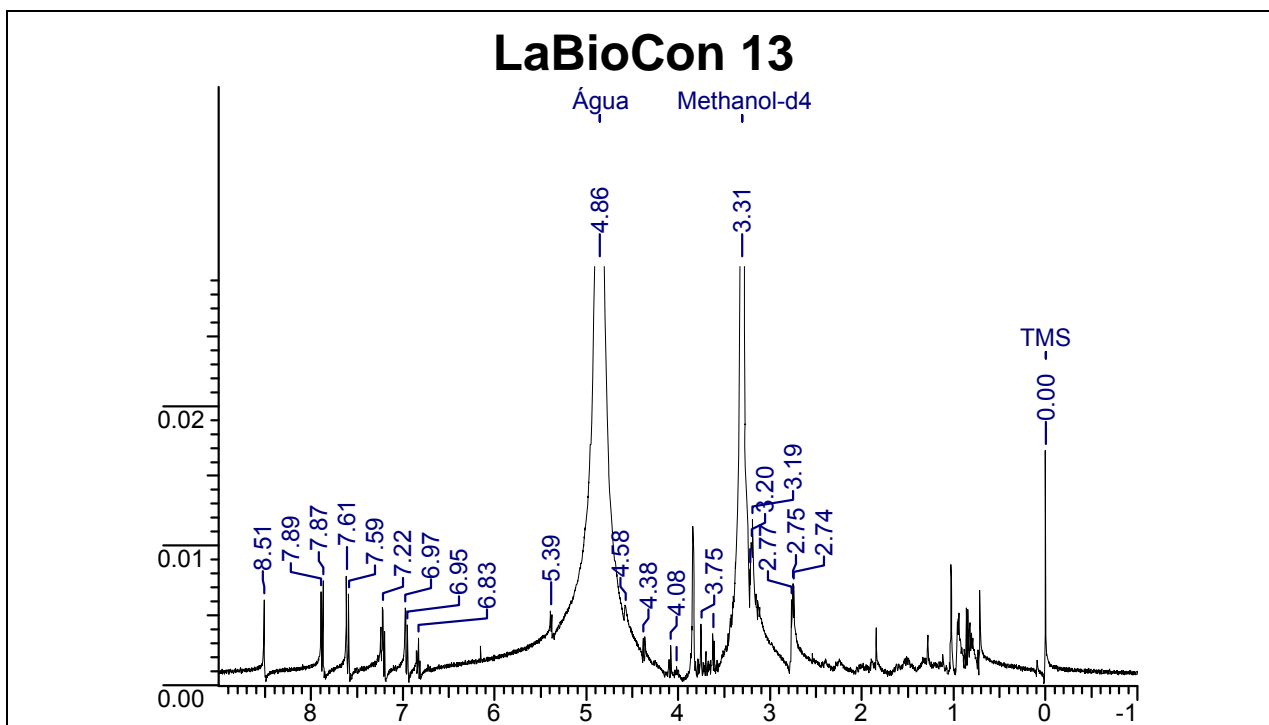


Figura 65. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 13

A estrutura proposta para o LaBioCon 13 foi o produto glicosilado na ponte metilênica.

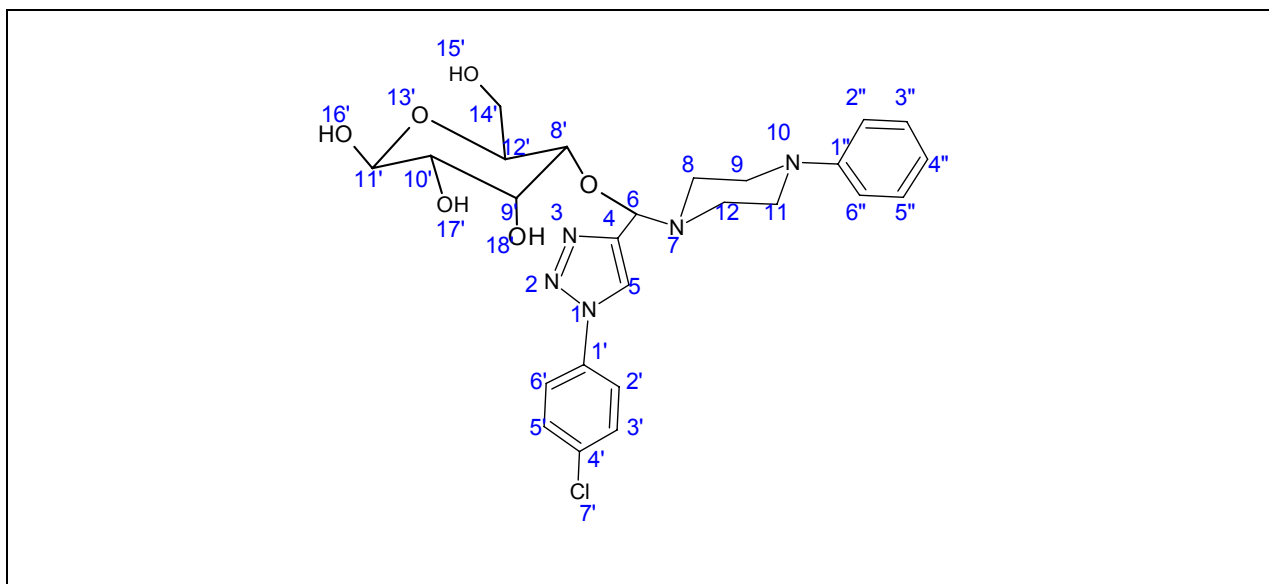


Figura 66. Estrutura química proposta para o produto glicosilado LaBioCon 13

3.4.5.6 LaBiocon 19

O aparecimento de um singlete em 4,12 ppm indica a presença de hidroxilação (espectro 20, página 161). Um multipletto entre 1,28-1,32ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 8 e 12 presentes no anel c. O aparecimento de um multipletto entre 3,21 e 3,00 ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 11 e 9 do anel c. Os dois hidrogênios da ponte metilênica, que liga anel b ao anel c, foram identificados no singlete em 3,29 ppm. Os dois dubletos entre 6,70-6,72 ppm ($J=8,0$) e 6,87-6,89 ppm ($J=8,0$) indicam a presença de quatro hidrogênios, dois referentes aos carbonos 6'' e 2'' e dois aos carbonos 5'' e 3'' respectivamente. Dois hidrogênios referentes aos carbonos 5' e 3' estão distribuídos no dubleto entre 7,60-7,62 ppm ($J=8,0$). Dois hidrogênios referentes aos carbonos 2' e 6' do anel a foram identificados no dubleto entre 7,87-7,89 ppm ($J=8,0$). O aparecimento de um singlete em 8,58ppm indica um hidrogênio do carbono 5 do anel b.

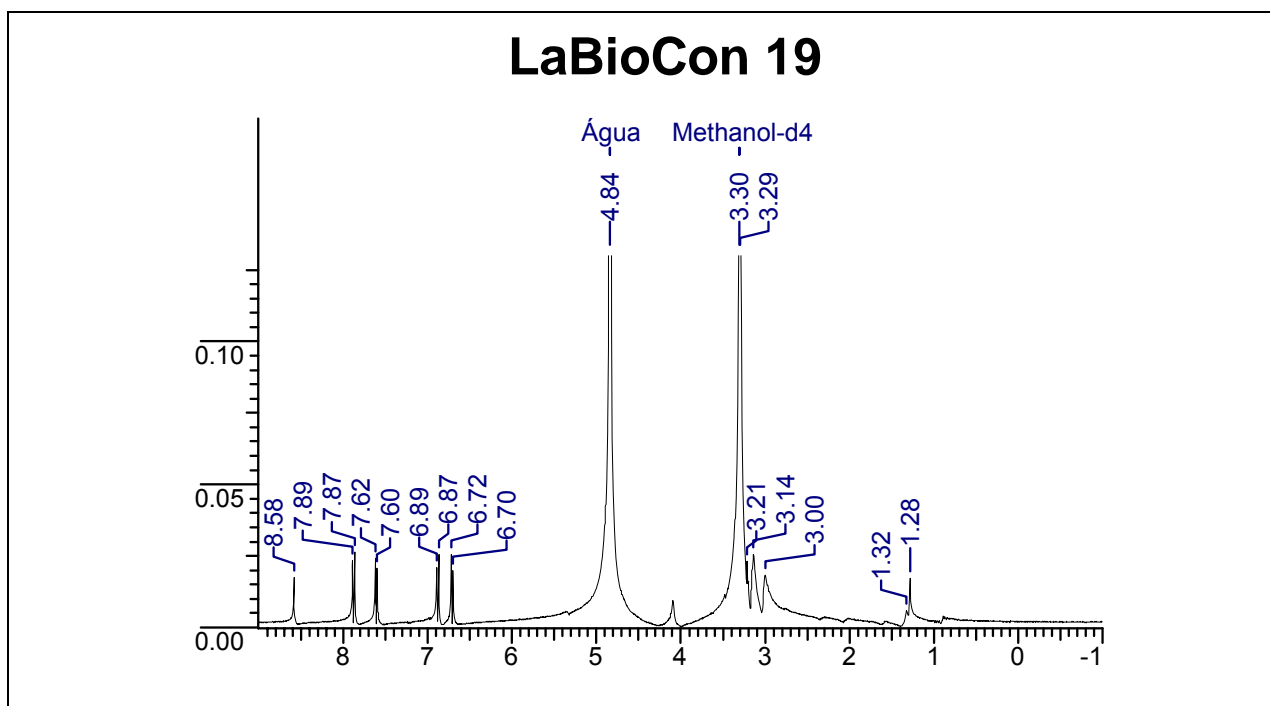


Figura 67. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 19

LaBioCon 19 apresenta, em seu espectro de massa, pico do íon molecular e pico do íon base em m/z 370,2. Em 354,2 (M^+) tem-se o pico de massa referente ao peso molecular do substrato LASSBio 581 e em 370,2 tem-se a massa do composto intacto, portanto $M^+ + 17$, indicando hidroxilação sem a saída do átomo de cloro do anel a do composto de partida (espectro 21, página 162).

A estrutura proposta para o LaBioCon 9 foi o produto hidroxilado no anel d.

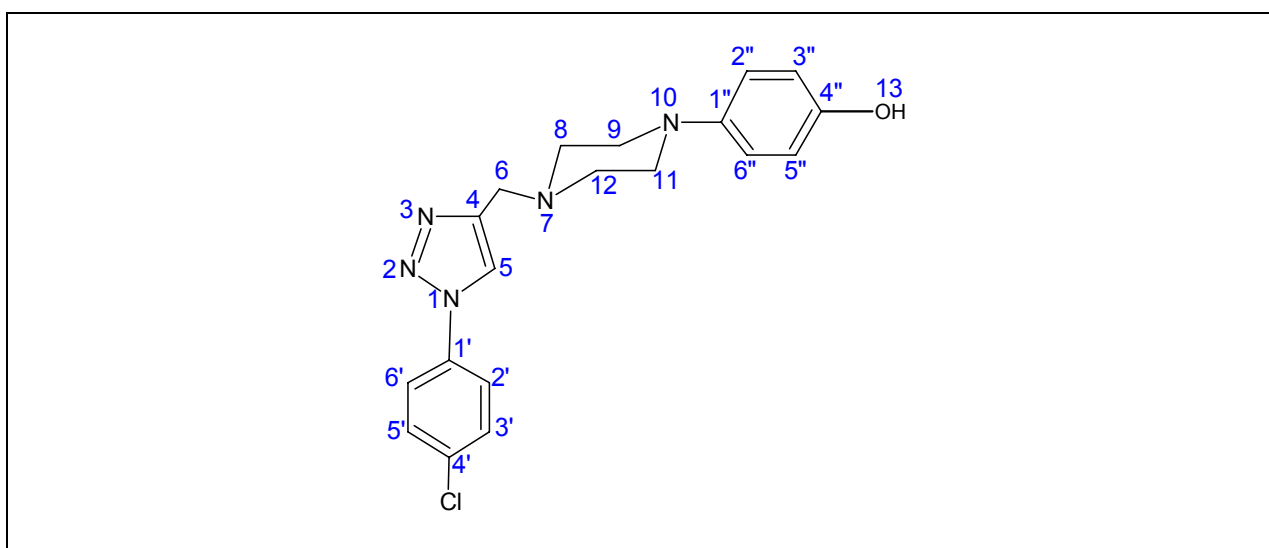


Figura 68. Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 19

3.4.5.7 LaBiocon 22

O aparecimento de um singlete em 2,26 indica a presença de dihidroxilação (espectro 22, página 163). O aparecimento de um singlete em 2,26ppm indica a presença de dois hidrogênios referentes às hidroxilas introduzidas no anel d e na ponte metilênica. Um multiplete entre 3,11 e 3,20 ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 9 e 11 presentes no anel c. O aparecimento de um multiplete em 2,77-2,93ppm indica a presença de quatro hidrogênios referentes aos carbonos 8 e 12 do anel c. O hidrogênio da ponte metilênica, que liga anel b ao anel c,

foi identificado no singlete em 4,04 ppm O duplete em 6,70-6,72 ppm ($J=8,0$) indica a presença dos dois hidrogênios dos carbonos 5'' e 3'' do anel d. O duplete entre 6,86-6,88 ppm ($J=8,0$) indica a presença de dois hidrogênios referentes aos carbonos 6'' e 2'' respectivamente. Dois hidrogênios referentes aos carbonos 5' e 3' estão distribuídos no duplete entre 7,60-7,62 ppm ($J=8,0$). Dois hidrogênios referentes aos carbonos 2' e 6' do anel a foram identificados no duplete entre 7,87-7,89 ppm ($J=8,0$). O aparecimento de um singlete em 8,55ppm indica um hidrogênio do carbono 5 do anel b.

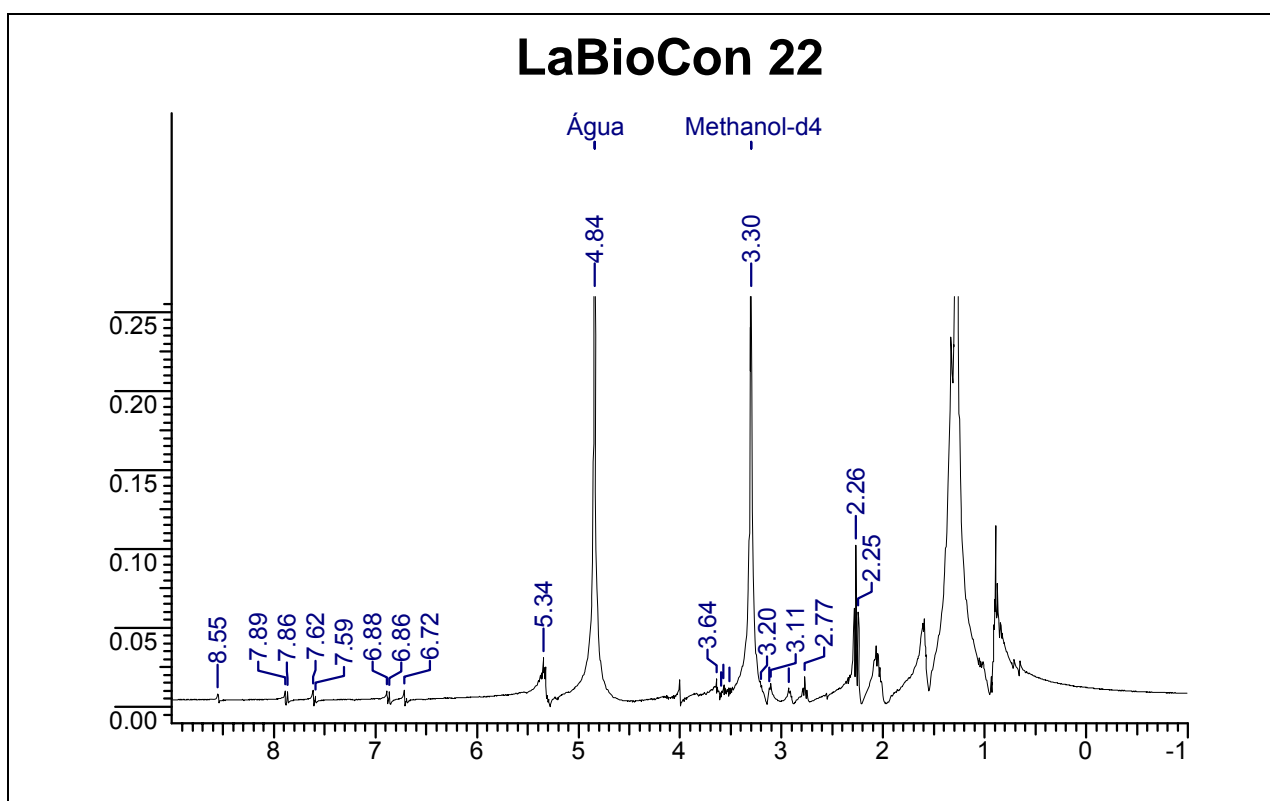


Figura 69. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 22

No espectro de massa do derivado LaBioCon 22, observou-se pico do íon molecular em m/z 386,3 e pico do íon base em m/z 370,2. Em 354,2 (M^+) tem-se o pico de massa referente ao peso molecular do substrato LASSBio 581 e em 386,2 tem-se a

massa do composto intacto, portanto $M^+ + 34$, indicando dihidroxilação (espectro 23, página 164).

A estrutura proposta para o LaBioCon 22 foi o produto dihidroxilado no anel d e na ponte metilênica.

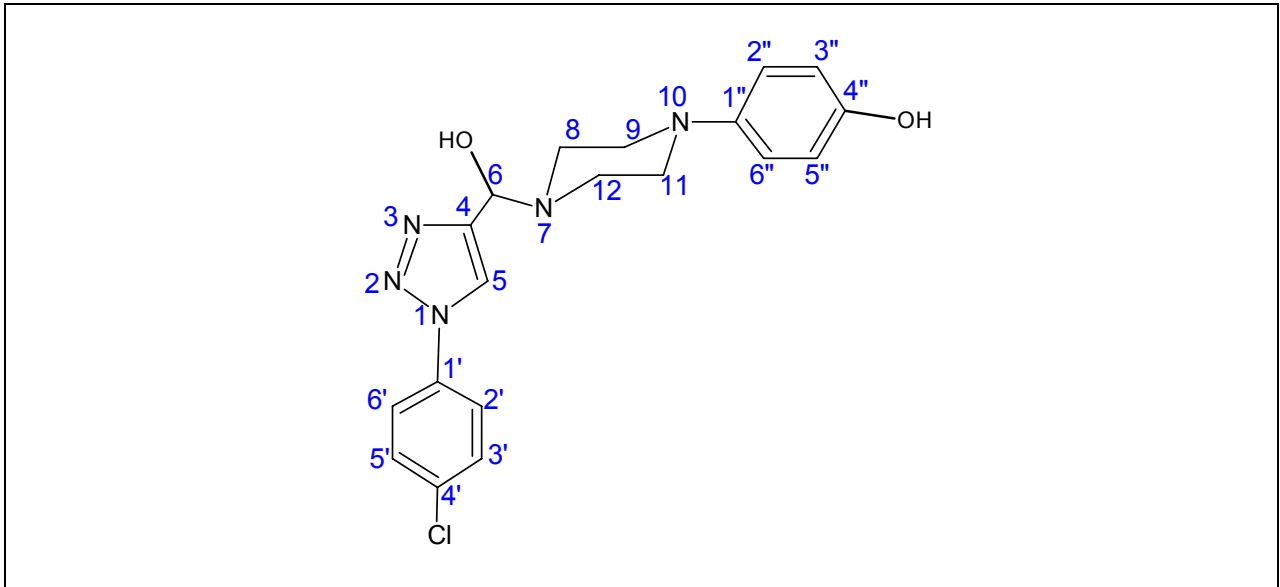


Figura 70. Estrutura química proposta para o produto hidroxilado LaBioCon 22.

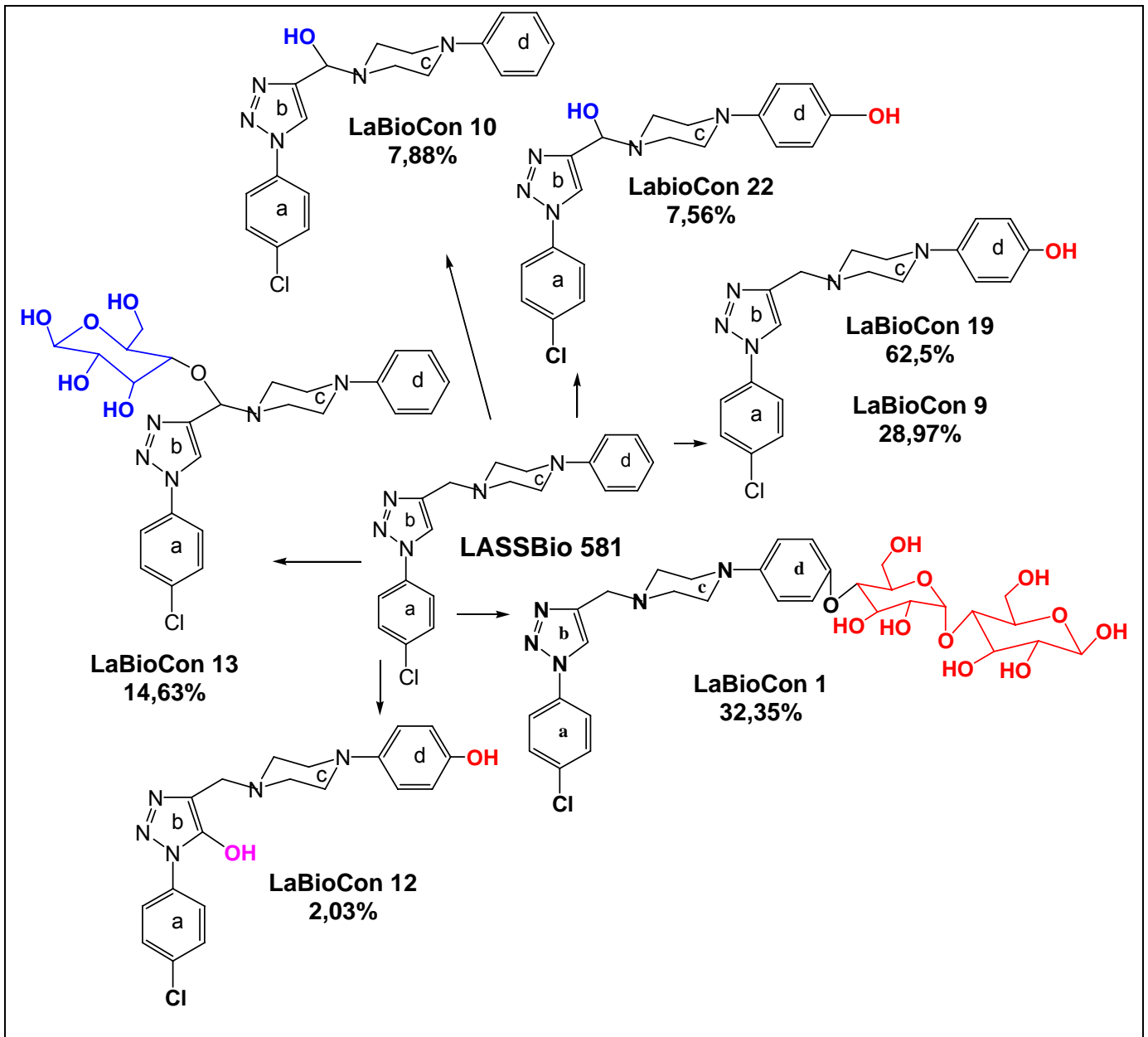


Figura 71. Estruturas químicas dos derivados funcionalizados do LASSBio 581 a partir da aplicação de bioconversões com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757, destacando suas respectivas percentagens de rendimento.

Tabela 5.1. RMN ¹H dos metabólitos identificados a partir da incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757.

N ° (Posição)	LASSBio 581 (ppm)	1 (ppm)	9 (ppm)	10 (ppm)	13 (ppm)	19 (ppm)	22 (ppm)
3	-	-	-	-	-	-	-
5	δ=7,95 (1H,s)	δ=8,71 (1H,s)	δ=8,70 (1H, s)	δ=8,44 (1H,s)	δ=8,51 (1H,s)	δ=8,58 (1H, s)	δ=8,55 (1H, s)
6	δ=3,83 (2H,s)	δ=3,29 (2H,s)	δ=3,29 (2H,s)	δ=3,74 (1H, s, OH)	δ=3,30 (1H,s)	δ=3,29 (2H,s)	δ=4,04 (1H,s) δ=2,26 (1H, s, OH)
8 e 12	δ=2,72-2,77 (4H,m)	δ=1,28-1,32 (4H,m)	δ=1,27-1,29 (4H,m)	δ=2,67-2,70 (4H,m)	δ=2,74-2,77 (4H,m)	δ=1,28-1,32 (4H,m)	8-δ=4,84 (1H,s) 12-δ=2,77- 3,11 (2H,2s)
9 e 11	δ=3,20-3,25 (4H,m)	δ=3,21-3,25 (4H,m)	δ=3,21-3,25 (4H,m)	δ=3,12-3,15 (4H,m)	δ=3,19 - 3,22 (4H,m)	δ=3,00-3,21 (4H,m)	9-δ=5,34 (1H,m) 11-δ=2,93- 3,20 (2H,2s)
2' e 6'	δ=7,71 (2H,d, J= 8,7Hz)	δ=7,89 (2H,d, J= 7,0Hz)	δ=7,89-7,90 (2H,d, J= 7,0Hz)	δ=7,78-7,80 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=7,87-7,89 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=7,87-7,89 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=7,87-7,89 (2H,d, J= 8,0Hz)
3' e 5'	δ=7,50 (2H,d, J= 8,7Hz)	δ=7,63 (2H,d, J= 7,0Hz)	δ=7,60-7,62 (2H,d, J= 7,0Hz)	δ=6,88-6,90 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=6,95 - 6,97 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=7,60-7,62 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=7,60-7,62 (2H,d, J= 8,0Hz)
4'	-	-	-	-	-	-	-
2" e 6"	δ=6,82-6,95 (2H,m)	δ=6,71-6,73 (2H,d, J= 7,2Hz)	δ= 6,71-6,72 (2H, d, J= 7,0Hz)	δ=7,49-7,51 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=7,20-7,22 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ= 6,70-6,72 (2H, d, J= 8,0Hz)	δ= 6,86-6,88 (2H, d, J= 8,0Hz)
3" e 5"	δ=7,22-7,30 (2H,m)	δ=6,89-6,91 (2H,d, J= 7,2Hz)	δ=6,88-6,90 (2H,d, J= 7,0Hz)	δ=7,15-7,17 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=7,59-7,61 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=6,87-6,89 (2H,d, J= 8,0Hz)	δ=6,70-6,72 (2H,d, J= 8,0Hz)
4"	δ=6,82-6,95 (1H,m)	-	-	δ=6,76-6,78 (1H,d, J= 8,0Hz)	δ=6,83 (1H,d, J= 8,0Hz)	-	-

Tabela 5.2. RMN ¹H dos metabólitos identificados a partir da incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757.

N °	LASSBio 581 (ppm)	1 (ppm)	9 (ppm)	10 (ppm)	13 (ppm)	19 (ppm)	22 (ppm)
8'	-	-	-	-	δ=5,39 (1H,t)	-	-
9'	-	-	-	-	δ=3,62 (1H,m)	-	-
10'	-	-	-	-	δ=3,75 (1H,m)	-	-
11'	-	-	-	-	δ=3,62 (1H,m)	-	-
12'	-	-	-	-	δ=4,02 (1H,m)	-	-
14'	-	-	-	-	δ=4,08 ;4,38 (2H,2s)	-	-
15', 16', 17'e 18'	-	-	-	-	δ=4,58 (4H,m,4 OH)	-	-
13	-	-	δ=4,29 (1H,s, OH)	-	-	δ=4,12 (1H,s, OH)	δ=2,26 (1H,s)

Tabela 5.3. RMN ^1H dos metabólitos identificados a partir da incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757.

N $^{\circ}$	LASSBio 581 (ppm)	1 (ppm)	9 (ppm)	10 (ppm)	13 (ppm)	19 (ppm)	22 (ppm)
14	-	$\delta=4,23$ (1H,s)	-	-	-	-	-
15	-	$\delta=4,20$ (1H,s)	-	-	-	-	-
17	-	$\delta=5,11$ (1H,s)	-	-	-	-	-
18	-	$\delta=4,27$ (1H,m)	-	-	-	-	-
19	-	$\delta=4,35$ (1H,s)	-	-	-	-	-
21	-	$\delta=3,49-3,65$ (1H,m)	-	-	-	-	-
22	-	$\delta=3,99$ (1H,s)	-	-	-	-	-
24	-	$\delta=5,34$ (1H,s)	-	-	-	-	-
25	-	$\delta=3,49-3,65$ (1H,m)	-	-	-	-	-
26	-	$\delta=4,28$ (1H,m)	-	-	-	-	-
32	-	$\delta=3,80$ (2H,s)	-	-	-	-	-
34	-	$\delta=3,78$ (2H,s)	-	-	-	-	-
27, 28, 33	-	$\delta=4,35$ (3H,s)	-	-	-	-	-
29, 30, 31, 35	-	$\delta=4,35$ (4H,s)	-	-	-	-	-

As novas moléculas formadas pela bioconversão do LASSBio 581 quando comparadas ao seu substrato original apresentarão diferentes propriedades físico-químicas e farmacocinética com possibilidades promissoras de aplicação. Os derivados formados, devido à introdução de grupamentos polares, terão uma maior solubilidade em água, o que propiciará administração intravenosa antes dificultada devido a baixa solubilidade em água do substrato de partida LASSBio 581. Devido à natureza das reações ocorridas, alguns dos compostos formados podem estar relacionados aos prováveis metabólitos humanos, justificando a possibilidade de utilização destes produtos como padrões de referencia para estudos do metabolismo.

As diferentes minimizações de energia observadas para os derivados, quando comparados ao substrato original, pode supor diferentes interações com receptor e possibilidade de descoberta de diferentes atividades.

As posições modificadas nos compostos formados indicam que as funcionalizações (hidroxilação, dihidroxilações e glicosilações) não estejam ocorrendo seqüencialmente, já que não há relação entre o desaparecimento e a formação subsequente de determinado composto, acreditando-se assim que provavelmente estas reações estejam sendo realizadas por enzimas distintas.

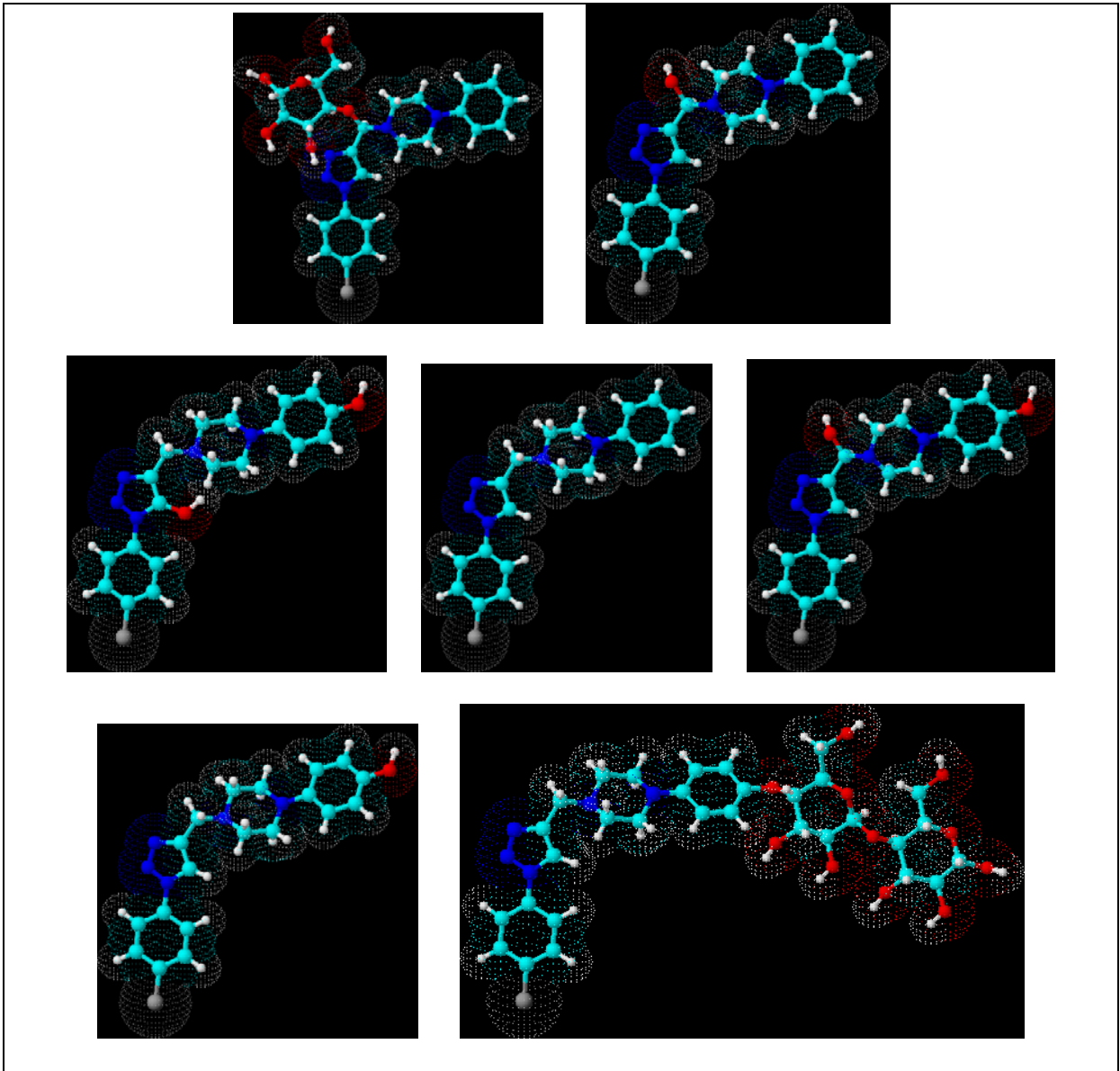


Figura 72: Estruturas químicas dos derivados funcionalizados do LASSBio 581 a partir da aplicação de bioconversões com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757, representadas em 3D com minimização de energia.

4. Conclusões

A bioconversão com fungos filamentosos, mostrou-se promissora para a produção de uma série de compostos funcionalizados a partir do LASSBio 581.

A análise dos resultados obtidos levando em consideração os parâmetros empregados para seleção, manutenção, repique e morfologia de crescimento fúngico, no meio líquido proposto, contribuíram para as reações de funcionalização obtidas.

Cunninghamella echinulata ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 propiciaram a formação de seis compostos funcionalizados por grupamentos químicos em diferentes posições. A partir dos ensaios realizados, a reação química mais freqüente foi a de hidroxilação similar àquelas observadas no metabolismo fase I para a maioria dos fármacos, sendo evidenciado pela formação dos derivados hidroxilados nas posições 4" e 6, dihidroxilados nas posições 5 e 4"; 6 e 4". Provavelmente estas reações tenham sido produzidas pelo sistema enzimático citocromo P-450. Devido à natureza das reações obtidas, alguns dos compostos formados podem estar relacionados aos prováveis metabólitos humanos.

Por sua vez, a obtenção do derivado glicosilado na posição 6, e diglicosilado na posição 4", raramente obtidas no metabolismo animal fase II, são observadas como produto do metabolismo fúngico, reforçando o caráter da biodiversidade dos metabólitos formados. Além disso, as glicosilações efetuadas por fungos filamentosos, podem sugerir posições de prováveis glicuronidações observadas em mamíferos, e portanto os possíveis locais de biotransformação fase II em humanos.

Os resultados das diferentes posições de funcionalização, leva-nos a crer que as reações são realizadas por enzimas distintas, visto que, embora sejam observadas dihidroxilação e glicosilação estas não ocorrem seqüencialmente.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Generalidades

5.1.1 Técnicas cromatográficas

Na determinação dos produtos funcionalizados a partir do novo protótipo de fármaco neuroativo LASSBio 581 foram utilizadas técnicas de cromatografia em camada delgada, *flash* cromatografia e cromatografia líquida de alta eficiência.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio TCL 20x20cm sílica gel 60 F₂₅₄, espessura da camada de sílica de 0,25cm (placa analítica) MERCK e as fases móveis: acetato de etila/metanol 70:30, acetato de etila/metanol 90:10, acetato de etila/metanol 95:05 e/ou metanol puro. As placas cromatográficas foram reveladas com iodo ressublimado e os diferentes valores de R_fs foram determinados.

Cromatografia em camada delgada preparativa usando placas analíticas e fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 foram realizadas quando necessária purificação adicional de determinados produtos formados. Após a corrida, as placas foram visualizadas em luz UV e o composto de interesse foi extraído da sílica com acetato de etila.

Os prováveis metabólitos formados foram separados por *flash* cromatografia, usando para fase estacionária Sílicagel 60 (VETEC) 0,063 - 0,200mm (70 – 230 mesh) e fase móvel acetato de etila/metanol 95:05, acetato de etila/metanol 70:30, acetato de etila/metanol 50:50 e/ou acetato de etila. A eluição dos diferentes produtos encontrados foi acompanhada por cromatografia em camada delgada usando cromatofolhas de alumínio TCL 20x20cm sílica gel 60 F₂₅₄ MERCK (placa

analítica), mesma fase móvel: acetato de etila/metanol 95:05 e revelação com iodo ressublimado.

Os cromatogramas, revelando os tempos de retenção dos prováveis metabólitos formados e de seu precursor, foram obtidos por análise em fase reversa usando cromatógrafo Gilson. As condições para execução da análise foram: coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250x4,6mm x 0,5 μ), bombas Gilson H1M, válvula dosadora manual Rheodyne com capacidade de 20 μ L e detector UV em comprimento de onda de 248nm. As análises foram realizadas em sistema isocrático usando como solvente mistura de metanol/tampão (fosfato de potássio monobásico 0,02M) 65:35 e 30 minutos de corrida, ou em sistema gradiente com as fases móveis metanol (solvente A) e mistura de metanol/tampão (fosfato de potássio monobásico 0,02M) 65:35 (solvente B), como especificado abaixo:

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	0	100
0 a 2	0 a 100	100 a 0
2 a 4	100 a 0	0 a 100
4 a 25	0	100

As fases móveis para cromatografia líquida de alta eficiência foram preparadas com solventes grau HPLC e água ultrapura (aparelho Millipore Simplicity). Antes do uso, foram filtradas em membranas Millipore de 0,45 μ m e 47mm de diâmetro e degaseificadas em banho de ultrassom Thornton T7 por 15 minutos.

5.1.2 Técnicas espectroscópicas

As análises espectrométricas de massas foram realizadas em espectrofotômetro de massas acoplado a cromatógrafo líquido Shimadzu AD Vp com analisador espectrofotométrico de massas quadrupolo Micromass (UK)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (500 MHz) foram obtidos em aparelho Bruker DRX 400 Advance NMR, tendo as amostras dissolvidas em metanol deuterado. Os valores de deslocamento químico foram referidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

5.1.3 Técnicas microbiológicas

Procedência dos microrganismos:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; NRRL: Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL, USA.

Meios de cultura:

Ágar batata (I):

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

Meio líquido PDSM (II):

- 5g peptona bacteriológica (Synth)
- 20g dextrose (Synth)
- 5g lecitina de soja (Inlab)
- 5g fosfato de potássio monobásico (Synth)
- 5g de cloreto de sódio (Vetec)
- 3g extrato de levedura (Vetec)
- 1 litro de água destilada

Ambos os meios foram esterilizados antes do uso em autoclave, na temperatura de 121°C por 15 minutos.

Os fungos filamentosos utilizados na bioconversão do substrato LASSBio 581, foram mantidos em ágar batata inclinado na temperatura de 2-4°C e repicados periodicamente com solução de glicerol a 25%. Sub-culturas das cepas selecionadas, foram preparadas antes de cada experimento, através do repique de culturas estocadas (com solução de glicerol 25% e ágar batata) e manutenção a 27°C por 7 dias.

5.2 Procedimentos experimentais

5.2.1 1-[1-(4-clorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-ilmetil]-4-fenilhexaidro piperazina

Em um erlenmeyer de 500mL foram colocados 10g de 4-cloro-anilina e 150mL de ácido clorídrico 37% (densidade 1,19g/mL), ajustando a temperatura para 5°C em banho de gelo. Com o auxílio de um balão de adição, 6g de nitrito de sódio dissolvido em 75mL de água destilada foi adicionado lentamente, mantendo temperatura de 5°C e sob agitação mecânica, à solução contida no erlenmeyer. Em seguida, a solução formada pelas etapas anteriores foi adicionada lentamente e em temperatura ambiente, também com o auxílio de um balão de adição, à um erlenmeyer contendo 75g de acetato de sódio, 75mL de água e 5,24g de azida de sódio (agitação mecânica por 15 minutos).

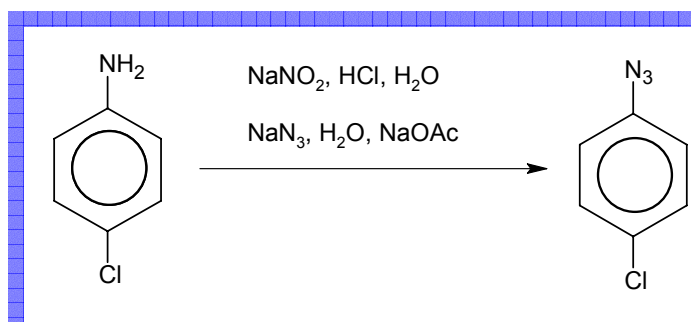


Figura 73. Representação esquemática da primeira etapa da síntese do LASSBio 581.

O composto formado pelas reações descritas anteriormente foi separado em funil de separação, pela extração com diclorometano e recolhimento da porção inferior de coloração amarelada. Após separação, o produto recolhido foi filtrado (filtração simples em funil de vidro e algodão), rotaevaporado e seco sob ar comprimido por aproximadamente 4 horas. O balão contendo o produto seco foi então, conectado a um condensador (sistema livre de trocas de ar tanto dentro do balão como entre o ar externo e interno). Com auxílio de uma seringa foi adicionado ao balão 10mL de álcool propargílico, destilado sob pressão reduzida e aproximadamente 90mL de tolueno anidro, mantendo a mistura sob refluxo por 18 horas. Terminado o tempo de refluxo, o produto formado foi rotaevaporado para sua concentração.

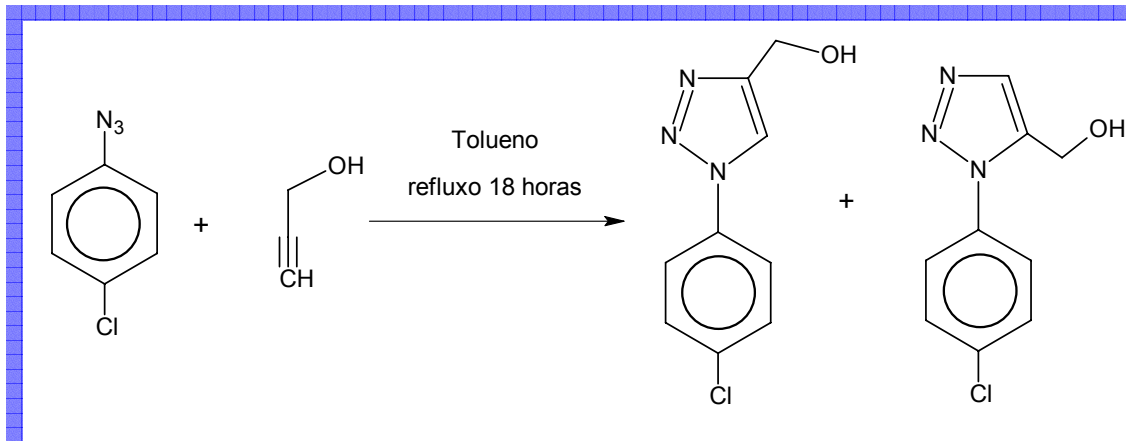


Figura 74. Representação esquemática da segunda etapa da síntese do LASSBio 581.

Em um funil de separação, foram colocados 40mL de ácido clorídrico 10%, pequena quantidade de água destilada e o produto formado anteriormente após refluxo de 18 horas. O processo de extração procedeu-se com 4 porções de 30mL de diclorometano e recolhimento das frações em recipiente contendo sulfato de sódio anidro. O produto extraído foi posteriormente filtrado, seco em rotavapor e agitado por quatro horas em capela com 56,68g de dióxido de manganês e 60mL de diclorometano. O composto formado foi filtrado e o álcool propargílico que não reagiu na etapa anterior foi separado por cromatografia em coluna usando diclorometano como fase móvel.

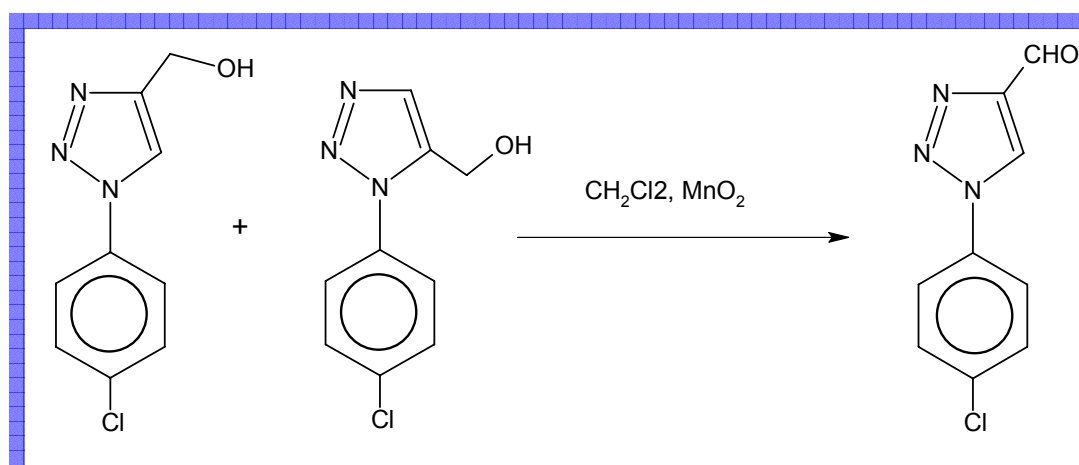


Figura 75. Representação esquemática da terceira etapa da síntese do LASSBio 581.

Em recipiente apropriado para câmara de hidrogenação foram colocados 3,850g do produto obtido por reação com dióxido de manganês, 6,9g de N-fenilpiperazina, aproximadamente 10mL de metanol anidro (quantidade suficiente para solubilização) e 350mg de Pd/C 10%. Reação foi realizada em câmara de hidrogenação na pressão de 60 psi e com supervisão a cada 2 horas durante 12 horas para o controle da pressão. O produto obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel como fase estacionária e n-hexano-diclorometano (em proporções crescentes de diclorometano) como fase móvel.

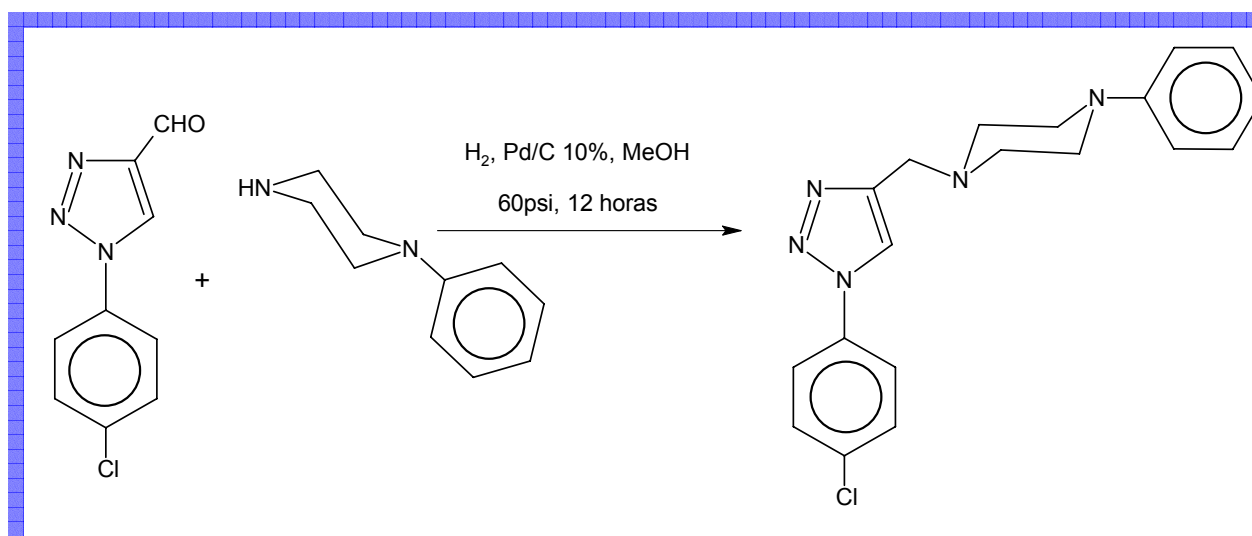


Figura 76. Representação esquemática da última etapa da síntese do LASSBio 581

5.2.2 Adaptação das cepas ao meio de cultura

As condições de crescimento, manutenção e manuseio das culturas dos fungos filamentosos ensaiados, foram estudadas visando a padronização do processo biotecnológico.

Para manutenção e repique dos microrganismos, ágar batata demonstrou-se adequado para crescimento homogêneo e formação de esporos viáveis. Com relação à formação de esporos, o período de sete dias mostrou-se eficaz na produção em quantidade suficiente para crescimento em meio líquido.

A escolha do meio líquido de inoculação foi realizada por comparação entre os diferentes meios líquidos Sabouraud (Difco) e PDSM, assim como pela formação de *pellets* e halo ao redor da parede do recipiente.

5.2.3. Triagem

Foram realizados experimentos de triagem (*screening*) para escolha das cepas que fossem capazes de biotransformar o substrato LASSBio 581 com produção de uma maior variedade de derivados ou formação de alguns deles em maior quantidade. *Absidia blakesleeana* ATCC 10148b, *Absidia blakesleeana* ATCC 22617, *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, *Mortierella isabelina* NRRL 1757, *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a e *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 foram ensaiados.

Inicialmente, foram feitas sub-culturas destes dez fungos filamentosos em ágar batata inclinado, através de repique de culturas estocadas com solução de glicerol a 25% e manutenção por sete dias a 27°C (câmara climática BOD Fanem 345 Micronal). Subseqüente ao período de sete dias, erlenmeyers com capacidade de 250mL e gargalo largo, contendo 100mL de meio líquido PDSM (II), foram inoculados com uma gota da suspensão de esporos (preparados com solução de glicerol a 25%) destes crescimentos de sete dias, e mantidos em agitação de 200rpm e 27°C (shaker Tecnal modelo TE-420).

Sessenta e cinco horas após a inoculação do meio PDSM, foram adicionados 50mg do substrato LASSbio 581, e manteve-se a agitação de 200rpm e 27°C por 96 horas. Alíquotas em 24, 48, 72 e 96 horas foram retiradas do meio reacional em duplicata e assepticamente em fluxo laminar, usando pipetas de Paster lavadas com

solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Os erpendorfs contendo as amostras coletadas foram centrifugados em micro centrífuga Fanem modelo 243, e o sobrenadante de incubação foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência em sistema isocrático e gradiente (descrições da análise seção 5.1.1). Para elaboração das cinéticas de biotransformação, as áreas dos picos dos diferentes derivados foram relacionadas ao tempo de incubação assim como a diminuição do substrato foi acompanhada para estabelecer o fim do processo de bioconversão.

5.2.4 Desenvolvimento e validação de metodologias para o monitoramento de bioconversões

5.2.4.1 Incubação

A formação dos produtos funcionalizados e o desaparecimento do substrato biotransformado, foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas (ou ainda em 120, 144, 168 e 190 horas) alíquotas foram retiradas do meio reacional em duplicata e asépticamente em fluxo laminar, com auxílio de pipetas de Paster lavadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Os erpendorfs contendo as amostras coletadas, foram centrifugados em micro centrífuga Fanem modelo 243, e o sobrenadante de incubação foi transferido para outro erpendorf para posterior análise.

O sobrenadante obtido por micro centrifugação foi agitado com acetato de etila e a fração orgânica foi coletada para análise por CCD. Várias fases móveis foram testadas segundo especificado na seção 5.1.1.

Para CLAE, o sobrenadante coletado foi injetado diretamente no cromatógrafo e analisado em sistema gradiente ou isocrático (seção 5.1.1.).

5.2.4.2 Separação e purificação dos produtos formados

A separação e purificação dos produtos formados, foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna segundo determinado na seção 5.1.1. Para acompanhamento da separação dos compostos encontrados, as frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (cromatofolhas de alumínio TCL 20x20cm Sílica gel 60 F₂₅₄ MERCK) usando como fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 e iodo ressublimado como revelador.

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. Utilização da luz UV e a extração dos compostos de interesse, foi procedida conforme seção 5.1.1.

Recristalização também foi empregada para separação e purificação dos compostos formados, como método único ou adicional à cromatografia de adsorção. Solventes de diferentes polaridades como ciclohexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água foram utilizados na separação destes diversos produtos. Os compostos solúveis nestes diferentes solventes (ou na mistura de alguns deles quando necessário) foram retirados com auxílio de pipeta de paster e analisados por cromatografia camada delgada (cromatofolhas de alumínio TCL 20x20cm Sílica gel 60 F₂₅₄ MERCK, fase móvel acetato de etila/metanol 95:05 e revelador iodo ressublimado) e cromatografia líquida de alta eficiência (método isocrático ou gradiente conforme seção 5.1.1.).

5.2.5 Extração dos produtos formados

A fração aquosa obtida a partir da filtração do micélio fúngico foi extraída três vezes com 250mL de acetato de etila P.A. ou grau HPLC (total de 750mL) em funil de separação de 2000mL. A cada porção de 250mL de acetato de etila adicionada, agitava-se vigorosamente e coletava-se a fração orgânica em recipiente contendo sulfato de magnésio anidro. A fração orgânica coletada foi filtrada a vácuo em funil de vidro sinterizado e seca em rotavapor para posterior separação e purificação dos produtos formados.

5.2.6 Isolamento e Purificação

Em uma haste de metal foi colocado um suporte para preparação da coluna cromatográfica. Ao suporte, inicialmente colocou-se uma pequena camada de lã de vidro e sobre esta uma camada de areia. Em um béquer, sílica gel para cromatografia em coluna, foi dissolvida na fase móvel (acetato de etila/metanol 95:05, acetato de etila/metanol 70:30 e/ou acetato de etila/metanol 50:50) e transferida para o suporte com auxílio de um funil de vidro. A sílica transferida foi compactada com vácuo até a formação de uma coluna com 27cm de comprimento (diâmetro foi de 2cm).

Como o extrato bruto não foi solúvel na fase móvel, adicionou-se pequena quantidade de Sílica para transformá-lo em um pó fino. O pó fino formado foi então colocado sobre a coluna de sílica formando uma camada reta, e sobre esta uma pequena camada de areia. A fase móvel foi adicionada devagar para evitar a formação de reentrâncias, e de maneira contínua com auxílio de um funil de separação.

As frações foram coletadas em tubos de ensaio e o processo de separação e extração foi acompanhado por CCD (condições especificadas na seção 5.1.1.). Pela análise das placas cromatográficas, os tubos de ensaio contendo as frações de mesmo R_fs foram misturados e secas em rotavapor.

Recristalização também mostrou-se eficaz para isolamento e purificação dos diferentes produtos formados (em substituição ao processo de cromatografia de adsorção) tendo sido realizado conforme descrito em 5.2.4.2.

5.2.7 Ensaio em escala semi-preparativa

Para os ensaios em escala semi-preparativa, erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de meio líquido PDSM (II) foram inoculados com uma gota da suspensão de esporos (formada a partir de crescimento recente de sete dias à temperatura de 27°C) e mantidos em agitação de 200rpm e 27°C. Para solubilização do substrato LASSBio 581 etanol P.A. e dimetilformamida P.A. foram testados. LASSBio 581 mostrou-se parcialmente solúvel em etanol e totalmente solúvel em dimetilformamida. Diante da solubilidade exposta, o substrato LASSBio 581 solubilizado em dimetilformamida ou na mistura de dimetilformamida/etanol 1:1 foi adicionada aos erlenmeyers inoculados, após sessenta e cinco horas, mantendo o tempo de inoculação por até 168 horas (tempo final da incubação dependia da escolha dos produtos a serem obtidos).

Terminado o tempo de incubação, a mistura reacional foi filtrada em funil de buchner usando gaze. A fração aquosa obtida foi supersaturada com cloreto de sódio, filtrada a vácuo em camada de celite para retirada do excesso de cloreto de sódio e extraída três vezes com acetato de etila. Sulfato de magnésio anidro, usado para eliminar possível água que estivesse misturada à porção orgânica, foi separado

por filtração em funil de vidro sinterizado. O solvente da fração orgânica foi evaporado em rotavapor e os produtos sintetizados foram separados por flash cromatografia, cromatografia em camada delgada preparativa e/ou por recristalização, acompanhada por cromatografia em camada delgada.

Para extração de prováveis metabólitos que tenham ficado retidos na massa fúngica, esta massa amorfa foi agitada com acetona por aproximadamente duas horas. Os produtos detectados após este processo de extração foram então separados e purificados por recristalização.

5.2.7.1 1º Ensaio (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 72h)

Para um primeiro ensaio em escala semi-preparativa, nove erlenmeyers foram inoculados com uma suspensão de esporos de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Após sessenta e cinco horas, foram adicionados 50 mg do substrato LASSBio 581 solubilizado em mistura de dimetilformamida (DMF) e etanol na proporção de 1:1, à cada um dos nove erlenmeyers. O tempo de incubação, após a adição do substrato foi de 72 horas com retirada de alíquotas para monitoramento da reação a cada 24 horas. Após as 72 horas, a mistura reacional foi filtrada, e o filtrado obtido foi supersaturado com cloreto de sódio. O peso do extrato bruto obtido foi de 334mg.

Após extração do filtrado, com acetato de etila, os produtos formados foram separados e purificados por cromatografia de adsorção em coluna, usando como fase estacionária Sílica gel e acetato de etila/metanol 95:05 como fase móvel (conforme descrito na seção 5.1.1). Foram observados 14 manchas com valores de R_fs diferentes. Para purificação adicional, foi realizada cromatografia em camada delgada preparativa (placas analíticas) conforme especificado na seção 5.1.1. O

peso da soma das frações separadas da fração aquosa foi de 144,7mg, obtendo um rendimento de 32%.

5.2.7.2 2º Ensaio (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, solvente: dimetilformamida, tempo de reação: 96h)

Em um segundo ensaio semi-preparativo, dez erlenmeyers foram inoculados com esporos de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Após sessenta e cinco horas, foram adicionados 30mg do substrato LASSBio 581 solubilizado em dimetilformamida, a cada um dos nove erlenmeyers. O tempo de incubação, após a adição do substrato foi de 96 horas com retirada de alíquotas para monitoramento da reação a cada 24 horas. Ao final do tempo de incubação, a mistura reacional foi filtrada e o filtrado obtido foi supersaturado com cloreto de sódio. O peso do extrato bruto obtido foi 185 mg.

Seguida à extração do filtrado, com acetato de etila, os produtos sintetizados foram separados e purificados por cromatografia de adsorção em coluna, usando Sílica gel como fase estacionária e acetato de etila/metanol 95:05 como fase móvel. Foram observados 15 manchas com valores de R_fs diferentes. O peso da soma das frações separadas da fração aquosa foi de 62,1mg, obtendo um rendimento de 20,7%.

5.2.7.3 3º Ensaio (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 190h)

Um terceiro ensaio em escala semi-preparativa, foi realizado usando dez erlenmeyers e inoculação com suspensão de esporos de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Após sessenta e cinco horas, foram adicionados a cada um dos dez erlenmeyers aproximadamente 42mg do substrato LASSBio 581 solubilizado em

mistura de dimetilformamida e etanol na proporção de 1:1. O tempo de incubação, após a adição do substrato foi de 190 horas com retirada de alíquotas para monitoramento da reação a cada 24 horas. Após 190 horas, a mistura reacional foi filtrada e o filtrado obtido foi supersaturado com cloreto de sódio. O peso do extrato bruto obtido foi 601,6mg.

Após extração do filtrado, com acetato de etila, os produtos sintetizados foram separados e purificados por cromatografia de adsorção em coluna, usando como fase estacionária Sílica gel e acetato de etila/metanol 95:05 como fase móvel. Observou-se 17 manchas com valores de R_fs diferentes. Quando necessário purificação adicional, realizou-se processo de recristalização. O peso da soma das frações separadas da fração aquosa foi de 49,9mg, obtendo um rendimento de 11,8%.

A extração da biomassa com acetona e agitação mecânica por aproximadamente duas horas também foi realizada na busca de prováveis metabólitos presentes no meio intracelular fúngico. Após extração, os produtos encontrados foram separados e purificados por recristalização.

5.2.7.4 4º Ensaio (Cepa: *Mortierella isabelina* NRRL 1757, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 168h)

Em um quarto ensaio semi-preparativo, nove erlenmeyers foram inoculados com suspensão de esporos de *Mortierella isabelina* NRRL 1757. Após sessenta e cinco horas, foram adicionados 50mg do substrato LASSBio 581 solubilizado em mistura de dimetilformamida e etanol na proporção de 1:1 a cada um dos erlenmeyers. O tempo de incubação, após a adição do substrato foi de 168 horas com retirada de alíquotas para monitoramento da reação a cada 24 horas. Após 168

horas, a mistura reacional foi filtrada e o filtrado obtido foi supersaturado com cloreto de sódio. O peso do extrato bruto obtido foi 319,1mg.

Após extração do filtrado, com acetato de etila, os produtos sintetizados foram separados e purificados por cromatografia de adsorção em coluna, usando como fase estacionária Sílica gel e acetato de etila/metanol em diferentes proporções (acetato de etila/metanol 95:05, acetato de etila/metanol 70:30, acetato de etila/metanol 50:50, metanol puro) como fase móvel. Observou-se 9 manchas com valores de R_fs diferentes. Quando necessário, para purificação adicional, foi realizado processo de recristalização. O peso da soma das frações separadas da fração aquosa foi de 240,42mg, obtendo um rendimento de 48,084%.

A micélio fúngico separado da fração aquosa foi tratado com acetona (agitação mecânica por aproximadamente duas horas), na busca de prováveis produtos funcionalizados que estivessem no meio intracelular fúngico. Após extração com acetona, os produtos encontrados foram separados e purificados por recristalização.

5.2.7.5 5º Ensaio (Cepa: *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, solvente: dimetilformamida/etanol 1:1, tempo de reação: 96h)

Quinto ensaio em escala semi-preparativa foi realizado, utilizando dez erlenmeyers inoculados com suspensão de esporos de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Após sessenta e cinco horas, foram adicionados a cada erlenmeyer 50mg do substrato LASSBio 581 solubilizado em mistura de dimetilformamida e etanol na proporção de 1:1. O tempo de incubação, após a adição do substrato foi de 96 horas com retirada de alíquotas para monitoramento da reação a cada 24

horas. Após 96 horas, a mistura reacional foi filtrada e o filtrado obtido foi supersaturado com cloreto de sódio.

Após extração do filtrado, com acetato de etila, os produtos sintetizados foram separados e purificados por recristalização. Observou-se 12 manchas com valores de rfs diferentes.

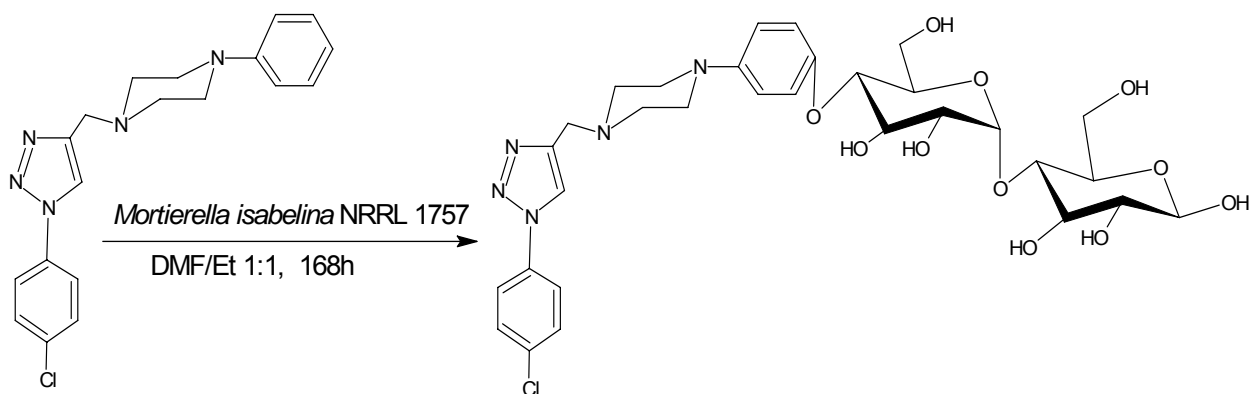
A biomassa separada da fração aquosa foi tratada com acetona (agitação mecânica por aproximadamente duas horas) e após extração, os produtos encontrados foram separados e purificados também por recristalização.

Tabela 6. Diferentes parâmetros avaliados entre quatro dos ensaios realizados em escala semi preparativa

	Incubação (horas)	Número de manchas (Rfs)	Peso das frações (mg)	Substrato (mg) /Rendimento (%)	Solventes	Peso extrato bruto (mg)	Cepa
1° Ensaio	72	14	144,7	450 (32)	DMF + etanol (1:1)	334	<i>C. echinulata</i> ATCC 9244
2° Ensaio	96	15	62,1	300 (20,7)	DMF	185	<i>C. echinulata</i> ATCC 9244
3° Ensaio	190	17	49,9	≈ 420 (11,8)	DMF + etanol (1:1)	601,6	<i>C. echinulata</i> ATCC 9244
4° Ensaio	168	9	240,42	450 (48,084)	DMF + etanol (1:1)	319,1	<i>M. isabellina</i> NRRL 1757

5.2.8 Isolamento dos metabólitos

5.2.8.1 LaBioCon 1



Após incubação do substrato LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757, conforme descrito na seção 5.2.7.4, a massa fúngica separada do meio reacional foi colocada em agitação magnético com 200mL de acetona por aproximadamente duas horas. A fração cetônica obtida foi evaporada em rotavapor e o LaBiocon 1 foi separado dos demais produtos formados por recristalização. No processo de recristalização, inicialmente a fração cetônica foi dividida em duas partes, uma solúvel em metanol e outra insolúvel. A porção solúvel em metanol foi ainda dividida em duas outras porções, uma solúvel em ciclohexano e outra insolúvel em ciclohexano. Da porção insolúvel em ciclohexano parte foi solúvel em acetato de etila e parte não. A partir da fração cetônica solúvel em metanol, insolúvel em ciclohexano e solúvel em acetato de etila obteve-se o produto diglicosilado LaBiocon 1 que apresentou tempo de retenção de 5,24 (análise por cromatografia líquida de alta eficiência usando como fase móvel: metanol e metanol/tampão 65:35 em sistema gradiente, condições da análise conforme descrito em 5.1.1) e quantidade de 4,3mg na forma de cristais amarelados. O percentual de formação do

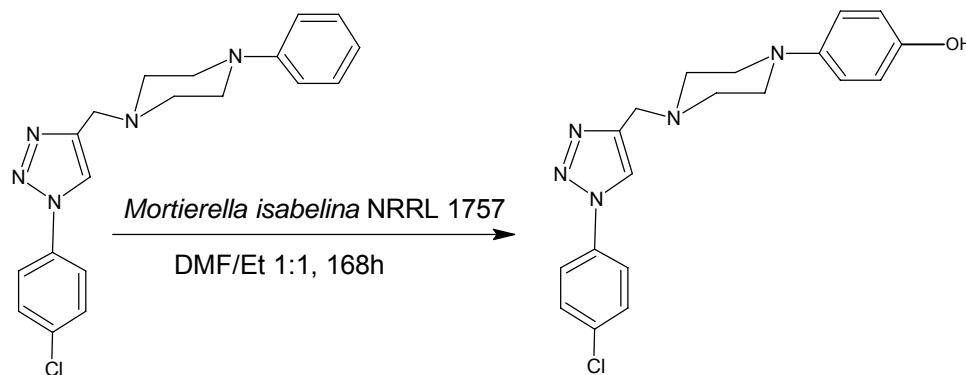
derivado LaBiocon 1 em relação aos demais compostos de estruturas preditas foi de aproximadamente 32,35%.

RMN ^1H (500MHz) MeOH- d_4 (δ -ppm): 1,28-1,32 (4H, m, H₈ e H₁₂); 3,21-3,25 (4H, m, H₉ e H₁₁); 3,29(2H, s, H₆); 3,49-3,65 (2H, m, H₂₁ e H₂₅); 3,78 (2H, s, H₃₄); 3,80 (2H, s, H₃₂); 3,99 (1H, s, H₂₂); 4,20 (1H, s, H₁₅); 4,23 (1H, s, H₁₄); 4,27 (1H, m, H₁₈); 4,28 (1H, m, H₂₆); 4,35 (8H, s, 7H-OH e 1H-H₁₉); 5,11(1H, s, H₁₇); 5,34(1H, s, H₂₄); 6,71-6,73 (2H, d, J=7,2 Hz, H_{2''} e H_{6''}); 6,89- 6,91 (2H, d, J=7,2 Hz, H_{3''} e H_{5''}); 7,63 (2H, d, J=7,0 Hz, H_{3'} e H_{5'}); 7,89 (2H, d, J=7,2 Hz, H_{2'} e H_{6'}); 8,71 (1H, s, H₅).

MS (100 a 700 Daltons, MeOH):

m/z= 352,58 [M⁺]; 680,6 [M⁺ + C₁₂H₂₁O₁₀]

5.2.8.2 LaBioCon 9



Para obtenção do produto LaBiocon 9, procedeu-se incubação do substrato LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757, conforme descrito na seção 5.2.7.4. O tratamento da massa fúngica com acetona, desenvolveu-se conforme descrito para LaBiocon 1 na seção 5.2.8.1. No processo de recristalização,

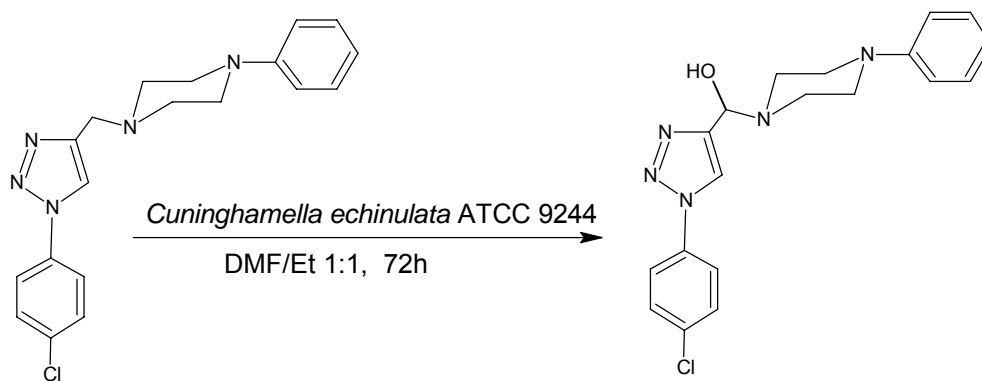
inicialmente a fração cetônica obtida foi dividida em duas partes, uma solúvel em metanol e outra insolúvel. A porção solúvel em metanol foi ainda dividida em duas outras porções, uma solúvel em ciclohexano e outra insolúvel em ciclohexano. A porção insolúvel em ciclohexano foi parte insolúvel em acetato de etila e parte solúvel. A partir da fração cetônica solúvel em metanol, insolúvel em ciclohexano e insolúvel em acetato de etila obteve-se o produto hidroxilado LaBiocon 9 que apresentou tempo de retenção de 5,21 (análise por cromatografia líquida de alta eficiência usando como fase móvel: metanol e metanol/tampão 65:35 em sistema gradiente, condições da análise conforme descrito em 5.1.1) e forma de cristais brancos. O percentual de formação do derivado LaBiocon 9 em relação aos demais compostos de estruturas preditas foi de aproximadamente 28,97%.

RMN ^1H (500 MHz) MeOH- d_4 (δ -ppm): 1,27-1,29 (4H, m, H_8 e H_{12}); 3,21-3,25 (4H, m, H_9 e H_{11}); 3,29 (2H, s, H_6); 4,29 (1H, s, OH); 6,71-6,72 (2H, d, $J=7,0$ Hz, $\text{H}_{2''}$ e $\text{H}_{6''}$); 6,88-6,90 (2H, d, $J=7,0$ Hz, $\text{H}_{3''}$ e $\text{H}_{5''}$); 7,60-7,62 (2H, d, $J=7,0$ Hz, $\text{H}_{3'}$ e $\text{H}_{5'}$); 7,89-7,90 (2H, d, $J=7,0$ Hz, $\text{H}_{2'}$ e $\text{H}_{6'}$); 8,70 (1H, s, H_5).

MS (100 a 700 Daltons, MeOH):

$m/z = 352,58$ [M^+]; $370,41$ [$\text{M}^+ + \text{OH}$]

5.2.8.3 LaBioCon 10



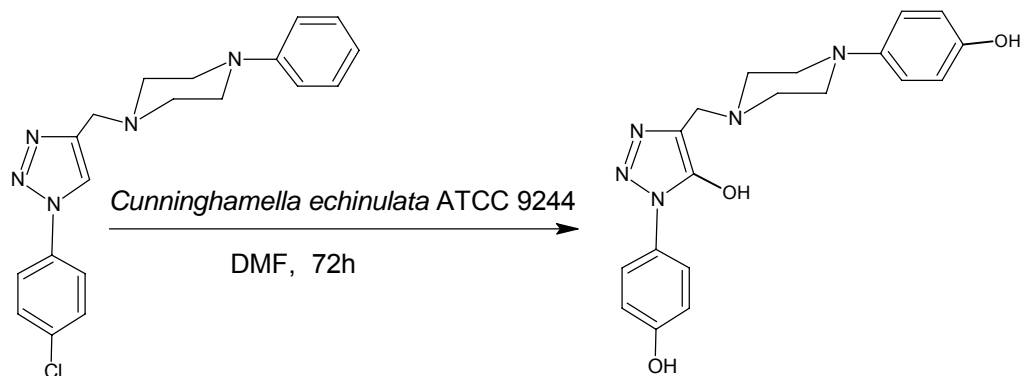
A incubação do substrato LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, filtração, extração da fração aquosa (meio reacional), separação e purificação dos produtos formados, conforme descrito na seção 5.2.7.1, foi realizada para obtenção do LaBiocon 10. Após separação dos produtos formados, os diferentes compostos foram secos em rotavapor e solubilizados em solvente adequado. O produto hidroxilado LaBiocon 10 foi insolúvel em metanol e solúvel em acetato de etila. Foram obtidas 18mg deste composto na forma de pó branco e observou-se tempo de retenção de 3,03 (análise por cromatografia líquida de alta eficiência usando como fase móvel: metanol/tampão 65:35 em sistema isocrático, condições da análise conforme descrito em 5.1.1). O percentual de formação do derivado LaBiocon 10 em relação aos demais compostos de estruturas previstas foi de aproximadamente 7,88%.

RMN ^1H (500 MHz) MeOH- d_4 (δ -ppm): 2,67-2,70 (4H, m, H_8 e H_{12}); 3,12-3,15 (4H, m, H_9 e H_{11}); 3,74 (1H, s, OH); 6,76-6,78 (1H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{4''}$); 6,88-6,90 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H_3' e H_5'); 7,15-7,17 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{3''}$ e $\text{H}_{5''}$); 7,49-7,51 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H_2'' e H_6''); 7,78-7,80 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H_2' e H_6'); 8,44 (1H, s, H_5).

MS (100 a 700 Daltons, MeOH):

m/z= 354,3 [M⁺]; 370,4 [M⁺ + 17]

5.2.8.4 LaBioCon 12

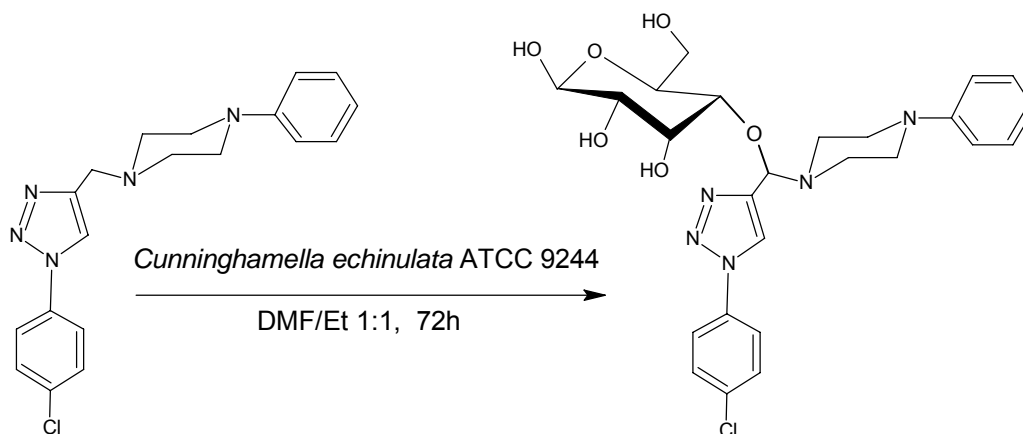


O produto dihidroxilado LaBiocon 12, foi obtido pela incubação do substrato LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, filtração, extração da fração aquosa, separação e purificação dos produtos formados, conforme seção 5.2.7.1. Após separação dos produtos formados, o composto LaBiocon 12 em mistura com outro produto foi seco em rotavapor e solubilizado em metanol. Para separação dos dois compostos, purificação adicional foi realizada por cromatografia em camada delgada preparativa segundo seção 5.1.1. Foram obtidas 18mg na forma de cristais brancos e o percentual de formação deste derivado em relação aos demais compostos de estruturas previstas foi de aproximadamente 2,03%.

MS (100 a 700 Daltons, MeOH):

m/z= 352,4 [M⁺]; 386,3 [M⁺ + 34]

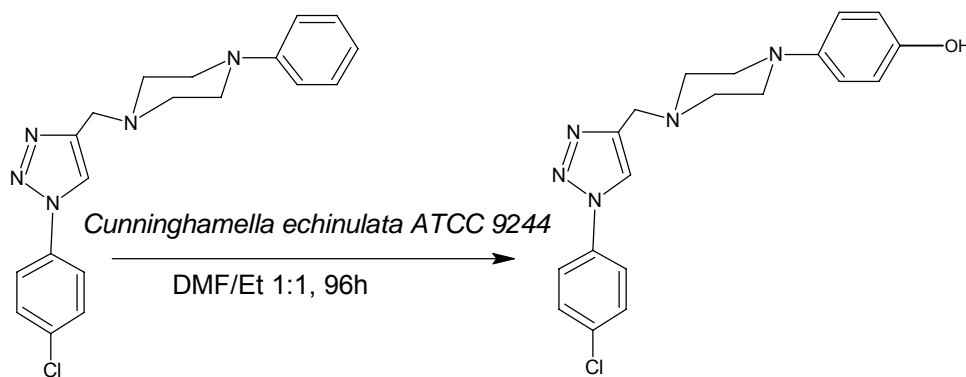
5.2.8.5 LaBioCon 13



O produto LaBiocon 13 foi obtido pela incubação do substrato LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, filtração, extração da fração aquosa (meio reacional), separação e purificação dos produtos formados, conforme descrito na seção 5.2.7.1. Após separação dos produtos formados, LaBiocon 13 foi seco em rotavapor e solubilizado em acetato de etila. Este composto glicosilado foi insolúvel em metanol e apresentou tempo de retenção de 7,21 (análise por cromatografia líquida de alta eficiência usando como fase móvel: metanol/tampão 65:35 em sistema isocrático, condições da análise conforme descrito em 5.1.1). Foram obtidas 12mg deste composto na forma de pó branco e percentual de formação de aproximadamente 14,63%.

RMN ^1H (500 MHz) MeOH- d_4 (δ -ppm): 2,74-2,77 (4H, m, H_8 e H_{12}); 3,19-3,22 (4H, m, H_9 e H_{11}); 3,30 (1H, s, H_6); 3,62 (2H, m, H_9' e H_{11}'); 3,75 (1H, m, H_{10}); 4,02 (1H, m, H_{12}'); 4,08 e 4,38 (2H, 2s, H_{14}'); 4,58 (4H, m, 4OH); 5,39 (1H, t, H_8'); 6,83 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H_4''); 6,95 e 6,97 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H_3' e H_5'); 7,20-7,22 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H_2'' e H_6''); 7,59-7,61 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H_3''' e H_5'''); 7,87 e 7,89 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H_2' e H_6'); 8,51 (1H, s, H_5).

5.2.8.6 LaBioCon 19



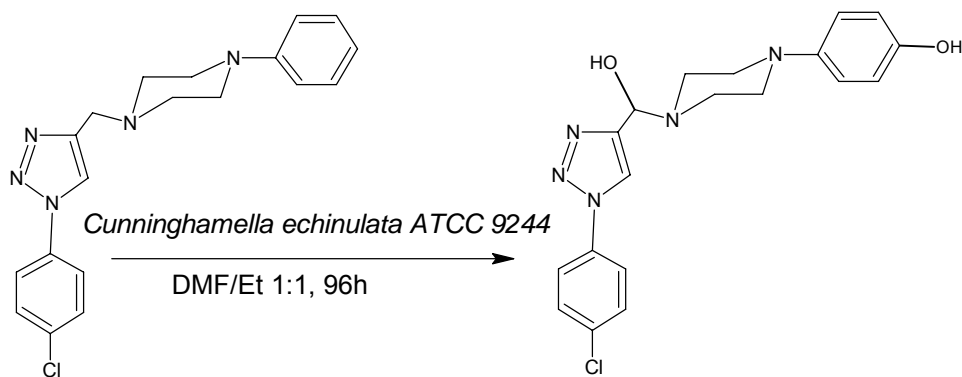
O produto LaBiocon 19 foi obtido pela incubação do substrato LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, filtração, extração da fração aquosa, separação e purificação dos produtos formados, conforme descrito na seção 5.2.7.5. No processo de recristalização, a fração orgânica seco em rotavapor foi parte solubilizada em metanol e parte solubilizada em ciclohexano. A porção solúvel em metanol e insolúvel em acetato de etila corresponde ao LaBiocon 19. Este composto foi obtida na forma de um óleo marrom, com percentual de formação em relação aos demais compostos de estruturas previstas de aproximadamente 62,5%.

RMN ^1H (500 MHz) MeOH- d_4 (δ -ppm): 1,28-1,32 (4H, m, H_8 e H_{12}); 3,00-3,21 (4H, m, H_9 e H_{11}); 3,29 (2H, s, H_6); 4,12 (1H, s, OH); 6,70-6,72 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{2''}$ e $\text{H}_{6''}$); 6,87-6,89 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{3''}$ e $\text{H}_{5''}$); 7,60-7,62 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{3'}$ e $\text{H}_{5'}$); 7,87-7,89 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{2'}$ e $\text{H}_{6'}$); 8,58 (1H, s, H_5);

MS (100 a 700 Daltons, MeOH):

$m/z = 354,2$ [M^+]; $370,2$ [$\text{M}^+ + 17$].

5.2.8.7 LaBioCon 22



O produto LaBiocon 22 foi obtido pela incubação do substrato LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, filtração e extração da biomassa com acetona conforme descrito em 5.2.7.5. No processo de recristalização, a fração cetônica seca em rotavapor foi parte solubilizada em metanol e parte solubilizada em acetato de etila. A porção solúvel em acetato de etila corresponde ao LaBiocon 22 que se apresentou amorfo com tempo de retenção de 5,07 (análise por cromatografia líquida de alta eficiência usando como fase móvel: metanol e metanol/tampão 65:35 em sistema gradiente, condições da análise conforme descrito em 5.1.1). O percentual de formação do LaBioCon 22 em relação aos demais derivados de estruturas preditas foi de aproximadamente 7,56%.

RMN ^1H (500 MHz) MeOH- d_4 (δ -ppm): 2,26 (2H, s, 2OH); 2,93-3,20 (2H, 2s, H_{11}); 2,77-3,11 (2H, 2s, H_{12}); 4,04 (1H, s, H_6); 4,84 (1H, s, H_8); 5,34 (1H, m, H_9); 6,70-6,72 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{3''}$ e $\text{H}_{5''}$); 6,86-6,88 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{2''}$ e $\text{H}_{6''}$); 7,60-7,62 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{3'}$ e $\text{H}_{5'}$); 7,87-7,89 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{2'}$ e $\text{H}_{6'}$); 8,55 (1H, s, H_5);

MS (100 a 700 Daltons, MeOH):

m/z = 354,2 [M^+]; 370,2 [$\text{M}^+ + 17$]; 386,2 [$\text{M}^+ + 34$]

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, Anthony M.; C. A. J.; DAVIS, J. Alf; PAYLOR, Michael. 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, Vanessa; LADRIL, S.; MAURS, Michèle; AZERAD, Robert. Microbial models of animal drug metabolism Part 5: Microbial preparation of human hydroxylated metabolites of irbesartan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.29, p.173-179, 2004.

AZERAD, R. Application of biocatalysts in organic synthesis. **Bull. Soc. Chim.**, v.132, p.71-51. 1995.

AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.63, p.169-218. 1999.

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

BORCHERT, H. H. Microbial models of mammal-bioconversion. **Archiv der Pharmazie**, v.324, p.401, 1991.

BOSSCHE, H. V.; KOYMANS, L. Review Article Cytochromes P450 in fungi. **Mycoses**, v.41, p.32-38, 1998.

BRINK, Hans. J. M. V. D.; GORCOM, Robert F. M. V.; HONDEL, Cees A. M. J. J. V. D.; PUNT, Peter J. Cytochrome P-450 Enzyme Systems in Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.23, p.1-17, 1998.

CARVALHO, C. C. C. R. de; FONSECA, M. M. R. da. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, p.1-9. 2005.

CERNIGLIA, C. E.; CAMPBELL, W. L.; FREEMAN, J. P.; EVANS, F. E. Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.2275-2279, 1989.

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.

DÉCOR, Anne; BELLOCQ, Delphine; THOISON, Odile; LEKIEFFRE, Nicolas; CHIARONI, Angèle; OUZZANI, Jamal; CRESTEIL, Thierry; GUÉRITTE, Françoise;

BAUDOIN, Olivier. In vitro oxidative metabolism study of (-)-rhazinilam. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p.1-7, 2005.

DÍAZ, I. R. D. **Citocromo P-450 ¿Qué, cómo y para qué?**. Acta Médica Colombiana, v.26, n.2, p.86-95, 2001. Disponível em: <http://www.actamedica.com/articulos/a60740175.htm>. Acesso em: 30 jul. 2005.

DONATO, M. T. **¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?**. Espanha, p.29-62, 2004. Disponível em: http://www.uv.es/jcastell/Citocromo_P-450.pdf. Acesso em: 30 jul. 2005.

DONATO, María Teresa; BLASCO, José Enrique O'connor. **Métodos de evaluación del citocromo P-450 y de su papel en el metabolismo de fármacos**. Espanha, 2004. Disponível em: http://www.uv.es/jcastell/Metodos_de_evaluacion_del_citocromo_P450.pdf. Acesso em: 30 jul. 2005.

Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry. Nova Iorque: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.

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.

FOSTER, B. C.; LITSTER, D. L.; ZAMECNIK, J.; COUTTS, R. T. The biotransformation of tranlylcypromine by *Cunninghamella echinulata*. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p.791-795, 1991.

FREITAG, D. G.; FOSTER, R. T.; COUTTS, R. T.; PICKARD, M. A.; PASUTTO, F. M. Stereoselective metabolism of RAC-Mexiletine by the fungus *Cunninghamella echinulata* yields the major human metabolites hydroxymethylmexiletine and P-hydroxymexiletine. **Drug Metabolism and Disposition**, v.25, n.6, p.685-692, 1997.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.17-48, 2000.

GOTOR, V.; QUIRÓS, M.; LIZ, R. Fungal and bacterial regioselective hydroxylation of pyrimidine heterocycles. **Tetrahedron**, v.53, n.18, p.6421-6432, 1997.

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

GUTIÉRREZ, María. C.; ALPHAND, Véronique; FURSTOSS, Roland. Microbiological transformations 52. Biocatalysed Baeyer-Villiger oxidation of 1-indanone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, p.231-238, 2003.

HAWES, E. M. 1996 Aspet N-Glucuronidation of Xenobiotics Symposium:

N⁺-Glucuronidation, a Common Pathway in Human Metabolism of Drugs with a Tertiary Amine Group. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.26, n.9, p.830-837, 1998.

HE, Xiangjiu; WANG, Xinluan; LIU, Bo; SU, Lina; WANG, Guanghui; QU, Gexia; YAO, Zhihong; LIU, Rui Hai; YAO, Xinsheng. Microbial transformation of methyl protodioscin by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.35, p.33-40, 2005.

HEZARI, M.; DAVIS, Patrick J. Microbial models of mammalian metabolism: Furosemide glucoside formation using the fungus *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v.21, n.2, p.259-267, 1992.

HOLLAND, Herbert. L.; QI, Jia; MANOHARAN, T. Samuel. Synthesis of (S)-4-hydroxy- α -lapachone and biotransformation of some 4-chromanones by *Mortierella isabellina* ATCC 42613. **Can. J. Chem.**, v.73, p.1399-1405, 1995.

HYLAND, R.; JONES, B. C.; SMITH, D. A. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. **Drug Metabolism and Disposition**, v.31, n.5, p.540-547, 2003.

IBRAHIM, Abdel-Rahim S. Sulfation of naringenin by *Cunninghamella elegans*. **Phytochemistry**, v.53, p.209-212, 2000.

IBRAHIM, Abdel-Rahim S.; GALAL, Ahmed. M.; MOSSA, Jaber S.; EL-FERALY Farouk S. Glucose-Conjugation of the Flavones of *Psiadia arabica* by *Cunninghamella elegans*. **Phytochemistry**, v.46, p.1193-1195, 1997.

JÜRGENS, Tannis M.; CLARK, Alice M. The metabolism of CGP-291: The use of microorganisms as models of mammalian metabolism. **Pharmaceutical Research**, v.7, n.7, p.742-745, 1990.

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

LACROIX, Isabelle; BITON, Jacques; AZERAD, Robert. Microbial Biotransformations of a Synthetic Immunomodulating Agent, HR325. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.5, n.7, p.1369-1380, 1997.

LANGOWSKI, Jan; LONG, Anthony. Computer system for the prediction of xenobiotic metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.407-415, 2002.

LECLUYSE, E. L. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p.343-368, 2001.

MAATOOQ, Galal T.; ROSAZZA, John P. N. Metabolism of daidzein by *Nocardia species* NRRL 5646 and *Mortierella isabellina* ATCC 38063. **Phytochemistry**, v.66, p.1007-1011, 2005.

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

MIRANDA, É. C. D. **Aplicação de Hidroxilação Microbiológica em Moléculas Naturais Complexas**. Monografia de final de curso. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003, 43p.

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.

MOLINARI, F.; ROMANO, D.; GANDOLFI, R.; KROPPENSTEDT, R. M.; MARINELLI, F. Newly isolated *Streptomyces* spp. as enantioselective biocatalysts: hydrolysis of 1,2-O-isopropylidene glycerol racemic esters. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.960-967, 2005.

MOODY, Joanna D.; FREEMAN, James P.; FU, Peter P.; CERNIGLIA Carl E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v.30, n.11, p.1274-1279, 2002.

MOODY, Joanna D.; FREEMAN, James P.; CERNIGLIA, Carl E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v.27, n.10, p.1157-1164, 1999.

MOODY, J. D.; HEINZE, T. M.; HANSEN Jr, E. B.; CERNIGLIA, C. E. Metabolism of the ethanolamine-type antihistamine diphenhydramine (Benadryl)TM by fungus *Cunninghamella elegans*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.53, p.310-315, 2000.

MOUSSA, Cecile; HOUZIAUX, P.; DANREE, Bernard; AZERAD, Robert. Microbial Models of Mammalian Metabolism: Fungal Metabolism of Phenolic and Nonphenolic p-Cymene-Related Drugs and Prodrugs. I. Metabolites of Thymoxamine. **Drug Metabolism and Disposition**, v.25, n.3, p.301-310, 1997.

NAKAGAWA, Keiko; MIYAKOSHI, Shunichi; TORIKATA, Akio. Microbial conversion of milbemycins: hydroxylation of milbemycin A₄ and related compounds. **The Journal of Antibiotics**, v.44, n.2, p.232-240, 1991.

O'BRIEN, P. J.; CHAN, K.; SILBER, P. M. Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo. **Chemico-Biological Interactions**, v.150, p.97-114, 2004.

OLIVEIRA, Valéria de. **Contribution a l'étude des hydroxylations microbiologiques: modulation par mutagenèse ou action des inhibiteurs de cytochromes P-450**. Tese (Doctorat). Pharmacie, Université René Descartes, Paris, 2000.

OMURA, Tsuneo. 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.62, n.7, p.988-992, 1999.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p.189-259, 2004.
- PARSHIKOV, I. A.; FREEMAN, J. P.; LAY Jr., J. O.; BEGER, R. D.; WILLIAMS, A. J.; SUTHERLAND, J. B. Regioselective transformation of ciprofloxacin to N-acetylciprofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.177, p.131-135, 1999.
- PARSHIKOV, I. A.; MURALEEDHARAN, K. M.; AVERY, M. A.; WILLIAMSON, J. S. Transformation of artemisinin by *Cunninghamella elegans*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.64, p.782-786, 2004.
- POTHULURI, J. V.; EVANS, F. E.; HEINZE, T. M.; CERNIGLIA, C. E. Formation of sulfato e glucoside conjugates of benzo[e]pyrene by *Cunninghamella elegans*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.45, p.677-683, 1996.
- PRAKASH *et al.* Characterization of the Novel Benzisothiazole Ring-Cleaved Products of the Antipsychotic Drug Ziprasidone. **Drug Metabolism and Disposition**, v.25, n.7, p.897-901, 1997.
- RAO, G. P.; DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian metabolism Biotransformation of HP 749 (Besipirdine) using *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v.25, n.6, p.709-715, 1997.
- ROSAZZA, J. P.; SMITH, R.V. Microbial models for drug metabolism. **Adv. Appl. Microbiol**, v.25, p.169-208, 1979.
- SARIASLANI, F. S. Microbial cytochromes P-450 and xenobiotic metabolism. **Adv. Appl. Microbiol**, v.36, p.133-178, 1991.
- SCHWARTZ, H.; LIEBIG-WEBER, A.; HOCHSTÄTTER, H.; BÖTTCHER, H. Microbial oxidation of ebastine. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v.44, p.731-735, 1996.
- SIQUEIRA, F. R. A. **Estudo Morfológico e Bioquímico de Microrganismos com Potencial Biotecnológico**. Trabalho final de curso (Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos e Correlatos), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.
- 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.
- SOFFERS, A. E. M. F.; BOERSMA, M. G.; VAES, W. H. J.; VERVOORT, J.; TYRAKOWSKA, B.; HERMENS, J.L.M.; RIETJENS, I.M.C.M. Computer-modeling-

based QSARs for analyzing experimental data on biotransformation and toxicity. **Toxicology in Vitro**, v.15, p.539-551, 2001.

TASSO, L.; NEVES, G.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; EIFLER-LIMA, V.L.; RATES, S.M.K.; COSTA T. D. Validated HPLC method for determination of LASSBio-581, a new heterocyclic N-phenylpiperazine derivative, in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, p.1127-1133, 2003.

Villarejo, A. D. Citocromo P-450: Reactividade, estrutura y mecanismo de acción. Citocromo P-450. Espanha, 2004. Disponível em: http://www.ranf.com/pdf/monografias/monografia_14/cap14.pdf. Acesso em: 30 jul. 2005.

WERMUTH, C. G.; **The Practice of Medicinal Chemistry**. 1. ed., Academic Press: London, 1996.

GAD, Shayne C. **Drug Safety Evaluation**. John Wiley-Interscience, 2002.

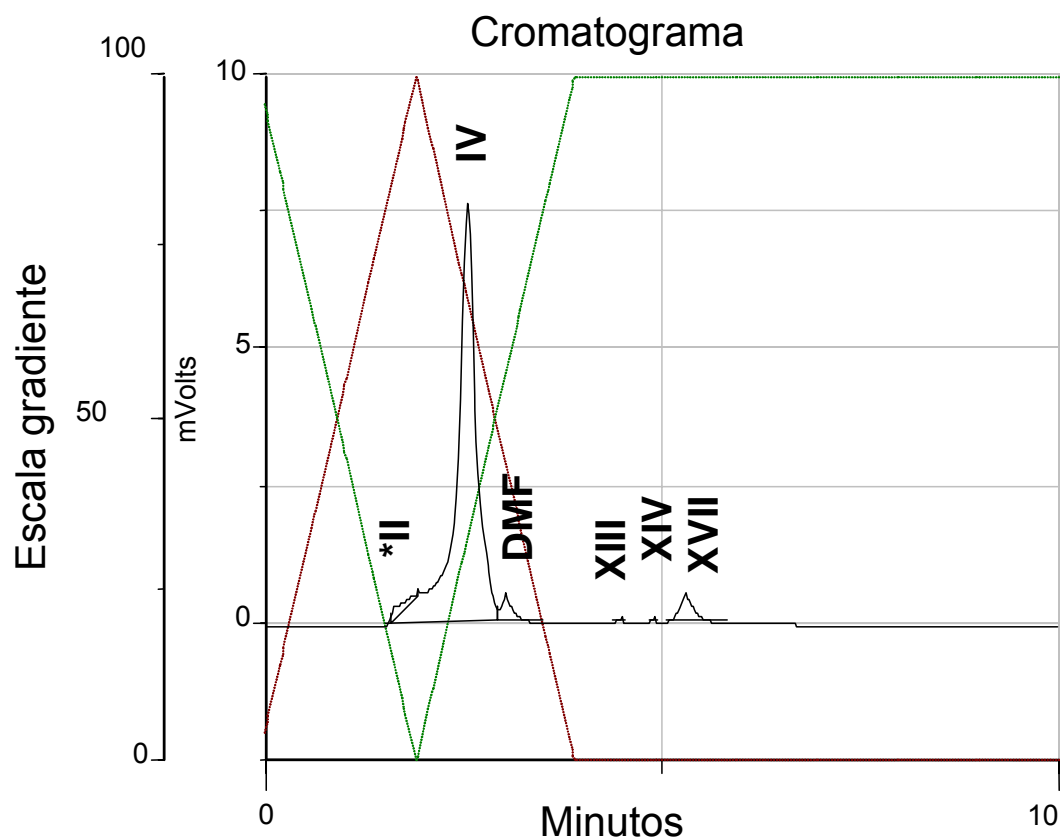
WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L.; FOYE, W. O. **Principles of Medicinal Chemistry**. 4.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995.

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, n.11, p.982-987, 1989.

ZHANG, Donglu; EVANS, Frederick E.; FREEMAN, James P.; YANG, Yifan; DECK, Joanna; CERNIGLIA, Carl E. Formation of mammalian metabolites of cyclobenzaprine by the fungus, *Cunninghamella elegans*. **Chemico-Biological Interactions**, v.102, p.79-92, 1996.

ZHANG, Donglu; HANSEN, Eugene B.; J. R.; DECK, Joanna; HEINZE, Thomas M.; HENDERSON, Allison; KORFMACHER, Walter A.; CERNIGLIA, Carl E. Fungal transformations of antihistamines: metabolism of cyproheptadine hydrochloride by *Cunninghamella elegans*. **Xenobiotica**, v.27, n.3, p.301-315, 1997.

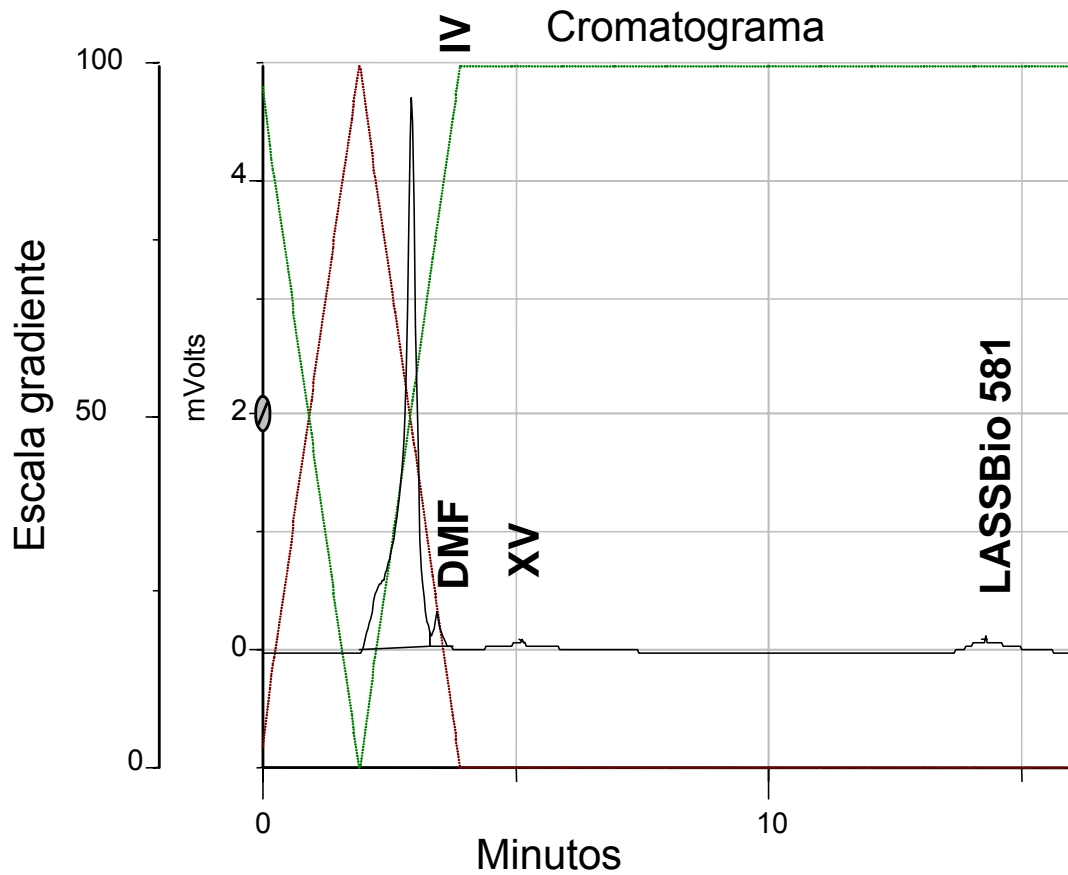
1. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Absidia blakesleana* ATCC 10148b no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm.



c:\gilson\farma\farma.101\vo121fr.gdt : Detetor UV/VIS : VOM 2
72h: Inj. Number: 4

- Metanol
- Metanol/Tampão 65:35

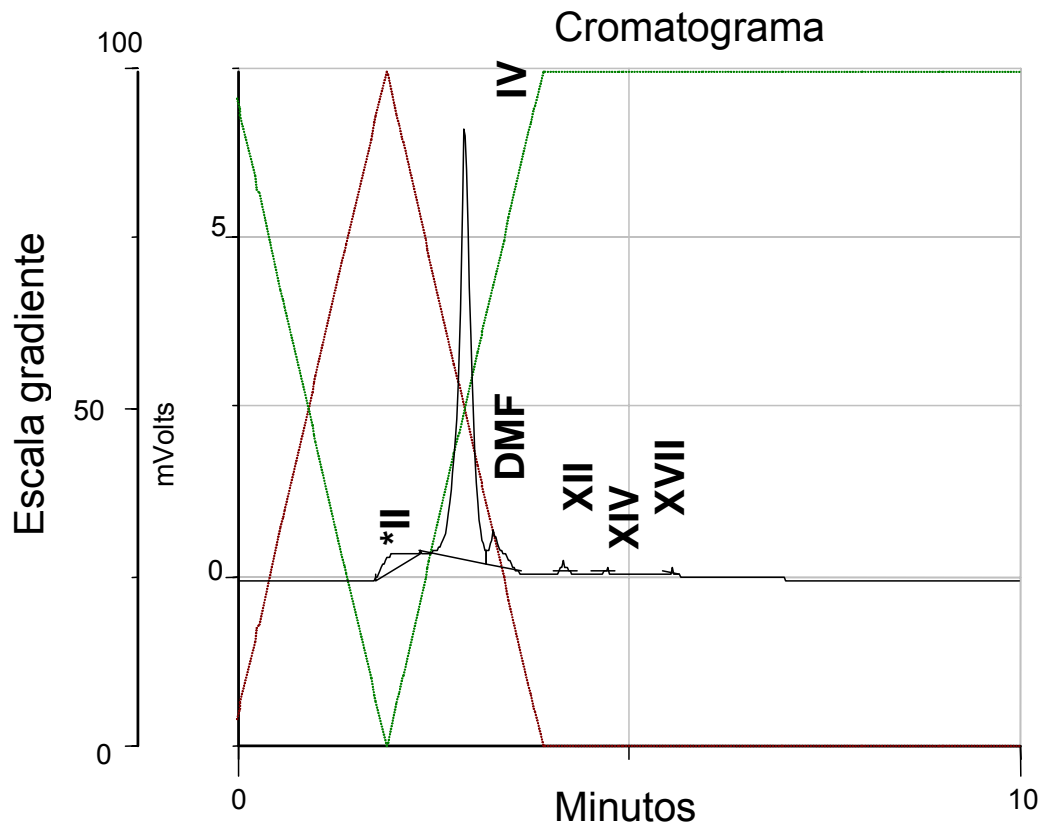
2. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Absidia blakesleana* ATCC 22617 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm.



c:\gilson\farma\farma.088\vo112fr.gdt : Detetor UV/VIS : LASSBio 581 VOM8-72h: Inj. Number: 5

- Metanol
- Metanol/Tampão 65:35

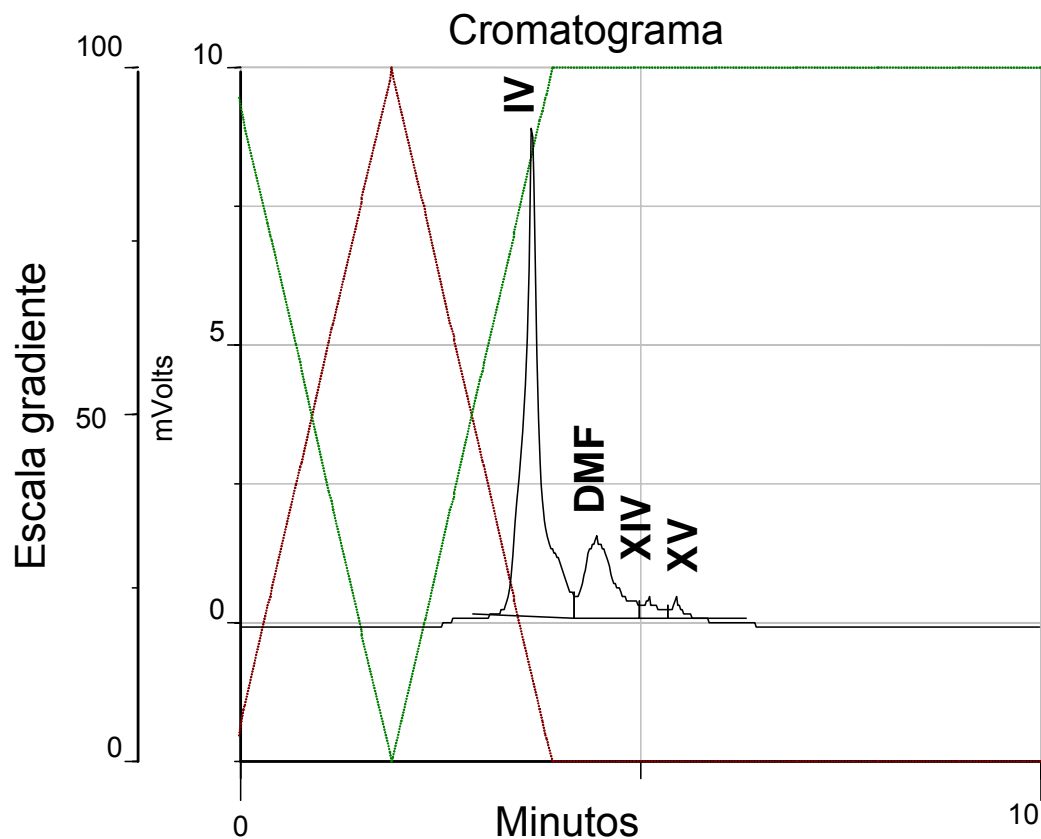
3. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009 no tempo de 72 horas e comprimento de onda 248nm.



c:\gilson\farma\farma.097\vo120fr.gdt : Detetor UV/VIS : VOM 3
72h: Inj. Number: 4

- Metanol
- Metanol/Tampão 65:35

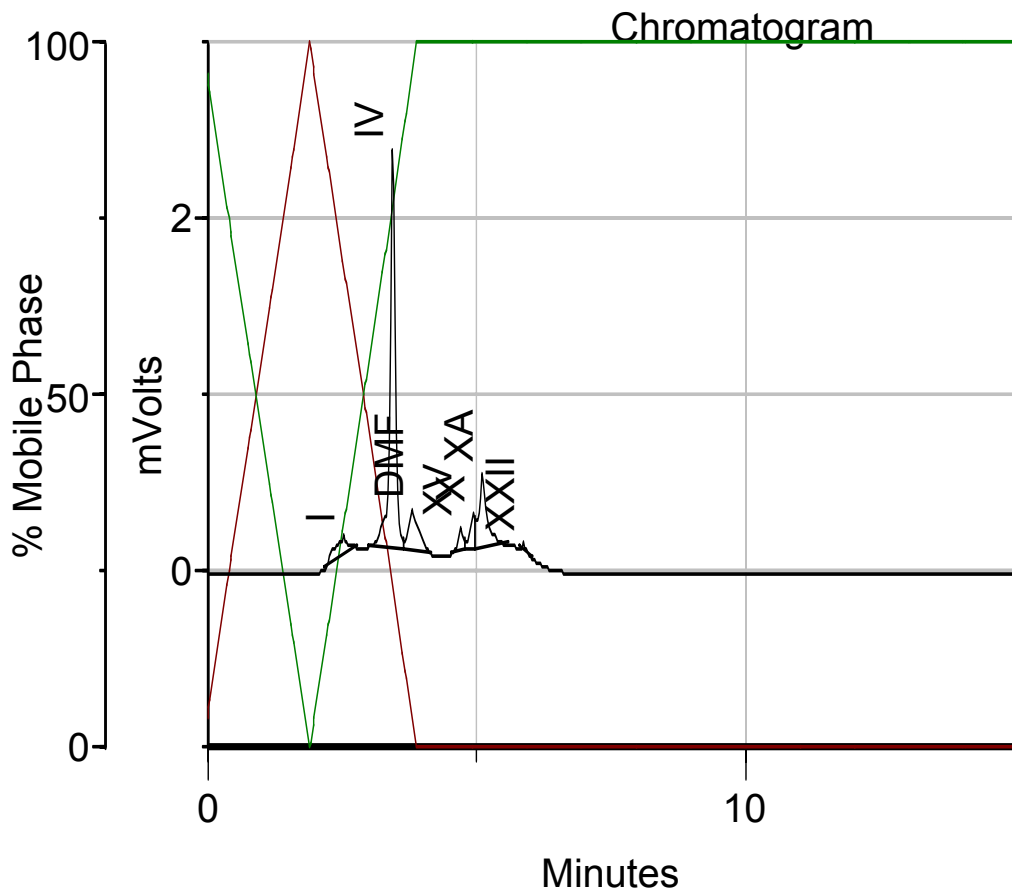
4. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Beauveria bassiana* ATCC 7159 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm.



c:\gilson\farma\farma.102\vo122fr.gdt : Detetor UV/VIS : VOM 11
96h: Inj. Number: 6

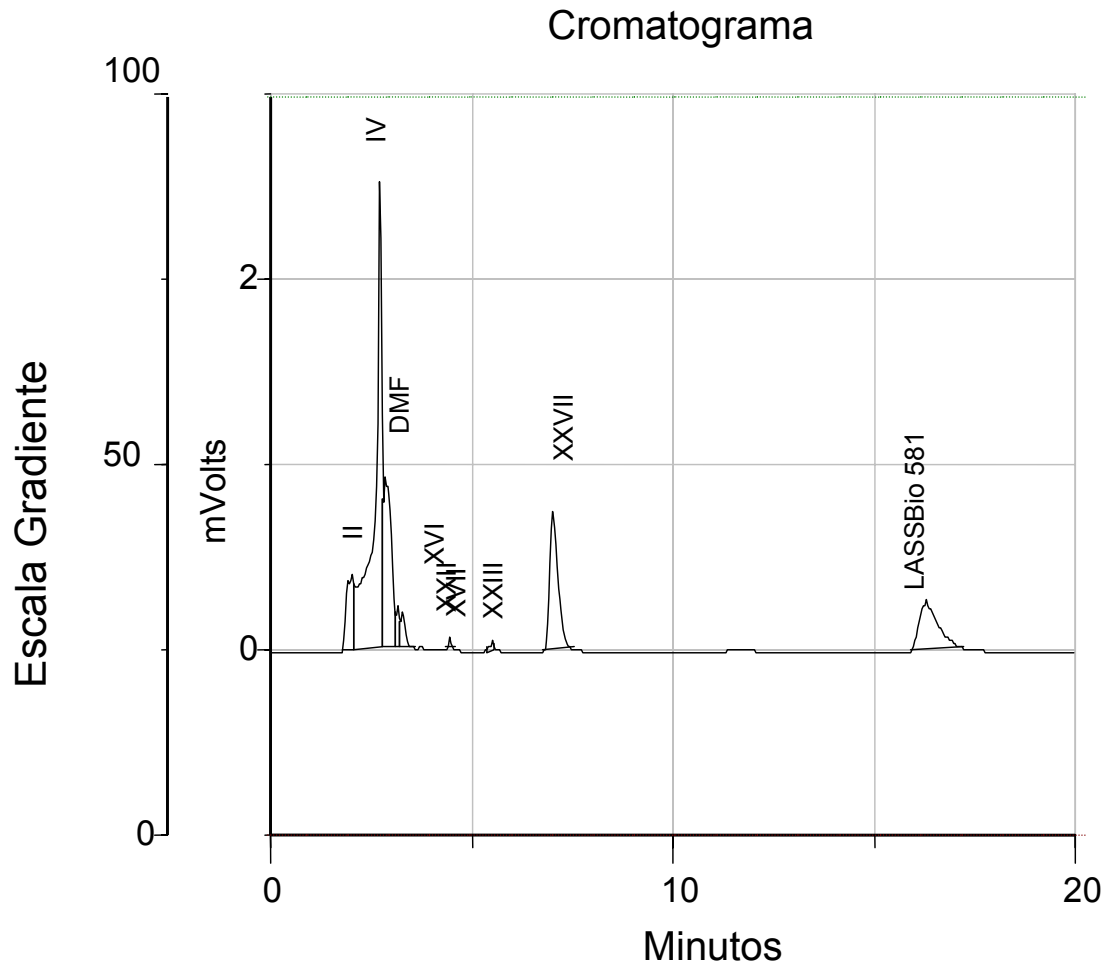
- Metanol
- Metanol/Tampão 65:35

5. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.



- Metanol
- Metanol/Tampão 65:35

6. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 no tempo de 24 em sistema isocrático, e comprimento de onda 248nm.

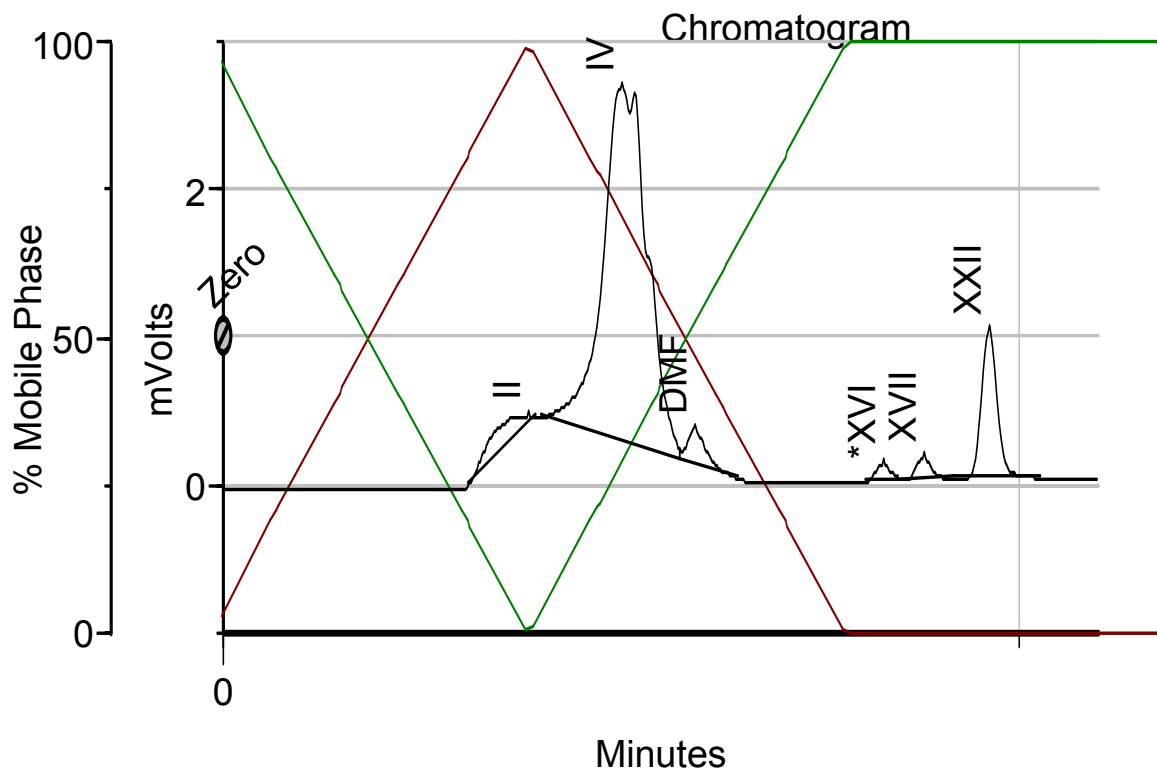


c:\gilson\farma\farma.057\vo61cin.gdt : Detetor UV/VIS : VO6-3-48h: Inj. Number: 3

..... Metanol

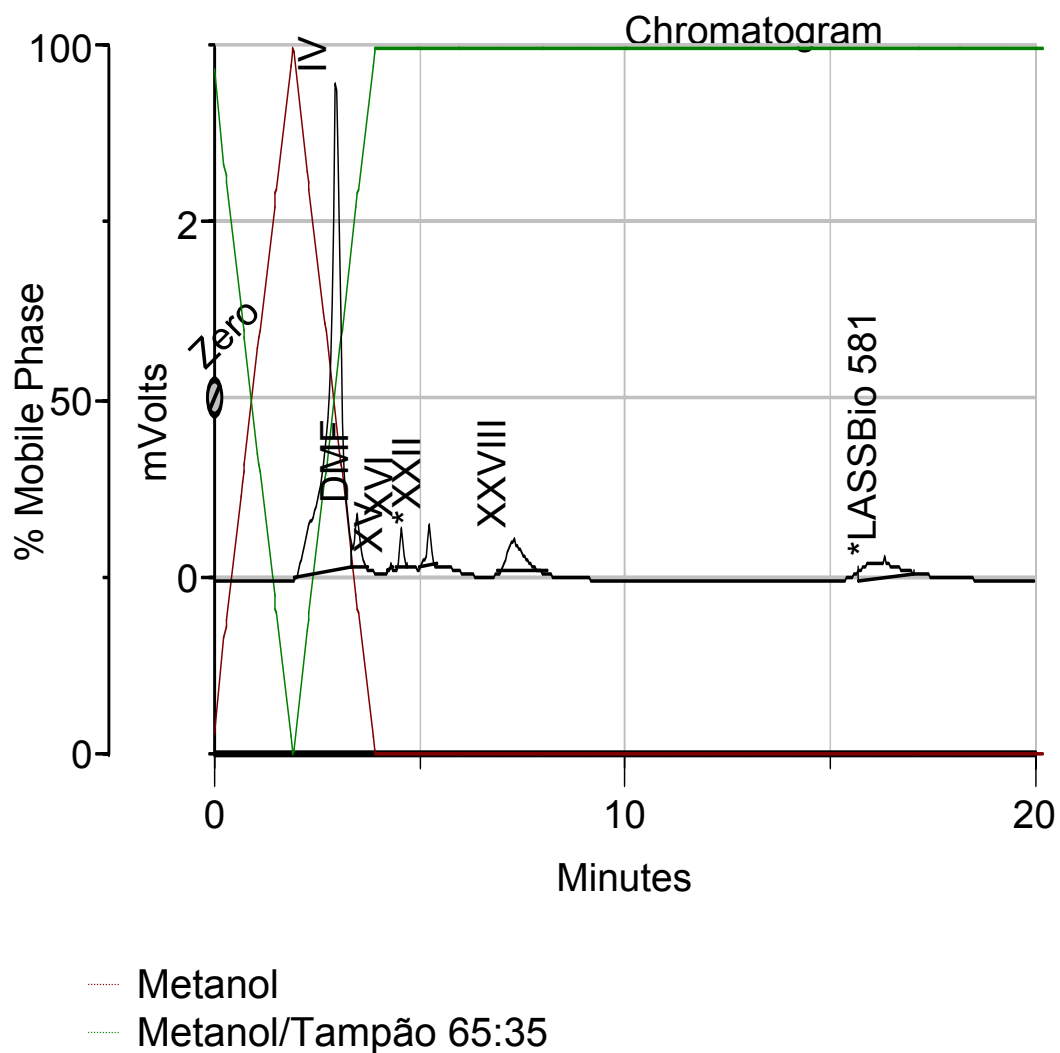
..... Metanol/Tampão 65:35

7. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 no tempo de 24 em sistema gradiente, e comprimento de onda 248nm.

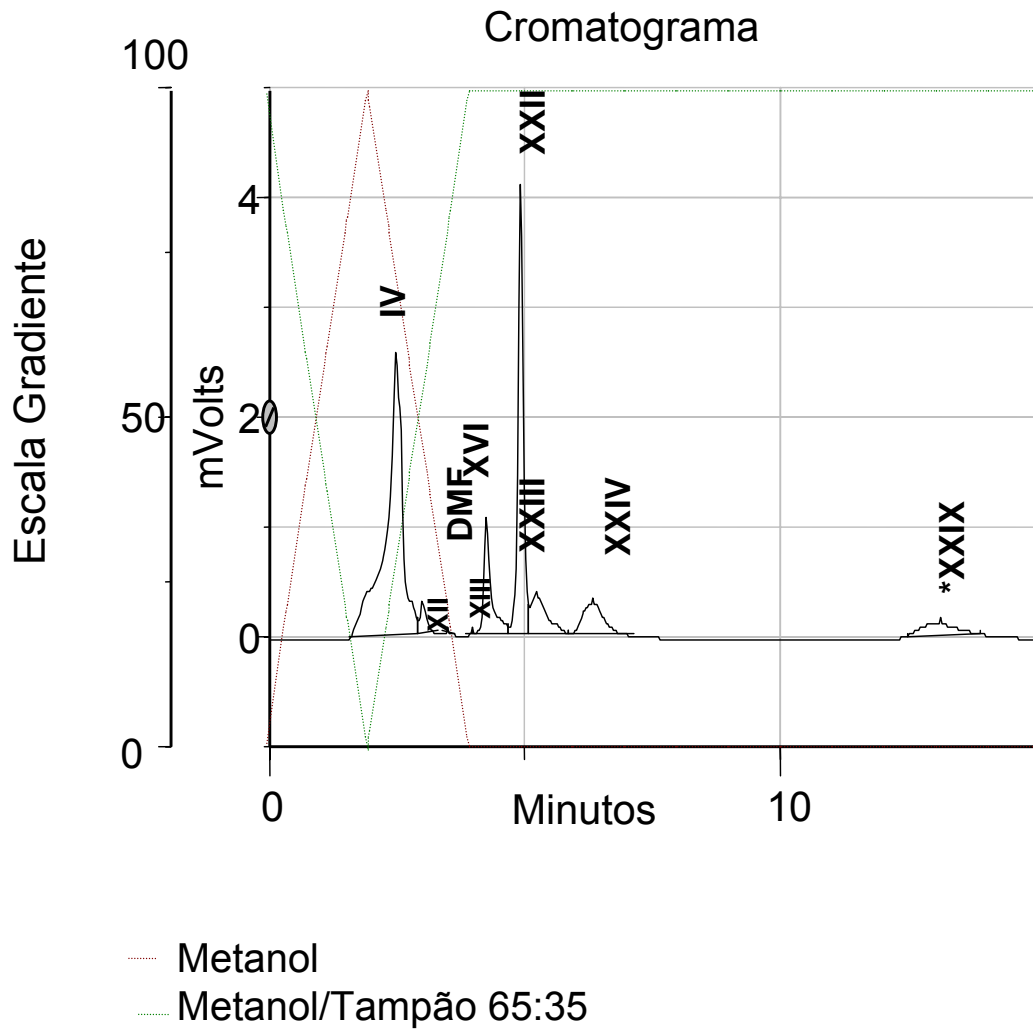


- Metanol
- Metanol/Tampão 65:35

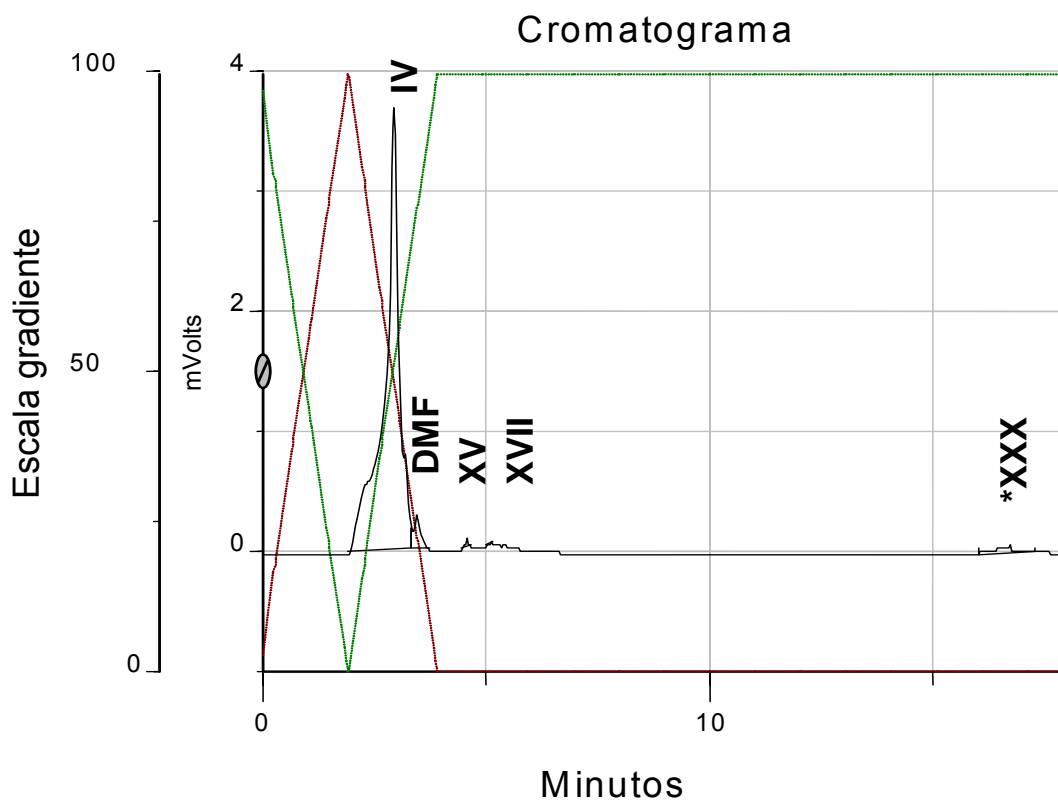
8. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.



9. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Mortierella isabelina* NRRL 1757 no tempo de 96 horas e comprimento de onda 248nm.



10. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Mucor griosyanus* ATCC 1207a no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.

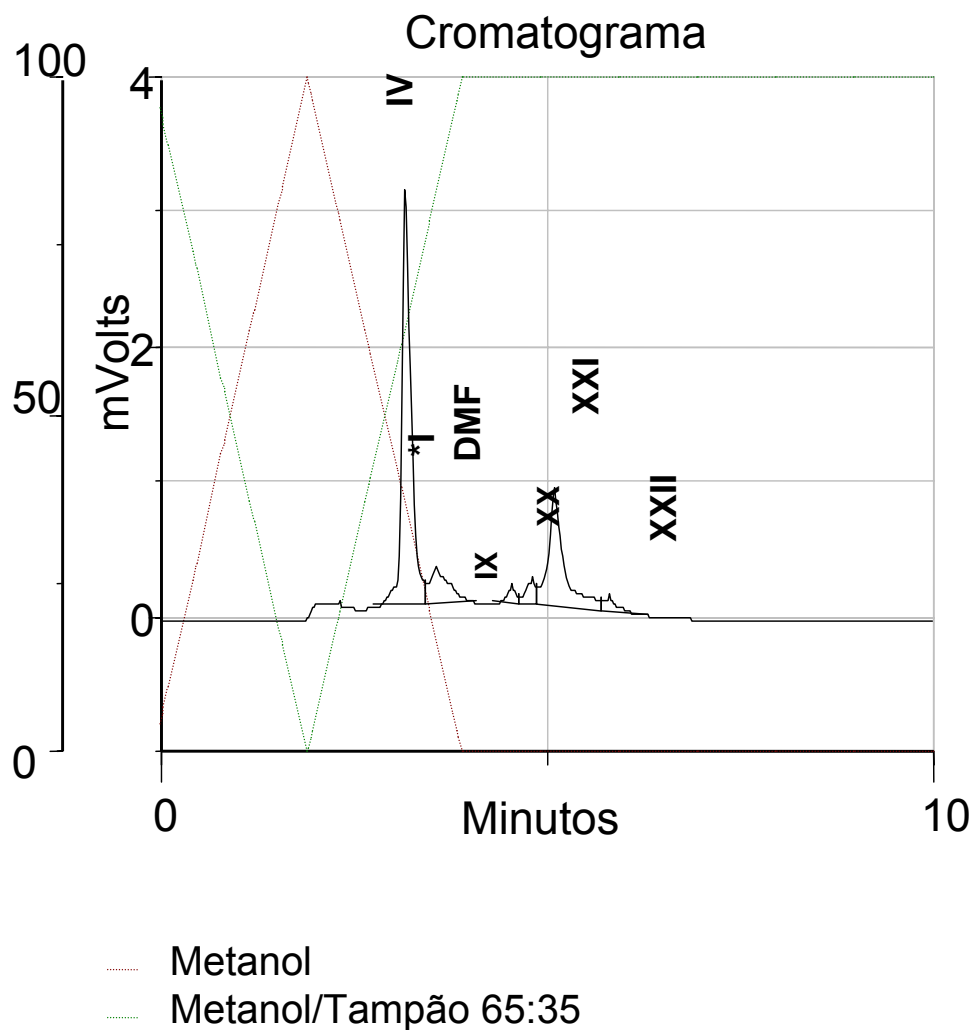


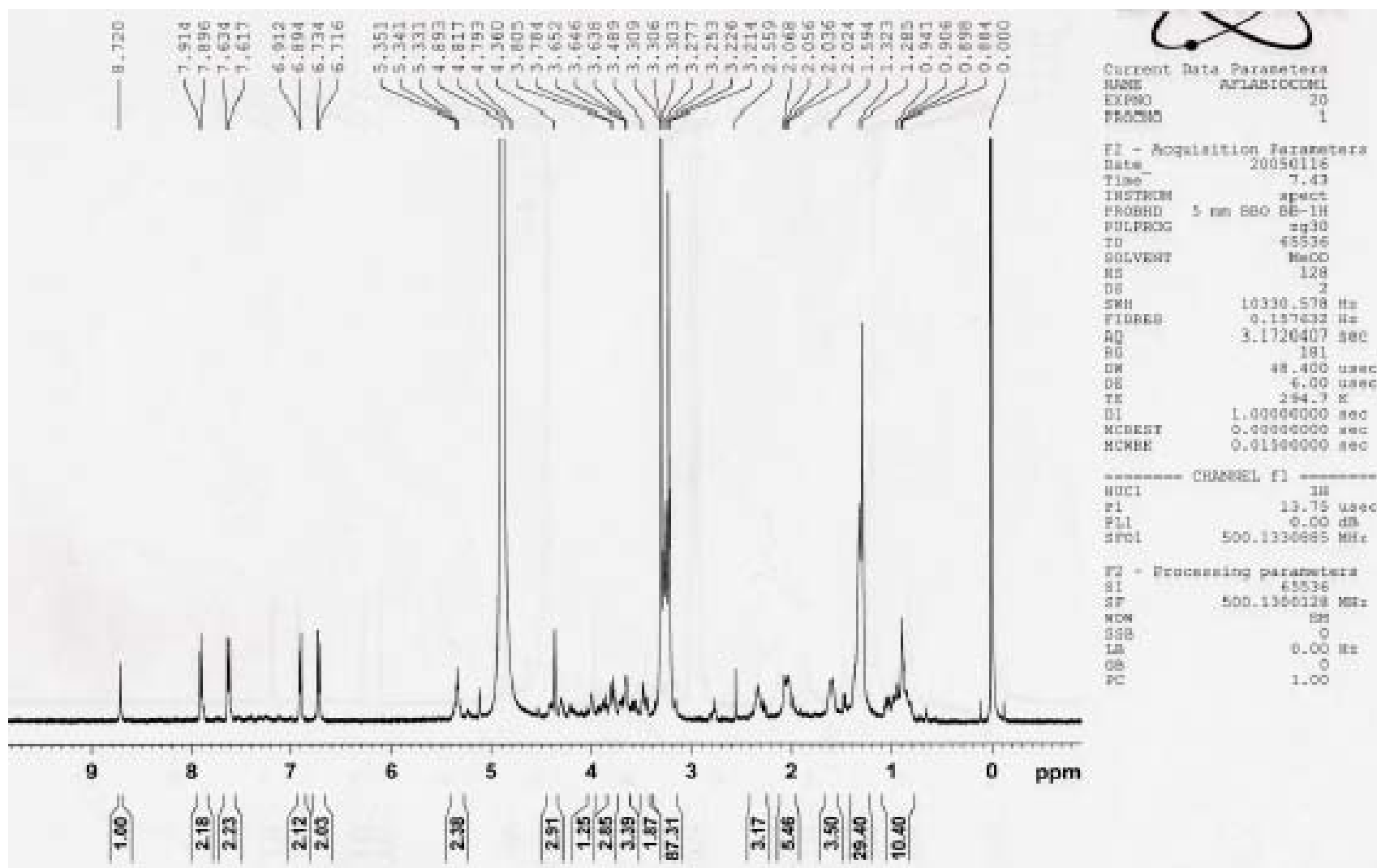
c:\gilson\farma\farma.088\vo112fr.gdt : Detetor UV/VIS :
LASSBio 581 VOM5-48h: Inj. Number: 8

— Metanol

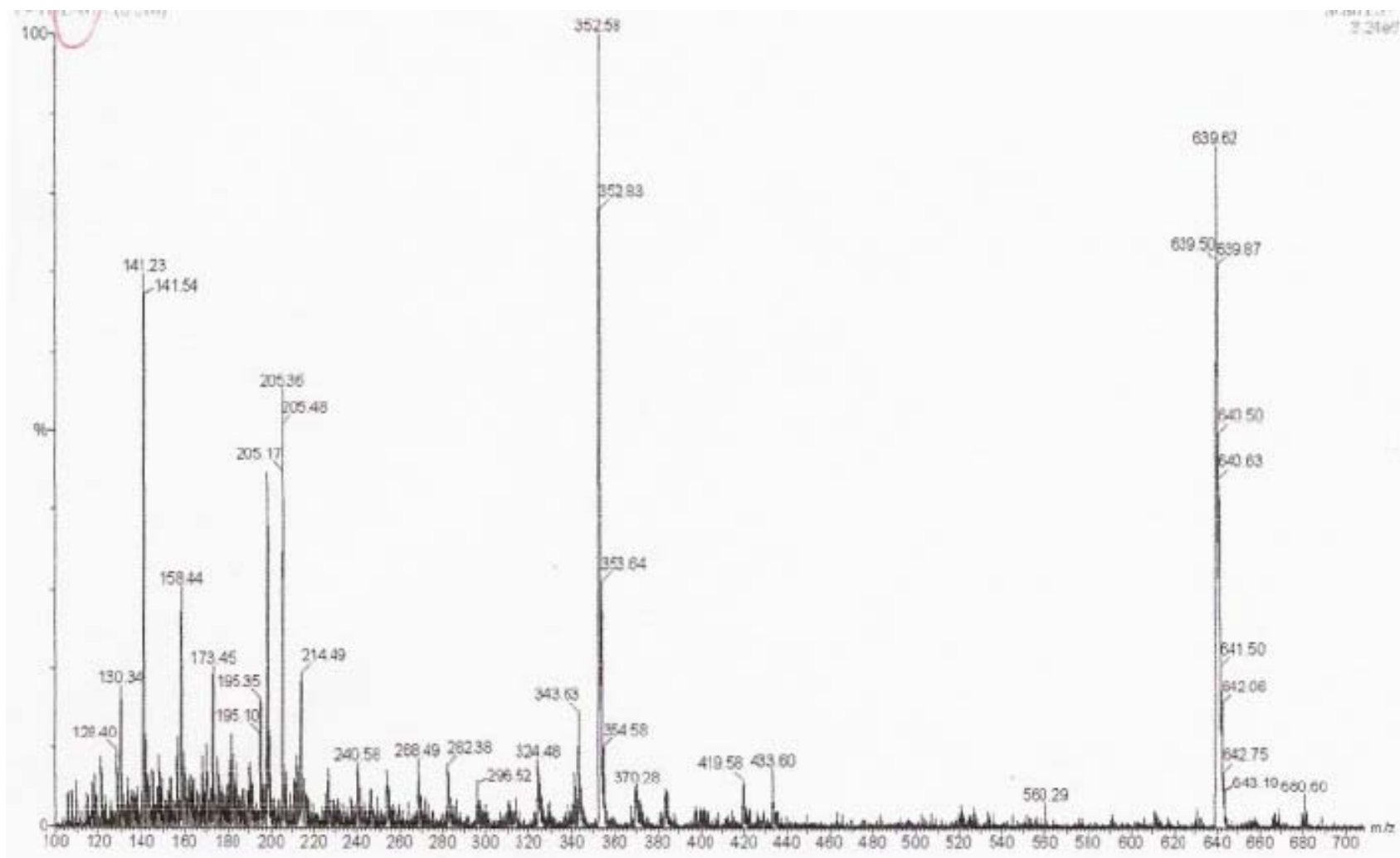
— Metanol/Tampão 65:35

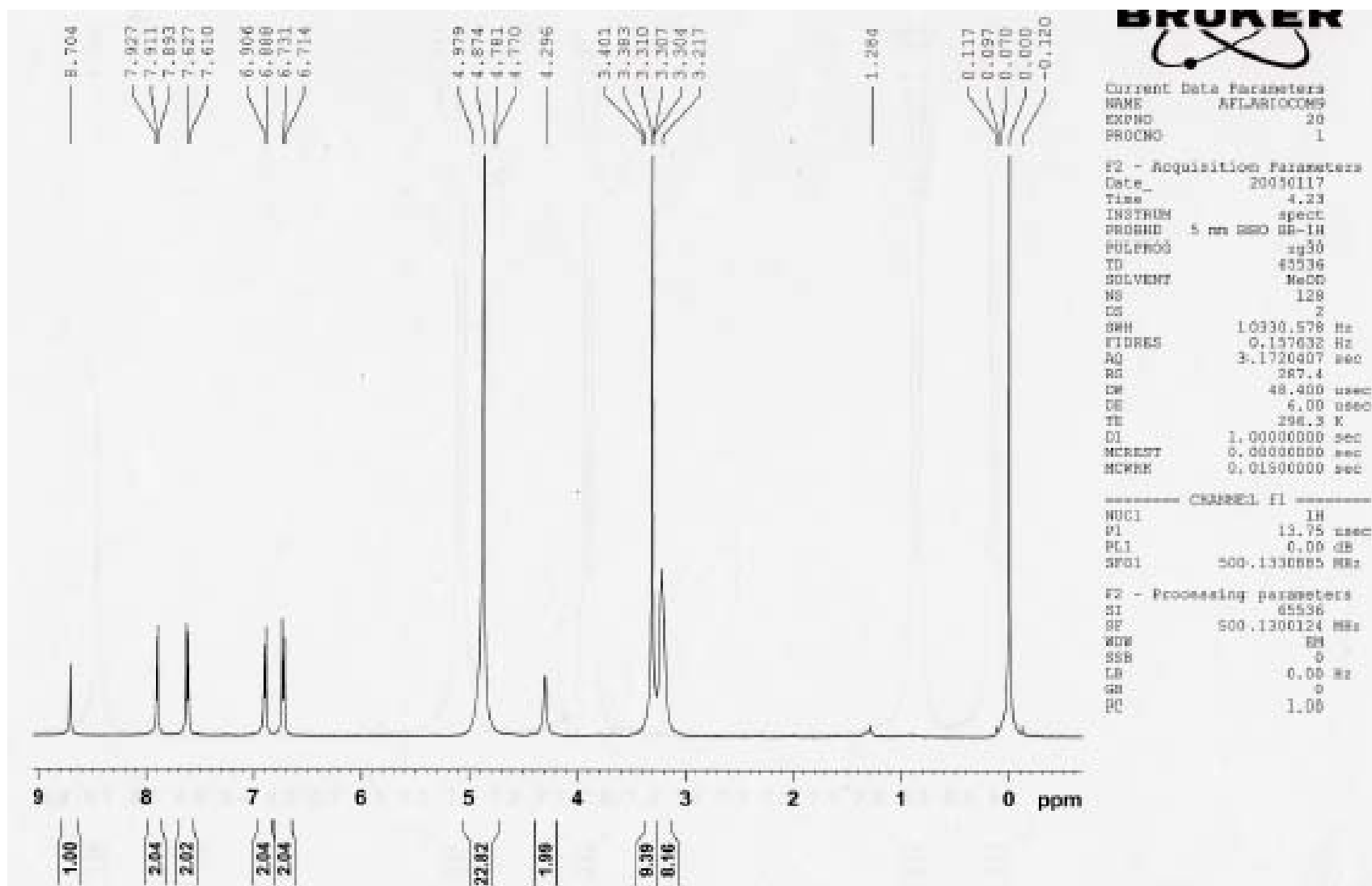
11. Perfil cromatográfico do sobrenadante de incubação do LASSBio 581 com *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 no tempo de 48 horas e comprimento de onda 248nm.



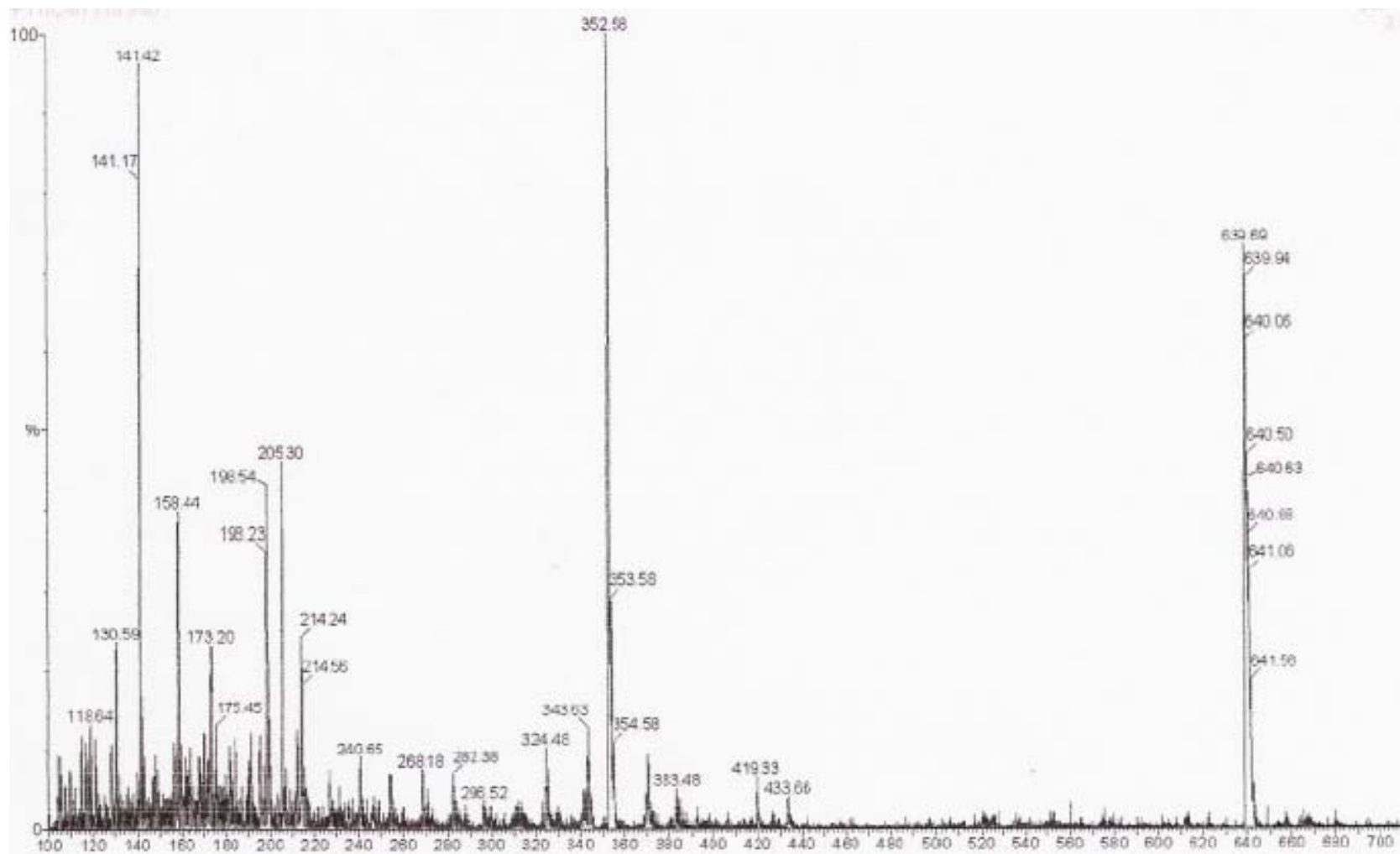
12. Espectro de RMN ^1H (500MHz) do derivado LaBioCon 1

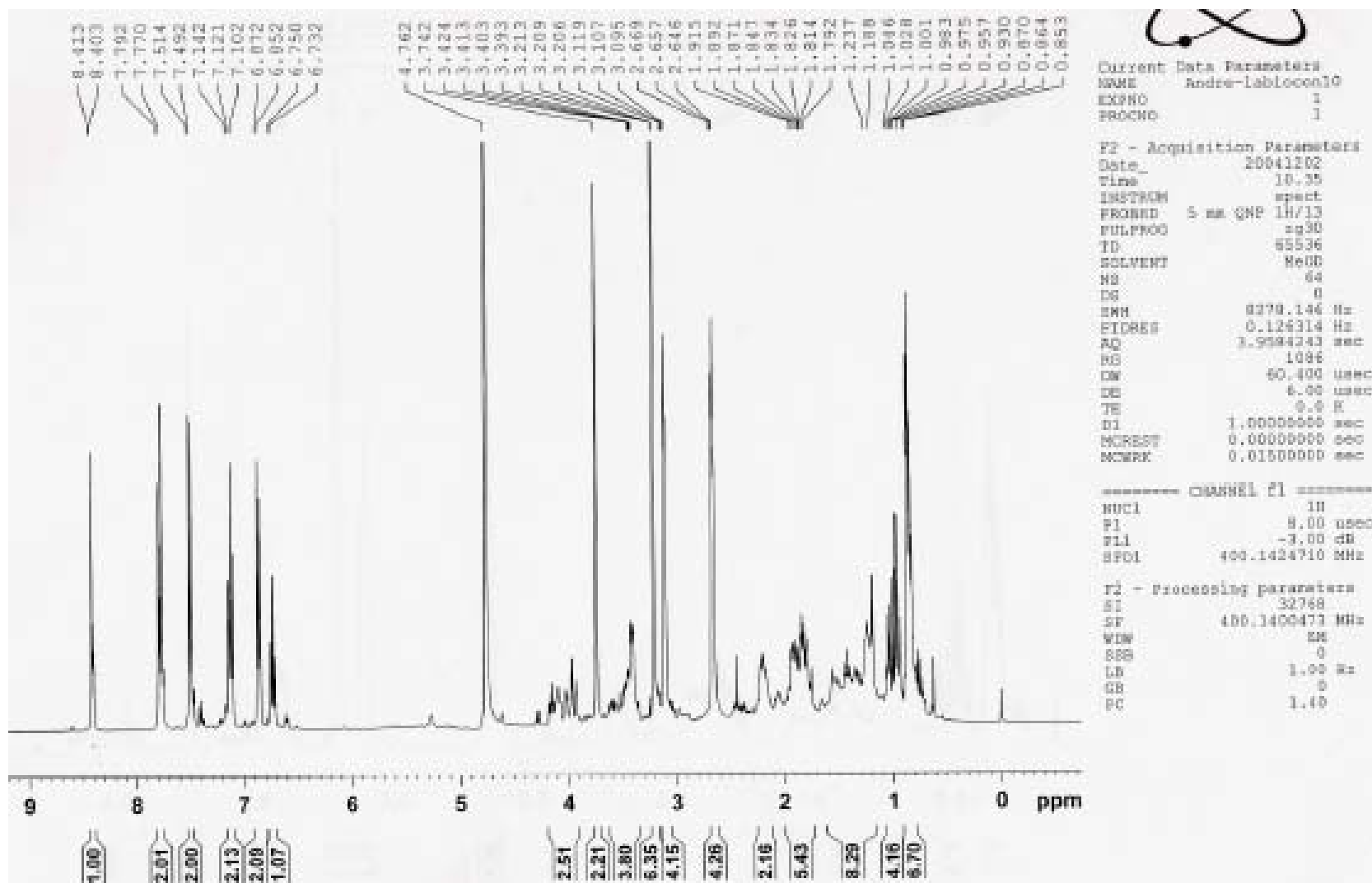
13. Espectro de massa do derivado LaBioCon 1



14. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 9

15. Espectro de massa do derivado LaBioCon 9

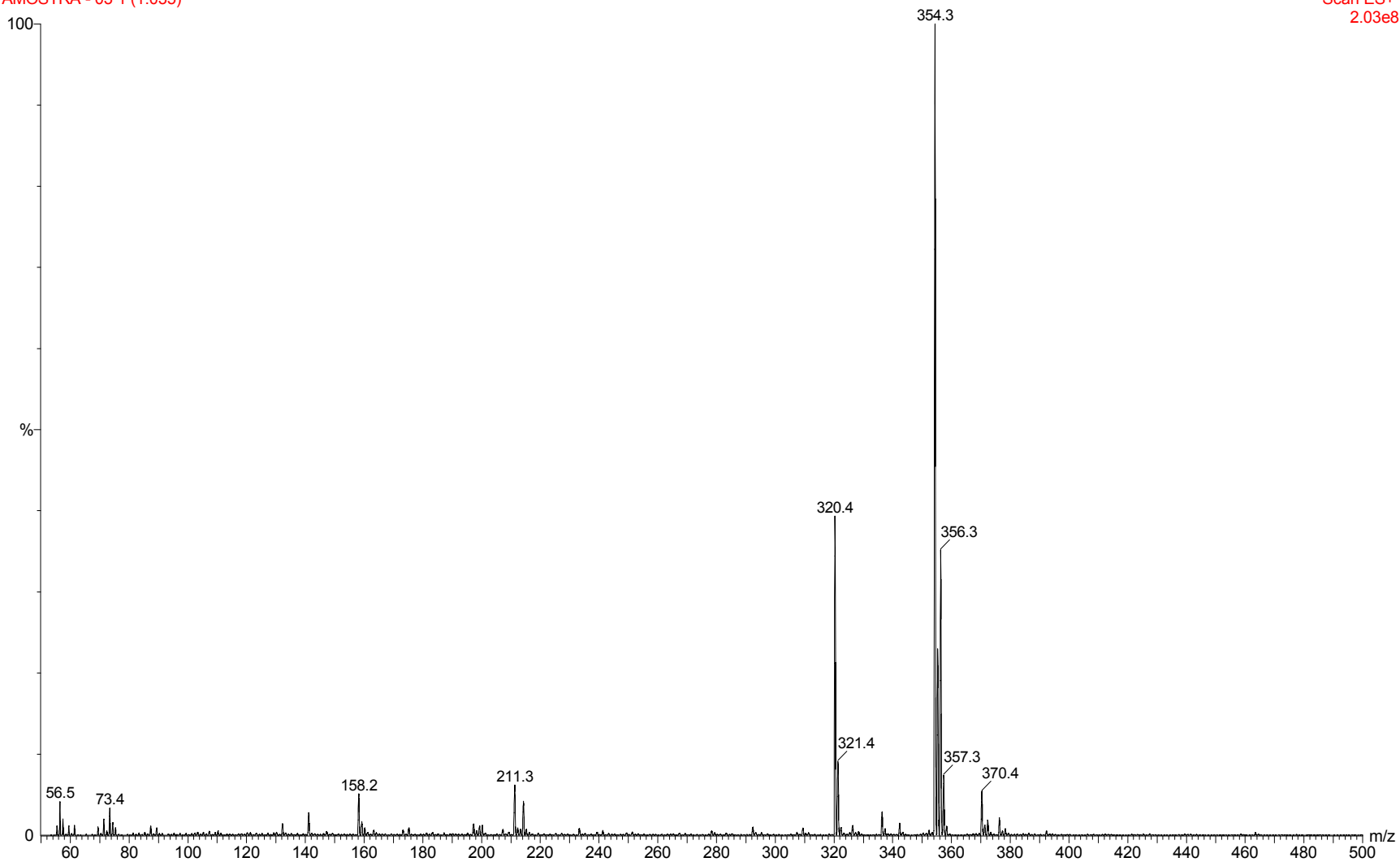


16. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 10

17. Espectro de massa do derivado LaBioCon 10

V 06 fr 10 -12
AMOSTRA - 03 1 (1.035)

23-Jul-2003 11:43:28
Scan ES+
2.03e8

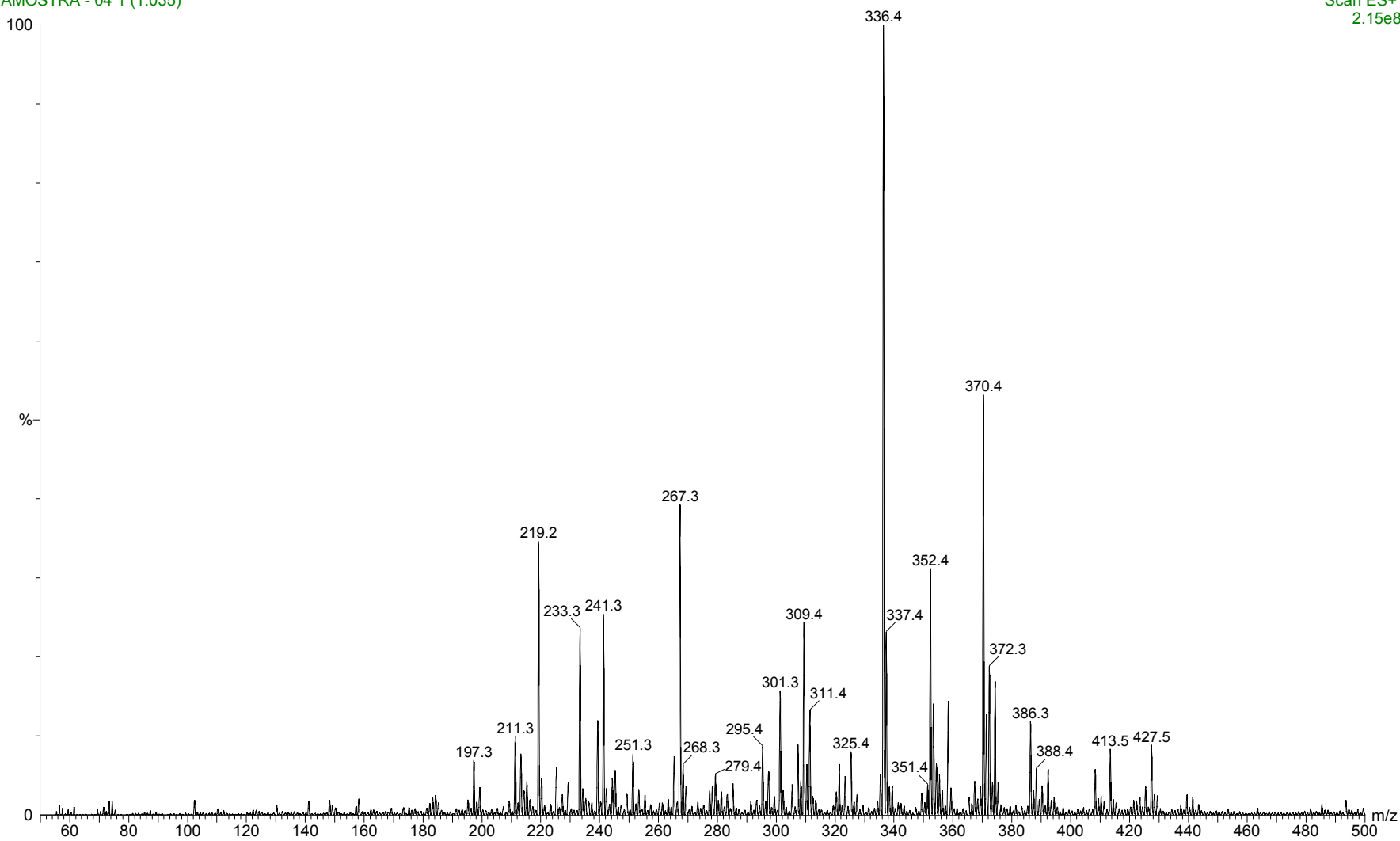


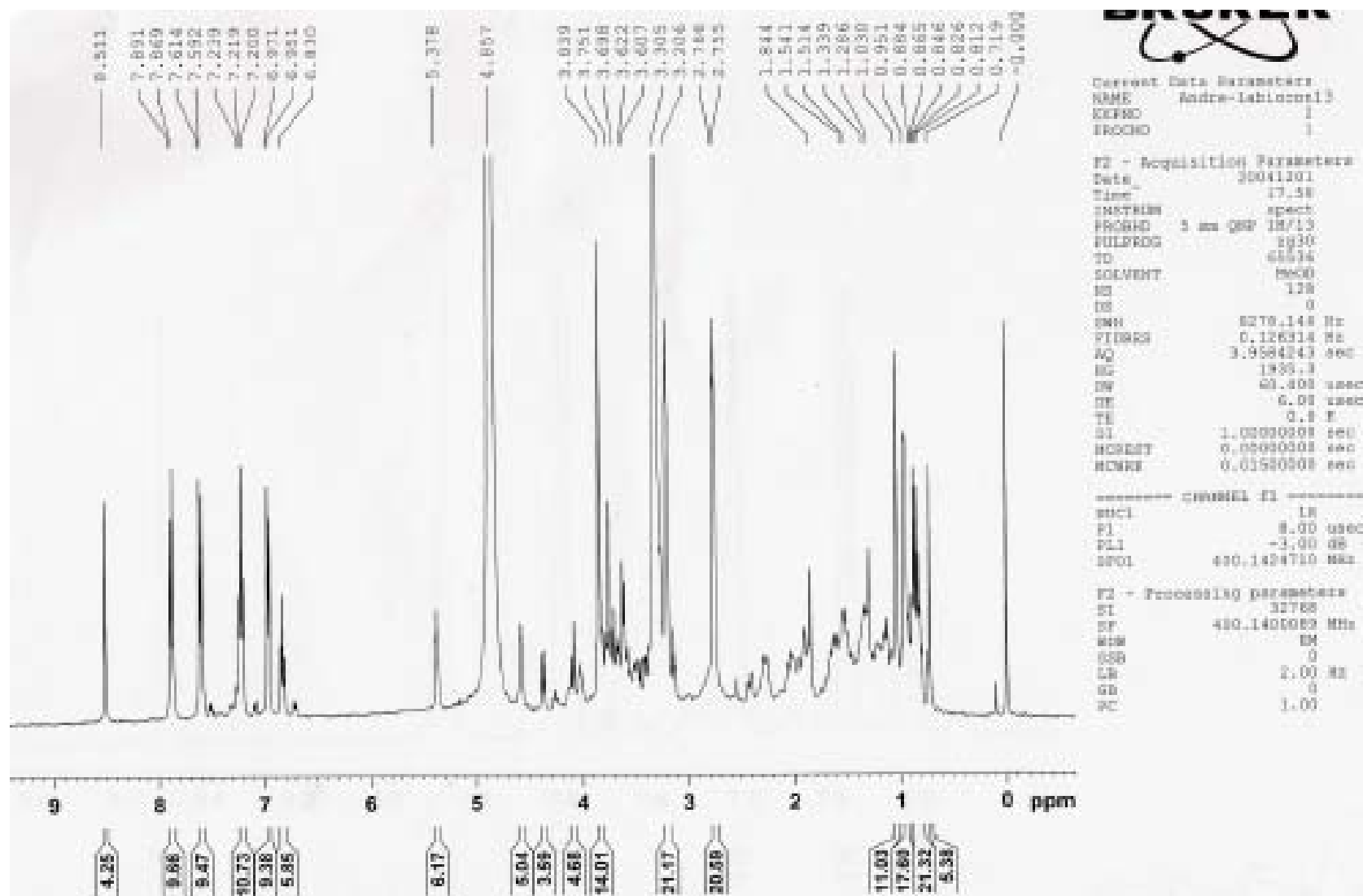
18. Espectro de massa do derivado LaBioCon 12

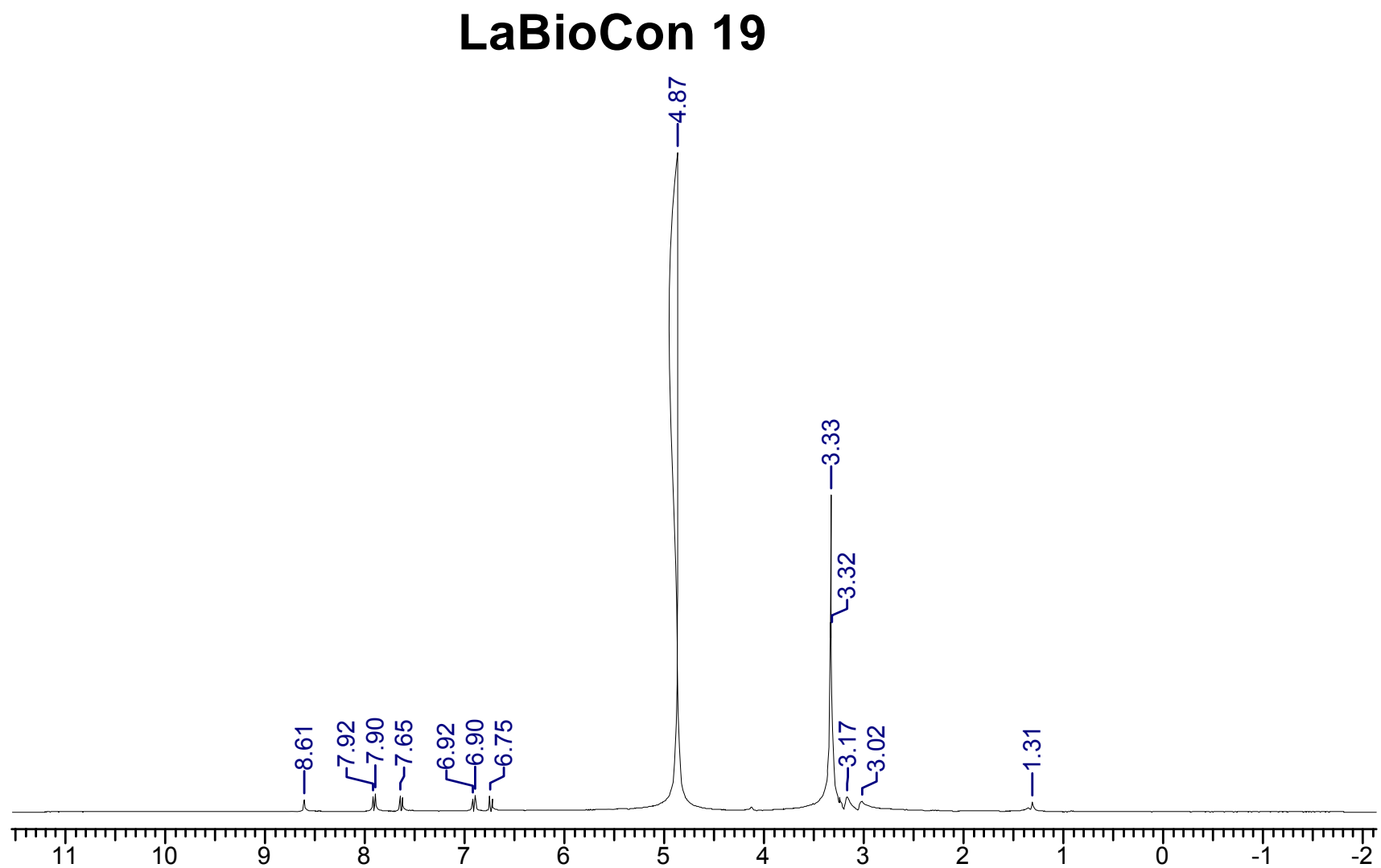
V 06 fr 13-14

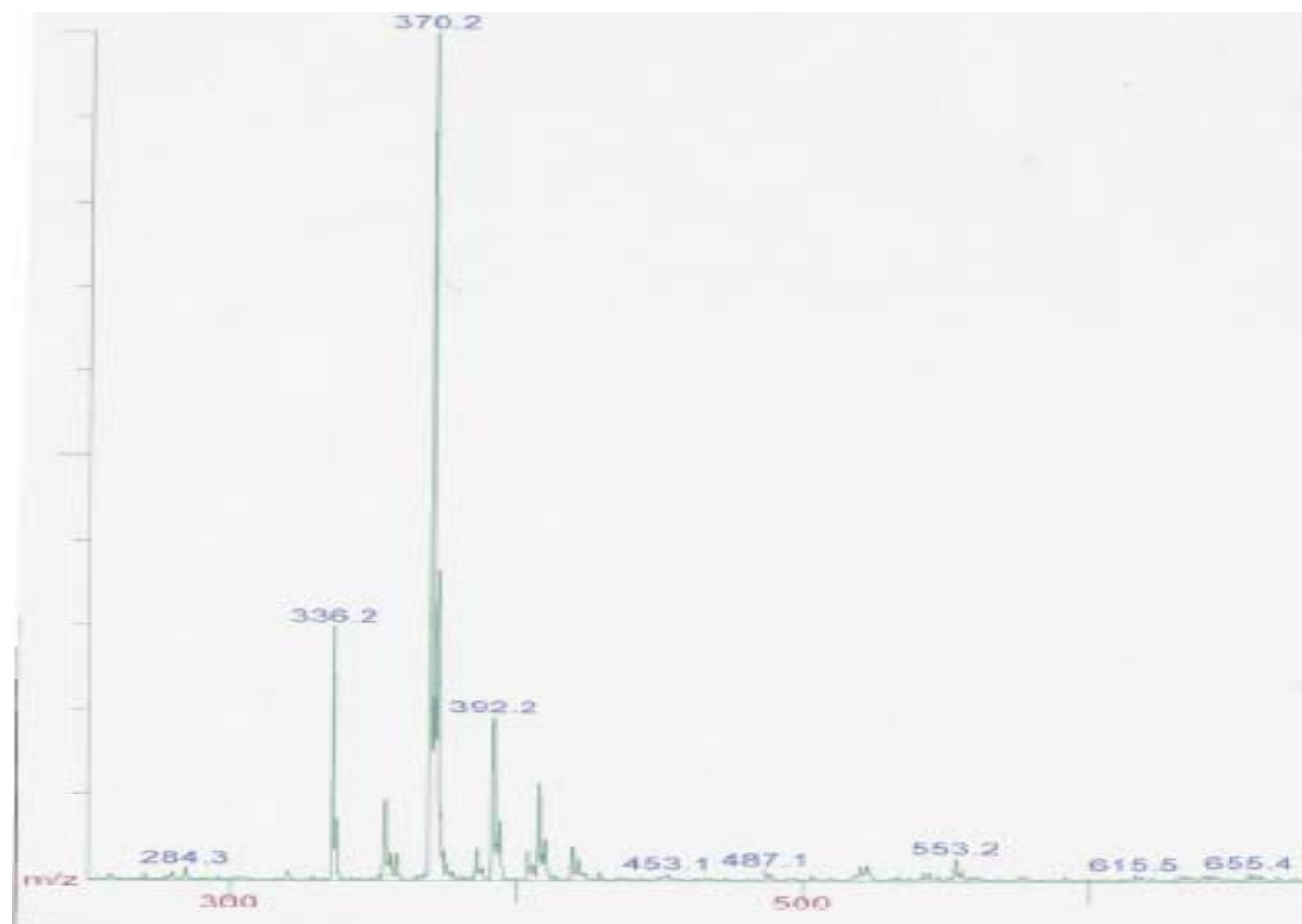
AMOSTRA - 04 1 (1.035)

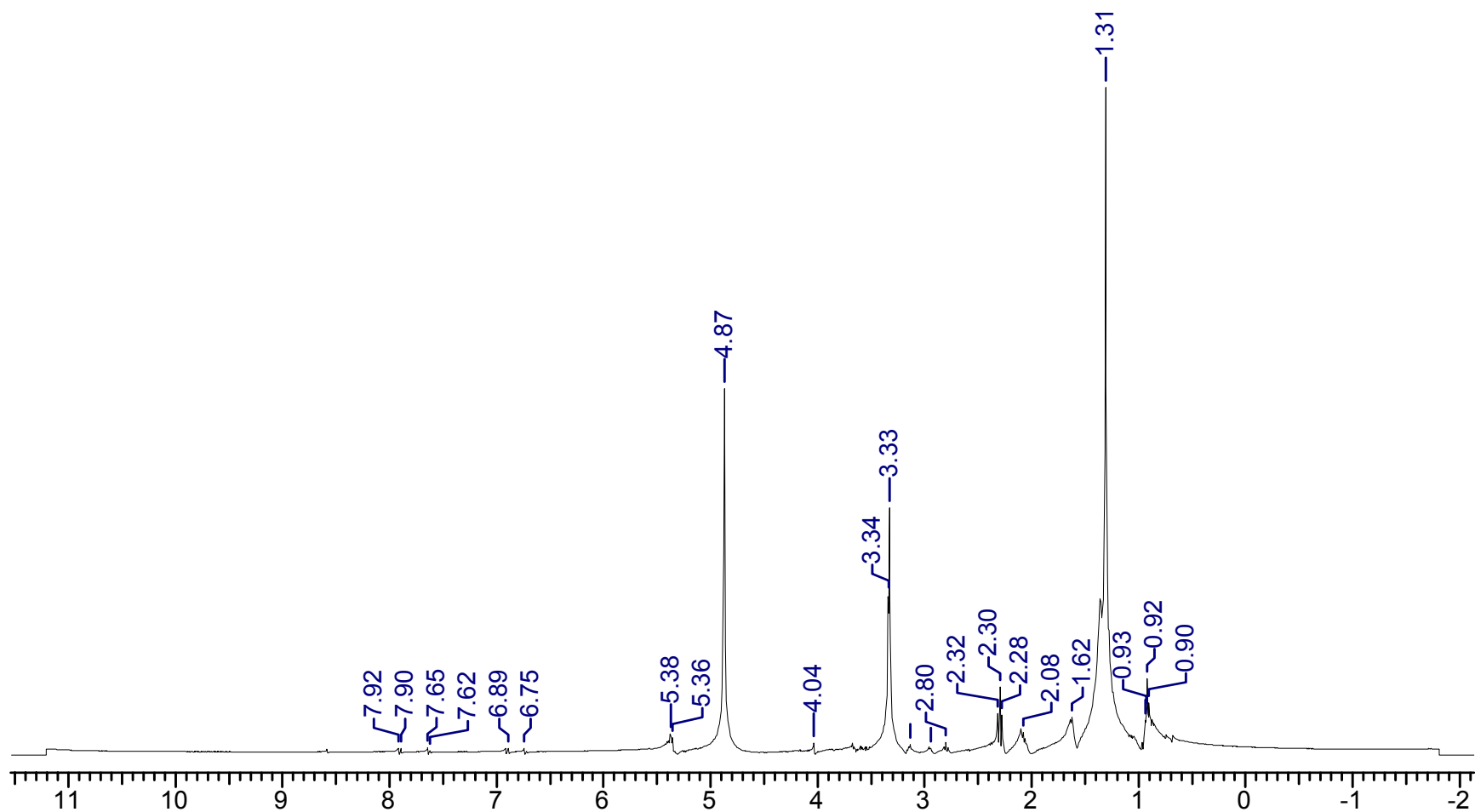
23-Jul-2003 12:17:10

Scan ES+
2.15e8

19. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 13

20. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 19

21. Espectro de massa do derivado LaBioCon 19

22. Espectro de RMN ^1H do composto LaBioCon 22**LaBioCon 22**

23. Espectro de massa do derivado LaBioCon 22