

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TATIANA CAIXETA FERREIRA GOMES

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

Goiânia
2007

TATIANA CAIXETA FERREIRA GOMES

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

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Valéria de Oliveira

Goiânia
2007

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

Gomes, Tatiana Caixeta Ferreira.

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Oliveira.

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

Bibliografia: f. 114-118.

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

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

CDU: 615.011

Aos meus pais,

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

Agradecimentos

A Deus, pela presença, força, sabedoria.

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

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

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

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

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

À Prof^a Dr^a Maria do Rosário pelo aceite em participar da banca de defesa, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Anna Maria Canavarro Benite e ao Prof Dr José Realino de Paula pela participação na banca de qualificação e grande colaboração.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fernando Pessoa

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE ESQUEMAS

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

LISTA DE GRÁFICOS

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AMPA	ácido α - amino-3hidroxi-5-metilsoxazola-4-propionato
APT	Espectro de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
ATCC	American Type Culture Colletion
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CO	Monóxido de carbono
CYP450	Citocromo P450
d	Dubleto
D_2O	Água deuterada
EI	Espectrometria de Infravermelho
EM	Espectrometria de Massas
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FMN	Flavina mononucleotídeo (forma oxidada)
FMNH_2	Flavina mononucleotídeo (forma reduzida)
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
i.p	intraperitonal
i.v	intravenosa
LaBioCon	Laboratório de Bioconversão
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LCP	Laboratoire de Cryptogamie Paris
M	Molar
m	Multiplete
min	Minutos
MeOH	Metanol

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOCONVERSÃO

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

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

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

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

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

Quimioseletividade

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

Regioseletividade

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

Enantioseletividade

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

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

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

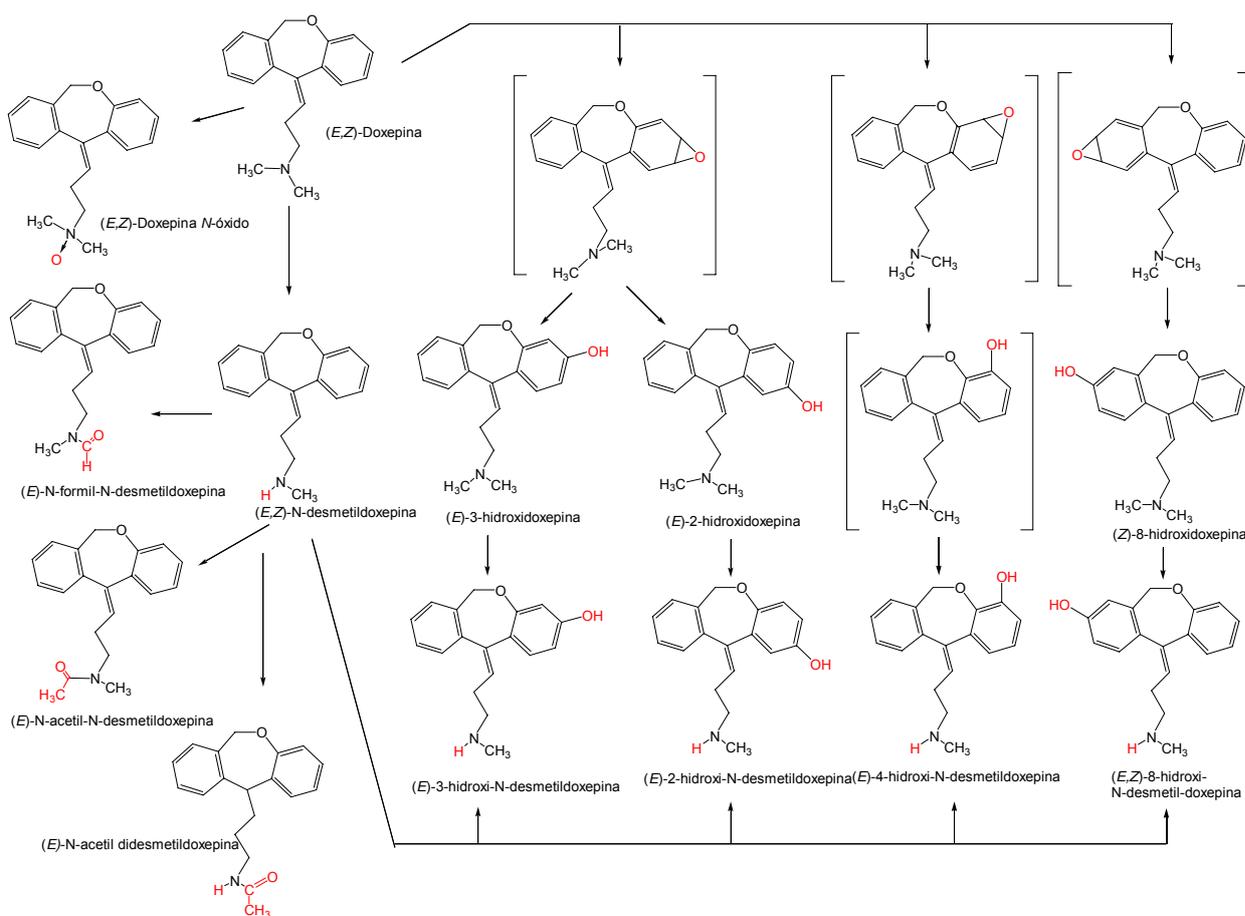


Figura 1.1 – Biotransformação estereoseletiva do antidepressivo doxepina por *Cunninghamella elegans* (MOODY, FREEMAN, CERNIGLIA, 1999).

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

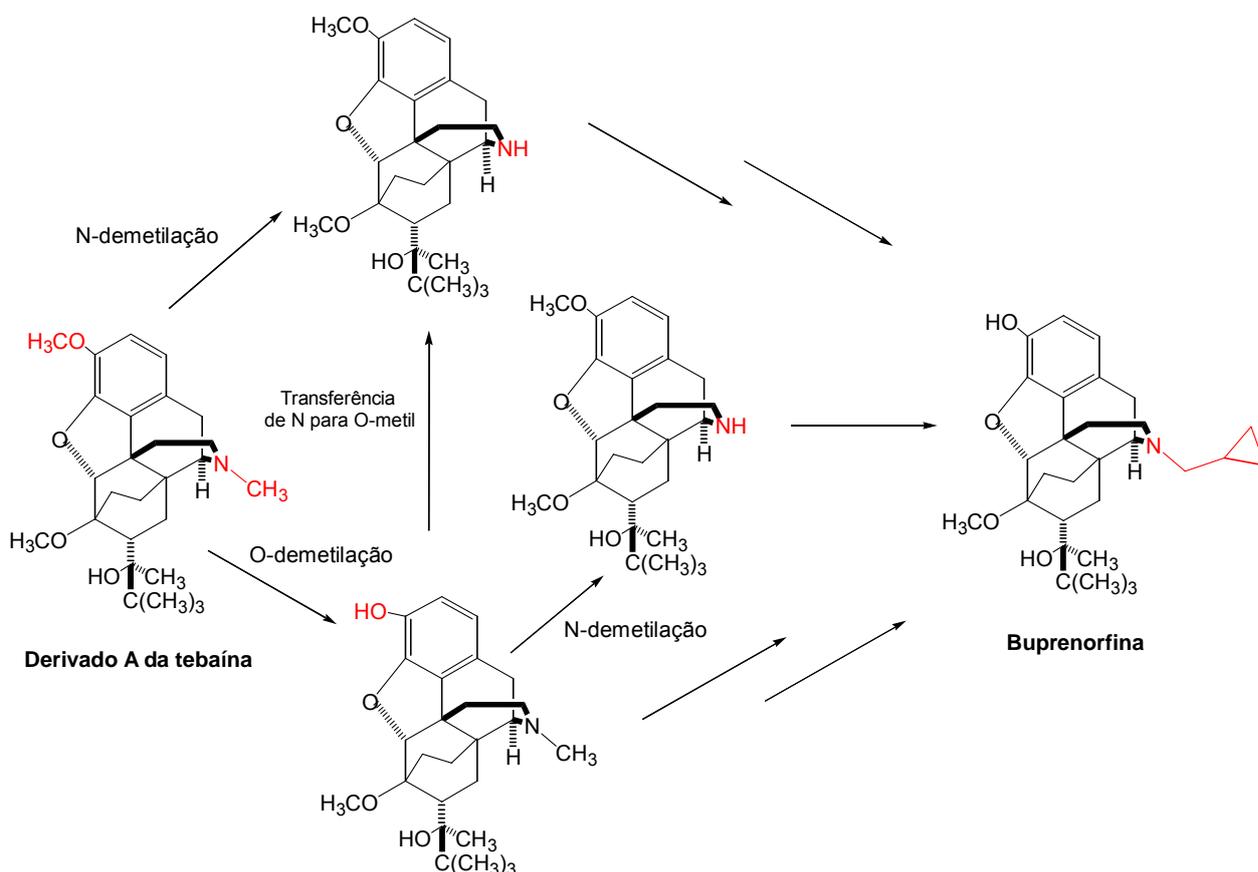


Figura 1.2 – Síntese de intermediários da buprenorfina a partir do derivado A da tebaína com *Cunninghamella echinulata* (ABEL et al., 2003).

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

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

1.1.1 Fatores que influenciam no processo de bioconversão

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

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

Estudos mostraram que informações sobre a morfologia dos “pellets” produzidos são importantes para estabelecer rendimentos, se forem pequenos poderiam oferecer uma menor barreira para difusão de O₂ e outros nutrientes apresentando rendimentos mais elevados do que quando compactos e grandes (GIBBS et al., 2000).

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

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

O O_2 não é o único nutriente que pode tornar-se limitante devido a uma pobre agitação, mas é provavelmente o mais importante fisiologicamente, pois uma limitação de O_2 pode resultar na supressão ou até na inibição total da produção de metabólitos em fungos aeróbios (GIBBS et al., 2000; PAPAGIANNI, 2004). No entanto, uma agitação muito vigorosa durante a incubação cria forças que podem afetar os microrganismos de diversas maneiras, por exemplo, danificando a estrutura das hifas, causando mudanças morfológicas, bem como, variações na taxa de crescimento e na formação do produto (PAPAGIANNI, 2004).

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

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

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

1.2 METABOLISMO DE FÁRMACOS

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

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

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

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

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

1.2.1 Reações de Fase I

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

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

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

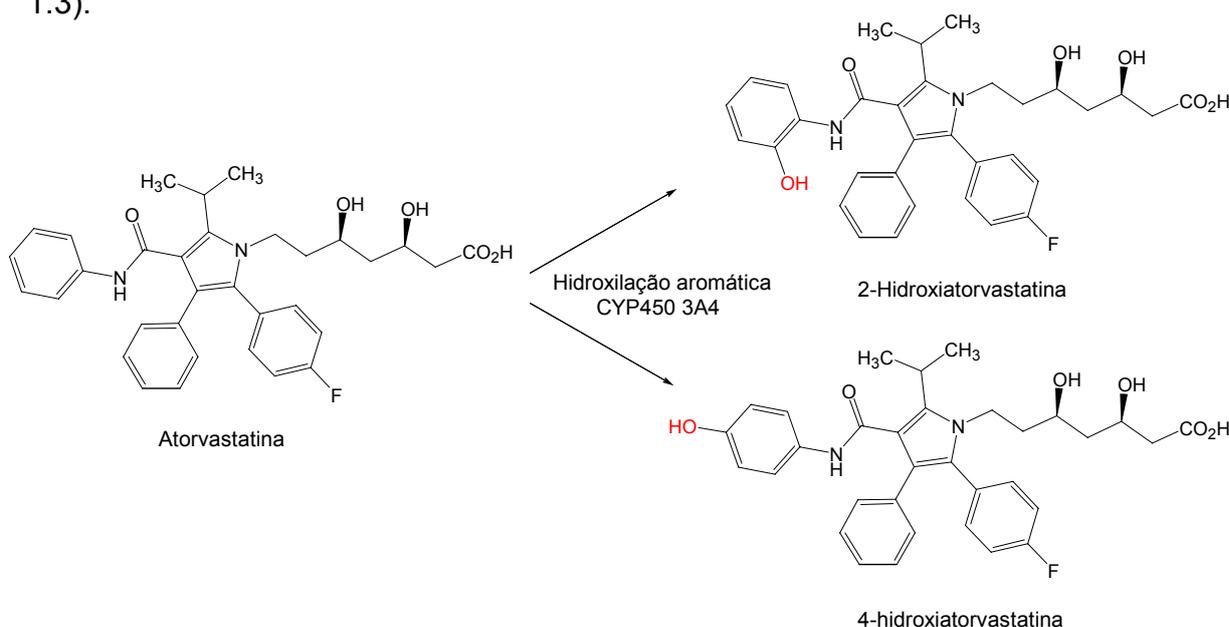


Figura 1.3 – Metabólitos ativos obtidos por meio de reação de biotransformação Fase I, hidroxilação aromática da atorvastatina. (FURA, 2006).

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

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

1.2.1.1 Sistema enzimático CYP450

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

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

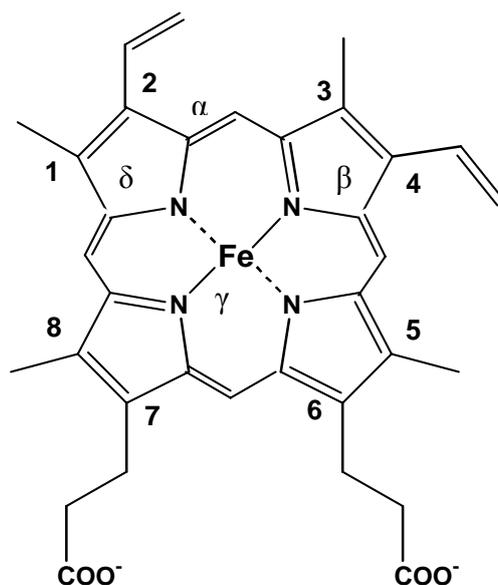


Figura 1.4 - Estrutura do grupo heme (ferro protoporfirina IX, heme b) (SONO et al., 1996).

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

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

1.2.1.2 Família do CYP450

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

1.2.1.3 Sistema de transporte de elétrons

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

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

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

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

Durante a terceira etapa o complexo CYP450 reduzido se liga ao oxigênio molecular (O_2) como um sexto ligante ferroso para formar o complexo oxiCYP450 (Figura 1.5-3). Este complexo sofre auto-oxidação a ânion superóxido na quarta etapa do ciclo (Figura 1.5-4).

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

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

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

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

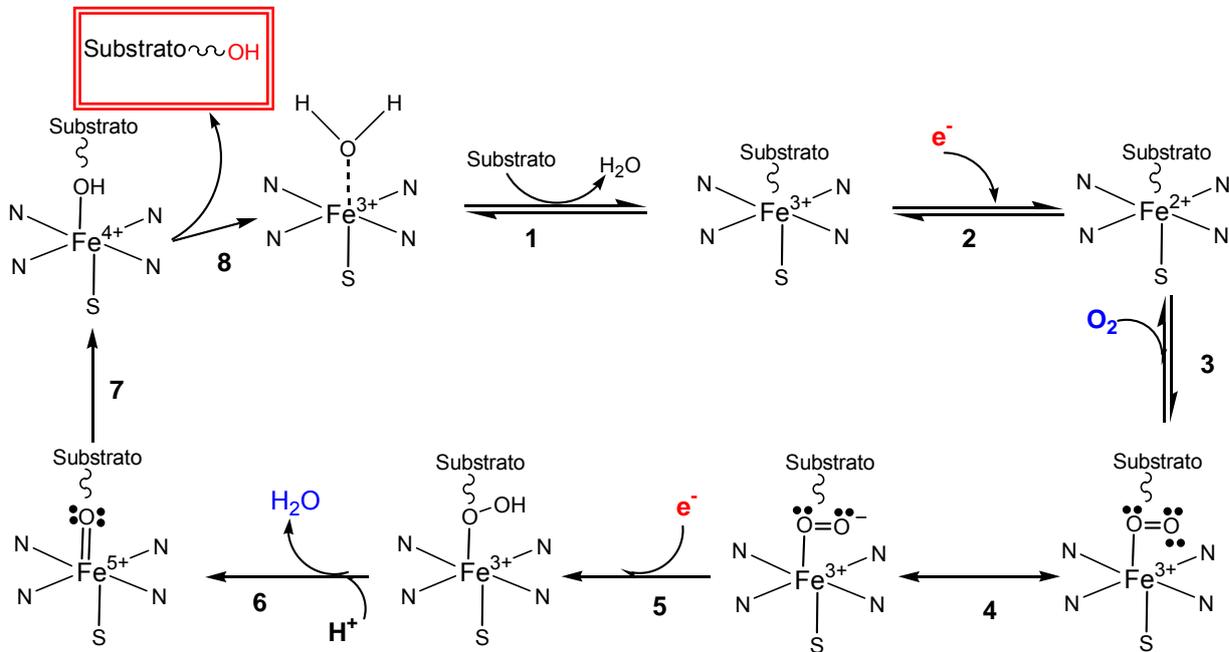


Figura 1.5 – Ciclo catalítico do citocromo P450 (WILLIAMS, 2002).

1.2.2 Reações de Fase II

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

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

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

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

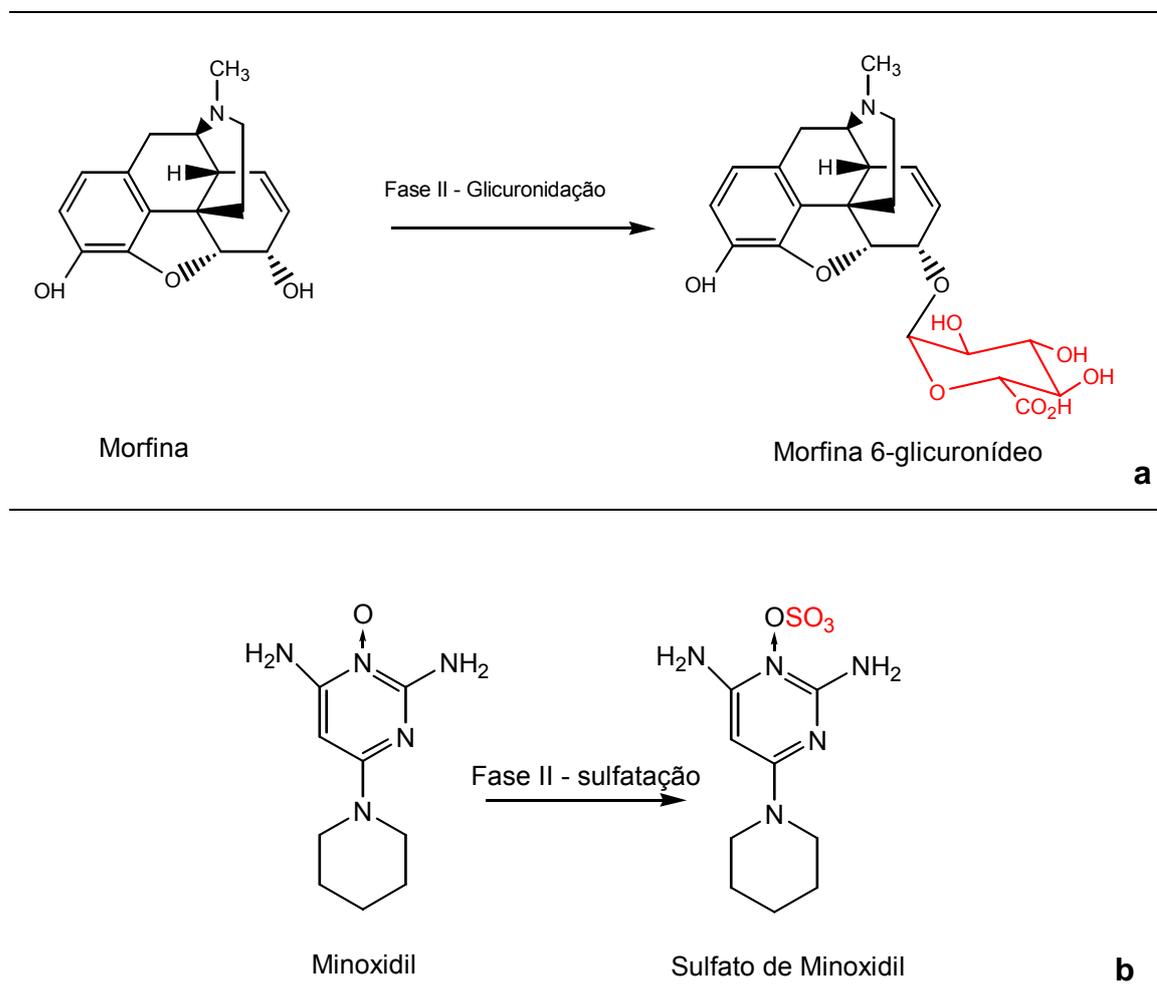


Figura 1.6 - Exemplos de metabólitos obtidos por meio de reações de biotransformação Fase II (conjugação): glicuronidação da morfina (a) (RITTER, 2000) e sulfatação do minoxidil (b) (ANDERSON, et al., 1998).

1.3 MODELO MICROBIANO DO METABOLISMO ANIMAL

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

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

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

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

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

1.3.1 Monoxigenases fúngicas e suas aplicações no Metabolismo Microbiano de Fármacos

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

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

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

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

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

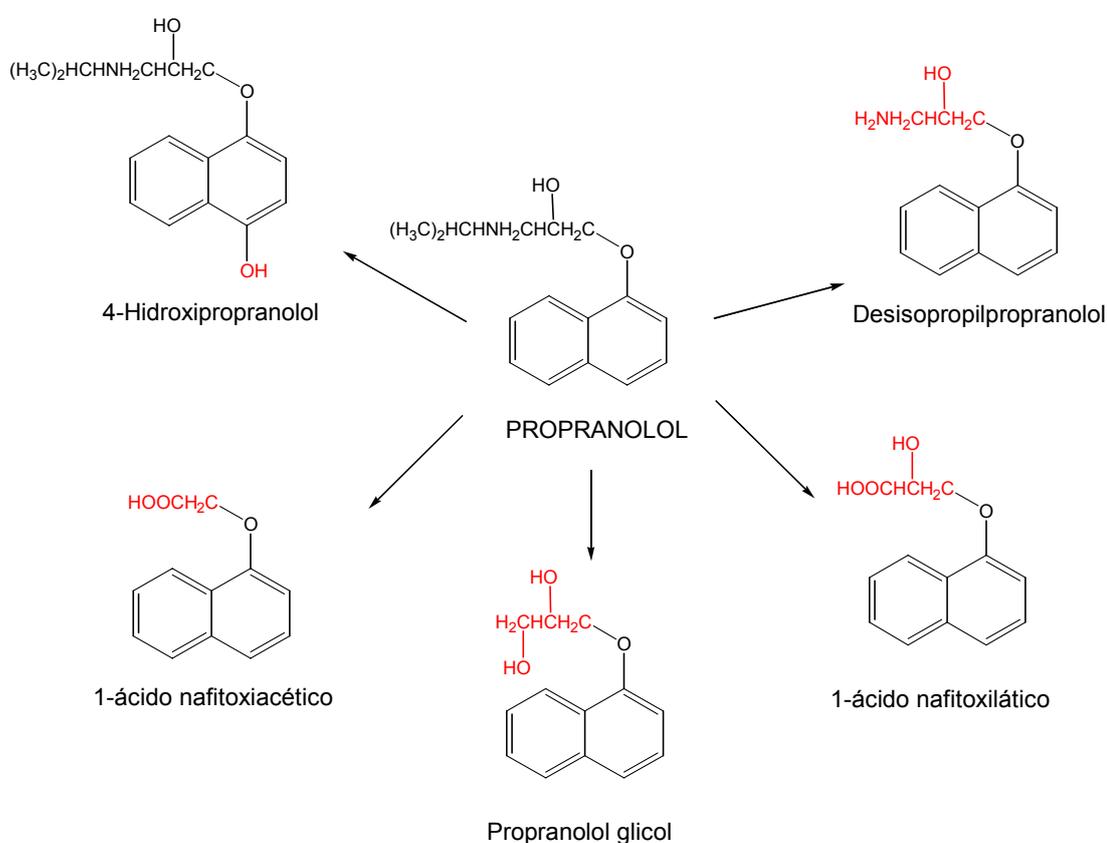


Figura 1.7 – Bioconversão do propranolol por *Cunninghamella echinulata* e seus metabólitos fúngicos Fase I também observados em humanos (FOSTER et al., 1989).

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

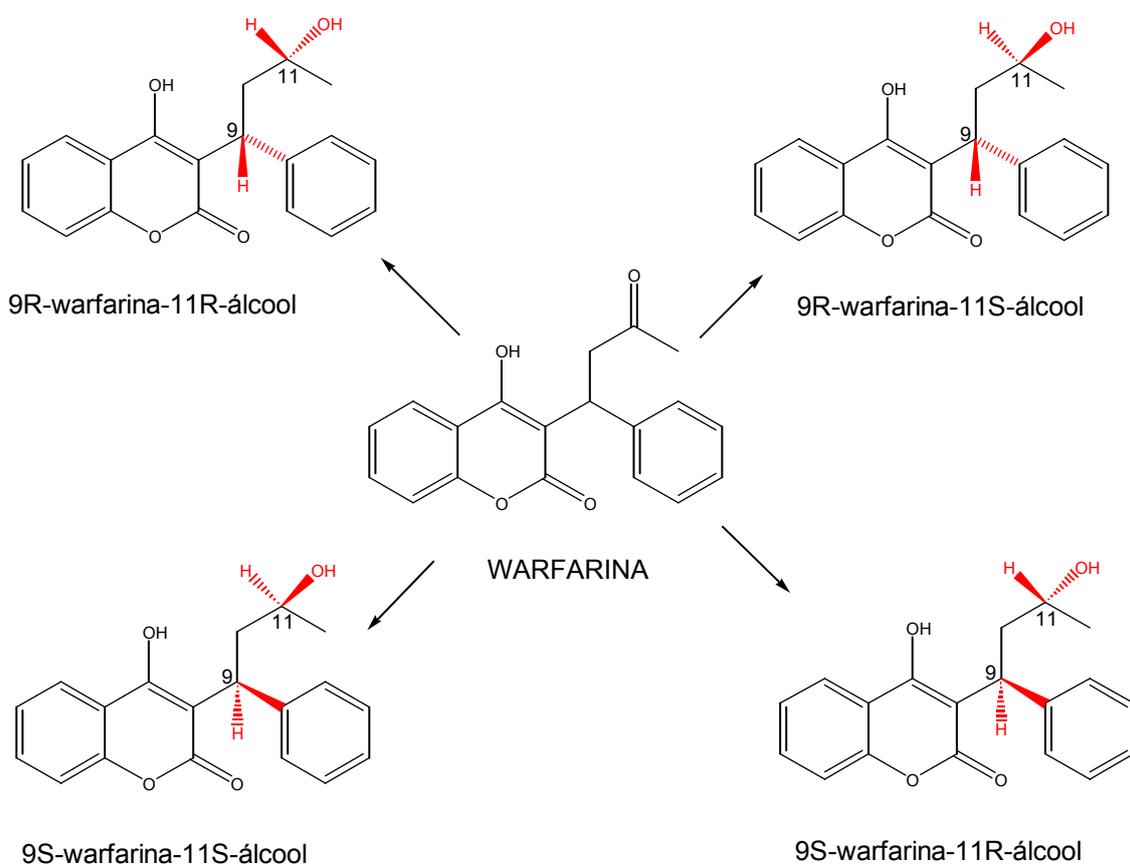


Figura 1.8 – Bioconversão do anticoagulante, warfarina, por *Cunninghamella elegans* (WONG, DAVIS, 1989).

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

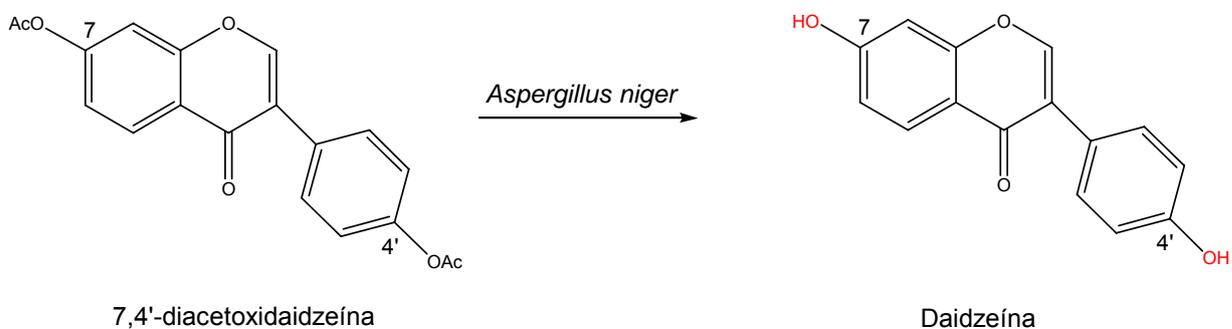


Figura 1.9 - Hidrólise da 7,4'-diacetoxidaidzeína por *Aspergillus niger* levando a produção da daidzeína (MIYAZAWA et al., 2004).

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

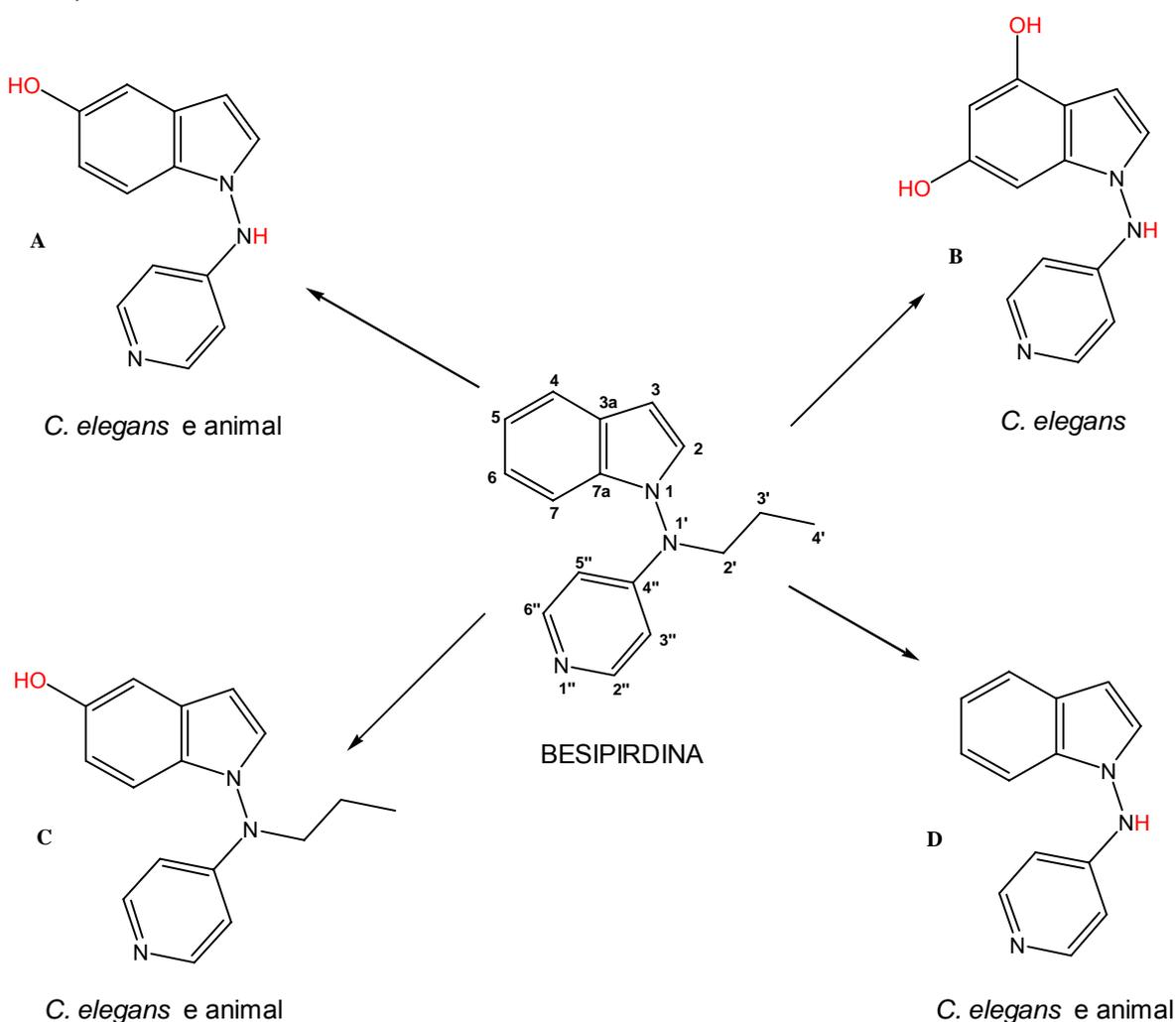


Figura 1.10 – Bioconversão da besipirdina por *Cunninghamella elegans* gerando quatro metabólitos (A, B, C e D), sendo que três deles são encontrados no metabolismo animal (A, C e D) (RAO, DAVIS, 1997).

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

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

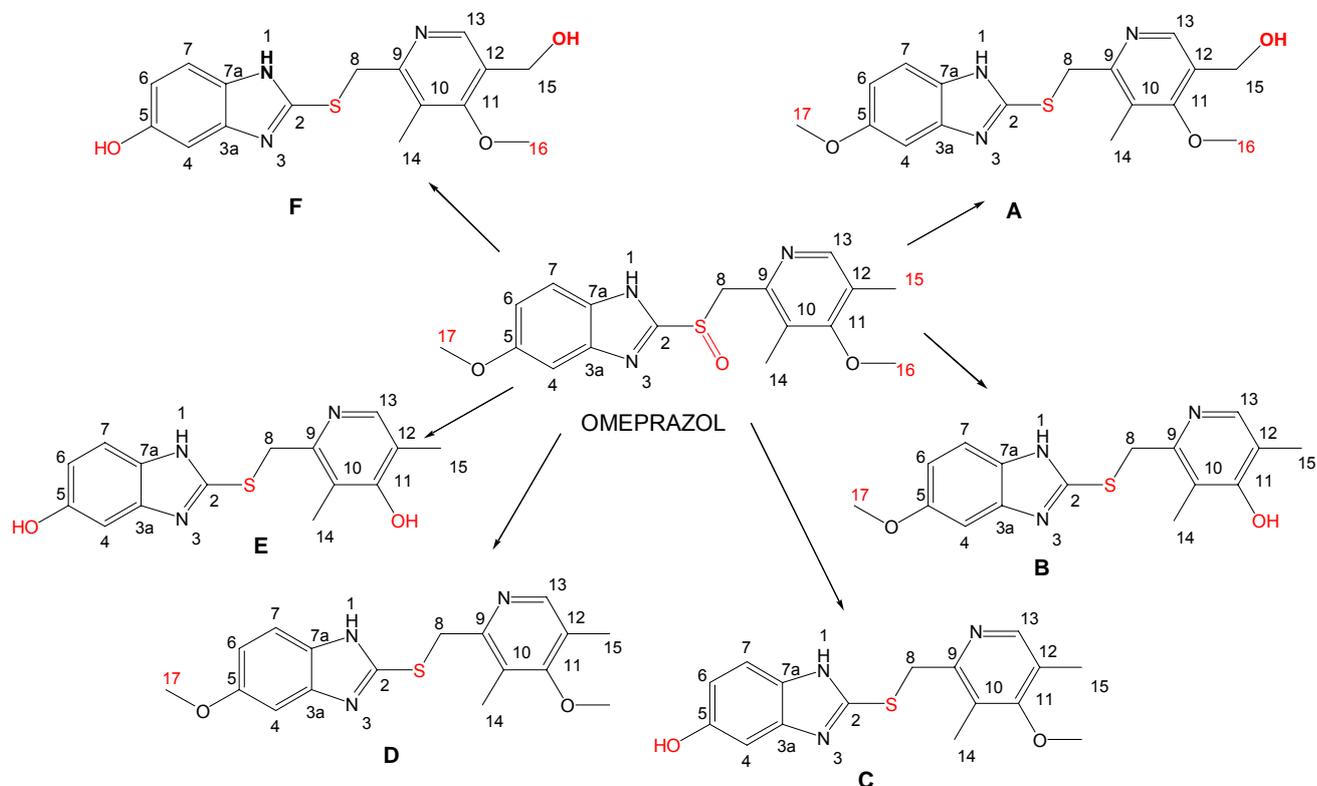


Figura 1.11 – Bioconversão do omeprazol por *Cunninghamella elegans* produzindo seis metabólitos (A, B, C, D, E, F) sendo que três deles correspondem a metabólitos animais (A, B, C) (PEARCE, LUSHNIKOVA, 2006).

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

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

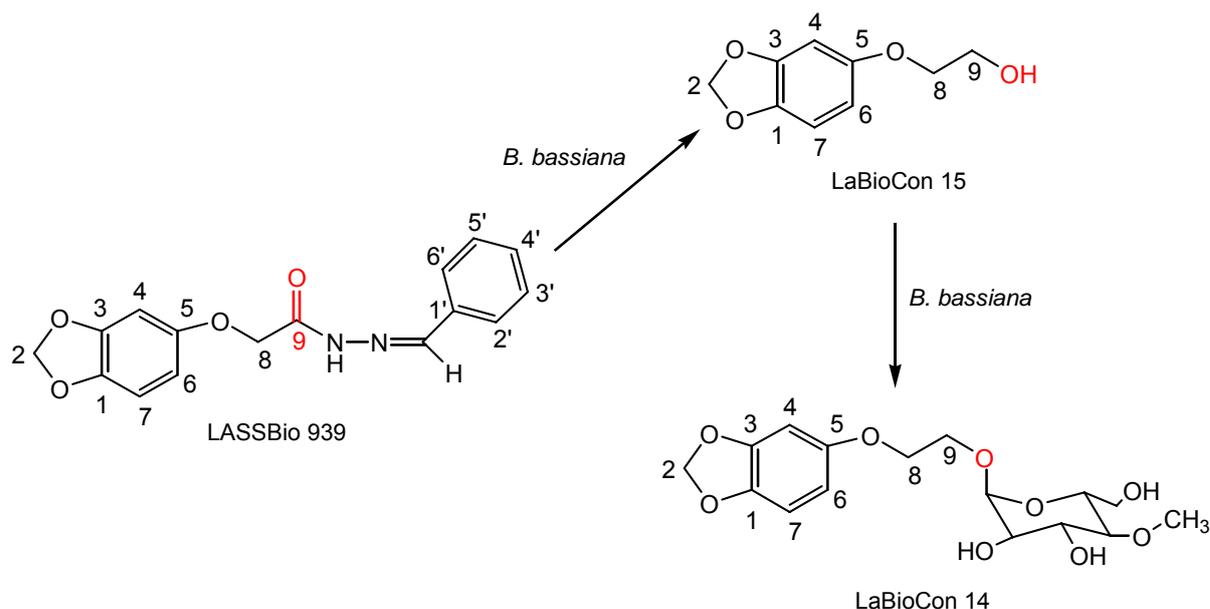


Figura 1.12 – Bioconversão do LASSBio 939 por *Beauveria bassiana* promovendo a obtenção de metabólitos hidroxilado (LaBioCon 15) e glicosilado (LaBioCon 14) (CIRILO, 2006).

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

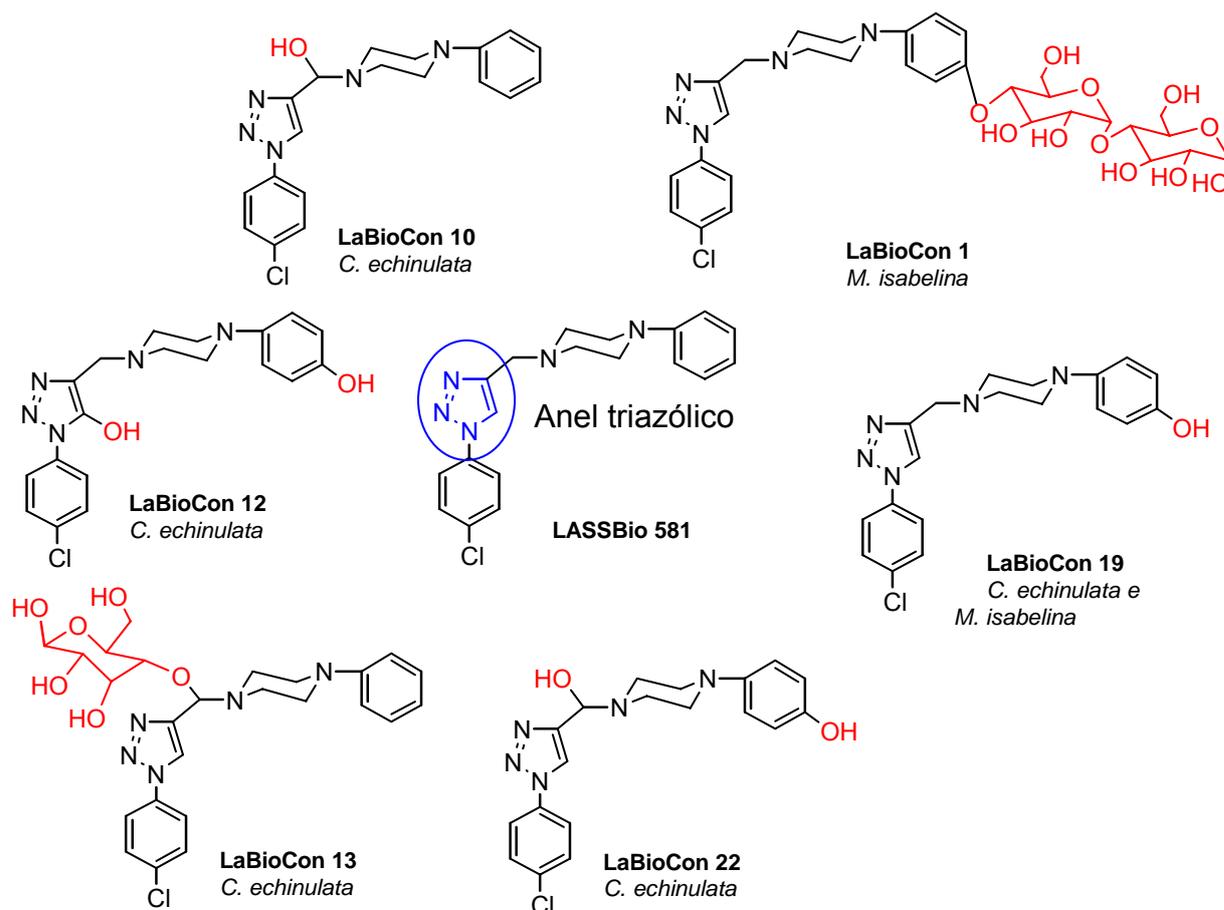


Figura 1.13 – Bioconversão do LASSBio 581 por *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabelina* e obtenção de seis diferentes metabólitos (PAZINI, 2006).

1.4 LASSBIO 579 – POTENCIAL CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACOS

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

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

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

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

Para o planejamento desses compostos heterocíclicos foram eleitos dois protótipos ligantes seletivos dos receptores dopaminérgicos, a clozapina, que apresenta restrição conformacional e alta afinidade pelo receptor do subtipo D₄ e o composto L-741, ligante seletivo de receptores do subtipo D₂ que apresenta alta afinidade por esse subtipo de receptor. Dentre os compostos planejados, destaca-se o derivado N-fenilpiperazínico, LASSBio 579, que foi desenvolvido através da hibridização da clozapina e do composto L-741 de modo a manter os grupamentos farmacofóricos necessários para a interação com os receptores dopaminérgicos. Assim, o anel b da clozapina sofreu uma contração a pirazol e recebeu um grupamento aril na posição 1; o anel c foi preservado e um átomo de cloro substituinte na posição para foi introduzido ao anel a. O anel d da clozapina foi transposto para o átomo de nitrogênio distal do anel c piperazina mimetizando a subunidade estrutural **A** presente em L-741. O novo candidato possui o grupamento farmacofórico N-fenilpiperazínico e apresenta núcleo pirazólico, o que o difere do LASSBio 581 citado anteriormente (Figura 1.14) (MENEGATTI et al., 2003).

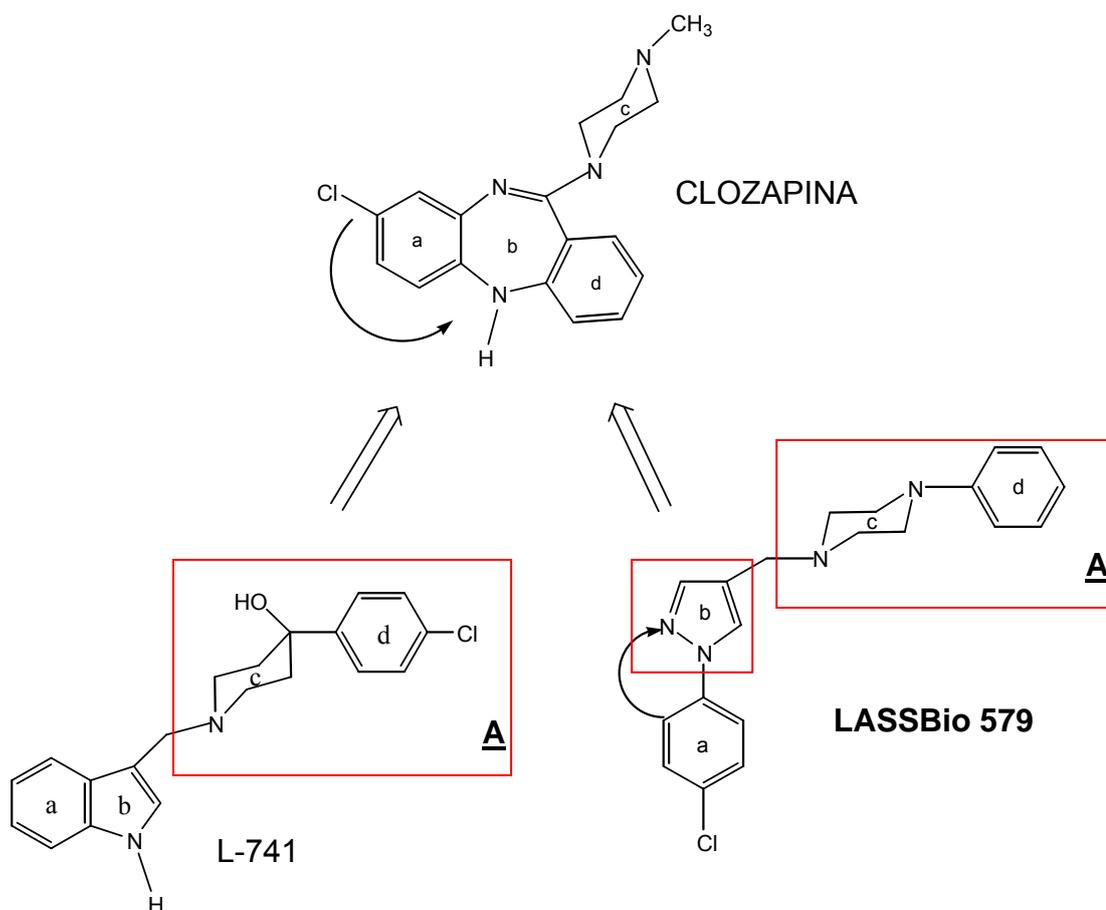


Figura 1.14 - Planejamento estrutural do candidato protótipo a agente anti-psicótico, a partir da clozapina e L-741 (MENEGATTI, 2003).

A Figura 1.15, ilustra a rota sintética empregada na obtenção do intermediário-chave 1-(4-clorofenil)-4-formil-pirazola). O intermediário cloro-fenilhidrazina (52%) foi obtido a partir da diazotação de 4-cloroanilina, com posterior redução empregando cloreto estanho (SnCl_2) em meio ácido. Na etapa seguinte, o intermediário cloro-fenilhidrazina é condensado com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, em etanol sob catálise ácida, logrando no intermediário 1-(4-clorofenil)-1*h*-pirazola (86%). Por fim, o intermediário-chave 1-(4-clorofenil)-4-formil-piperazola (78%) foi obtido a partir da reação de formilação dos intermediário 1-(4-clorofenil)-1*h*-pirazola, via complexo eletrofílico de Vilsmeier-Haack. O LASSBio 579 (77%) foi obtido através da reação do intermediário-chave pirazólico substituído 1-(4-clorofenil)-4-formil-piperazola e da *N*-fenilpiperazina, via aminação redutiva (MENEGATTI, 2001).

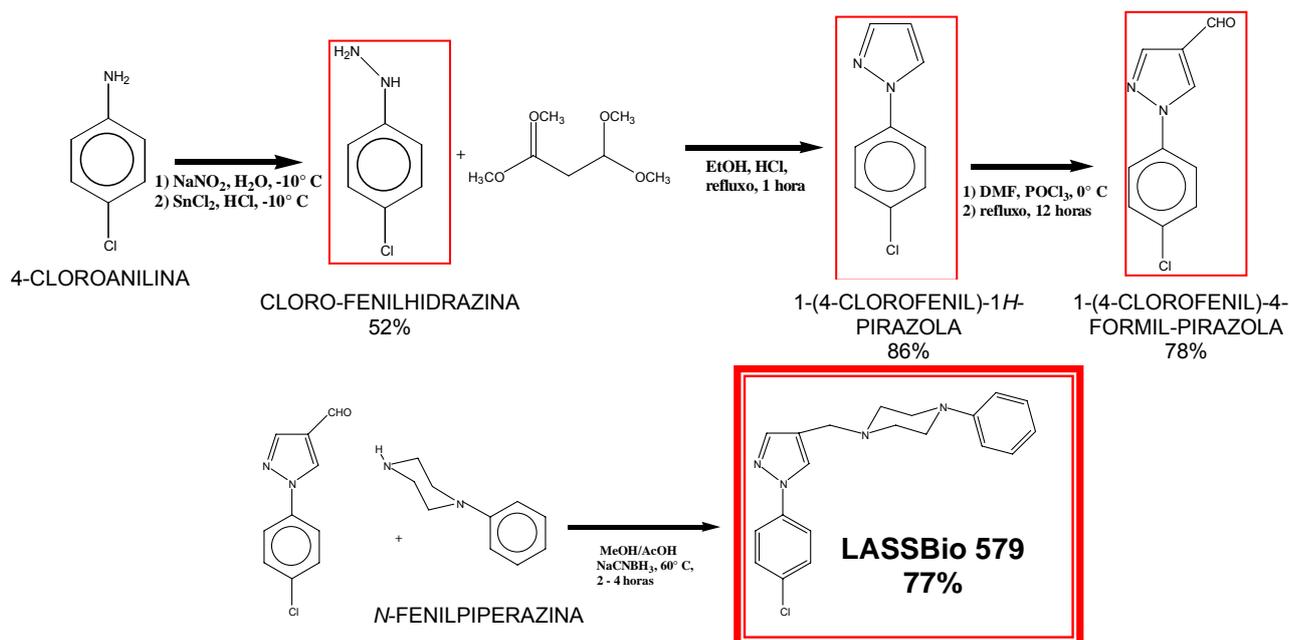


Figura 1.15 - Representação esquemática das etapas da síntese do LASSBio 579 (MENEGATTI, 2001).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 MÉTODOS DE MONITORAMENTO APLICADOS AOS ESTUDOS DE BIOCONVERSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

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

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

Mais especificamente, objetivou-se:

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

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

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

Na CCD foram utilizadas cromatofolhas de alumínio TLC 20x20 cm sílica gel 60 F₂₅₄, espessura da camada de sílica de 0,25 cm (placa analítica) Alugram[®] (Macherey-Nagel, Germany) e as fases móveis acetato de etila/metanol 20:80, acetato de etila/metanol 60:40, acetato de etila/metanol 95:05. As placas cromatográficas foram visualizadas em luz UV a 254 nm e 365 nm e os diferentes valores de R_fs foram determinados.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

3.2.1 Microrganismos

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

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

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

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

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

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

- *Chaetonium indicum* LCP 984200

3.2.2 Meios de cultura

Ágar Batata

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

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

Meio líquido “Potato Dextrose Soy Medium” – PDSM

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

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

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

3.2.3 Manutenção das cepas

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

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

3.3 TRIAGEM

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

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

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

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

cm sílica gel 60 F₂₅₄. Os sobrenadantes de incubação do período de 48 horas de todas as cepas foram escolhidos para análise por CLAE.

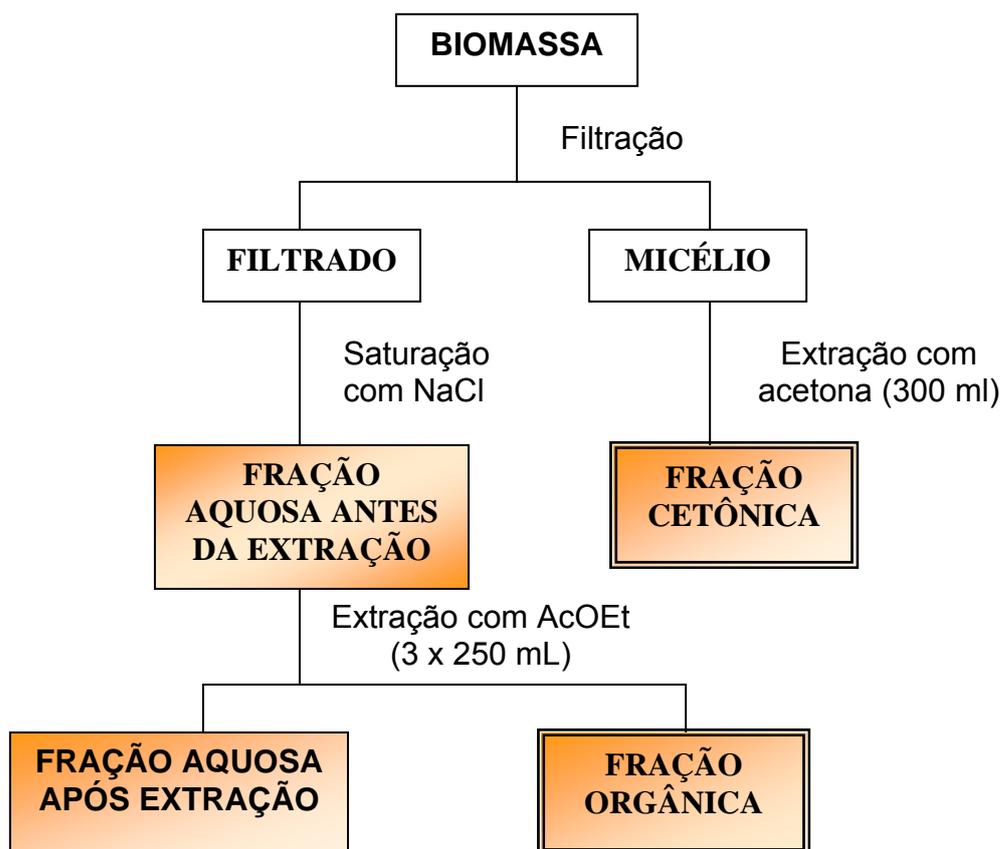
3.4 SEMI-PREPARATIVO

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

3.4.1 Filtração e Extração

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

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

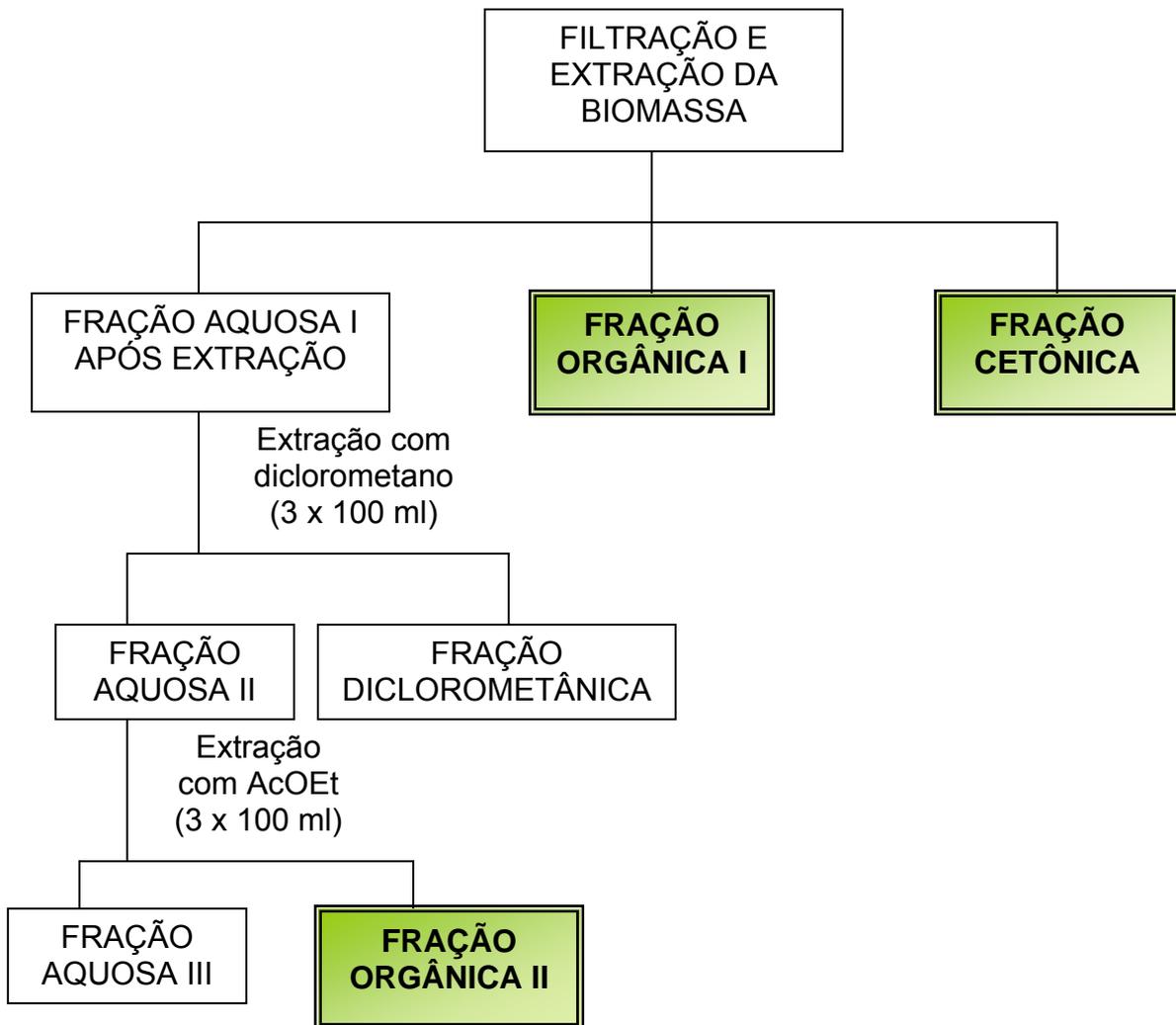


Esquema 1 - Processo de extração dos derivados ao término da incubação.

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

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

filtrou-se em funil de vidro sinterizado e evaporou-se o solvente. Após a extração com diclorometano, a fração aquosa II foi saturada com NH_4Cl (cloreto de amônio P.A - Vetec[®]), extraída com três partes (100 ml) de acetato de etila, filtrada e rotaevaporada sob vácuo, resultando na Fração Orgânica II e na Fração Aquosa III (Esquema 2).



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

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

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