

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA CAMILA LOPES CAVAION

APLICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA S-OXIDAÇÃO DO
ÁCIDO 2-[4-(1,4-TIAZINAN-4-ILSULFONIL)FENILCARBAMOIL]BENZÓICO
(LASSBio-596)

Goiânia

2012



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG



Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Juliana Camila Lopes Cavaion				
E-mail:	julianacavaion@yahoo.com.br				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:			UF:		Sigla:
País:	Brasil	UF:	GO	CPF:	013.777.121-50
Título:	Aplicação de fungos filamentosos para S-oxidação do ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonyl)fenilcarbamoil]benzóico (LASSBio-596)				
Palavras-chave: Microrganismos. Previsão <i>in silico</i> . LASSBio-596. <i>Beauveria bassiana</i> . S-oxidação. Sulfona.					
Título em outra língua:		Application of filamentous fungi for S-oxidation of 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ylsulfonyl)phenylcarbamoil]benzoic acid (LASSBio-596)			
Palavras-chave em outra língua:		Microorganisms. <i>In silico</i> prediction. LASSBio-596. <i>Beauveria bassiana</i> . S-oxidation. Sulfone.			
Área de concentração:		Fármacos e Medicamentos			
Data defesa:		04 de junho de 2012			
Programa de Pós-Graduação:		Ciências Farmacêuticas			
Orientador (a):	Prof.ª Dra. Valéria de Oliveira				
E-mail:	valeria@farmacia.ufg.br				

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Juliana Camila Lopes Cavaion
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 04 / 06 / 2012

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

JULIANA CAMILA LOPES CAVAION

**APLICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA S-OXIDAÇÃO DO
ÁCIDO 2-[4-(1,4-TIAZINAN-4-ILSULFONIL)FENILCARBAMOIL]BENZÓICO
(LASSBio-596)**

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof.^a Dra. Valéria de Oliveira

Goiânia

2012

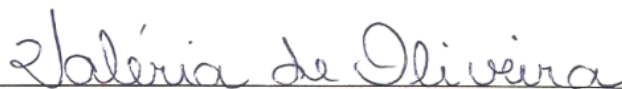
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

- C376a Cavaion, Juliana Camila Lopes.
Aplicação de fungos filamentosos para S-oxidação do
ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]
benzóico (LASSBio-596) [manuscrito] / Juliana Camila
Lopes Cavaion. - 2012.
91 f.
- Orientadora: Prof.^a Dra. Valéria de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Farmácia, 2012.
Bibliografia.
1. Microorganismos – Biotransformação. 2. *Beauveria
bassiana*. 3. Oxidação - Sulfona. I. Título.
- CDU: 615.1:582.28

Folha de Aprovação

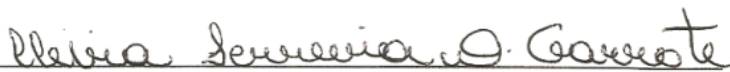
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 04 de junho de 2012, pela mestranda Juliana Camila Lopes Cavaion.

Banca Examinadora:

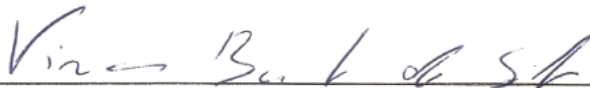


Profa. Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFG)

Presidente



Profa. Dra. Cléia Ferreira Duarte Garrote (FF/UFG)



Prof. Dr. Vinícius Barreto da Silva (FF/UFG)

Dedico esta conquista à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe pelo apoio e carinho.

À minha orientadora professora Dra. Valéria de Oliveira pelo incentivo e otimismo.

À professora Dra. Carolina Horta Andrade pela orientação nos estudos in silico.

Ao professor Dr. Ricardo Menegatti pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás.

À Fernanda Maura Ferreira Bellato por desenvolver seu trabalho na secretaria do Programa de Pós-graduação com exímio desempenho e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Ao LASSBio da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao Rodolpho de Campos Braga pela realização das análises de Espectrometria de Massas.

Ao professor Dr. Luciano Moraes Lião do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

Aos membros da banca de Qualificação, professores Dra. Carolina Horta Andrade, Dra. Michelle Pereira Quintino e Dr. Ricardo Menegatti, pela disponibilidade em contribuir com sugestões e críticas necessárias ao aprimoramento desta dissertação.

Aos professores Dra. Clévia Ferreira Duarte Garrote, Dra. Michelle Pereira Quintino e Dr. Vinícius Barreto da Silva pelo aceite em participar da banca de Defesa.

Aos meus amigos Emmanuel, Kelly, Telma, Sarah, Mariana, Larissa, Renata, Marcos Túlio, Rodolpho, Bruno, e em especial à minha amiga Juliana Penso, pela convivência nestes dois anos de trabalho no LaBioCon.

Aos meus amigos Amanda, Sávia, Sérgio e Daniele da Fundação Hemocentro de Brasília que possibilitaram as viagens para Goiânia.

Aos meus pais (Juvênia e Lourival), irmãos (Janaína e Wilton), sobrinho (Gabriel), minha amada cachorrinha e todos os familiares.

Ao meu estimado amigo Pedro Henrique pelo incondicional apoio.

Ao Everton, também conhecido como Fíiiii, pela motivação.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Os fungos filamentosos possuem o sistema enzimático citocromo P450 semelhante ao de mamíferos, cuja aplicação permite catalisar reações oxidativas de fase I do metabolismo. A obtenção de derivados funcionalizados por estes microrganismos foi o objetivo principal deste trabalho. Estudos *in silico* de previsão do metabolismo nos programas *MetaPrint2D* e *SMARTCyp* indicaram reações de S-oxidação, hidroxilação aromática e desalquilação, sendo mais provável a S-oxidação no anel tiomorfolina do ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzóico (LASSBio-596). Os fungos filamentosos *Absidia blakesleana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, *Fusarium roseum* ATCC 14717 e *Streptomyces vendulae* ATCC 8664 foram empregados para biotransformação do LASSBio-596. Nas condições reacionais aplicadas, substrato solubilizado em metanol com concentração de 0,25 mg/mL adicionado ao meio de cultura líquido PDSM e incubado a 27 °C com 200 rpm por 96 horas, a *Beauveria bassiana* ATCC 7159 promoveu a S-oxidação no anel tiomorfolina resultando no derivado sulfona do LASSBio-596, denominado LaBioCon 214, com rendimento de 5,84 %, e constatou-se a reação de hidrólise da amida obtendo o composto 4-(tiomorfolina-sulfonil)anilina, LaBioCon 202, com rendimento de 13,8 %. Verificou-se que o solvente utilizado interfere no processo de biotransformação. O monitoramento das reações e a purificação dos derivados obtidos foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta em 267 nm e cromatografia preparativa com coluna Microsorb 100-5 C18 (250 x 10 mm, 5 µm). Posteriormente, foi obtido o derivado sulfona, LaBioCon 223, por via sintética. A caracterização estrutural foi realizada por métodos clássicos como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas.

Palavras-chave: Microrganismos. Previsão *in silico*. LASSBio-596. *Beauveria bassiana*. S-oxidação. Sulfona.

ABSTRACT

Filamentous fungi have cytochrome P450 enzyme system similar to mammals whose application allows catalyze phase I oxidative reactions of metabolism. Obtaining functionalized derivatives by these microorganisms was the main purpose of this dissertation. Studies *in silico* to predict metabolism in the programs *MetaPrint2D* and *SMARTCyp* indicated S-oxidation, aromatic hydroxylation and dealkylation reactions, as the most likely S-oxidation in thiomorpholine ring of 2-[4-(1,4-thiazinan-4-ylsulfonyl)phenylcarbamoyl]benzoic acid (LASSBio-596). The filamentous fungi *Absidia blakesleana* ATCC 26617, *Aspergillus candidus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, *Fusarium roseum* ATCC 14717 and *Streptomyces vendulae* ATCC 8664 were used for biotransformation of LASSBio-596. In the reaction conditions applied, substrate dissolved in methanol with concentration of 0.25 mg/mL added to liquid culture medium PDSM and incubated at 27 °C with 200 rpm for 96 hours, the fungus *Beauveria bassiana* ATCC 7159 performed S-oxidation in the thiomorpholine ring resulting in sulfone derivative of LASSBio-596, called LaBioCon 214, yield of 5.84 %, and it was found the hydrolysis of amide reaction obtaining the compound 4-(thiomorpholinosulfonyl)aniline, LaBioCon 202, yield of 13.8 %. It was noted the solvent used affects the biotransformation process. The monitoring of the reactions and purification of the derivatives obtained were performed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detector at 267 nm and preparative chromatography with column Microsorb 100-5 C18 (250 x 10 mm, 5 µm). Subsequently, sulfone derivative was obtained, called LaBioCon 223, by synthesis. Structural characterization was made by classical methods such as ¹H NMR and mass spectrometry.

Keywords: Microorganisms. *In silico* prediction. LASSBio-596. *Beauveria bassiana*. S-oxidation. Sulfone.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angström
AcOEt : MeOH	Acetato de etila : metanol
ADME/ Tox	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção/ toxicidade
AM1	<i>Austin model 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CYP	Citocromo
CYP450	Citocromo P450
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DFT	<i>Density functional theory</i> (teoria do funcional de densidade)
ee	Excesso enantiomérico
EM	Espectrometria de massas
Hz	Hertz
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LaBioCon 202	4-(tiomorfolina-sulfonil)anilina
LaBioCon 214	Derivado sulfona do LASSBio-596 obtido por biossíntese
LaBioCon 223	Derivado sulfona do LASSBio-596 obtido por via sintética
LaBioCon	Laboratório de Bioconversão
LabMol	Laboratório de Modelagem Molecular para Planejamento de Fármacos e Estudos de Metabolismo
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LASSBio-596	Ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzóico
LPS	Lipopolissacarídeo
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
<i>m/z</i>	Massa-carga
NOR	<i>Normalised occurrence ratio</i>
PDE 4	Enzima fosfodiesterase 4
PDE 5	Enzima fosfodiesterase 5

PDSM	<i>Peptone dextrose soy medium</i>
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
RPM	Rotações por minuto
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FÁRMACOS	13
1.2	ESTUDO DO METABOLISMO DE FÁRMACOS	15
1.2.1	Modelo microbiano do metabolismo animal	16
1.3	REAÇÕES DE S-OXIDAÇÃO	18
1.4	ÁCIDO 2-[4-(1,4-TIAZINAN-4-ILSULFONIL)FENILCARBAMOIL]BENZÓICO (LASSBio-596)	23
2	OBJETIVOS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	SUBSTRATO	28
3.2	ESTUDOS <i>in silico</i>	28
3.3	MICRORGANISMOS	29
3.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	30
3.4.1	Preparação dos meios de cultura	30
3.4.1.1	Meio sólido ágar batata inclinado	30
3.4.1.2	Meio líquido PDSM (<i>Peptone Dextrose Soy Medium</i>)	30
3.4.2	Manutenção e repique das cepas	31
3.4.3	Inoculação no meio de cultura líquido PDSM	31
3.4.4	Adição do substrato	32
3.4.4.1	Incubação A	32
3.4.4.2	Incubação B	32
3.4.5	Coleta das alíquotas	32
3.4.6	Processo de extração	33
3.5	CROMATOGRAFIA	34
3.5.1	Cromatografia em camada delgada	34
3.5.2	Cromatografia em coluna	34
3.5.3	Cromatografia líquida de alta eficiência	35
3.6	ESPECTROSCOPIA	35
3.7	ESPECTROMETRIA	35
3.8	SÍNTESE	36
3.8.1	Síntese do derivado sulfóxido do LASSBio-596	36

3.8.2	Síntese do derivado sulfona do LASSBio-596	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	PREVISÃO <i>in silico</i>	37
4.2	MODELO MICROBIANO DO METABOLISMO – INCUBAÇÃO A	43
4.3	MODELO MICROBIANO DO METABOLISMO – INCUBAÇÃO B	46
4.3.1	LaBioCon 202	51
4.3.2	LaBioCon 214	55
4.4	SÍNTESE	63
4.4.1	LaBioCon 223	63
5	CONCLUSÕES	68
6	PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FÁRMACOS

Os fármacos são compostos químicos estranhos ao organismo e que uma vez administrados podem ser eliminados inalterados ou biotransformados em metabólitos mais polares. Os sistemas enzimáticos envolvidos na biotransformação estão localizados principalmente no retículo endoplasmático liso e no citosol das células hepáticas. Também estão presentes nas mitocôndrias e em outros tecidos, tais como pulmão, esôfago, rim, cérebro, coração e placenta (ANZENBACHER; ANZENBACHEROVÁ, 2001).

O metabolismo dos fármacos pode ser dividido em reações de fase I e reações de fase II. Na fase I os compostos são modificados por oxidação, redução ou hidrólise, sendo tais reações catalisadas pelas enzimas do sistema microssomal hepático, também conhecidas como oxidases de função mista. Este sistema é composto pelo citocromo P450 (CYP450), citocromo b5 e a enzima NADPH citocromo P450 redutase. A introdução de grupos funcionais (-OH, -COOH, -SH, -O-, -NH₂) pelas enzimas de fase I tem a finalidade de aumentar a polaridade dos compostos, a fim de facilitar a excreção pelo organismo (FURA, 2006).

As reações de fase II são conhecidas como reações de conjugação e geralmente levam à formação de produtos farmacologicamente inativos e polares. Os grupamentos envolvidos com mais frequência são glicuronil, glicil, sulfato, metil e acetil. As enzimas de fase II incluem superfamílias de enzimas que catalisam reações de conjugação como glutathione-S-transferase, UDP-glucuronil transferase, sulfotransferases, *N*-acetiltransferase e metiltransferases (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

Embora tenha sido observado pela primeira vez no final dos anos 40, o termo citocromo P450 somente foi usado em 1962 para identificar uma hemoproteína com características únicas, designando o nome de pigmento microssomal ligante ao monóxido de carbono (OMURA; SATO, 1962). A característica clássica das P450 é a posição peculiar de sua banda de Soret em 450 nm como resultado da formação do complexo Fe(II)-CO, surgindo desta constatação a denominação P450 (OMURA; SATO, 1964).

O sítio ativo da CYP450 contém a protoporfirina IX situada em uma cavidade hidrofóbica na proteína, tendo a quinta posição de coordenação do ferro-heme ocupada por um átomo de enxofre de uma cisteína residual, responsável pela ligação do sítio ativo à enzima e o sexto sítio de coordenação está ligado a uma molécula de água. É neste sexto sítio que ocorre a ativação do oxigênio molecular. Mesmo apesar da diversidade de substratos que podem ser oxidados e do tipo de reação, todas as CYP450 envolvem um ciclo catalítico comum (DENISOV *et al.*, 2005; BERNHARDT, 2006; JUNG, 2011).

As CYP são capazes de ativar dois átomos de oxigênio que são fornecidos pela molécula de oxigênio (O₂). O oxigênio se liga ao grupamento heme que, por sua vez, está ligado fortemente à proteína através do enxofre tiolato aniônico de um resíduo de cisteína. Esse tipo de ligação à proteína permite que o heme ative a molécula de oxigênio, separando os dois átomos. Um oxigênio é utilizado na formação de água e o outro é introduzido no substrato. Na maioria dos casos, o grupamento funcional adicionado ao substrato é uma hidroxila, contudo as reações catalisadas pelas CYP podem incluir também epoxidações, *N*-,*S*-,*O*-desalquilações, *N*-oxidações, sulfoxidações e desalogenações (ZUBER; ANZENBACHEROVA; ANZENBACHER, 2002).

A superfamília das CYP inclui dezenas de famílias identificadas por um número arábico após a sigla, tais como CYP1, CYP2 e CYP3. A escolha do número pode ser arbitrária ou estar relacionada à função da família, por exemplo, a CYP21 atua como hidroxilase na posição 21 de esteróides (ANZENBACHER; ANZENBACHEROVÁ, 2001). As enzimas que constituem as subfamílias possuem maior similaridade de sequências e são identificadas por uma letra após o número que identifica a família, como por exemplo, CYP1A, CYP2C e CYP3A. As isoenzimas são designadas por um número após a identificação das subfamílias, como por exemplo, CYP1A1, CYP2C9 e CYP3A4 (DE MONTELLANO, 2005; DE MONTELLANO, 2010).

As diferentes isoformas de CYP podem ser encontradas em quase todas as espécies de seres vivos, como animais, vegetais, fungos e bactérias (NELSON *et al.*, 1996). A quantidade pode variar conforme a espécie, desde 3 isoformas em *Saccharomyces cerevisiae*, 74 em *Cunninghamella elegans*, 57 em seres humanos e até 102 em camundongos (SELISKAR; ROZMAN, 2007).

Sete das 57 isoformas humanas conhecidas são responsáveis pelo metabolismo de mais de 90 % dos fármacos em uso clínico. Estas isoformas são: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5 (SUN; SCOTT, 2010). Dentre estas, as três principais, CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9, metabolizam cerca de 70 % dos fármacos, sendo a CYP3A4, a forma mais abundante no fígado e responsável pelo metabolismo de aproximadamente 50 % dos fármacos (LI, 2001).

A Figura 1 apresenta a estrutura da CYP3A4 humana determinada por cristalografia de raios-X (YANO *et al.*, 2004). Esta isoforma é responsável pelo metabolismo de diversos fármacos como atorvastatina, lovastatina, sildenafil, triazolam, ciclosporina, nifedipina, diltiazem, verapamil, ritonavir, indinavir, dentre outros (LI; KAMINSKI; RASMUSSEN, 1995; ZANGER *et al.*, 2008; ZHOU, 2008).



Figura 1 – Estrutura cristalográfica da isoforma CYP3A4 com o grupo heme ao centro (YANO *et al.*, 2004).

1.2 ESTUDO DO METABOLISMO DE FÁRMACOS

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (da sigla IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*) a química farmacêutica medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento de

um composto (IUPAC, 1998). A descoberta é a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada fisiopatologia e a aplicação de estratégias de planejamento estrutural para desenho de ligantes do alvo selecionado. A etapa de otimização compreende a melhoria da estrutura através de modificações planejadas, visando o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo e excreção/ toxicidade – ADME/ Tox) e estabelecimento da relação estrutura-atividade. Em seguida, a etapa de desenvolvimento objetiva a avaliação do perfil ADME/ Tox e das propriedades farmacêuticas, de modo a viabilizar seu uso clínico (LIMA, 2007).

O estudo do metabolismo dos fármacos é uma ferramenta para avaliar o perfil farmacológico, farmacocinético e de segurança dos metabólitos gerados (AZERAD, 1999; FURA, 2006). Pode ser desenvolvido por métodos *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* e *in silico*. A expressão *in silico* refere-se a simulações realizadas no computador, em que realiza-se a previsão do comportamento de sistemas reais (TESTA; BALMAT; LONG, 2004; MODA, 2011).

1.2.1 Modelo microbiano do metabolismo animal

A bioconversão é definida como a conversão química de um substrato utilizando métodos biológicos ou biocatalisadores. Quando a conversão é realizada por células inteiras que contêm as enzimas metabolizadoras esse processo é denominado biotransformação (LERESCHE, MEYER, 2006).

O progresso no uso de enzimas e células inteiras na química orgânica sintética foi impulsionado pelos estudos em laboratórios acadêmicos e industriais sobre a utilização de microrganismos para modificar núcleos esteroidais (PETERSON; MURRAY, 1952). De acordo com Stoudt (1960), em 1937 Mamoli e Vercellone prepararam a testosterona a partir da deidroepiandrosterona utilizando microrganismos, conforme esquematizado na Figura 2. Esse trabalho viabilizou o desenvolvimento da produção dos hormônios sintéticos.

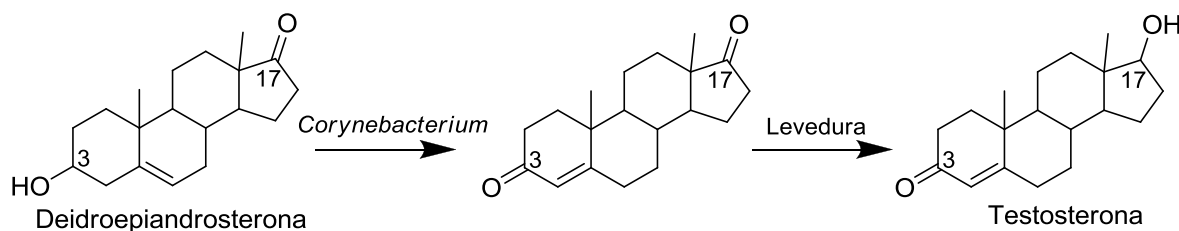


Figura 2 – Biotransformação da deidroepiandrosterona utilizando microrganismos (STOUDT, 1960).

Hench e colaboradores (1949) publicaram um trabalho sobre a produção da corticosterona, um derivado da cortisona, através da ação de microrganismos na deoxicorticosterona. Com a transformação microbiana foi possível funcionalizar o C-11 de forma mais simples que a proposta por síntese química (Figura 3).

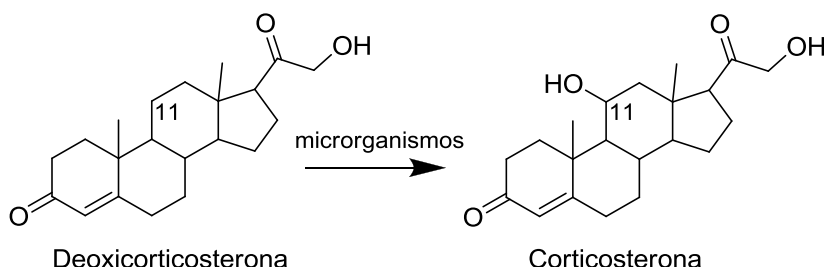


Figura 3 – Biotransformação da deoxicorticosterona utilizando microrganismos (HENCH *et al.*, 1949).

Em 1952, Peterson e Murray promoveram a hidroxilação da ligação C–H não ativada da progesterona, realizando a bioconversão para 11 α -hidroxiprogesterona pelo fungo *Rhizopus arrhizus*, como demonstrado na Figura 4.

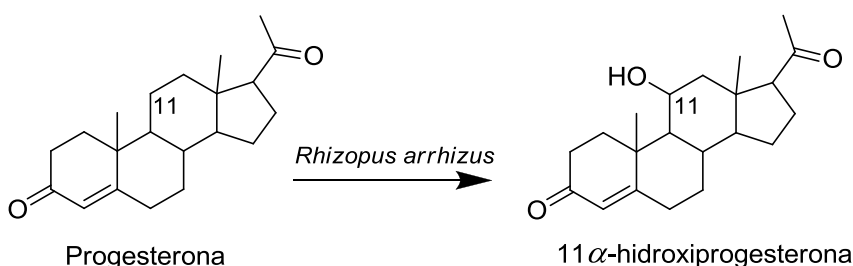


Figura 4 – Biotransformação da progesterona em 11 α -hidroxiprogesterona pelo fungo *Rhizopus arrhizus* (PETERSON; MURRAY, 1952).

Na década de 70, Smith e Rosazza propuseram o modelo microbiano do metabolismo após notarem a similaridade entre os metabólitos produzidos por alguns microrganismos e os metabólitos de mamíferos, principalmente os de fase I. Com isso, sugeriram que os microrganismos e os mamíferos possuem um sistema enzimático CYP450 homólogo (SMITH; ROSAZZA, 1974; NELSON; STROBEL,

1989). Os fungos filamentosos são os microrganismos mais comumente utilizados no estudo do modelo microbiano (VAN DEN BRINK *et al.*, 1998; AZERAD, 1999; FURA *et al.*, 2004; ASHA; VIDYAVATHI, 2009; ČREŠNAR; PETRIČ, 2011).

A aplicação do modelo microbiano para o estudo do metabolismo de fármacos apresenta vantagens como:

- (1) a manutenção das culturas de microrganismos é mais simples e barata que a manutenção de culturas de células e tecidos ou animais de laboratório;
- (2) os meios de cultura são facilmente preparados e possuem baixo custo;
- (3) possibilidade de utilização de um grande número de cepas;
- (4) útil nos casos em que régio- e estereoespecificidade são necessárias;
- (5) facilidade para substituir reações sintéticas que envolvem muitas etapas;
- (6) as concentrações usadas são maiores que as administradas em animais de laboratório;
- (7) detecção, isolamento e identificação estrutural dos metabólitos formados;
- (8) produção dos metabólitos em quantidade suficiente para elucidação estrutural e para estudos farmacológicos e toxicológicos;
- (9) podem ser formados novos metabólitos com diferentes atividades biológicas;
- (10) metodologia confiável e reprodutível;
- (11) enquadramento na química verde por utilizar água como solvente (AZERAD, 1999; FURA *et al.*, 2004; ASHA; VIDYAVATHI, 2009; LUSTOSA *et al.*, 2012).

Como limitações do modelo microbiano citam-se a necessidade de realização de triagem das cepas, de adequação das condições reacionais e a dificuldade de extração dos compostos isolados quando há grande número de metabólitos formados ocasionando um rendimento diminuído.

1.3 REAÇÕES DE S-OXIDAÇÃO

Conforme mencionado anteriormente, as reações de fase I são catalisadas pelas enzimas da CYP450. As reações de sulfoxidação correspondem a S-oxidação de sulfetos a sulfóxidos, que ainda podem ser oxidados a sulfonas (HOLLAND *et al.*, 1991).

A configuração piramidal do sulfóxido R_1R_2SO faz do átomo de enxofre um centro pró-quiral (JENKS; MATSUNAGA; GORDON, 1996). Existem na literatura

alquil-aril-sulfetos apresentaram resultados fornecendo sulfóxidos com bons ee (60-100 %) e rendimentos moderados (20-50 %) (HOLLAND, 1988).

Assim, iniciou-se uma investigação sistemática por microrganismos capazes de oxidar de forma enantiosseletiva derivados alquil-aril-sulfetos. Em 1978, Abushanab e colaboradores publicaram a conversão de metil-*p*-toluil-sulfeto por *Helminthosporium sp.* obtendo o enantiômero *S* do sulfóxido com aproximadamente 100 % de ee e 50 % de rendimento, Figura 7 (ABUSHANAB *et al.*, 1978).

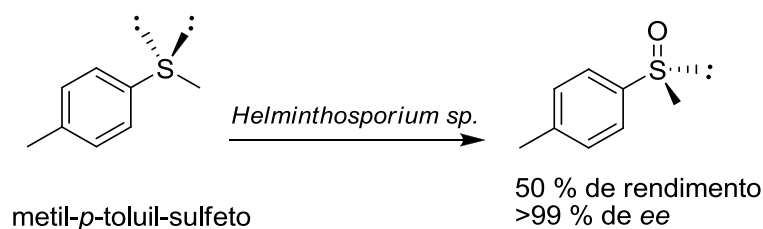


Figura 7 – Oxidação de metil-*p*-toluil-sulfeto por *Helminthosporium sp.* obtendo o enantiômero *S* do sulfóxido (ABUSHANAB *et al.*, 1978).

O grupo de estudos do pesquisador Holland utilizou os fungos *Helminthosporium sp.* NRRL 4671 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 na oxidação do derivado etil-fenil-sulfeto para obtenção de (*S*)-etil-fenil-sulfóxido com rendimentos de 40 % e 84 % de ee e (*R*)-etil-fenil-sulfóxido com 70 % e 84 % de ee, respectivamente (Figura 8). Esses resultados mostraram a versatilidade deste método na obtenção do enantiômero de interesse (HOLLAND; CARTER, 1982; HOLLAND *et al.*, 1997).

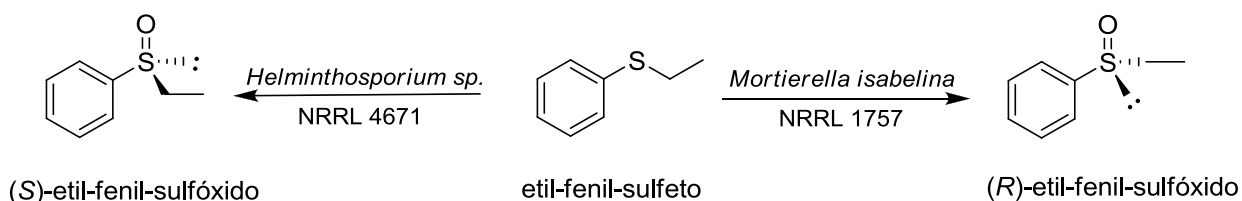


Figura 8 – Oxidação de etil-fenil-sulfeto por *Helminthosporium sp.* NRRL 4671 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 (HOLLAND *et al.*, 1997).

Podem-se citar alguns exemplos de fármacos que sofrem reações de *S*-oxidação no processo de biotransformação, tais como, albendazol (anti-helmíntico), omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol (inibidores da bomba de prótons), fenotiazina, promazina, clorpromazina e tioridazina (antipsicóticos fenotiazínicos utilizados no tratamento da esquizofrenia) e sulindaco (anti-inflamatório não-esteroidal) (VALOIS *et al.*, 1994; ANDERSSON, 1996; FANG; GORROD, 1999; PANGBURN *et al.*, 2005).

Os estudos de biotransformação de fármacos podem caracterizar metabólitos ativos ou novos intermediários úteis para a indústria farmacêutica. Cita-se como exemplo a tioridazina, que sofre S-oxidação formando derivados sulfóxidos. A sulfoxidação do grupo tioetil forma o metabólito tioridazina-2-sulfóxido e a sulfoxidação no anel tiazina forma a tioridazina-5-sulfóxido. Posteriormente, a tioridazina e tioridazina-2-sulfóxido podem sofrer uma oxidação a sulfona e formar a tioridazina-2-sulfona, conforme demonstrado na Figura 9 (ZEHNDER *et al.*, 1962; GRUENKE; CRAIG, 1975).

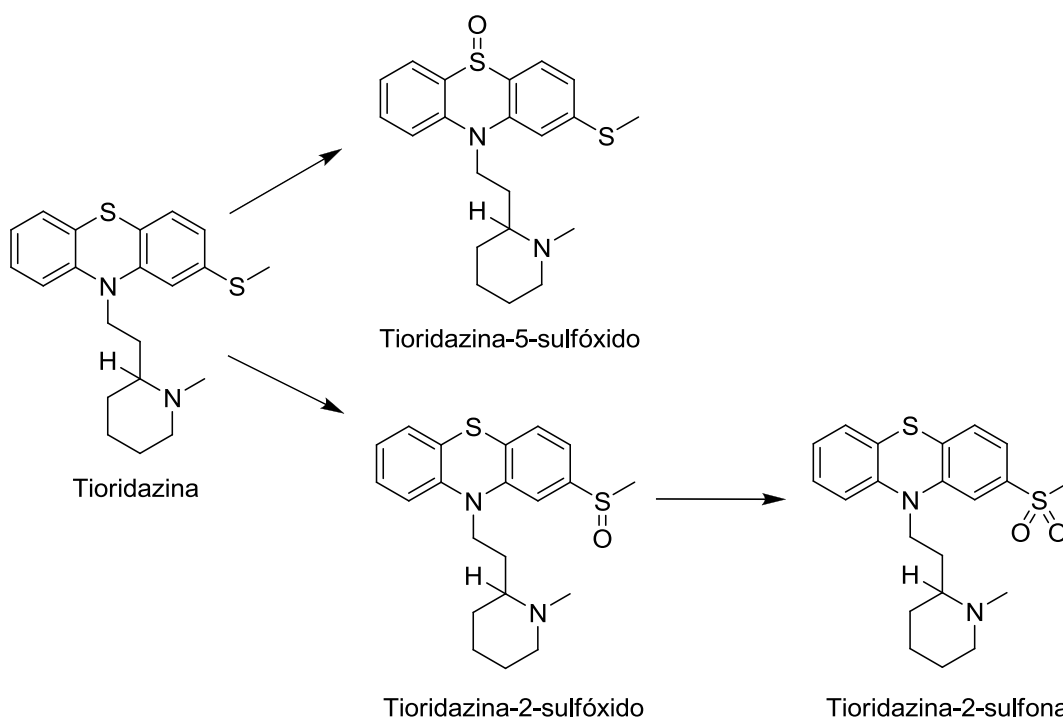


Figura 9 – Biotransformação da tioridazina em seus metabólitos tioridazina-5-sulfóxido, tioridazina-2-sulfóxido e tioridazina-2-sulfona (ZEHNDER *et al.*, 1962).

Tioridazina-2-sulfóxido e tioridazina-2-sulfona são metabólitos farmacologicamente ativos, enquanto tioridazina-5-sulfóxido está relacionada com a cardiotoxicidade do fármaco (GOTTSCHALK *et al.*, 1978; HALE; POKLIS, 1986). A tioridazina-2-sulfóxido foi introduzida em uso clínico, sendo aproximadamente duas vezes mais potente como agente antipsicótico do que a tioridazina (AQUILAR, 1975).

Borges e colaboradores (2007) estudaram a biotransformação estereosseletiva da tioridazina por fungos endofíticos isolados de plantas da família Asteraceae. O átomo de enxofre da cadeia lateral (posição 2) ou do anel fenotiazínico (posição 5) foi oxidado, formando os principais metabólitos encontrados

em seres humanos, tioridazina-2-sulfóxido e tioridazina-5-sulfóxido, conforme demonstrado na Figura 9.

Avaliou-se o perfil de biotransformação da tioridazina por 12 fungos endofíticos isolados de *Tithonia diversifolia*, *Viguiera arenaria* e *Viguiera robusta* e 1 fungo de solo (*Penicillium waksmanii*). Dentre os 13 fungos, quatro merecem destaque por exibirem um potencial de biotransformação estereosseletivo mais evidenciado: *Phomopsis* sp. apresentou maior mono-5-sulfoxidação para as formas (S)- e (R)- (9,3 % e 5,8 %, respectivamente); *Glomerella cingulata* apresentou maior mono-5-sulfoxidação para as formas (S)- + (R)- (39,7 %); *Diaporthe phaseolorum* apresentou maior mono-2-sulfoxidação para as formas (S)- e (R)- (84,4 % e 82,5 %, respectivamente) e *Aspergillus fumigatus* apresentou maior mono-2-sulfoxidação das formas (S)- (20,7 %) e (R)- (34,4 %) (BORGES, 2006).

Considerando que os metabólitos são farmacologicamente ativos, o estudo do perfil de biotransformação por fungos endofíticos torna-se útil na obtenção dos metabólitos de tioridazina na forma enantiomericamente pura, a fim de serem posteriormente avaliados em estudos clínicos e toxicológicos (BORGES *et al.*, 2008).

Outro exemplo de aplicação do modelo microbiano do metabolismo é o estudo do perfil de biotransformação do fármaco albendazol. A bactéria *Streptomyces griseus* bioconverteu o albendazol em dois metabólitos, albendazol sulfóxido e albendazol sulfona, semelhantes aos metabólitos produzidos em mamíferos, Figura 10 (PRASAD; GIRISHAM; REDDY, 2010).

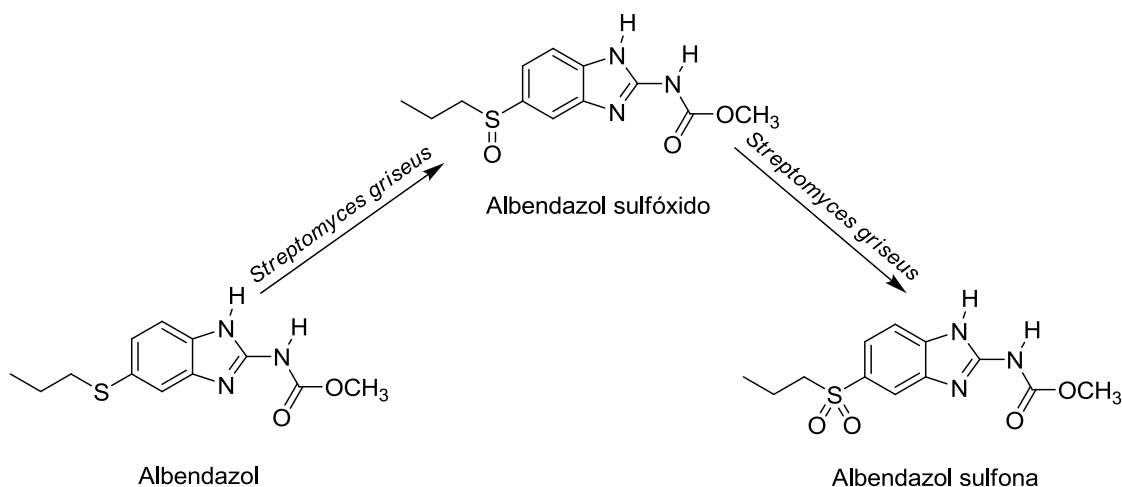


Figura 10 – Biotransformação do albendazol por *Streptomyces griseus* por S-oxidação, resultando na formação dos metabólitos sulfóxido e sulfona (PRASAD; GIRISHAM; REDDY, 2010).

O albendazol sulfóxido mostrou-se farmacologicamente ativo, sendo a eficácia da atividade anti-helmíntica atribuída a este metabólito (PRASAD; GIRISHAM; REDDY, 2010).

1.4 ÁCIDO 2-[4-(1,4-TIAZINAN-4-ILSULFONIL)FENILCARBAMOIL]BENZÓICO (LASSBio-596)

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro é um laboratório de pesquisa multidisciplinar na área de química farmacêutica medicinal e tem como principal objetivo contribuir para a descoberta de candidatos a protótipos de novos fármacos (BARREIRO, 2009).

Em pesquisas do LASSBio para desenvolvimento de fármacos antiasmáticos, identificaram-se a citocina fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as enzimas fosfodiesterases (PDEs) 4 e 5 como alvos promissores para o planejamento de novos candidatos a protótipos antiasmáticos simbióticos (LIMA; DE LIMA, 2009). Um agente simbiótico pode ser definido como um composto desenhado para atuar em, no mínimo, dois alvos moleculares pertencentes a janelas bioquímicas distintas, no entanto, envolvidos em uma mesma resposta fisiopatológica (BARREIRO; FRAGA, 2008).

O princípio da etapa de planejamento estrutural dos novos agentes antiasmáticos simbióticos constituiu-se da revisão da literatura científica relacionada aos protótipos com comprovada seletividade sobre os alvos moleculares eleitos (TNF- α , PDE 4 e PDE 5). De acordo com estes estudos, os compostos selecionados foram a talidomida (como protótipo modulador das ações do TNF- α) (LIMA, FRAGA, BARREIRO, 2001), a sildenafil (como inibidor seletivo de PDE 5) e a arilsulfonamida (como inibidor seletivo de PDE 4) (LIMA, 2001).

Com base em dados da relação estrutura química–atividade biológica de cada um dos protótipos selecionados e de seus análogos estruturais, o procedimento realizado foi o processo de simplificação molecular para mapeamento das unidades farmacofóricas dos protótipos em estudo. Após a identificação das subunidades farmacofóricas, a etapa seguinte foi a combinação dos farmacóforos selecionados empregando-se a estratégia de hibridação molecular (LIMA, 2001).

O híbrido planejado foi submetido a trocas bioisostéricas da unidade *N*-metilpiperazina, objetivando a construção de série congênere para permitir o desenho das sulfonamidas (LIMA, 2001). A gênese dos protótipos simbióticos está ilustrada na Figura 11.

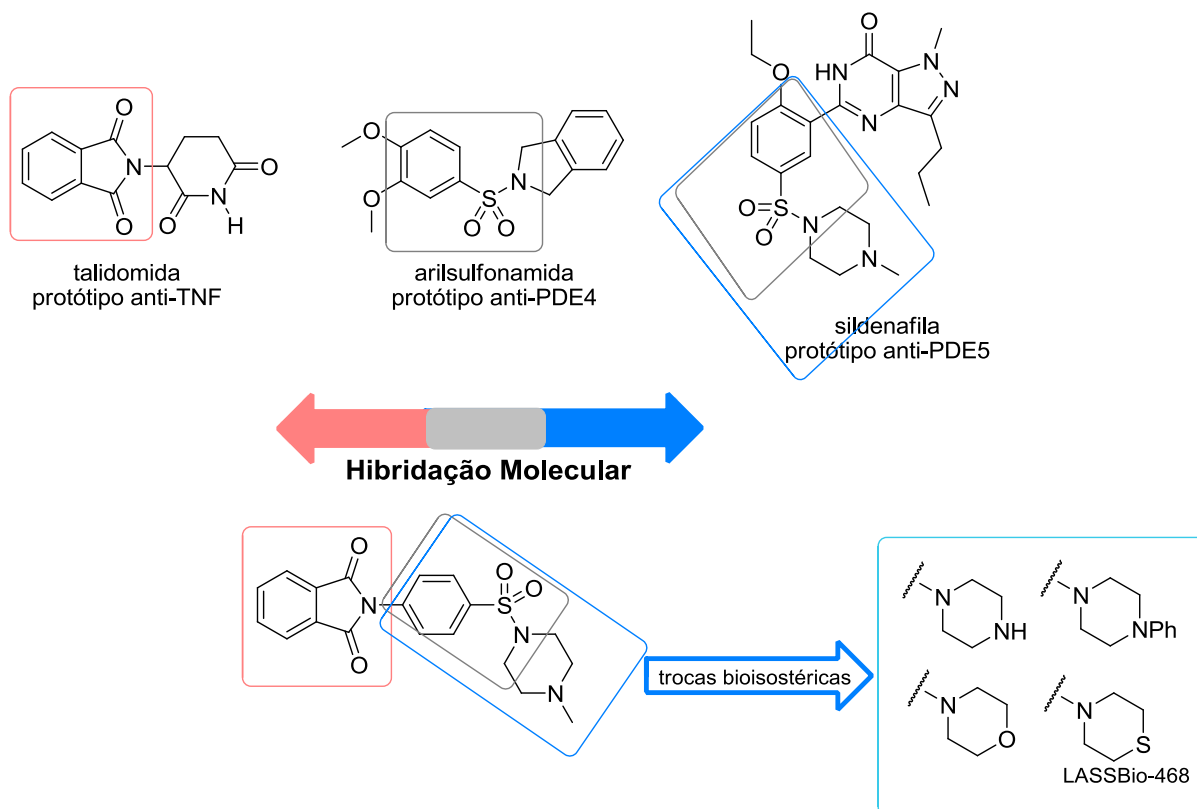


Figura 11 – Gênese dos protótipos simbióticos (LIMA; DE LIMA, 2009).

Em seguida, foram realizadas etapas de síntese, purificação e caracterização estrutural, sendo que os compostos foram submetidos a ensaios em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por inalação de lipopolissacarídeo (LPS). A interpretação da resposta inflamatória foi baseada no processo de migração dependente da participação da citocina $\text{TNF-}\alpha$, em que notou-se um aumento do número de neutrófilos no lavado bronco alveolar dos animais tratados com LPS (DE MORAES *et al.*, 1996).

Os resultados mostraram a capacidade dos híbridos de inibirem o processo de migração celular e diminuírem os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ no lavado bronco alveolar, sendo o composto denominado LASSBio-468 (2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenil]-1,3-isoindolinadiona) o mais potente. Em seguida, determinou-se a habilidade do LASSBio-468 inibir *in vitro* as enzimas PDE 4 e PDE 5 (LIMA *et al.*, 2002).

Após atestar o caráter simbiótico do LASSBio-468, atentou-se para a labilidade química do núcleo ftalimídico frente à hidrólise pH dependente, experimentalmente demonstrada para o protótipo talidomida (SCHUMACHER, SMITH, WILLIAMS, 1965). Então, considerou-se a transformação do LASSBio-468 em seu derivado carboxi-amídico correspondente (Figura 12). Assim, o produto hidrolisado foi preparado resultando no composto denominado LASSBio-596 (ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzóico), que configura-se como um legítimo candidato a protótipo de fármaco antiasmático simbiótico (BARREIRO *et al.*, 2002; BARREIRO *et al.*, 2004; LIMA, DE LIMA, 2009; ROCCO *et al.*, 2010).

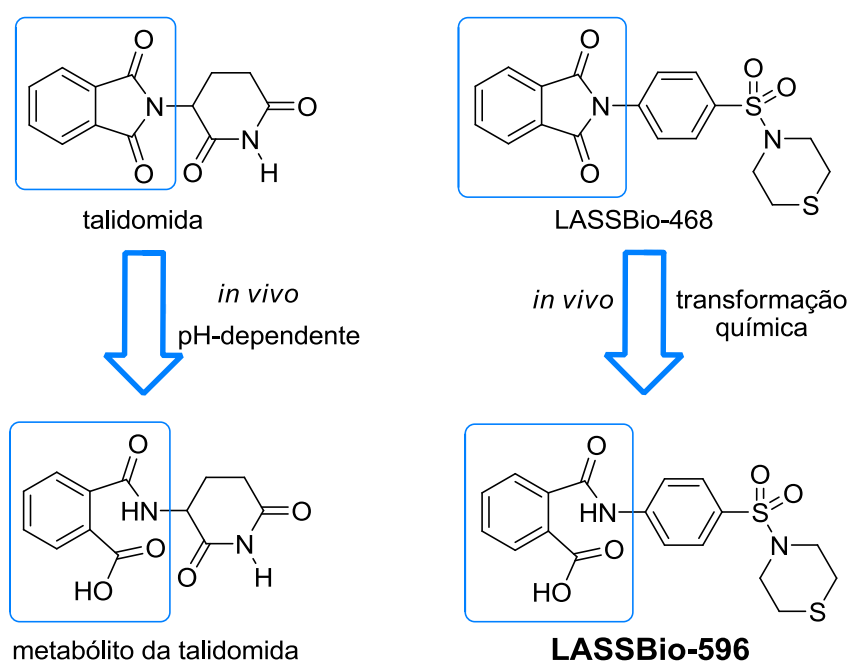


Figura 12 – Hidrólise da talidomida e do LASSBio-468 (LIMA; DE LIMA, 2009).

Em um estudo realizado em modelo de injúria pulmonar aguda, o composto LASSBio-596 fez a modulação do processo inflamatório pulmonar através da reversão das alterações mecânicas, bloqueio da fibroproliferação, inibição do recrutamento de neutrófilos e produção de TNF- α (ROCCO *et al.*, 2003).

Em outro estudo realizado em modelo de asma crônica murina, o composto teve a capacidade de prevenir as alterações morfológicas e mecânicas do pulmão induzidas pelo quadro de asma, bloqueando o processo de fibroproliferação e diminuindo a resistência das vias aéreas (CAMPOS *et al.*, 2006).

Além disso, num estudo mais recente em que houve a comparação entre o LASSBio-596 e o glicocorticoide dexametasona observou-se que os efeitos benéficos do LASSBio-596 superaram os evidenciados pela dexametasona, pois o

composto LASSBio-596 atuou no processo inflamatório induzido pela microcistina-LR (toxina produzida por cianobactérias na água), evitando as alterações na mecânica pulmonar e bioquímicas e também minimizando as modificações histológicas (CARVALHO, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010).

Considerando tais resultados promissores comparando com o glicocorticóide dexametasona, existe a necessidade de realização do estudo do metabolismo do LASSBio-596 para análise da segurança dos metabólitos gerados.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal foi a obtenção de derivados do LASSBio-596 através da biotransformação realizada por fungos filamentosos.

Os objetivos específicos foram:

- Executar estudos *in silico* para previsão do metabolismo utilizando a isoforma CYP2C9;
- Realizar a triagem com as cepas para bioconversão;
- Estabelecer as condições reacionais de bioconversão;
- Obter os derivados em quantidade suficiente para caracterização estrutural através de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas;
- Realizar a síntese dos derivados sulfóxido e sulfona do LASSBio-596.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUBSTRATO

O substrato é o ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoi]benzóico denominado **LASSBio-596** ($C_{18}H_{18}N_2O_5S_2$). O composto foi sintetizado no LASSBio da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A estrutura química está representada na Figura 13.

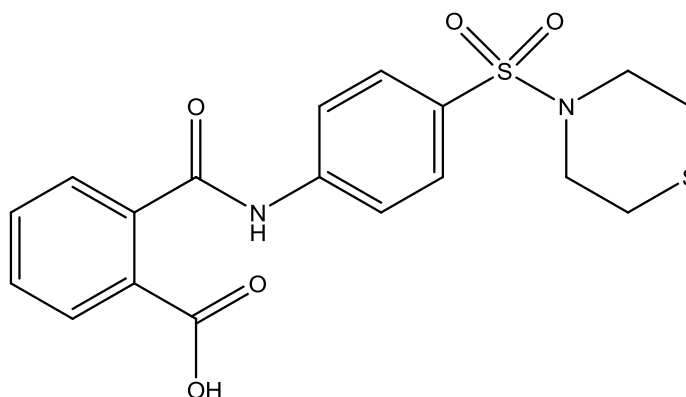


Figura 13 – Estrutura química do LASSBio-596 (Fonte: autor, 2011).

3.2 ESTUDOS *in silico*

Os cálculos foram realizados no Laboratório de Modelagem Molecular para Planejamento de Fármacos e Estudos de Metabolismo (LabMol) da Universidade Federal de Goiás em estações computacionais com sistema operacional CentOS 5.5 GNU/Linux, processadores Intel® Core™2 Duo, sob a coordenação da professora Dra. Carolina Horta Andrade.

A previsão dos sítios de metabolismo do LASSBio-596 foi realizada com o auxílio do programa *MetaPrint2D* (desenvolvido por Sam Adams, em colaboração com Lars Carlsson, Scott Boyer e Robert Glen. *Unilever Centre for Molecular Sciences Informatics, University of Cambridge; AstraZeneca, Mölndal*) e do programa *SMARTCyp* (desenvolvido por Patrik Rydberg, David Gloriam e Lars Olsen, *Department of Molecular Drug Research, University of Copenhagen*) utilizando a seguinte representação SMILES O=C(O)c1ccccc1C(=O)Nc3ccc(S(=O)(=O)N2CCSCC2)cc3.

As simulações de *Docking* foram realizadas empregando-se a ferramenta MOE-Dock do programa *Molecular Operating Environment* 2009.10 (*Chemical Computing Group, Inc.*). A estrutura do substrato LASSBio-596 foi construída e otimizada no programa MOE utilizando o campo de força MMFF94 e o método AM1 para calcular as cargas parciais.

Os cálculos preliminares foram executados com o ligante co-cristalizado (flurbiprofeno) de forma a se reproduzir a sua orientação cristalográfica no complexo original com o CYP2C9, a fim de validar o método. A estrutura cristalográfica do complexo CYP2C9–flurbiprofeno foi obtida no banco de dados de proteínas sob o código 1R9O e resolução 2,0 Å (WESTER *et al.*, 2004).

A enzima foi preparada para os estudos de *Docking* da seguinte maneira:

- (i) o ligante flurbiprofeno foi removido do sítio ativo da enzima;
- (ii) as moléculas de água foram retiradas, mantendo-se somente as moléculas de água 600, 819 e 842, sendo estas importantes no sítio ativo (WESTER *et al.*, 2004);
- (iii) átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura;
- (iv) foi utilizada a opção *Wall Constraint*;
- (v) e aplicação dos parâmetros *Placement: Triangle Matcher / Rescoring 1: London dG / Refinement: Forcefield / Rescoring 2: Affinity dG*.

A justificativa para manutenção das moléculas de água 600, 819 e 842, denominadas estruturais, baseou-se na descrição da literatura para a isoforma CYP2C9. Todas as outras moléculas de água devem ser excluídas antes da realização dos estudos de *Docking*, já que não participam das interações com os ligantes. Geralmente as moléculas de água não excluídas, denominadas estruturais, são as que estão dentro do sítio ativo do citocromo, próximas ao grupamento heme (WESTER *et al.*, 2004).

3.3 MICRORGANISMOS

Para os estudos de bioconversão foram utilizados os fungos filamentosos da coleção ATCC (*American Type Culture Collection*) mantidos no Laboratório de Bioconversão (LaBioCon) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

As cepas escolhidas foram:

- *Absidia blakesleana* ATCC 26617
- *Aspergillus candidus* ATCC 1009
- *Beauveria bassiana* ATCC 7159
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245
- *Cunninghamella elegans* ATCC 36112
- *Fusarium roseum* ATCC 14717
- *Streptomyces vendulae* ATCC 8664

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Preparação dos meios de cultura

3.4.1.1 Meio sólido ágar batata inclinado

- 19,5 g de ágar batata dextrose;
- 2,5 g de peptona bacteriológica;
- 2,5 g de extrato de levedura;
- 2,5 g de extrato de malte;
- 500 mL de água destilada.

Os componentes foram pesados em balança semi-analítica e transferidos para um Béquer para solubilização com agitação. Foram distribuídos cerca de 5 mL do meio de cultura para tubos de ensaio com tampa rosqueável. Os tubos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos e, em seguida, mantidos levemente inclinados para solidificação do ágar à temperatura ambiente.

3.4.1.2 Meio líquido PDSM (*Peptone Dextrose Soy Medium*)

- 5 g de peptona bacteriológica;
- 20 g de D-glicose anidra (dextrose);
- 5 g de cloreto de sódio;
- 5 g de fosfato de potássio monobásico;

- 3 g de extrato de levedura;
- 5 g de lecitina de soja;
- 1 L de água destilada.

Os componentes foram pesados separadamente, solubilizando-os em aproximadamente 400 mL de água destilada num Erlenmeyer de 1 L. Somente a lecitina de soja, acrescida de aproximadamente 500 mL de água destilada, foi levada ao agitador magnético com aquecimento por cerca de 30 minutos a 40 °C para sua total dissolução. Em seguida, a lecitina de soja totalmente solubilizada foi misturada aos outros componentes e completado o volume do Erlenmeyer para 1 L. Porções de 100 mL do meio de cultura foram medidas com uma proveta e transferidas para Erlenmeyers de boca larga de 250 mL. Os Erlenmeyers contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

3.4.2 Manutenção e repique das cepas

As cepas dos fungos filamentosos utilizados na bioconversão de substratos foram mantidas em meio sólido ágar batata inclinado entre 2–4 °C e repicadas periodicamente com solução esterilizada de glicerol a 25 %. Sub-culturas das cepas selecionadas foram preparadas antes de cada experimento e incubadas por 7 dias a 25 °C em câmara germinativa DBO (demanda bioquímica de oxigênio) (Modelo 101M/3 Eletrolab[®]) para crescimento da colônia.

3.4.3 Inoculação no meio de cultura líquido PDSM

Para realizar a inoculação dos fungos no meio de cultura previamente esterilizado, fez-se a desinfecção da bancada de trabalho com álcool 70 % e executou-se todo o procedimento com o auxílio da flambagem pelo bico de Bunsen.

Após o período de 7 dias de crescimento dos fungos filamentosos nos tubos contendo o meio sólido, adicionou-se gotas de glicerol a 25 % aos esporos e homogeneizou-se com o auxílio da pipeta de Pasteur. Inoculou-se apenas uma gota da suspensão dos esporos em cada Erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido PDSM. Após a inoculação, os Erlenmeyers foram incubados em agitação rotativa (Modelo TE 424, Tecnal[®]) de 200 rotações por minuto (rpm) a 27 °C por um período mínimo de 65 horas antes da adição do substrato.

3.4.4 Adição do substrato

3.4.4.1 Incubação A

Em balança analítica (FA2104N, Celtac), pesou-se exatamente 400 mg do substrato LASSBio-596 e dissolveu-se em 16 mL do solvente dimetilformamida. Após 65 horas de incubação, os Erlenmeyers foram retirados da agitação rotativa e adicionou-se 2,0 mL do substrato LASSBio-596 a cada Erlenmeyer, obtendo-se a concentração final de 0,5 mg/mL. Além disso, fez-se o controle para acompanhamento da reação. Em seguida, retornou-se os Erlenmeyers para a incubadora sob agitação de 200 rpm a 27 °C por 96 horas.

3.4.4.2 Incubação B

Em balança analítica (FA2104N, Celtac), pesou-se exatamente 100 mg do substrato LASSBio-596 e dissolveu-se em 12 mL do solvente dimetilformamida. Paralelamente, pesou-se exatamente 100 mg do substrato LASSBio-596 e dissolveu-se em 8 mL do solvente metanol.

Os Erlenmeyers foram designados com o número 7 para representar a *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e com o número 9 para *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. E cada Erlenmeyer foi denominado de A,B,C,D.

Após 65 horas de incubação, os Erlenmeyers foram retirados da agitação rotativa e procedeu-se a duas etapas:

- nos Erlenmeyers 7A, 7B, 9A e 9B adicionou-se 2,0 mL da solução LASSBio-596 em metanol, obtendo-se a concentração final de 0,25 mg/mL;
- nos Erlenmeyers 7C, 7D, 9C e 9D adicionou-se 3,0 mL do substrato LASSBio-596 em dimetilformamida, obtendo-se a concentração final de 0,25 mg/mL.

Em seguida, retornou-se os Erlenmeyers para a incubadora sob agitação de 200 rpm a 27 °C por 96 horas.

3.4.5 Coleta das alíquotas

Para realizar a coleta das alíquotas, fez-se a desinfecção da bancada de trabalho com álcool 70 % e executou-se todo o procedimento com o auxílio da

flambagem pelo bico de Bunsen. Amostras de aproximadamente 1 mL do meio reacional foram coletadas em 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

3.4.6 Processo de extração

Após a incubação ser interrompida, o conteúdo dos Erlenmeyers foi filtrado a vácuo em funil de Buchner utilizando tiras de gaze em cruz com a intenção de separar o micélio (massa fúngica) do meio (sobrenadante de incubação). Os Erlenmeyers foram lavados com a menor quantidade possível de água destilada para não aumentar o volume do sobrenadante. O micélio foi espremido para retirar toda a água destilada.

Ao micélio foram acrescentados aproximadamente 100 mL de acetona. Essa fração foi mantida em agitador magnético por 40 minutos. A massa fúngica foi filtrada com papel de filtro e após a evaporação rotativa obteve-se a fração cetônica.

O sobrenadante da incubação foi supersaturado com cloreto de sódio e mantido em agitador magnético por 30 minutos. Filtrou-se a vácuo utilizando uma camada de celite sobre o funil de Buchner. Foi realizada a extração desse filtrado com três porções de aproximadamente 200 mL de acetato de etila em ampola de separação. A água residual foi adsorvida pelo agente dessecante sulfato de magnésio anidro. Em seguida, filtrou-se em funil de vidro sinterizado. Fez-se a evaporação rotativa e obteve-se a fração acetato de etila.

A fração aquosa foi armazenada na geladeira e as frações cetônica e acetato de etila foram armazenadas no dessecador. O processo de extração foi esquematizado na Figura 14.

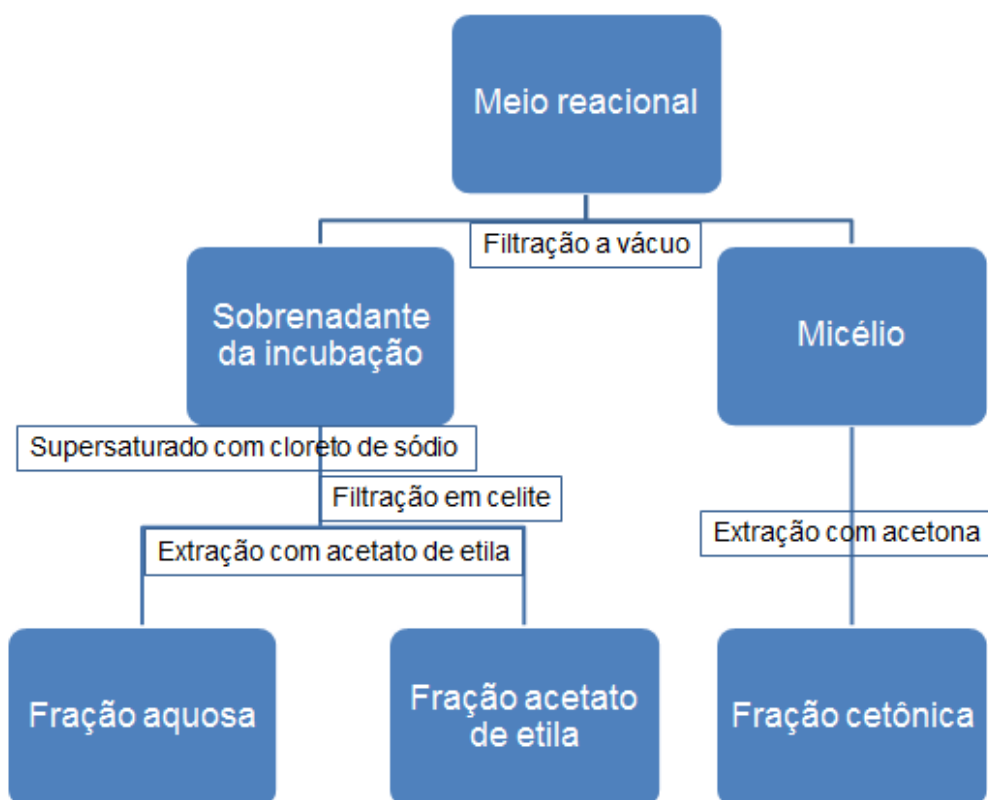


Figura 14 – Processo de extração ao término da incubação (Fonte: autor, 2011).

3.5 CROMATOGRAFIA

3.5.1 Cromatografia em camada delgada

Na análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio TLC 20 x 20 cm sílica-gel 60 F₂₅₄, espessura da camada de sílica de 0,25 cm (placa analítica) Alugram (Macherey-Nagel, Germany).

As fases móveis utilizadas foram acetato de etila : metanol (AcOEt : MeOH) na proporção (70:30) e (95:5). As placas foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) 254 nm e posteriormente expostas a vapores de iodo para revelação.

3.5.2 Cromatografia em coluna

Na separação por cromatografia em coluna empregou-se coluna de vidro preenchida com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm / 70-230 mesh). O comprimento da

fase estacionária foi 32 cm, com 2 cm de diâmetro. O tamanho da pastilha foi 0,9 cm. A fase móvel utilizada foi clorofórmio, sendo a separação monitorada por CCD.

3.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

O substrato LASSBio-596 foi solubilizado em metanol grau cromatográfico para obtenção de solução de concentração 0,01 mg/mL para determinação do comprimento de onda de máxima absorção por espectrofotometria na região do UV/visível, em espectrofotômetro *Varian Cary Winuv* de 200 a 800 nm.

A purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativo (*Varian ProStar / Varian 440-LC Fraction Collector*, programa *Galaxie Chromatography Data System*, versão 1.9.302.952) foi realizada com a utilização de coluna em fase reversa Microsorb 100-5 C18 (250 x 10 mm, 5 µm), fase móvel metanol grau cromatográfico e detector UV em 267 nm.

3.6 ESPECTROSCOPIA

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás utilizando espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o ^1H).

3.7 ESPECTROMETRIA

Os espectros de massas (EM) foram obtidos no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás utilizando espectrômetro 4000 Q TRAP[®] (*Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada*). Os espectros de massas foram obtidos no modo positivo com ionização por *electrospray* e parâmetros otimizados para o íon molecular protonado utilizando nitrogênio como gás de colisão e diferentes energias de colisão (30–60 eV).

3.8 SÍNTESE

As reações de síntese foram realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM), sob a coordenação do professor Dr. Ricardo Menegatti.

3.8.1 Síntese do derivado sulfóxido do LASSBio-596

Em um balão volumétrico contendo 100 mg (0,246 mmol) do LASSBio-596 foram adicionados 1 mL de acetonitrila (CH_3CN), 1 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) e 1 gota de água destilada. A mistura foi agitada por 5 minutos antes da adição da solução de 56,75 mg (0,19 mmol) de ácido triclorocianúrico em 1 mL de CH_3CN , que foi adicionada lentamente por gotejamento. Após alguns minutos, a temperatura começou a elevar-se, e o balão foi colocado em banho-maria para manter a temperatura abaixo de 40 °C. A adição por gotejamento durou aproximadamente 15 minutos e a mistura permaneceu sob agitação por 30 minutos com temperatura abaixo de 40 °C. O excesso de ácido triclorocianúrico foi destruído através da adição lenta de bissulfito de sódio (NaHSO_3) em ambiente resfriado pelo banho de gelo. Filtrou-se e dilui-se com 10 mL de éter. A solução etérea foi lavada com 1 N NaOH (hidróxido de sódio) (2 x 3 mL), 1 N HCl (ácido clorídrico) (2 x 3 mL), saturada com solução de cloreto de sódio (NaCl), e seca com sulfato de magnésio (MgSO_4) (XIONG; HUANG; ZHONG, 2001).

3.8.2 Síntese do derivado sulfona do LASSBio-596

Em um balão volumétrico, 100 mg (0,246 mmol) do LASSBio-596 foi dissolvido em 6,15 mL de CH_3CN e mantido sob agitação num banho de gelo a + 5 °C. Permanganato de potássio (KMnO_4) (0,245 g) finamente moído foi adicionado em pequenas porções num período de 15 minutos e depois agitado por 5 minutos. Em seguida, o balão foi removido do banho de gelo e permaneceu agitando à temperatura ambiente por 50 minutos. O produto foi filtrado em uma camada de celite e o resíduo foi lavado sucessivamente com CH_3CN (2 x 10 mL) (FATIADI, 1987).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREVISÃO *in silico*

A previsão dos sítios de metabolismo do LASSBio-596 foi realizada com o auxílio do programa *MetaPrint2D*, uma ferramenta que prevê os possíveis metabólitos obtidos por reações de fase I e reações de fase II através da busca em banco de dados de estruturas conhecidas.

A cor que circula cada átomo indica a NOR (*Normalised Occurrence Ratio*), sendo que quanto maior a NOR, maior a frequência de relatos no banco de dados para determinado sítio de metabolismo (Figura 15).

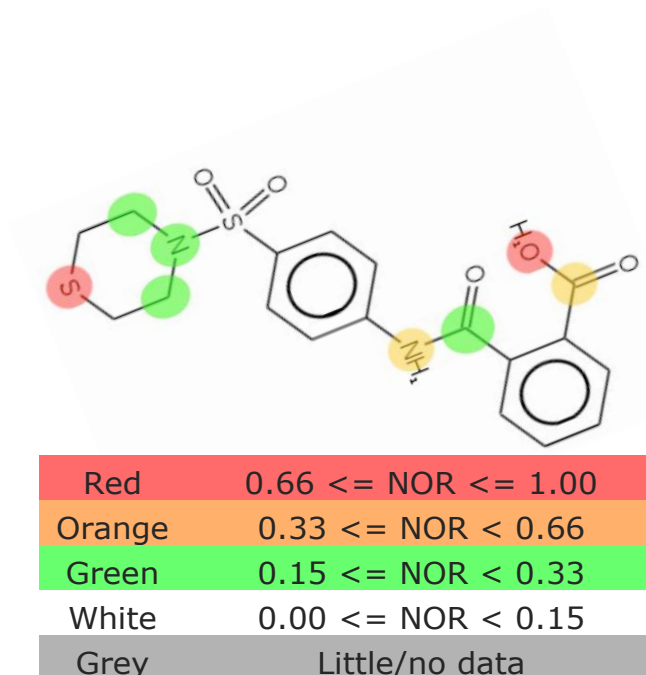
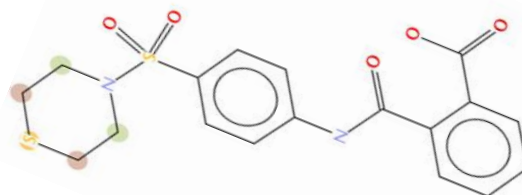


Figura 15 – Previsão dos sítios de metabolismo do LASSBio-596 pelo *MetaPrint2D* (Fonte: <http://www.metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d-react/metaprintReactor/O%3DC%28O%29c1cccc1C%28%3DO%29Nc3ccc%28S%28%3DO%29%28%3DO%29N2CCSCC2%29cc3;model=ALL+%28Metabolite+2010.2%29;confi g=LOOSE>)

Outra ferramenta utilizada foi o programa *SMARTCyp*, que prevê os sítios mais lábeis ao metabolismo mediado pela isoforma CYP3A4 através de cálculos de mecânica quântica, aplicando-se a teoria do funcional de densidade (DFT). A Figura 16 ilustra o resultado obtido para o LASSBio-596, onde o átomo de enxofre apresenta a menor energia de ativação (26,3 KJ/mol), significando que este sítio poderia ser mais facilmente metabolizado.



Molecule 1

Rank Atom Score Energy

1	S.25	18.3	26.3
2	C.24	50.27	57.7
3	C.23	65.44	72.3

Figura 16 – Previsão dos sítios de metabolismo do LASSBio-596 pelo SMARTCyp (Fonte: <http://www.farma.ku.dk/smartcyp/smartcyp.php>)

A previsão *in silico* dos metabólitos do LASSBio-596 pelas ferramentas MetaPrint2D e SMARTCyp foi esquematizada na Figura 17.

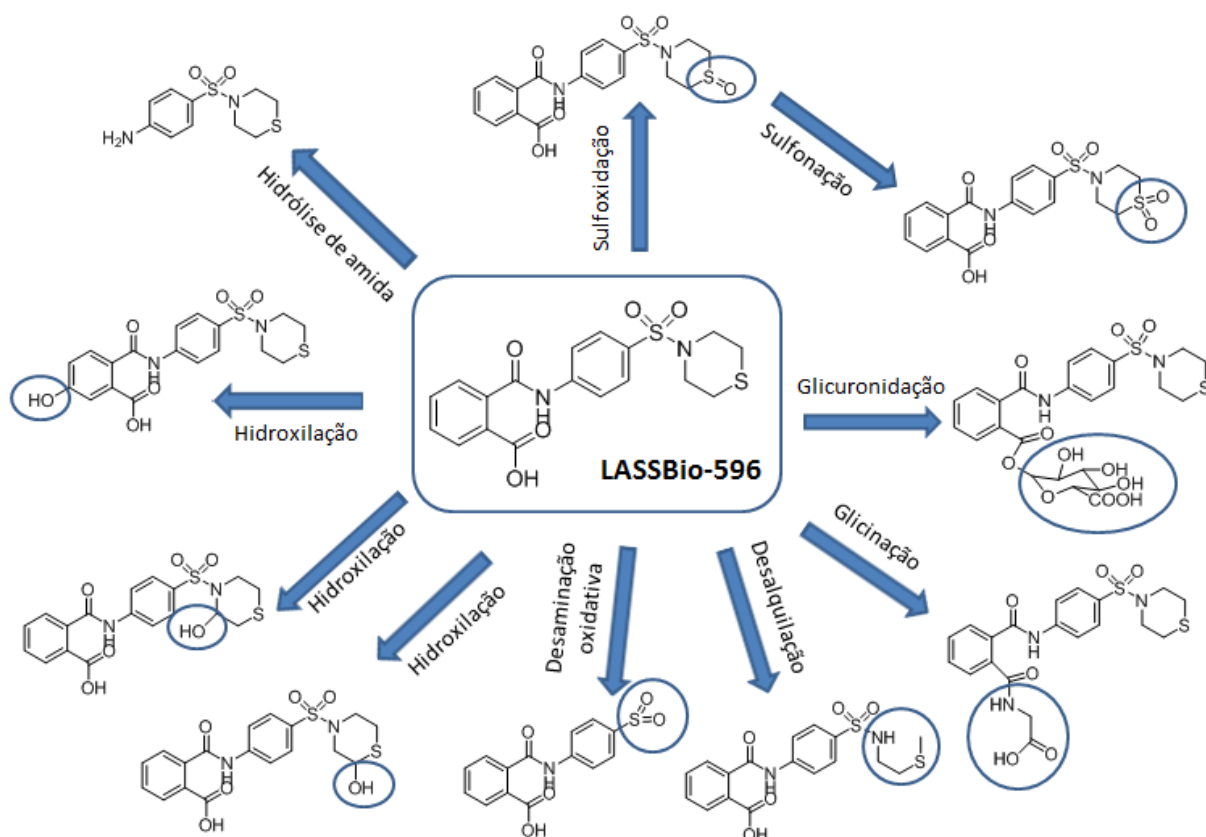


Figura 17 – Previsão *in silico* dos sítios de metabolismo pelos programas MetaPrint2D e SMARTCyp com um círculo destacando a modificação obtida na estrutura do LASSBio-596 (Fonte: autor, 2011).

Para o mapeamento dos pontos de interação entre o substrato e a CYP450 foram utilizadas metodologias de modelagem molecular com a isoforma CYP2C9. A justificativa para a escolha da isoforma foi a similaridade estrutural dos compostos envolvidos no planejamento do LASSBio-596, talidomida e arilsulfonamida, os quais sofrem metabolismo principalmente pela CYP2C9 (LU *et al.*, 2004; ZHOU; ZHOU; HUANG, 2010).

A Figura 18 demonstra o diagrama bidimensional (2D) das interações da conformação mais energeticamente favorecida.

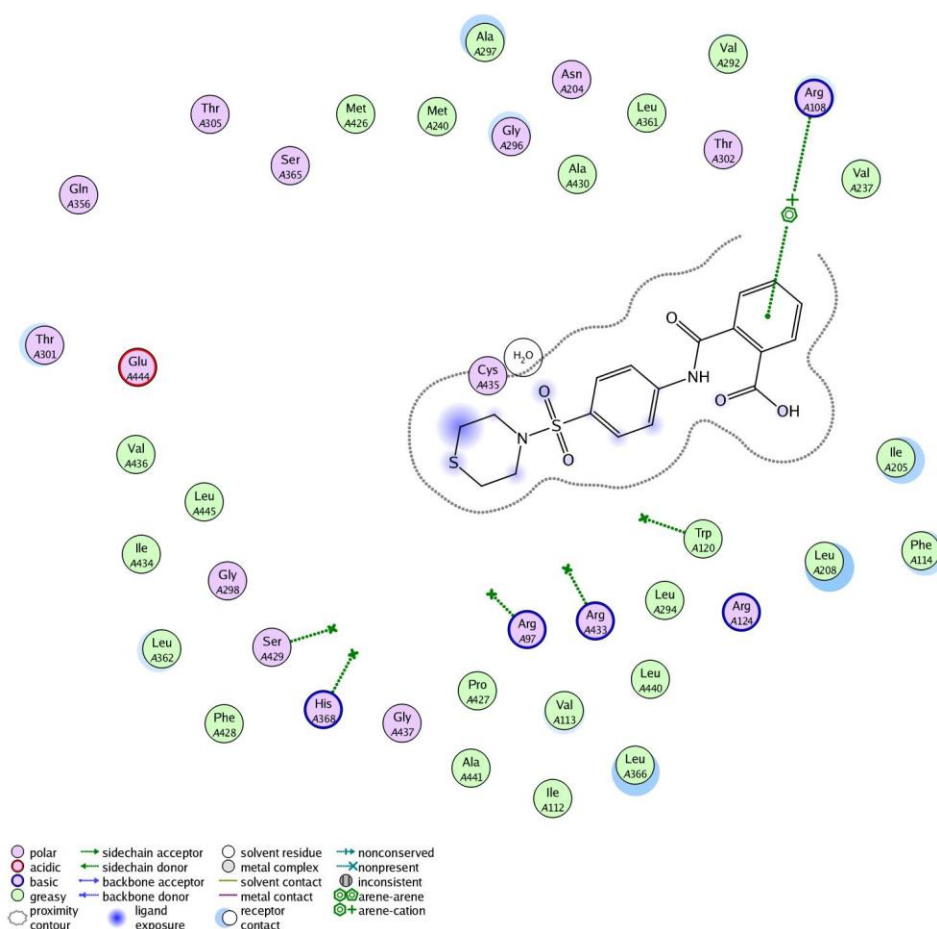


Figura 18 – Diagrama 2D das interações do LASSBio-596 no sítio ativo da CYP2C9 (Fonte: autor, 2011).

A metodologia empregada mostrou-se adequada, pois reproduziu a estrutura do complexo original CYP2C9–flurbiprofeno apresentando RMSD (*root-mean-square deviation*) de 0,63 Å. As poses de interações do LASSBio-596 no sítio ativo da CYP2C9 foram analisadas pelo programa MOE-Dock permitindo a flexibilidade do receptor.

Uma das poses obtidas, classificação nº 22, apresentou-se em posição favorável para a S-oxidação do LASSBio-596 com energia livre de ligação de $-5,72$ Kcal/mol. O átomo de enxofre do anel tiomorfolina do LASSBio-596 está a uma distância de $4,15$ Å do ferro do heme da CYP2C9, o que sugere que o metabolismo possa ocorrer por S-oxidação. A Figura 19 ilustra as interações tridimensionais (3D) do LASSBio-596 no sítio ativo da CYP2C9.

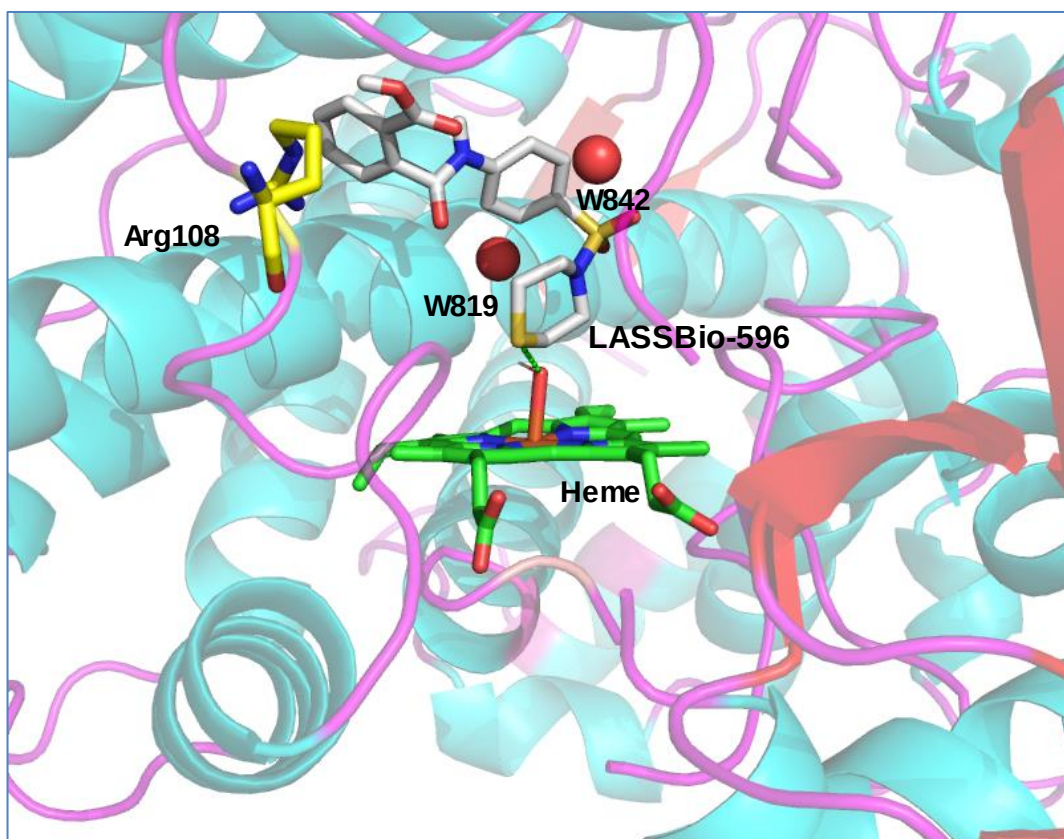


Figura 19 – Pose prevista do LASSBio-596 pelos estudos de *Docking*, sugerindo que o metabolismo possa ocorrer por S-oxidação (Fonte: autor, 2011).

A Figura 20 demonstra a estrutura do LASSBio-596 com as numerações nos carbonos, com o destaque circular no átomo de S e nos carbonos 1'', 2'', 4 e 5.

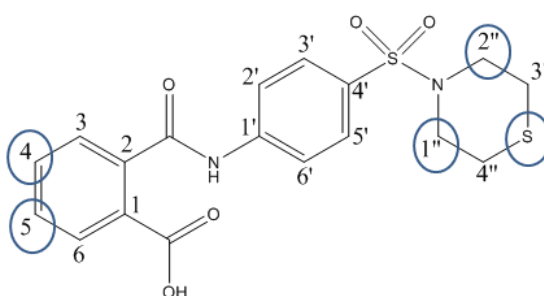


Figura 20 – Estrutura do LASSBio-596 com destaque circular no átomo de S e nos carbonos 1'', 2'', 4 e 5, que são os sítios passíveis de metabolismo (Fonte: autor, 2011).

O Quadro 1 apresenta as informações das demais poses analisadas no programa MOE-Dock. Descreveu-se a classificação da pose, a energia livre calculada, a distância entre o sítio de metabolismo e o ferro do heme da CYP2C9, o provável sítio de metabolismo, o tipo de reação e o número de repetição por pose. As poses 5 e 12 referem-se aos carbonos com numeração 4 e 5, onde há previsão de que ocorra hidroxilação aromática, pois a principal oxidação metabólica das ligações C–H aromáticas é a hidroxilação. A pose 10 refere-se aos carbonos numeração 1" e 2", onde há previsão de que ocorra desalquilação ou hidroxilação. A pose 22 refere-se ao enxofre, onde há previsão de que ocorra S-oxidação, como discutido anteriormente. O metabolismo dos anéis heterocíclicos geralmente envolve o átomo hetero ou a hidroxilação do átomo do carbono α . Os heteroátomos de enxofre geralmente são oxidados gerando o sulfóxido ou a sulfona correspondentes. Ao passo que a hidroxilação dos anéis heterocíclicos é geralmente incomum.

Pose #	ΔG_{calc}^a (Kcal/mol)	d^b (Å)	Provável sítio de metabolismo	Tipo de reação	Nº de repetições
Pose 5	-7,40	2,90	C ₄	Hidroxilação aromática	9
Pose 10	-7,04	4,72	C _{1"} ou C _{2"}	Desalquilação/Hidroxilação	5
Pose 12	-6,99	2,85	C ₅	Hidroxilação aromática	11
Pose 22	-5,72	4,15	S	S-oxidação	1

a = Energia livre de ligação.

b = Distância entre o sítio de metabolismo e o ferro do heme da CYP2C9.

Quadro 1 – Poses de interações do LASSBio-596 no sítio ativo da isoforma CYP2C9 utilizando o programa MOE-Dock (Fonte: autor, 2011).

A Figura 21 apresenta as poses de interações do LASSBio-596 no sítio ativo da CYP2C9 com as respectivas distâncias, visualizadas no programa MOE-Dock.

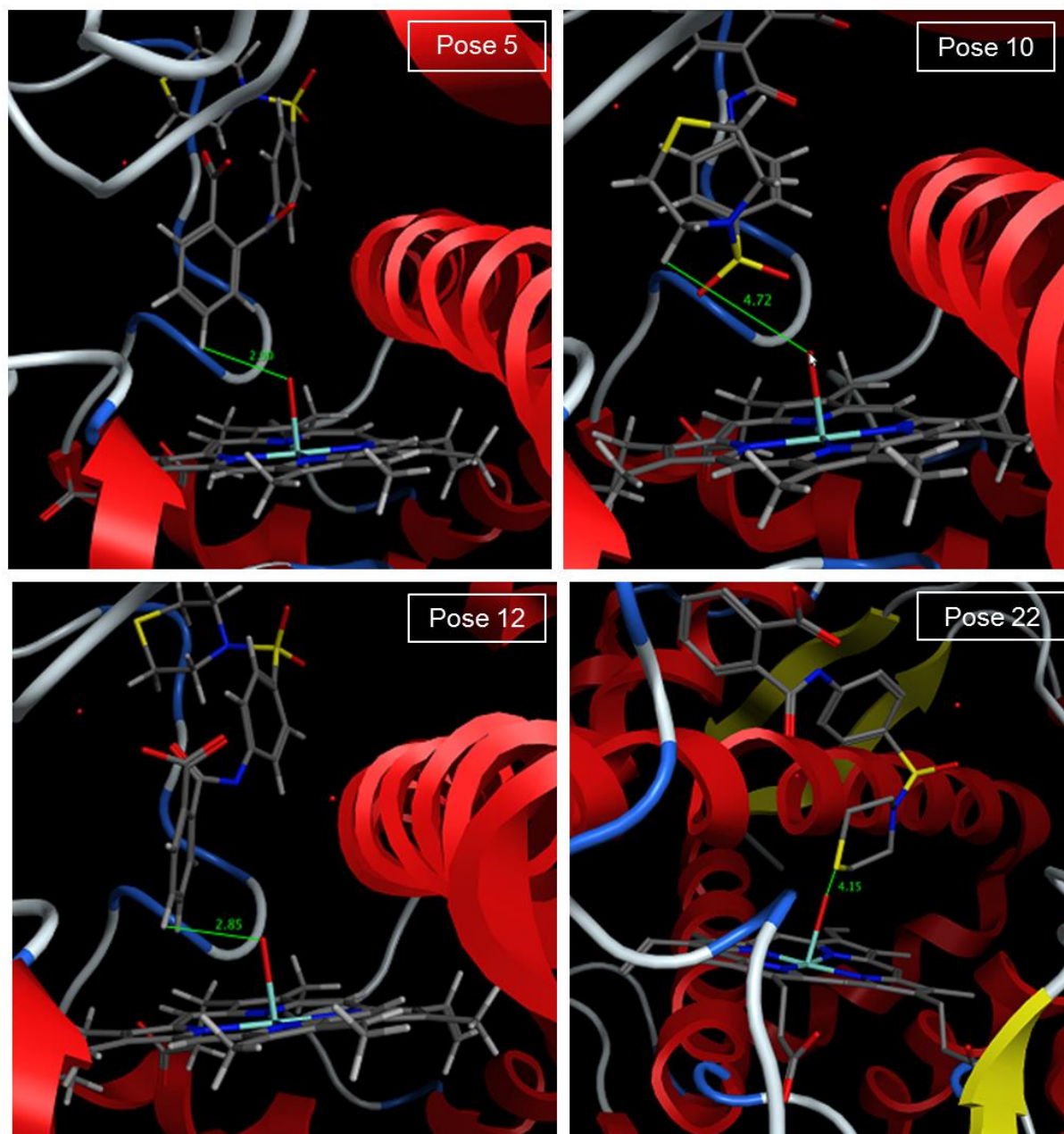


Figura 21 – Poses de interações do LASSBio-596 no sítio ativo da CYP2C9 (Fonte: autor, 2011).

4.2 MODELO MICROBIANO DO METABOLISMO – INCUBAÇÃO A

A escolha dos fungos filamentosos para a triagem baseou-se em dados da literatura dos tipos de reações, principalmente de fase I, realizadas por tais fungos (MOUSSA *et al.*, 1996; AZERAD, 1999; ASHA; VIDYAVATHI, 2009). A morfologia das cepas pode ser visualizada nas Figuras 22, 23, 24 e 25, sendo descrito o aspecto com 7 dias de crescimento no meio de cultura sólido ágar batata inclinado e o aspecto no meio de cultura líquido PDSM após a fase de crescimento com 65 horas de incubação.

Fungos filamentosos	<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 26617	<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 1009	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245
Aspecto morfológico 7 dias de crescimento				
	Filamentos algodonosos de coloração cinza com esporos pretos	Filamentos algodonosos de coloração branca com esporos pretos	Filamentos algodonosos de coloração escura com esporos pretos	Filamentos algodonosos de coloração branca com esporos pretos

Figura 22 – Aspecto morfológico de *A. blakesleana* ATCC 26617, *A. candidus* ATCC 1009, *C. echinulata* ATCC 9244 e *C. echinulata* ATCC 9245 no meio de cultura sólido ágar batata inclinado com 7 dias de crescimento a 25 °C (Fonte: autor, 2011).

Fungos filamentosos	<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	<i>Streptomyces vendulae</i> ATCC 8664
Aspecto morfológico 7 dias de crescimento			
	Filamentos algodonosos de coloração esbranquiçada	Filamentos algodonosos de coloração escura com esporos pretos	Filamentos algodonosos de coloração cinza com esporos pretos

Figura 23 – Aspecto morfológico de *C. elegans* ATCC 36112, *F. roseum* ATCC 14717 e *S. vendulae* ATCC 8664 no meio de cultura sólido ágar batata inclinado com 7 dias de crescimento a 25 °C (Fonte: autor, 2011).

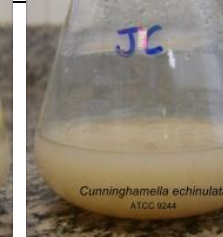
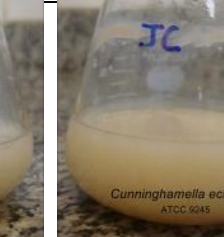
Fungos filamentosos	<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 26617	<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 1009	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245
Aspecto após 65 horas de incubação (antes da adição do substrato)				
	<i>Pellets</i> grandes, sem halo de crescimento	Massa amorfa, halo de crescimento, viscoso	<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso	<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso

Figura 24 – Aspecto de *A. blakesleana* ATCC 26617, *A. candidus* ATCC 1009, *C. echinulata* ATCC 9244 e *C. echinulata* ATCC 9245 no meio de cultura líquido PDSM após a fase de crescimento com 65 horas de incubação, 200 rpm, 27 °C (Fonte: autor, 2011).

Fungos filamentosos	<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	<i>Streptomyces vendulae</i> ATCC 8664	Branco = meio de cultura + substrato LASSBio-596
Aspecto após 65 horas de incubação (antes da adição do substrato)				
	Massa amorfa, halo de crescimento, menos viscoso	Massa amorfa, halo de crescimento, viscoso	Massa amorfa, halo de crescimento, menos viscoso	Coloração amarelada, fluido

Figura 25 – Aspecto de *C. elegans* ATCC 36112, *F. roseum* ATCC 14717, *S. vendulae* ATCC 8664 e branco no meio de cultura líquido PDSM após a fase de crescimento com 65 horas de incubação, 200 rpm, 27 °C (Fonte: autor, 2011).

A observação do crescimento tem relevância, pois a forma morfológica dos fungos filamentosos no meio de cultura líquido interfere no desempenho dos processos biotecnológicos. A massa amorfa caracteriza-se pelas interações entre os filamentos em suspensão, aumentando a estrutura do micélio e consequentemente a viscosidade do meio de cultura. A formação de *pellets* (crescimento em forma de esfera) diminui a viscosidade do meio, no entanto há discrepância na distribuição nutricional, já que enquanto o fluido de fermentação está aerado e rico em nutrientes, as células do interior dos *pellets* estão estressadas devido à limitação de transporte nutricional (GIBBS, SEVIOUR, SCHMID, 2000).

Assim, através do aspecto morfológico das cepas no meio de cultura líquido pode-se fazer a estimativa do rendimento, sendo que maiores rendimentos são esperados com a formação de *pellets* pequeníssimos por oferecerem uma menor barreira para difusão de oxigênio e outros nutrientes. A vantagem do crescimento na forma de *pellets* pequeníssimos é a obtenção de uma maior superfície de contato facilitando as reações de oxidação. Quando o crescimento apresenta-se como massa amorfa, melhor rendimento é observado em modificações de compostos por reação de redução ou outras reações mais demoradas (GIBBS, SEVIOUR, SCHMID, 2000).

Observou-se que ao término do período de 96 horas de incubação o substrato LASSBio-596 não havia sido bioconvertido pelo sistema enzimático dos fungos filamentosos. Notou-se somente a presença de um composto mais polar no branco, ou seja, o Erlenmeyer que tinha apenas o meio de cultura e o substrato. Então, investigou-se a possível razão para que não tenha ocorrido a bioconversão nas condições reacionais aplicadas.

Durante a fase de crescimento do microrganismo ocorre a formação do seu complexo enzimático capaz de metabolizar os compostos. Contudo para que a biotransformação ocorra há a necessidade do substrato entrar em contato com as enzimas produzidas pelo microrganismo. Deste modo, o substrato deve atravessar a membrana celular do microrganismo, devendo estar dissolvido em solução antes de ser adicionado ao meio de cultura para possibilitar a biotransformação pelas enzimas dos fungos filamentosos (CARVALHO, 2011). Portanto, concluiu-se que o LASSBio-596 não foi completamente solubilizado no solvente dimetilformamida no momento da adição do substrato, impedindo assim a bioconversão pelos fungos filamentosos nas condições reacionais aplicadas. Por esta razão buscou-se outro solvente capaz de solubilizar o substrato.

4.3 MODELO MICROBIANO DO METABOLISMO – INCUBAÇÃO B

Para o processo denominado incubação B, os fungos filamentosos selecionados foram *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, amplamente relatados na literatura devido à capacidade de metabolizar substratos (GROGAN; HOLLAND, 2000; BORGES *et al.*, 2009; ASHA; VIDYAVATHI, 2009). De acordo com o estudo desenvolvido por Carneiro e colaboradores (2010) no LaBioCon, obteve-se o metabólito sulfóxido do LASSBio-294 com a aplicação de *B. bassiana* ATCC 7159 como modelo microbiano, conforme demonstrado na Figura 26. Comparando-se as estruturas químicas, notou-se que o LASSBio-294 apresenta o anel tiofeno, o qual sofreu S-oxidação pela *B. bassiana* ATCC 7159 e o LASSBio-596 apresenta o anel tiomorfolina, o qual mostra-se como provável sítio de metabolismo no estudo *in silico*.

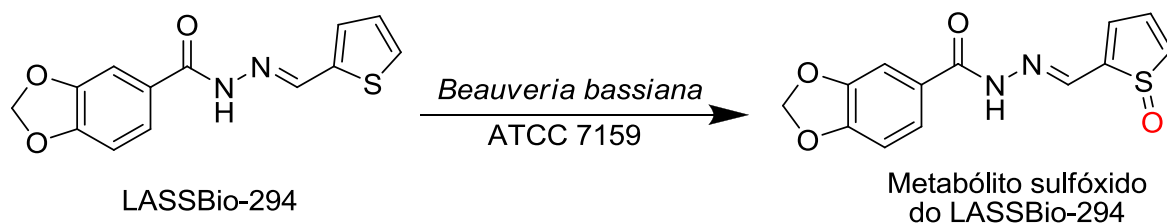


Figura 26 – Sulfoxidação do LASSBio-294 promovida pela *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (CARNEIRO *et al.*, 2010).

Em seguida, testou-se a solubilidade do LASSBio-596 para escolha do solvente hábil em dissolvê-lo. Os solventes comumente utilizados na bioconversão são álcool etílico e acetona (AZERAD, 1999). A dimetilformamida é utilizada quando o substrato é de difícil solubilização, no entanto verificou-se que o LASSBio-596 não dissolveu-se completamente em dimetilformamida. A alternativa foi optar pelo metanol, um solvente pouco utilizado. Contudo, o metanol foi o único solvente que solubilizou totalmente o substrato LASSBio-596.

A utilização de metanol como solvente em processos de biotransformação foi investigada em trabalhos publicados em 2010, em que se observaram a viabilidade dos microrganismos e a capacidade metabólica na presença de metanol (LI *et al.*, 2010; ZEHENTGRUBER *et al.*, 2010).

A incubação B foi realizada testando-se os solventes metanol e dimetilformamida. Foram utilizados os seguintes Erlenmeyers:

- 4 em que o substrato foi totalmente solubilizado em metanol;
- 4 em que o substrato foi parcialmente solúvel em dimetilformamida;
- 1 branco contendo somente o meio de cultura e o substrato solubilizado em metanol;
- 1 branco da *Beauveria bassiana* ATCC 7159 e
- 1 branco da *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244.

A morfologia das cepas pode ser visualizada na Figura 27, sendo descrito o aspecto com 7 dias de crescimento no meio de cultura sólido ágar batata inclinado.

Fungos filamentosos	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244
Aspecto morfológico 7 dias de crescimento		
	Textura coriácea branca	Filamentos algodonosos de coloração escura com esporos pretos

Figura 27 – Aspecto morfológico de *B. bassiana* ATCC 7159 e *C. echinulata* ATCC 9244 no meio de cultura sólido ágar batata inclinado com 7 dias de crescimento a 25 °C (Fonte: autor, 2011).

Durante o período de incubação houve um cuidadoso monitoramento da viabilidade dos fungos filamentosos nos Erlenmeyers em que foi utilizado metanol para solubilizar o substrato. Percebeu-se que o metanol não foi tóxico para *B. bassiana* ATCC 7159 e *C. echinulata* ATCC 9244 através da observação do crescimento na parede do Erlenmeyer, conforme pode ser visualizado na Figura 28.

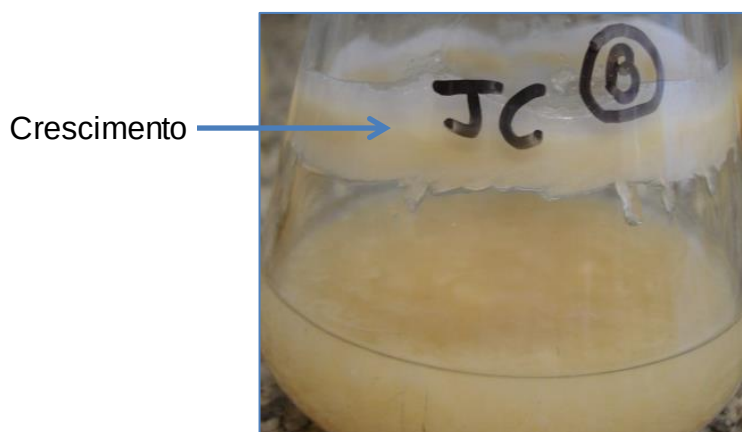


Figura 28 – Crescimento de *C. echinulata* ATCC 9244 na parede do Erlenmeyer em meio de cultura líquido PDSM, 200 rpm a 27 °C, com 48 horas de incubação, utilizando metanol como solvente (Fonte: autor, 2011).

Na Figura 29 foi descrito o aspecto no meio de cultura líquido PDSM ao término do período de 96 horas de incubação.

Fungos filamentosos	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159		<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	
Aspecto após 96 horas (término da incubação)	Solvente utilizado na adição do substrato = metanol			
				
	<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso, colorações amarelada e rosada		<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso, coloração amarelada	
	Solvente utilizado na adição do substrato = dimetilformamida			
				
	<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso, coloração rosada		<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso, coloração amarelada	
	Solvente utilizado = metanol			
				
	Coloração amarelada, fluido	<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso, coloração rosada		<i>Pellets</i> pequeníssimos, halo de crescimento, viscoso, coloração amarelada

Figura 29 – Aspecto de *B. bassiana* ATCC 7159, *C. echinulata* ATCC 9244 e brancos no meio de cultura líquido PDSM ao término do período de 96 horas de incubação, 200 rpm, 27 °C (Fonte: autor, 2011).

Após o término do período de incubação fez-se uma placa de CCD com fase móvel AcOEt : MeOH (70:30) e notou-se que ocorreu a bioconversão apenas no

Erlenmeyer da *B. bassiana* ATCC 7159 em que o substrato foi totalmente solubilizado com metanol (Figura 30).

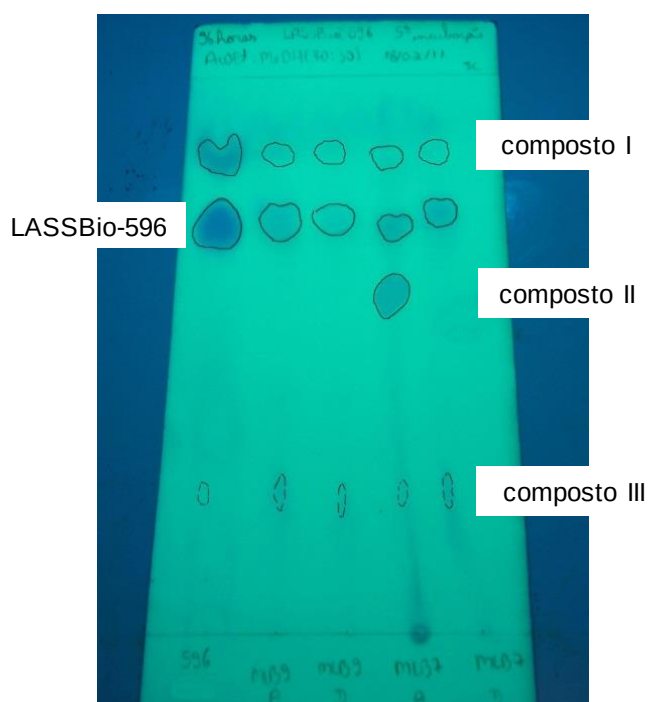


Figura 30 – Cromatoplaça do término do período de 96 horas de incubação, com destaque para o substrato LASSBio-596 e os compostos I, II e III. Fase estacionária sílica-gel 60 F₂₅₄, fase móvel AcOEt : MeOH (70:30), UV 254 nm (Fonte: autor, 2011).

De acordo com a CCD apresentada acima, fez-se o Quadro 2 e calculou-se o fator de retenção (Rf) do LASSBio-596 e dos compostos I, II e III.

Solvente utilizado	Microrganismos	Compostos / Rf			Substrato / Rf
		I (0,82)	II (0,55)	III (0,21)	LASSBio-596 (0,69)
Metanol	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	+	+	+	+
Dimetilformamida		+	-	+	+
Metanol	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	+	-	+	+
Dimetilformamida		+	-	+	+
Metanol	Branco = substrato + meio de cultura	+	-	+	+

Legenda: (-) ausência; (+) presença.

Quadro 2 – Formação de derivados após 96 horas de incubação com *B. bassiana* ATCC 7159 e *C. echinulata* ATCC 9244 em diferentes solventes, monitorada por CCD. Rf do LASSBio-596 e dos compostos I, II e III. Fase estacionária sílica-gel 60 F₂₅₄, fase móvel AcOEt : MeOH (70:30), UV 254 nm (Fonte: autor, 2011).

O Erlenmeyer do branco apresentou LASSBio-596 com Rf de 0,69 e outros dois produtos denominados compostos I e III. Já havia sido notado que o composto I com Rf de 0,82 aparecia na CCD desde o momento inicial. Durante a bioconversão, o composto III apareceu no branco e em todos os outros Erlenmeyers com Rf de 0,21 e sugeriu-se que era um produto de degradação do substrato nas condições reacionais aplicadas.

Quanto aos Erlenmeyers com o meio reacional, observou-se que ocorreu a bioconversão apenas no Erlenmeyer da *B. bassiana* ATCC 7159 em que o substrato foi totalmente solubilizado em metanol. O composto II com Rf de 0,55 mais retido na fase estacionária percorreu uma distância menor que o substrato LASSBio-596, significando que era mais polar, ou seja, um possível metabólito.

Procedeu-se ao isolamento dos derivados para caracterização estrutural. Logo, teve-se o propósito de purificar o composto II obtido por bioconversão pelo fungo *B. bassiana* ATCC 7159 e o composto I já presente no substrato. Quanto ao composto III sugeriu-se que era um produto de degradação, pois aparecia em todos os Erlenmeyers, inclusive no branco.

4.3.1 LaBioCon 202

Para o isolamento do composto I fez-se uma cromatografia em coluna do LASSBio-596 e denominou-o de LaBioCon 202 com rendimento de 13,8 % e coloração levemente esverdeada. Em seguida, prepararam-se amostras para análises de RMN ^1H e EM. Na Figura 31 (Anexo A) está apresentado o espectro de RMN ^1H do LaBioCon 202 solubilizado em clorofórmio deuterado (CDCl_3) com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

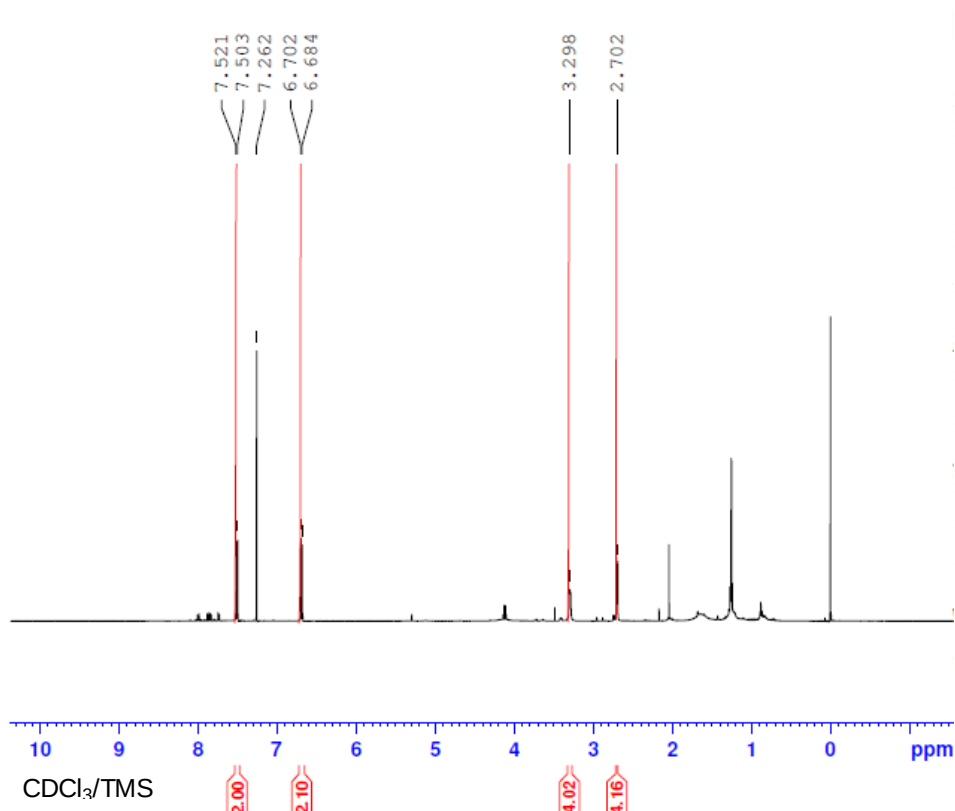


Figura 31 – Espectro de RMN ¹H do LaBioCon 202. Solvente CDCl₃ com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

A Figura 32 demonstra a proposta de estrutura química do LaBioCon 202 (composto I) com as numerações nos carbonos do anel aromático e do anel tiomorfolina.

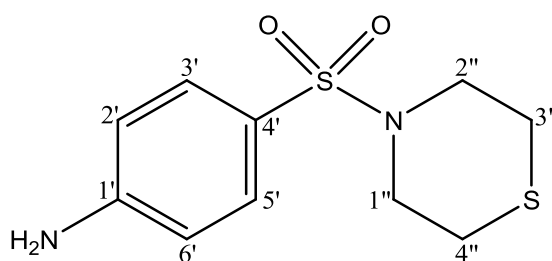


Figura 32 – Proposta de estrutura do LaBioCon 202 (composto I) com as numerações nos carbonos do anel aromático e do anel tiomorfolina (Fonte: autor, 2011).

As características dos sinais foram descritas no Quadro 3, sendo estas a quantidade de hidrogênios, deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento (*J*).

Nº átomo	H	Multiplicidade	ppm ou δ	J (Hz)
3' e 5'	2 H	dublete	7,51	8,8
2' e 6'	2 H	dublete	6,69	8,8
1" e 2"	4 H	multiplete	3,30	-
3" e 4"	4 H	triplete	2,70	5,1

Quadro 3 – Dados espectrais de RMN ^1H do LaBioCon 202. Solvente CDCl_3 com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

Em seguida, na Figura 33 (Anexo B) fez-se uma expansão da região onde encontram-se os hidrogênios presentes no anel aromático. Os hidrogênios nos carbonos numerados 3' e 5' aparecem como dublete, constante de acoplamento *orto* de 8,8 Hz e deslocamento químico de 7,51 ppm, o que significa que estão mais desblindados. Os hidrogênios nos carbonos numerados 2' e 6' também aparecem como dublete, constante de acoplamento *orto* de 8,8 Hz e deslocamento químico de 6,69 ppm. O sinal com deslocamento químico em 7,26 ppm corresponde ao solvente CDCl_3 .

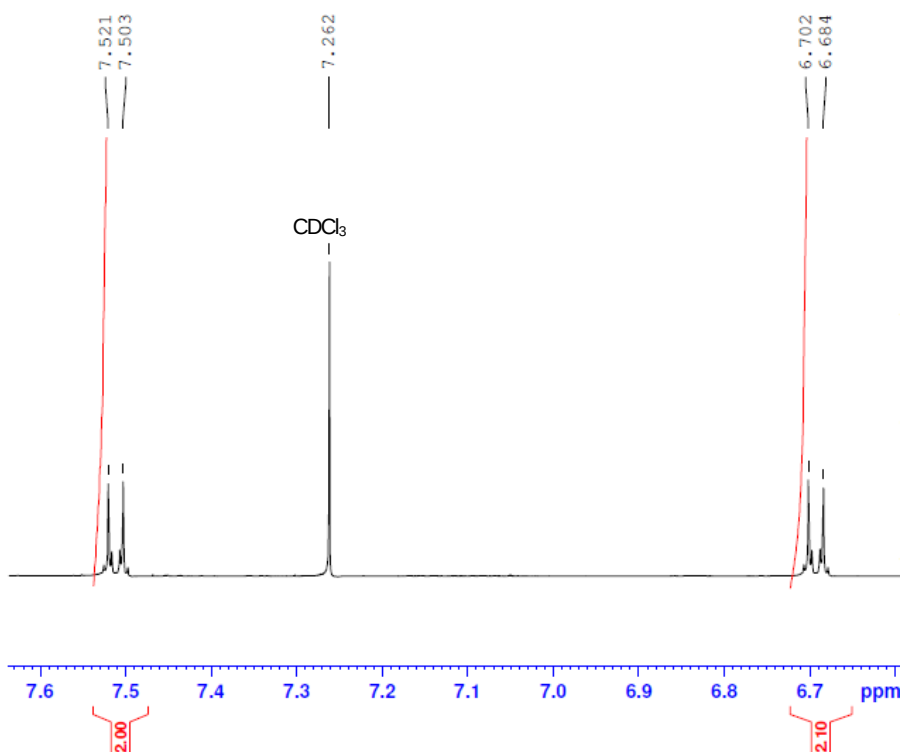


Figura 33 – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel aromático do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 202. Solvente CDCl_3 com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

Na expansão da Figura 34 (Anexo C) interpretou-se os hidrogênios do anel tiomorfolina como multipletos correspondendo a quatro hidrogênios nos carbonos numerados 1" e 2", mais desblindados com deslocamento químico de 3,30 ppm. E triplete, quatro hidrogênios, 3" e 4", mais blindados com deslocamento químico de 2,70 ppm.

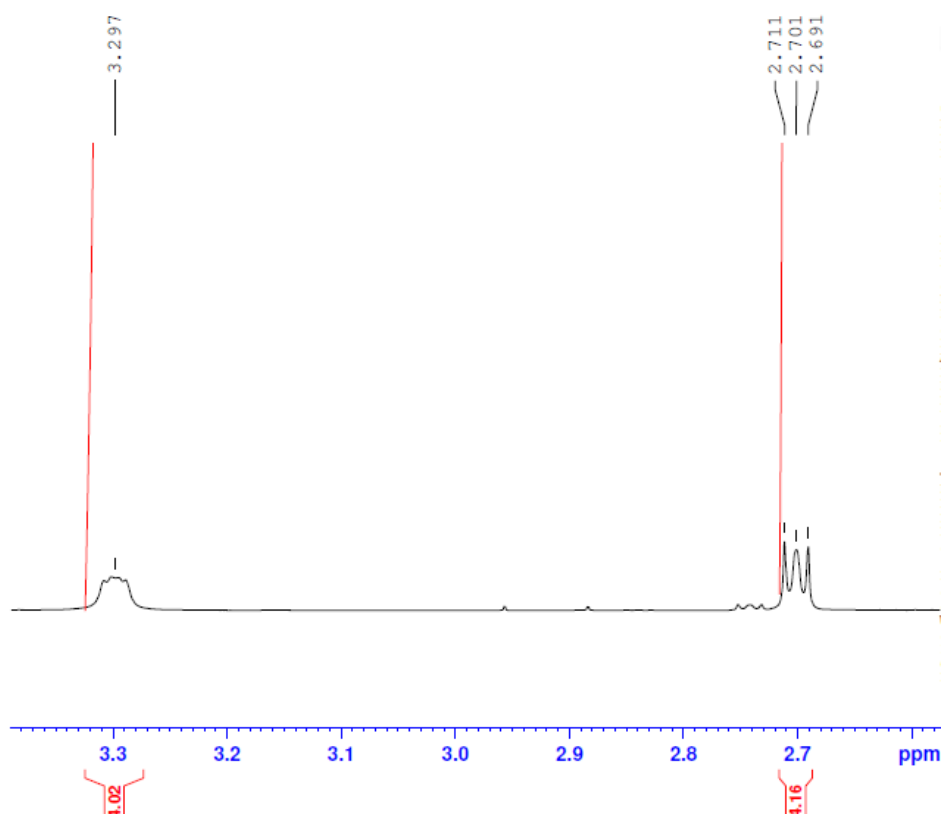


Figura 34 – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel tiomorfolina do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 202. Solvente CDCl_3 com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

Outra análise realizada para caracterização da estrutura foi a EM. A Figura 35 (Anexo D) mostra o pico em 151,097 para uma fragmentação na carbonila e o pico do íon molecular protonado em 259,350. Considerando-se as interpretações da RMN ^1H e EM, a proposta da estrutura química do composto I denominado LaBioCon 202 foi a ocorrência da reação de hidrólise da amida no LASSBio-596, conforme Figura 36 .

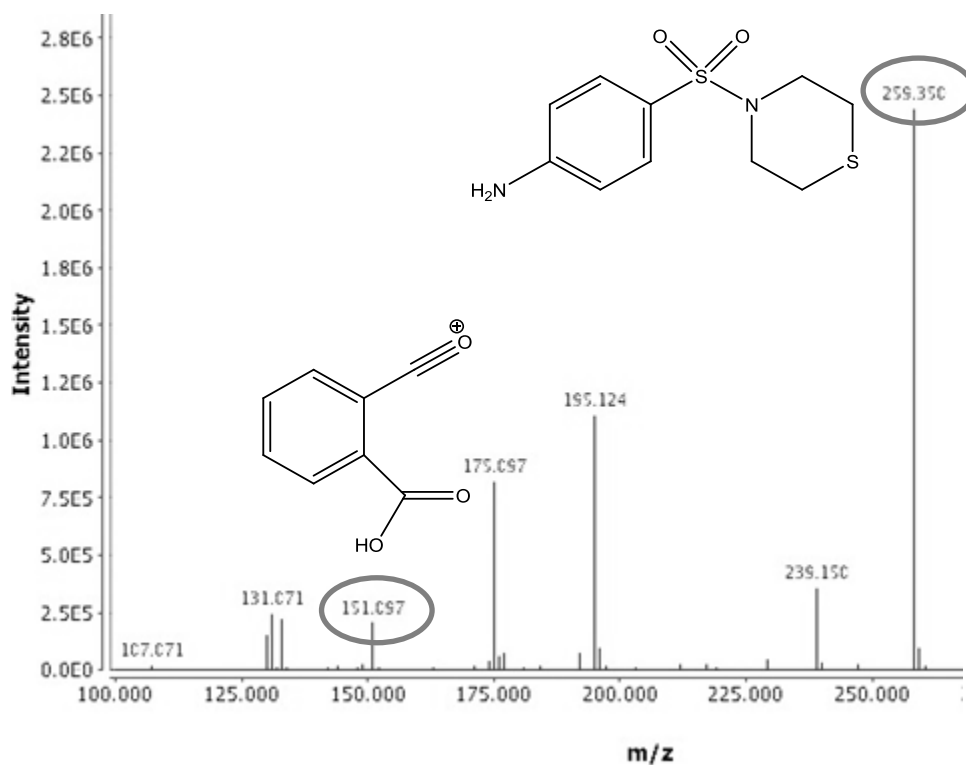


Figura 35 – Espectro de massas do LaBioCon 202. Ionização por *electrospray* no modo positivo, espectrômetro 4000 Q TRAP (Fonte: autor, 2011).

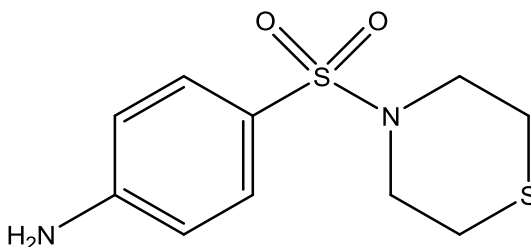


Figura 36 – Estrutura do LaBioCon 202. Nome químico: 4-(tiomorfolina-sulfonil)anilina (Fonte: autor, 2011).

4.3.2 LaBioCon 214

Fez-se a purificação da fração acetato de etila extraída da incubação B por CLAE semi-preparativa. Inicialmente, fez-se a varredura em espectrofotômetro para determinar o comprimento de onda de absorção máxima do substrato LASSBio-596 e obteve-se o valor 267 nm, conforme Figura 37 (Anexo E).

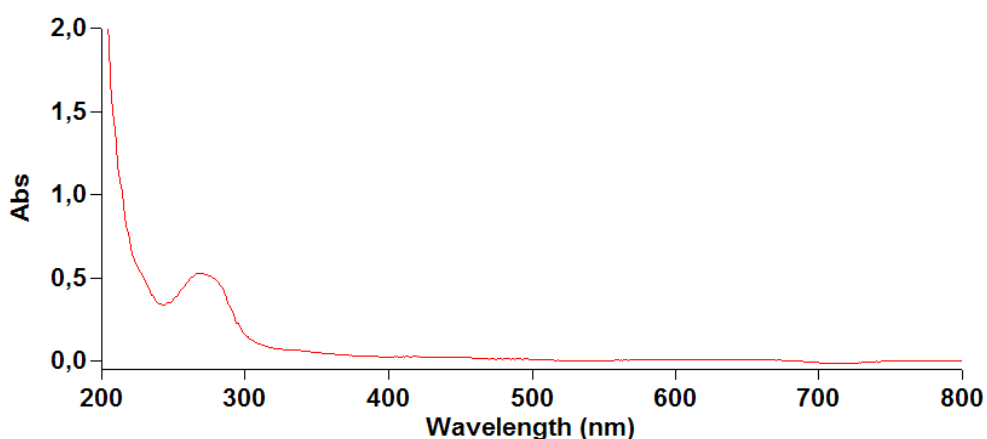


Figura 37 – Espectro na região do UV/visível do substrato LASSBio-596 0,01 mg/mL, na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm (Fonte: autor, 2011).

Injetou-se a fração acetato de etila solubilizada em metanol grau cromatográfico com fluxo de 4,0 mL por minuto e tempo de corrida de 6 minutos. O cromatograma não apresentou boa resolução entre os picos. Considerando a polaridade, o pico 1 corresponde ao composto II da cromatoplaça da Figura 30 e o pico 2 corresponde ao LASSBio-596. Coletou-se o pico 1 em um tubo de ensaio de plástico, no entanto pequena alíquota do pico 2 também foi recolhida (Figura 38 – Anexo F).

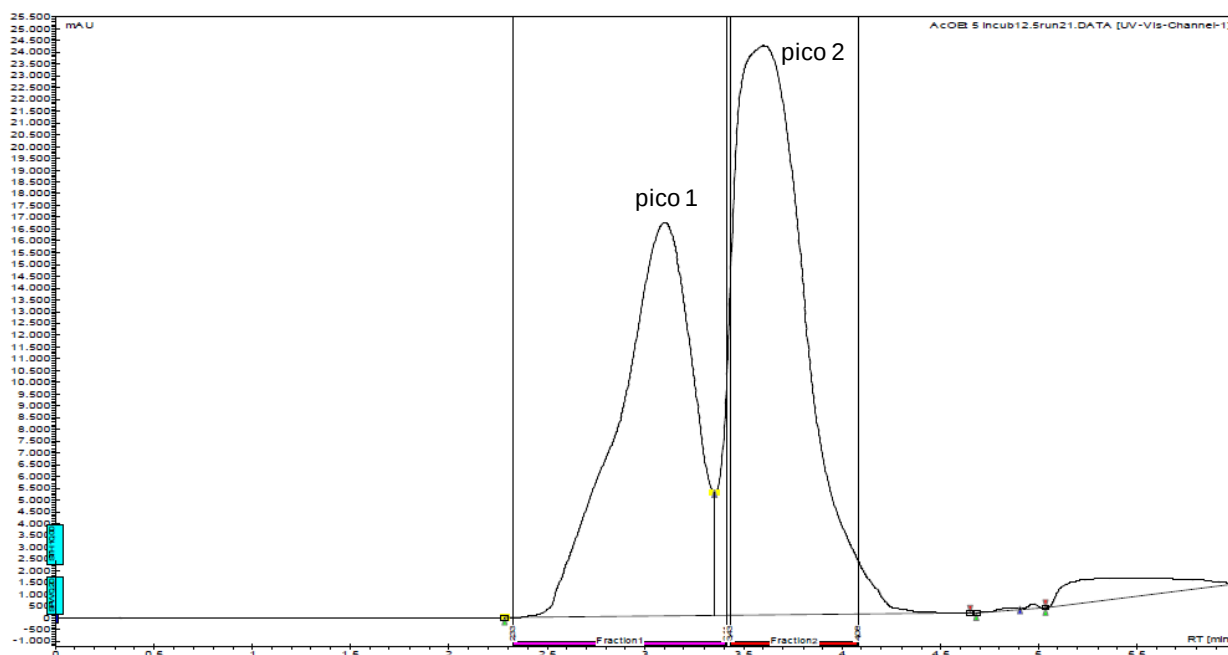


Figura 38 – Cromatograma da fração acetato de etila da incubação B. Coluna em fase reversa Microsorb 100-5 C18 (250 x 10 mm, 5 µm), fase móvel metanol e detector UV em 267 nm, fluxo 4,0 mL/min, tempo de corrida 6 minutos (Fonte: autor, 2011).

Então, injetou-se esta fração coletada para purificação do pico 1, utilizando-se fluxo de 4,0 mL por minuto e tempo de corrida de 6 minutos (Figura 39 – Anexo G).

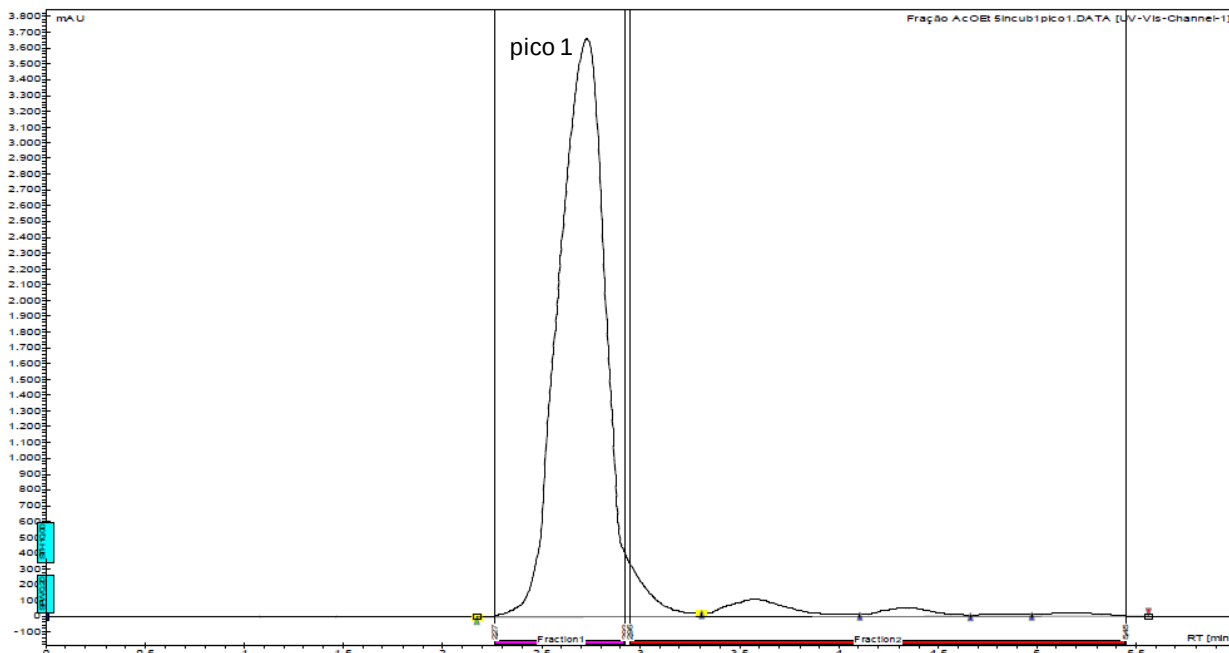


Figura 39 – Perfil cromatográfico da alíquota 1 coletada da fração acetato de etila para separação do pico 1. Coluna em fase reversa Microsorb 100-5 C18 (250 x 10 mm, 5 μ m), fase móvel metanol e detector UV em 267 nm, fluxo 4,0 mL/min, tempo de corrida 6 minutos (Fonte: autor, 2011).

Com a purificação do pico 1, observou-se que o composto II apresentou uma coloração amarelada, sendo denominado de LaBioCon 214. Calculou-se o rendimento de 5,84 % e prepararam-se amostras para análise de RMN ^1H e EM para caracterização estrutural para verificar se este composto II mais polar era o metabólito do LASSBio-596 obtido por bioconversão.

Na Figura 40 (Anexo H) está apresentado o espectro de RMN ^1H do LaBioCon 214 solubilizado em metanol deuterado (CD_3OD) com TMS como padrão interno.

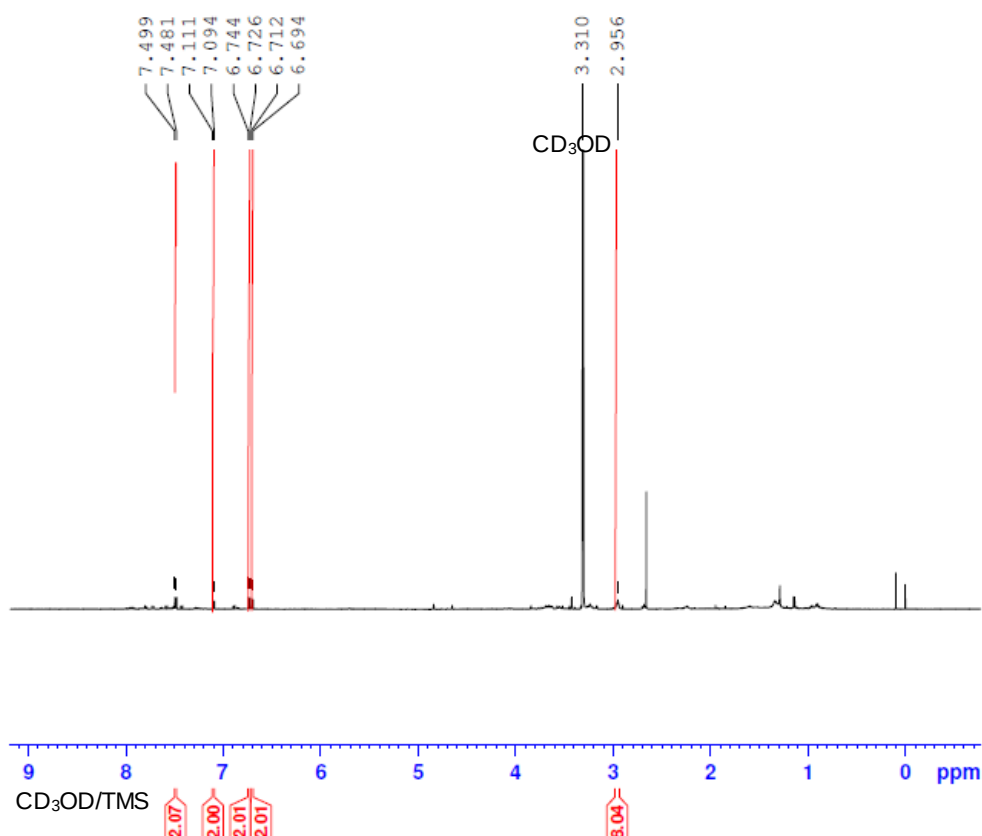


Figura 40 – Espectro de RMN ^1H do LaBioCon 214. Solvente CD_3OD com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

A Figura 41 demonstra as numerações nos carbonos dos anéis da estrutura química proposta como LaBioCon 214 (composto II).

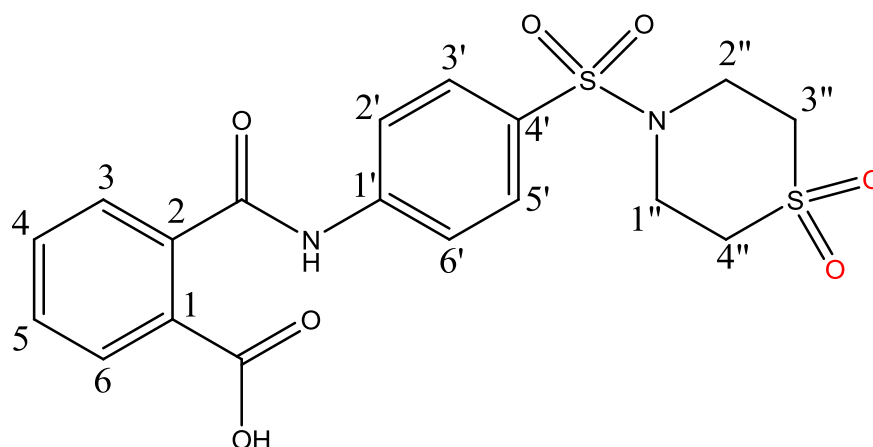


Figura 41 – Proposta de estrutura do LaBioCon 214 (composto II) com as numerações nos carbonos dos anéis (Fonte: autor, 2011).

As características dos sinais foram descritas no Quadro 4, sendo estas a quantidade de hidrogênios, multiplicidade, deslocamento químico e constante de acoplamento (J).

Nº átomo	H	Multiplicidade	ppm ou δ	J (Hz)
3' e 5'	2 H	dubleto	7,49	8,7
2' e 6'	2 H	dubleto	7,10	8,7
4 e 5	2 H	dubleto	6,73	8,7
3 e 6	2 H	dubleto	6,70	8,7
1", 2", 3" e 4"	8 H	múltiplo	2,96	-

Quadro 4 – Dados espectrais de RMN ^1H do LaBioCon 214. Solvente CD_3OD com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

Em seguida, na Figura 42 (Anexo I) fez-se uma expansão da região onde encontram-se os hidrogênios presentes nos anéis aromáticos. Os hidrogênios nos carbonos numerados 3' e 5' aparecem como dubleto, constante de acoplamento *orto* de 8,7 Hz e deslocamento químico de 7,49 ppm, o que significa que estão mais desblindados. Os hidrogênios nos carbonos numerados 2' e 6' também aparecem como dubleto, constante de acoplamento *orto* de 8,7 Hz e deslocamento químico de 7,10 ppm. Da mesma forma, observou-se para os hidrogênios nos carbonos 4 e 5 e 3 e 6, com deslocamento químico de 6,73 e 6,70, respectivamente. No espectro não foi possível notar o hidrogênio do grupamento carboxílico e o hidrogênio ligado ao nitrogênio porque são lábeis e fazem permuta com o deutério. Se eles fossem visualizados estariam num deslocamento químico de aproximadamente 11 ppm para -OH e 9 ppm para -NH. O sinal com deslocamento químico em 3,31 ppm corresponde ao solvente CD_3OD .

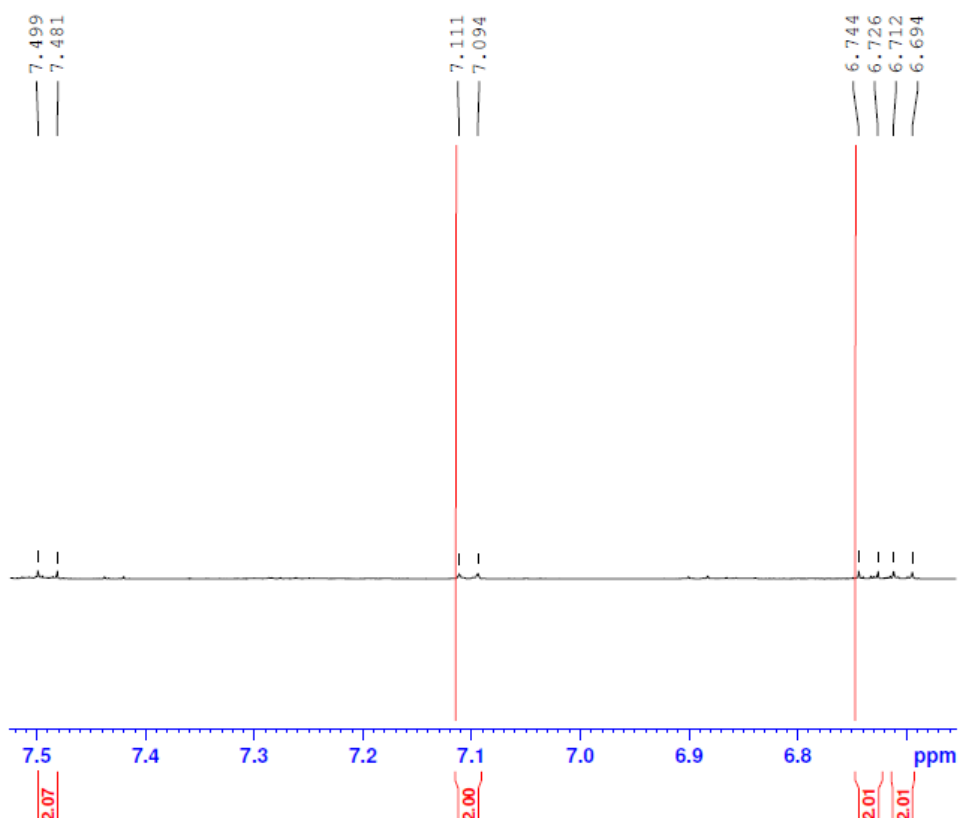


Figura 42 – Expansão da região dos hidrogênios presentes nos anéis aromáticos do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 214. Solvente CD_3OD com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

As expansões adiante fazem a comparação entre o espectro do LASSBio-596 e o espectro do LaBioCon 214. Para o LASSBio-596 (Figura 43) interpretou-se os hidrogênios do anel tiomorfolina como tripleto correspondendo a quatro hidrogênios nos carbonos numerados 1" e 2", mais desblindados com deslocamento químico de 3,21 ppm e J de 5,1 Hz. E outro tripleto, quatro hidrogênios, 3" e 4", mais blindados com deslocamento químico de 2,67 ppm e J de 5,1 Hz. No espectro do LaBioCon 214 (Figura 44 – Anexo J) notou-se um único multiplete correspondendo a oito hidrogênios, com deslocamento químico de 2,96 ppm. Tal aproximação dos hidrogênios pode ter ocorrido devido a um ambiente químico parecido. Considerando que há uma sulfona ligada ao anel tiomorfolina, supôs-se que também tenha uma sulfona na outra extremidade.

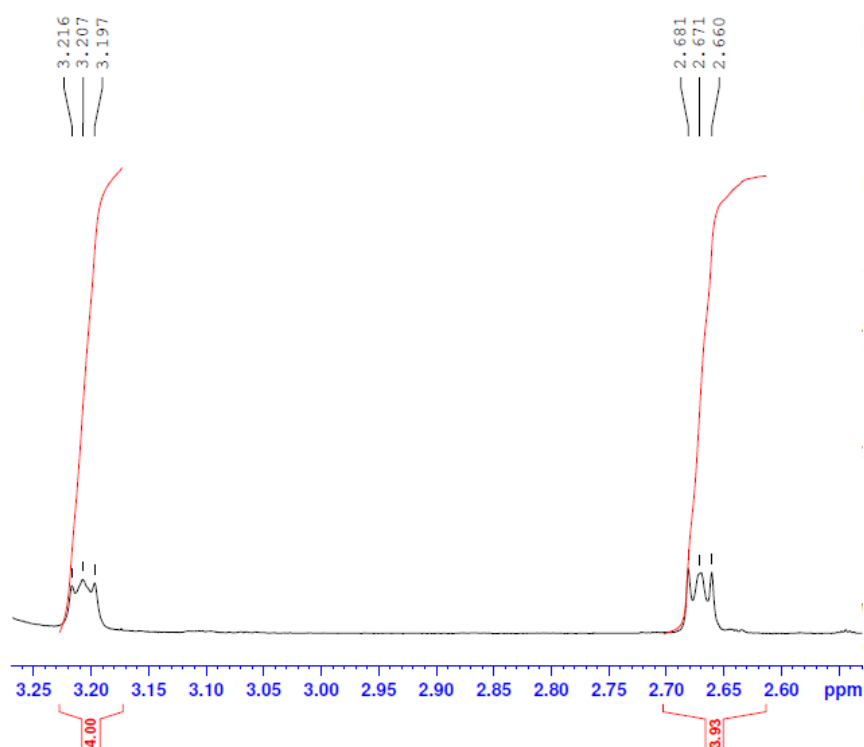


Figura 43 – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel tiomorfolina do espectro de RMN ^1H do LASSBio-596 (Fonte: autor, 2011).

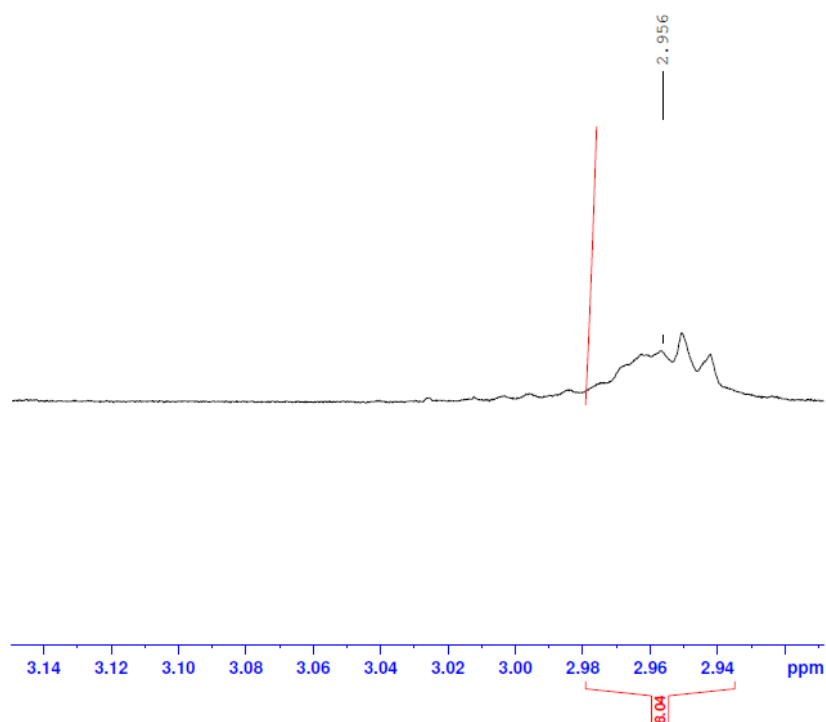


Figura 44 – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel tiomorfolina do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 214 (Fonte: autor, 2011).

Outra análise realizada para caracterização da estrutura foi a EM. O LASSBio-596 apresenta peso molecular de 406,48 g/mol. Na Figura 45 (Anexo K), destacou-se o pico com valor massa-carga (m/z) de 407,108, além do pico em 423,377 e o pico do íon molecular protonado em 439,377.

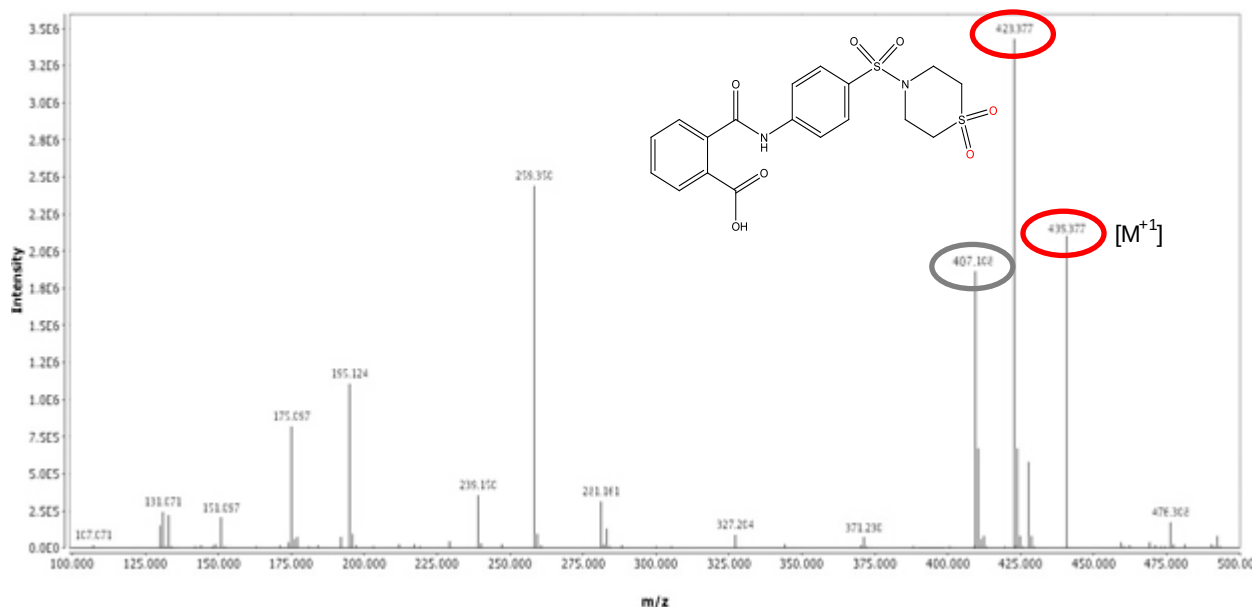


Figura 45 – Espectro de massas do LaBioCon 214. Ionização por *electrospray* no modo positivo, espectrômetro 4000 Q TRAP (Fonte: autor, 2011).

Então, inferiu-se que o pico em 423,377 corresponde ao sulfóxido porque é a soma da massa molecular do LASSBio-596 com um átomo de oxigênio mais um próton. E o pico em 439,377 corresponde à sulfona porque é a soma do LASSBio-596 com dois átomos de oxigênio mais um próton. Considerando-se as interpretações da RMN ^1H e EM, a proposta da estrutura química do composto II denominado LaBioCon 214 foi uma sulfona no anel tiomorfolina do LASSBio-596 (Figura 46), conforme estudos do metabolismo *in silico* que fizeram a previsão de S-oxidação.

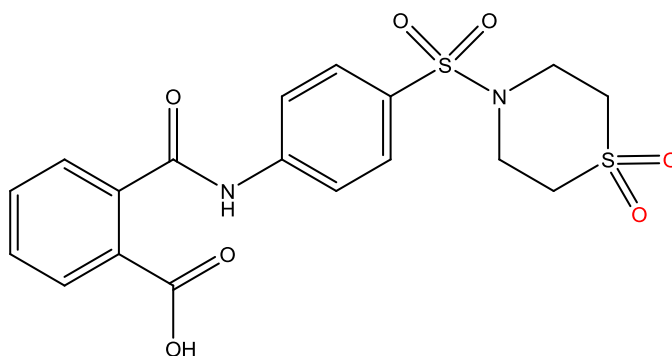


Figura 46 – Estrutura química do derivado sulfona LaBioCon 214 (Fonte: autor, 2011).

4.4 SÍNTESE

Para obtenção dos derivados do LASSBio-596 via sintética foram utilizados agentes oxidantes, a fim de promover a S-oxidação. Na Figura 47 está esquematizada a proposta de mecanismo de reação para obtenção de derivado sulfóxido.

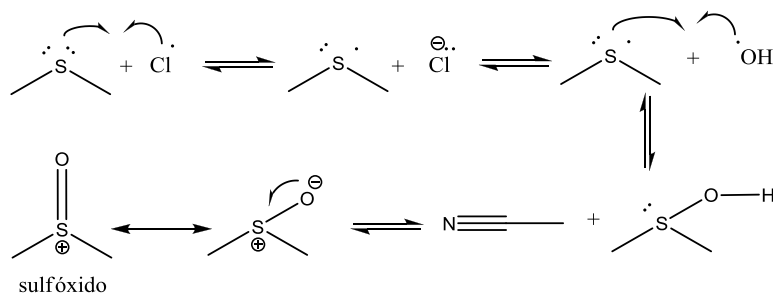


Figura 47 – Proposta de mecanismo de reação para obtenção de derivado sulfóxido (Fonte: autor, 2012).

A reação para síntese do derivado sulfóxido do LASSBio-596 está esquematizada na Figura 48.

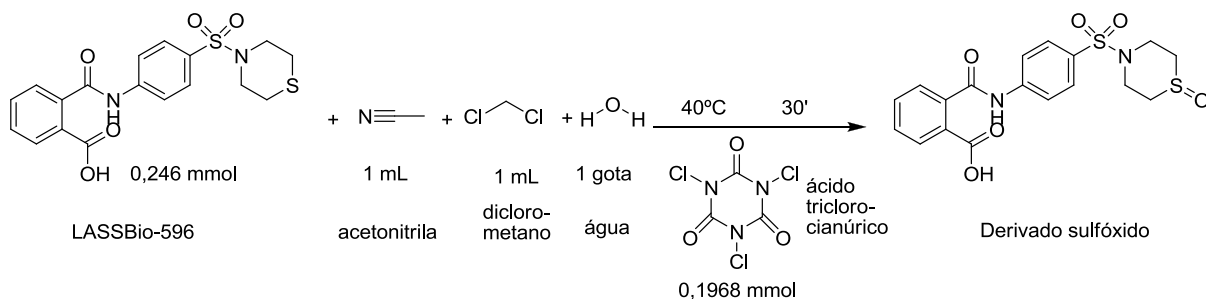


Figura 48 – Reação para síntese do derivado sulfóxido do LASSBio-596 (Fonte: autor, 2011).

Fez-se a tentativa de purificação do sulfóxido por CLAE semi-preparativa, contudo não obteve-se êxito devido à dificuldade de resolução entre os picos.

4.4.1 LaBioCon 223

Na Figura 49 está esquematizada a proposta de mecanismo de reação para obtenção de derivado sulfona.

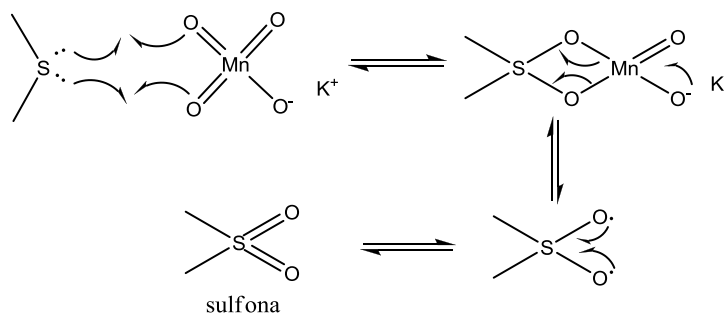


Figura 49 – Proposta de mecanismo de reação para obtenção do derivado sulfona do LASSBio-596 (Fonte: autor, 2012).

A reação para síntese do derivado sulfona do LASSBio-596 está esquematizada na Figura 50.

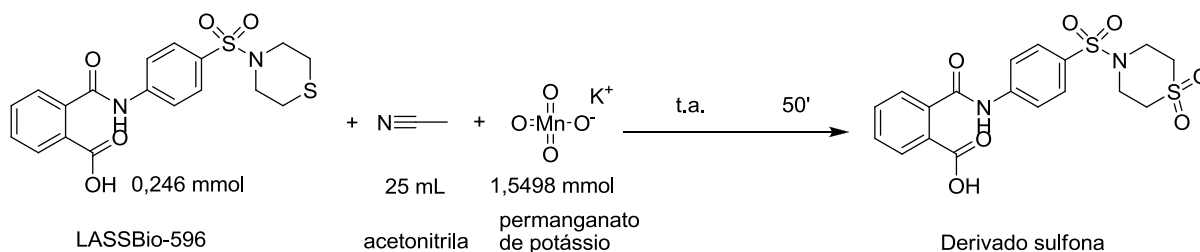


Figura 50 – Reação para síntese do derivado sulfona do LASSBio-596 (Fonte: autor, 2011).

Obteve-se um produto de coloração amarelada com rendimento de 75,4 %, sendo denominado LaBioCon 223. Na Figura 51 (Anexo L) está apresentado o espectro de RMN ^1H do LaBioCon 223 solubilizado em CD_3OD com TMS como padrão interno.

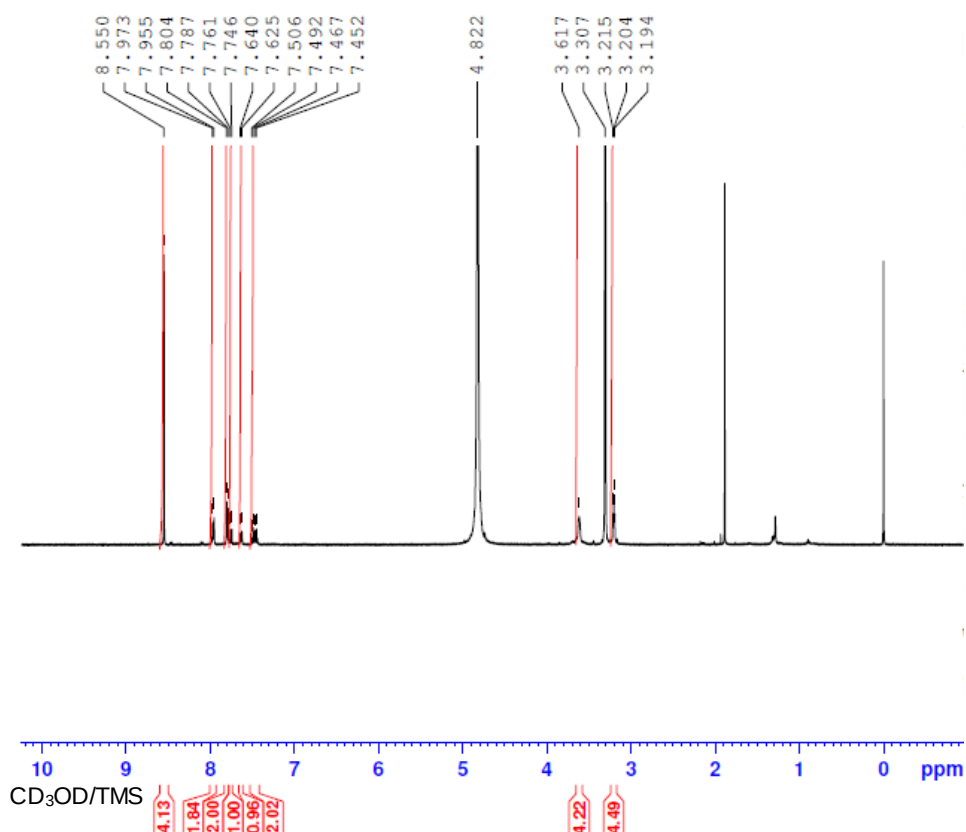


Figura 51 – Espectro de RMN ^1H do LaBioCon 223. Solvente CD_3OD com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

A Figura 52 demonstra as numerações nos carbonos dos anéis da estrutura química proposta como LaBioCon 223.

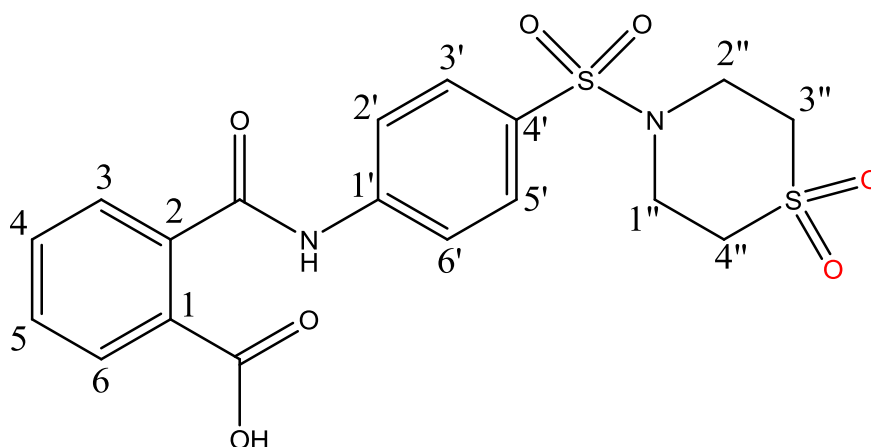


Figura 52 – Proposta de estrutura do LaBioCon 223 com as numerações nos carbonos dos anéis (Fonte: autor, 2011).

As características dos sinais foram descritas no Quadro 5, sendo estas a quantidade de hidrogênios, multiplicidade, deslocamento químico e constante de acoplamento (J).

Nº átomo	H	Multiplicidade	ppm ou δ	J (Hz)
3' e 5'	2 H	dublete	7,96	8,7
2' e 6'	2 H	dublete	7,79	8,7
3 ou 6	1 H	duplo dublete	7,75	1,4 e 7,4
3 ou 6	1 H	duplo dublete	7,63	1,4 e 7,4
4 ou 5	1 H	duplo duplo dublete	7,49	1,4; 7,4 e 7,4
4 ou 5	1 H	duplo duplo dublete	7,45	1,4; 7,4 e 7,4
1" e 2"	4 H	multipleto	3,62	-
3" e 4"	4 H	triplete	3,20	5,2

Quadro 5 – Dados espectrais de RMN ^1H do LaBioCon 223. Solvente CD_3OD com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

As Figuras 53 e 54 (Anexos M e N) são expansões para visualização das informações descritas no Quadro 5.

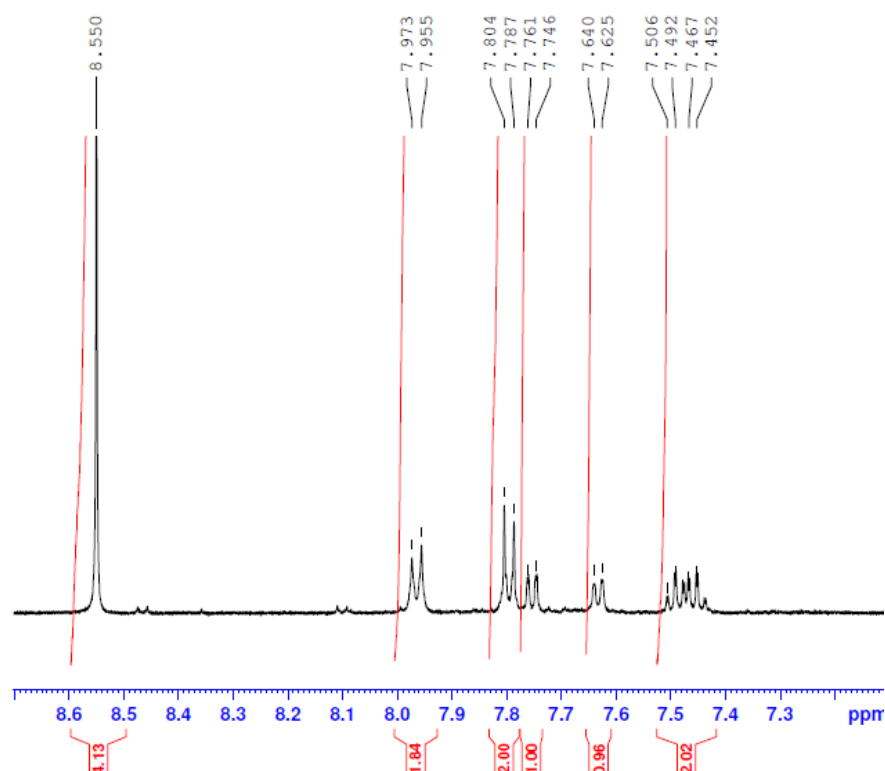


Figura 53 – Expansão da região dos hidrogênios presentes nos anéis aromáticos do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 223. Solvente CD_3OD com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

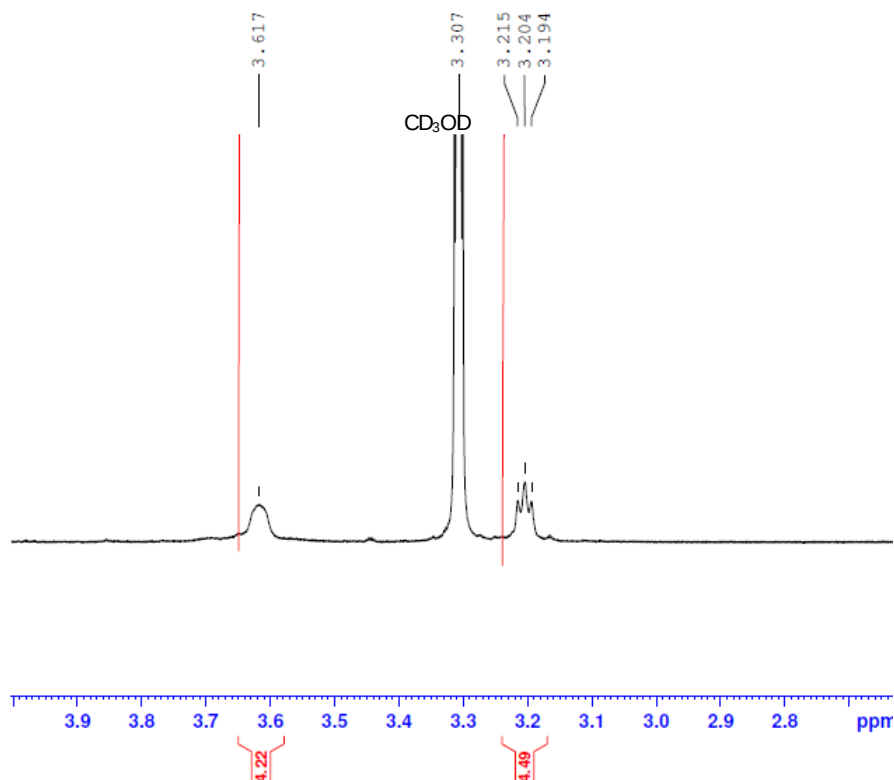


Figura 54 – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel tiomorfolina do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 223. Solvente CD_3OD com TMS como padrão interno, espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz) (Fonte: autor, 2011).

Na Figura 53 notou-se um sinal com deslocamento químico em 8,55 ppm e integração correspondendo a quatro hidrogênios. Propôs-se que o sinal seja do ácido ftálico resultante da reação de síntese do derivado sulfona do LASSBio-596. Na Figura 55 está representada a estrutura do ácido ftálico.

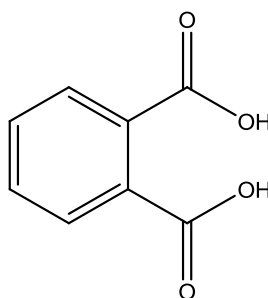


Figura 55 – Estrutura química do ácido ftálico (Fonte: autor, 2011).

Então, concluiu-se que o LaBioCon 223 apresentava uma impureza devido à observação deste sinal no espectro de RMN ^1H .

5 CONCLUSÕES

Os estudos realizados com o LASSBio-596 permitiram as seguintes conclusões:

- Previsão de reações de S-oxidação, hidroxilação aromática e desalquilação com as quatro melhores poses no sítio ativo da isoforma CYP2C9;
- O solvente utilizado para solubilização do substrato é fator determinante, e interfere no processo de biotransformação;
- LaBioCon 202 foi caracterizado como 4-(tiomorfolina-sulfonil)anilina, o que corresponde ao produto da reação de hidrólise da amida, com rendimento de 13,8 % e coloração levemente esverdeada;
- LaBioCon 214 foi obtido pela biotransformação realizada pelo fungo filamentoso *Beauveria bassiana* ATCC 7159, com rendimento de 5,84 % e coloração amarelada;
- LaBioCon 223 foi obtido por síntese e apresentou uma impureza, provavelmente o ácido ftálico.

6 PERSPECTIVAS

A baixa solubilidade em solventes polares e instabilidade do LASSBio-596 em solução dificultaram a obtenção de um maior número de derivados, com melhor rendimento. Novos estudos envolvendo estes parâmetros poderão facilitar as reações de biotransformação com fungos filamentosos.

Estudar a estabilidade do LASSBio-596 no meio reacional de forma a obter o derivado sulfóxido, além de isolar a sulfona em maior quantidade para realização de estudos farmacológicos e toxicológicos.

Realizar estudos *in silico* para previsão do metabolismo utilizando as outras isoformas da CYP450.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSHANAB, E.; REED, D.; SUZUKI, F.; SIH, C. J. Stereospecific microbial oxidation of thioethers to sulfoxides. Application to the synthesis of *R*-mevalonolactone. **Tetrahedron Letters**, n. 37, p. 3415-3418, 1978.

ANDERSSON, T. Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors. Focus on omeprazole, lansoprazole and pantoprazole. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 31, n. 1, p. 9-28, 1996.

ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 5-6, p. 737-747, 2001.

AQUILAR, S. J. An open study of mesoridazine (Serentil) in chronic schizophrenics. **Diseases of the Nervous System**, v. 36, n. 9, p. 484-489, 1975.

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

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in *In Vitro* Metabolism of Drugs – A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1699–1722, 2010.

AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Biotransformations)**, v. 63, ed. K. Faber, Th. Scheper, p. 169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

BARREIRO, E. J.; ROCCO, P. R. M.; ZIN, W. A.; LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; KOATZ, V. L. G. Uso do Composto LASSBio-596 e Congêneres, e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos, no Tratamento da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Pedido de privilégio de invenção do INPI **PI 0208767-7**, Depósito - 08/11/2002.

BARREIRO, E. J.; ROCCO, P. R. M.; ZIN, W. A.; LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M. Derivados N-Feniltalimídicos e Carbamoilbenzóicos Funcionalizados, Processo para sua Preparação e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos. INPI **PI 0401660-2**, Depósito - 27/04/2004.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New Insights for Multifactorial Disease Therapy: The Challenge of the Symbiotic Drugs. **Current Drug Therapy**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2008.

BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 128–145, 2006.

BORGES, K. B. **Análise estereosseletiva da tioridazina e seus principais metabólitos: um estudo cinético de biotransformação empregando fungos.** Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 669-674, 2007.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: an investigation of *rac*-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 945-952, 2008.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PATRÓN, R. D.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 385–397, 2009.

CAMPOS, H. S.; XISTO, D. G.; OLIVEIRA, M. B. C.; TEIXEIRA, I.; NEGRI, E. M.; MAUAD, T.; CARNIELLI, D.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; FAFTE, D. S.; ZIN, W. A.; LAPA E SILVA, J. R.; ROCCO, P. R. M. Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n. 2, p. 283-287, 2006.

CARNEIRO, E. O.; ANDRADE, C. H.; BRAGA, R. C.; TÔRRES, A. C. B.; ALVES, R. O.; LIÃO, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; DE OLIVEIRA, V. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 12, p. 3734–3736, 2010.

CARREÑO, M. C. Applications of Sulfoxides to Asymmetric Synthesis of Biologically Active Compounds. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 6, p. 1717-1760, 1995.

CARVALHO, C. C. C. R. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 75–83, 2011.

CARVALHO, G. M. C. **Comparação do tratamento com LASSBio-596 ou dexametasona na lesão pulmonar aguda induzida por microcistina-LR.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

CARVALHO, G. M. C.; OLIVEIRA, V. R.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; VALENÇA, S. S.; SALDIVA, P. H. N.; FAFTE, D. S.; ZIN, W. A. Can LASSBio-596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR? **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 604-612, 2010.

ČREŠNAR, B.; PETRIČ, S. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1814, p. 29–35, 2011.

DE MONTELLANO, P. R. O. **Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry**, 3rd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2005.

DE MONTELLANO, P. R. O. Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 2, p. 932–948, 2010.

DE MORAES, V. L. G.; VARGAFTIG, B. B.; LEFORT, J.; MEAGER, A.; CHIGNARD, M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, n. 8, p. 1792-1796, 1996.

DENISOV, I. G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G.; SCHLICHTING, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 6, p. 2253-2277, 2005.

DODSON, R. M.; NEWMAN, N.; TSUCHIYA, H. M. Microbiological Transformations. XI. Preparation of Optically Active Sulfoxides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 2707-2708, 1962.

FANG, J.; GORROD, J. W. Metabolism, Pharmacogenetics, and Metabolic Drug–Drug Interactions of Antipsychotic Drugs. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 19, n. 4, p. 491-510, 1999.

FATIADI, A. J. The Classical Permanganate Ion: Still a Novel Oxidant in Organic Chemistry. **Synthesis**, v. 2, p. 85-127, 1987.

FURA, A.; SHU, Y. Z.; ZHU, M.; HANSON, R. L.; ROONGTA, V.; HUMPHREYS, W. G. Discovering Drugs through Biological Transformation: Role of Pharmacologically Active Metabolites in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 18, p. 4339-4351, 2004.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, volume 11, issues 3-4, pages 133-142, 2006.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GOTTSCHALK, L. A.; DINOVO, E.; BIENER, R.; NANDI, B. R. Plasma concentrations of thioridazine metabolites and ECG abnormalities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 2, p.155-157, 1978.

GROGAN, G. J.; HOLLAND, H. L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 1–32, 2000.

GRUENKE, L. D.; CRAIG, J. C. Identification of a metabolite of thioridazine and mesoridazine from human plasma. **Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 221-225, 1975.

HALE, P. W. Jr.; POKLIS, A. Cardiotoxicity of thioridazine and two stereoisomeric forms of thioridazine 5-sulfoxide in the isolated perfused rat heart. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 44-55, 1986.

HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H.; POLLEY, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. **Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic**, p. 97-104, 1949.

HOLLAND, H. L.; CARTER, I. M. The mechanism of sulphide oxidation by *Mortierella isabellina* NRRL 1757. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 2420-2425, 1982.

HOLLAND, H. L. Chiral Sulfoxidation by Biotransformation of Organic Sulfides. **Chemical Reviews**, v. 88, n. 3, p. 473-485, 1988.

HOLLAND, H. L.; RAND, C. G.; VISKI, P.; BROWN, F. M. Microbial oxidation of benzyl sulfides and bibenzyl by *Mortierella isabellina* and *Helminthosporium* species. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 69, p. 1989-1993, 1991.

HOLLAND, H. L.; BROWN, F. M.; LAKSHMAIAH, G.; LARSEN, B. G.; PATEL, M. Biotransformation of organic sulfides - VIII. A predictive model for sulfoxidation by *Helminthosporium* species NRRL 4671. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 5, 683-697, 1997.

HOLLAND, H. L. Biotransformation of organic sulfides. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 2, p. 171-181, 2001.

International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary of terms used in Medicinal Chemistry. **IUPAC Recommendations 1998**. Disponível em <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/>> Acesso em 12 set 2011.

JENKS, W. S.; MATSUNAGA, N.; GORDON, M. Effects of Conjugation and Aromaticity on the Sulfoxide Bond. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 1275-1283, 1996.

JUNG, C. The mystery of cytochrome P450 Compound I: A mini-review dedicated to Klaus Ruckpaul. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1814, p. 46-57, 2011.

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

LI, A. P.; KAMINSKI, D. L.; RASMUSSEN, A. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. **Toxicology**, v. 104, n. 1-3, p. 1-8, 1995.

LI, A. P. Screening for Human ADME/Tox Drug Properties in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 7, p. 357-366, 2001.

LI, X. D.; WANG, M.; ZHENG, Y.; LUO, J. M.; SUN, H. Optimization of conditions for the Biotransformation of 5-Cyanovaleramide from Adiponitrile by *Rhodococcus ruber* CGMCC 3090. **Bioinformatics and Biomedical Engineering** (iCBBE), 4th International Conference on, v. 1, p. 1-4, 2010.

LIMA, L. M. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios e antiasmáticos**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LIMA, L. M.; CASTRO, P.; MACHADO, A. L.; FRAGA, C. A. M.; LUGNIER, C.; KOATZ, V. L. G.; BARREIRO, E. J. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Phthalimide Derivatives, Designed as New Thalidomide Analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 3067–3073, 2002.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIMA, L. M.; DE LIMA, N. M. Contribuição do LASSBio[®] no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 35-48, 2009.

LU, J.; HELSBY, N.; PALMER, B. D.; TINGLE, M.; BAGULEY, B. C.; KESTELL, P.; CHING, L. M. Metabolism of Thalidomide in Liver Microsomes of Mice, Rabbits, and Humans. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 2, p. 571-577, 2004.

LUSTOSA, K. R. M. D.; MENEGATTI, R.; BRAGA, R. C.; LIÃO, L. M.; DE OLIVEIRA, V. Microbial β -glycosylation of entacapone by *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 611–613, 2012.

MODA, T. L. **Modelagem *In Silico* de Propriedades Farmacocinéticas para a Avaliação de Candidatos a Novos Fármacos**. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.

MOUSSA, C.; HOUZIAUX, P.; DANREE, B.; AZERAD, R. 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, 1996.

NELSON, D. R.; STROBEL, H. W. Secondary Structure Prediction of 52 Membrane-Bound Cytochromes P450 Shows a Strong Structural Similarity to P450_{cam}. **Biochemistry**, v. 28, p. 656-660, 1989.

NELSON, D. R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J. J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C.; NEBERT, D. W. P450 superfamily: update on new

sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1-42, 1996.

OMURA, T.; SATO, R. A new cytochrome in liver microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 4, p. 1375-1376, 1962.

OMURA, T.; SATO, R. The Carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. I - Evidence for its heme protein nature. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 7, p. 2370-2378, 1964.

PANGBURN, H. A.; KRAUS, H.; AHNEN, D. J.; RICE, P. L. Sulindac metabolites inhibit epidermal growth factor receptor activation and expression. **Journal of Carcinogenesis**, v. 4, n. 16, p. 1-12, 2005.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C. Microbial oxygenation of steroids at carbon 11. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 7, p. 1871-1872, 1952.

PRASAD, G. S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S. M. Microbial transformation of albendazole. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 415-420, 2010.

ROCCO, P. R. M.; MOMESSO, D. P.; FIGUEIRA, R. C.; FERREIRA, H. C.; CADETE, R. A.; MACHADO, A. L.; KOATZ, V. L. G.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; ZIN, W. A. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **European Respiratory Journal**, v. 22, p. 20-27, 2003.

ROCCO, P. R. M.; XISTO, D. G.; SILVA, J. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; LUCIANO, M. N.; MEDEIROS, I. A.; CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R. O.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. Ó.; DALLA-COSTA, T.; CATTANI, V. B.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. LASSBio-596: da descoberta aos ensaios pré-clínicos. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 10-27, 2010.

SCHUMACHER, H.; SMITH, R. L.; WILLIAMS, R. T. The metabolism of thalidomide: the fate of thalidomide and some of its hydrolysis products in various species. **British Journal of Pharmacology**, v. 25, p. 338-351, 1965.

SELISKAR, M.; ROZMAN, D. Mammalian cytochromes P450 – Importance of tissue specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 3, p. 458-466, 2007.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 161, n. 2, p. 551-558, 1974.

STOUDT, T. H. The microbiological transformation of steroids. **Advances in Applied Microbiology**, v. 2, p. 183-222, 1960.

SUN, H.; SCOTT, D. O. Structure-based Drug Metabolism Predictions for Drug Design. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 75, p. 3-17, 2010.

TESTA, B.; BALMAT, A. L.; LONG, A. Predicting drug metabolism: Concepts and challenges. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 907-914, 2004.

VALOIS, M. E. C.; TAKAYANAGUI, O. M.; BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L.; CARVALHO, D. Determination of Albendazole Metabolites in Plasma by HPLC. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 86-90, 1994.

VAN DEN BRINK, H. J. M.; VAN GORCOM, R. F. M.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, n. 1, p. 1-17, 1998.

WESTER, M. R.; YANO, J. K.; SCHOCH, G. A.; YANG, C.; GRIFFIN, K. J.; STOUT, C. D.; JOHNSON, E. F. The Structure of Human Cytochrome P450 2C9 Complexed with Flurbiprofen at 2.0-Å Resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35630–35637, 2004.

WRIGHT, L. D.; CRESSON, E. L.; VALIANT, J.; WOLF, D. E.; FOLKERS, K. Biotin Sulfoxide. III. The Characterization of Biotin Sulfoxide from a Microbiological Source. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 16, 4163-4166, 1954.

XIONG, Z. X.; HUANG, N. P.; ZHONG, P. A Selective and convenient oxidation of sulfides to Sulfoxides with trichloroisocyanuric acid. **Synthetic Communications**, v. 31, n. 2, p. 245–248, 2001.

YANO, J. K.; WESTER, M. R.; SCHOCH, G. A.; GRIFFIN, K. J.; STOUT, C. D.; JOHNSON, E. F. The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-Å Resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38091–38094, 2004.

ZANGER, U. M.; TURPEINEN, M.; KLEIN, K.; SCHWAB, M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 6, p. 1093-1108, 2008.

ZEHENTGRUBER, D.; DRAGAN, C. A.; BUREIK, M.; LUTZ, S. Challenges of steroid biotransformation with human cytochrome P450 monooxygenase CYP21 using resting cells of recombinant *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Biotechnology**, v. 146, p. 179-185, 2010.

ZEHNDER, K.; KALBERER, F.; KREIS, W.; RUTSCHMANN, J. Metabolism of thioridazine (Mellaril) and one of its pyrrolidine analogues in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v.11, n. 7, p.535-550, 1962.

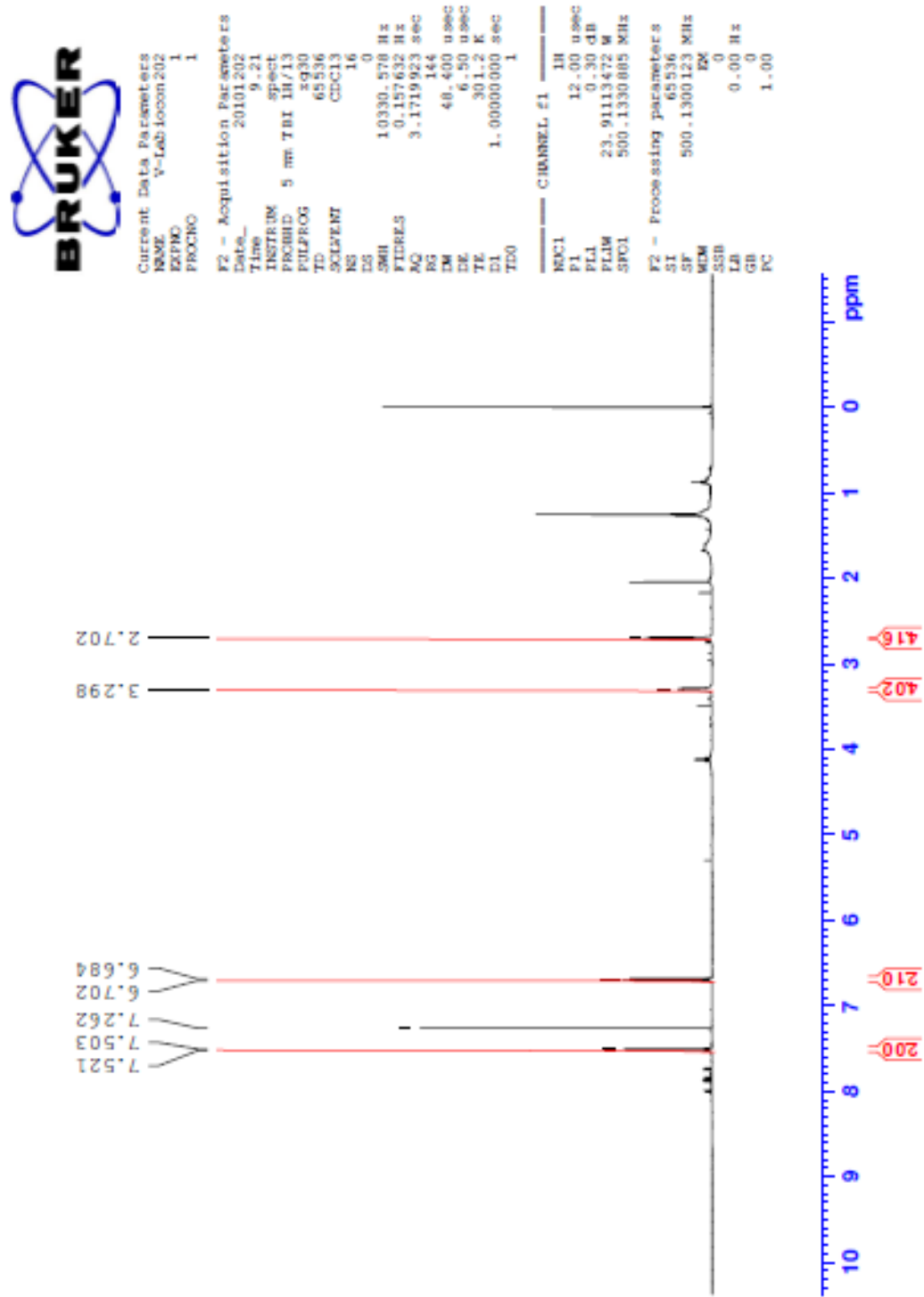
ZHOU, S. F. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 310-322, 2008.

ZHOU, S. F.; ZHOU, Z. W.; HUANG, M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. **Toxicology**, v. 278, p. 165–188, 2010.

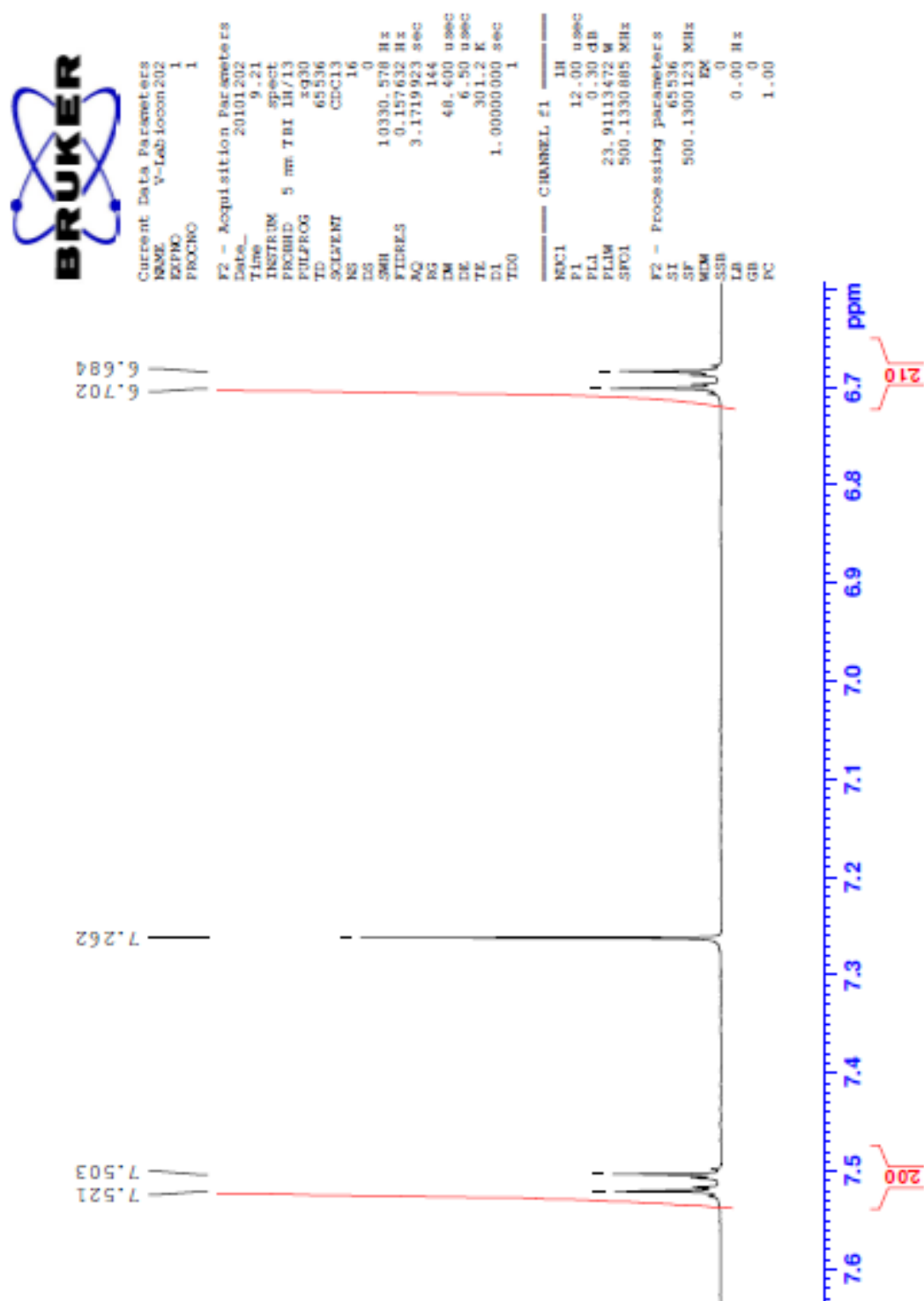
ZUBER, R.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANZENBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 189-198, 2002.

ANEXOS

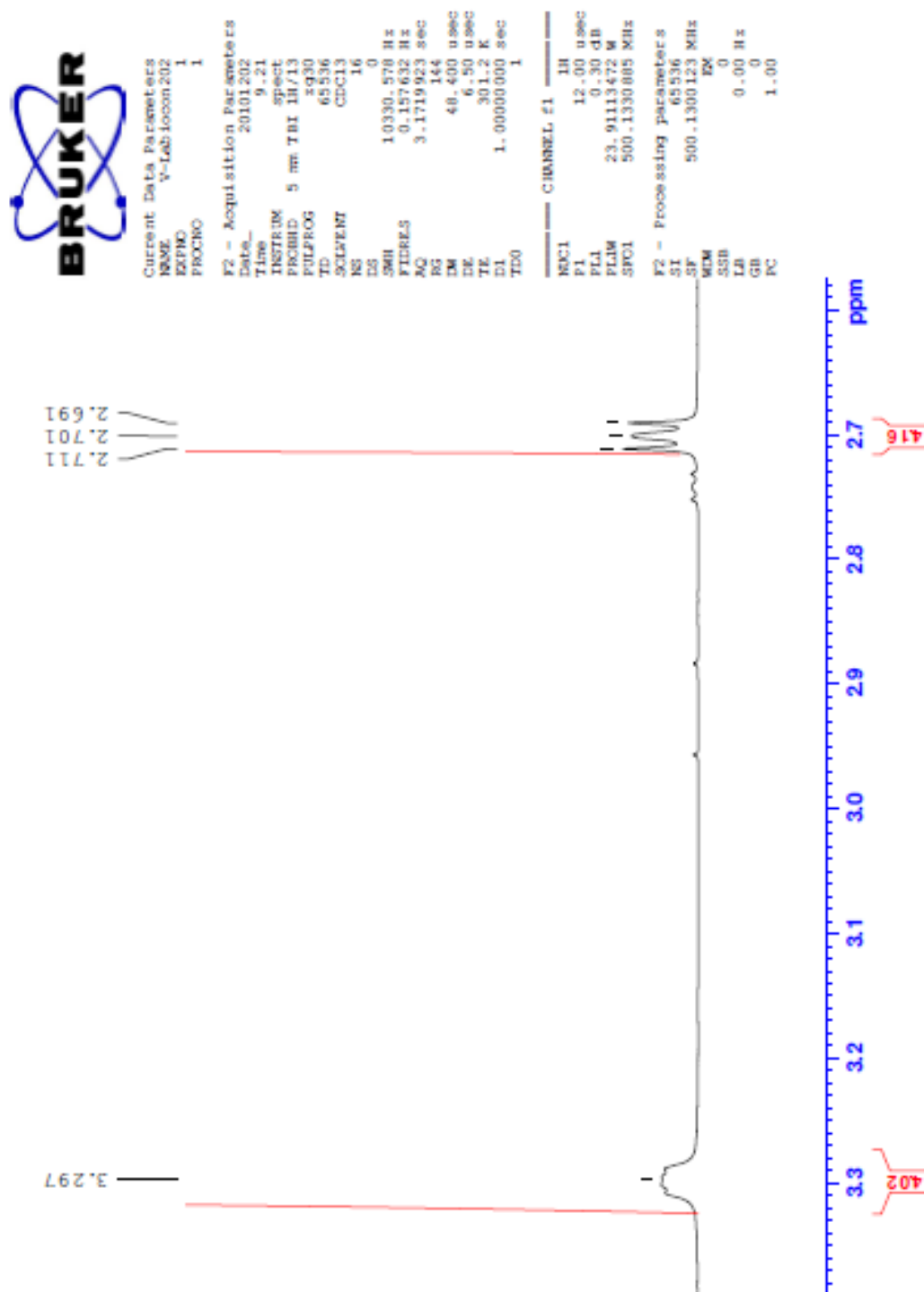
Anexo A – Espectro de RMN ¹H do LaBioCon 202.



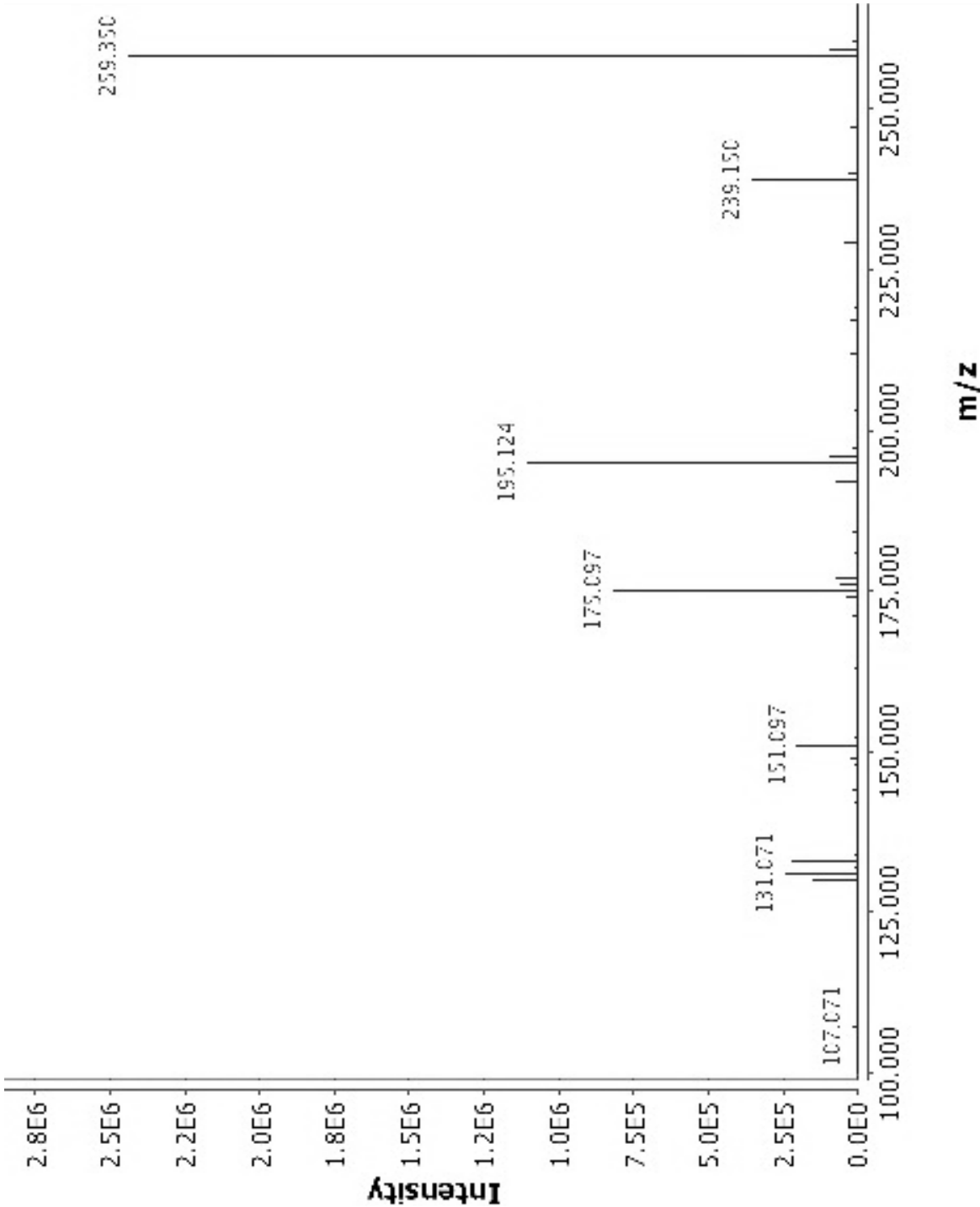
Anexo B – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel aromático do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 202.



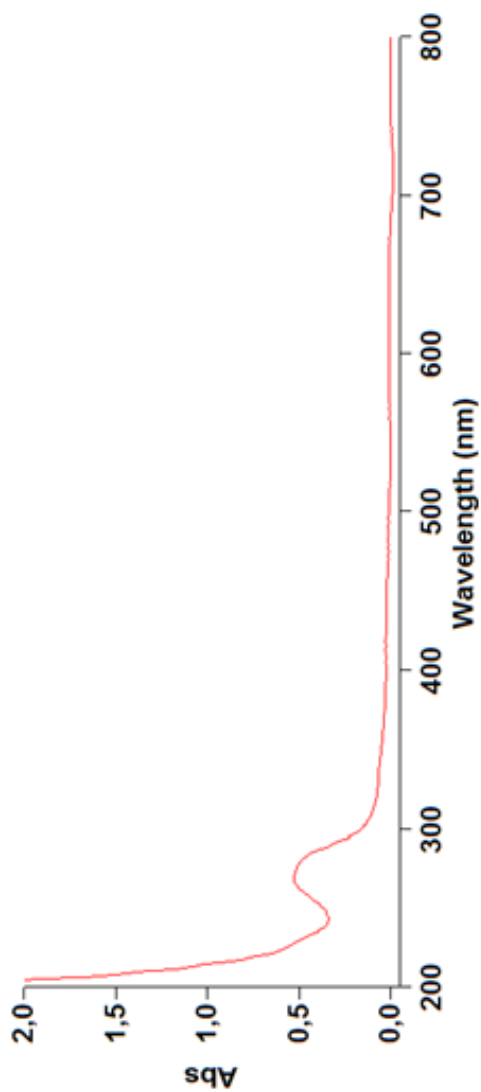
Anexo C – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel tiomorfolina do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 202.



Anexo D – Espectro de massas do LaBioCon 202.



Anexo E – Espectro na região do UV/visível do substrato LASSBio-596 0,01 mg/mL, na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm.



Scan Analysis Report

Report Time : qui 17 mar 10:55:58 AM 2011
Batch: C:\Varian\Cary Winuv\Samples\LCQM-2011\Kelly\Varredura Juliana Camila LassBio 596
0,01mg-mL 17-03-11.DSW
Software version: 3.00(182)
Operator: Juliana Camila

Sample Name: LASSBIO 596

Collection Time 17/3/2011 10:56:14

Peak Table	
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0,0100
Range	800,0nm to 200,0nm

Anexo F – Injeção da fração acetato de etila da incubação B.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

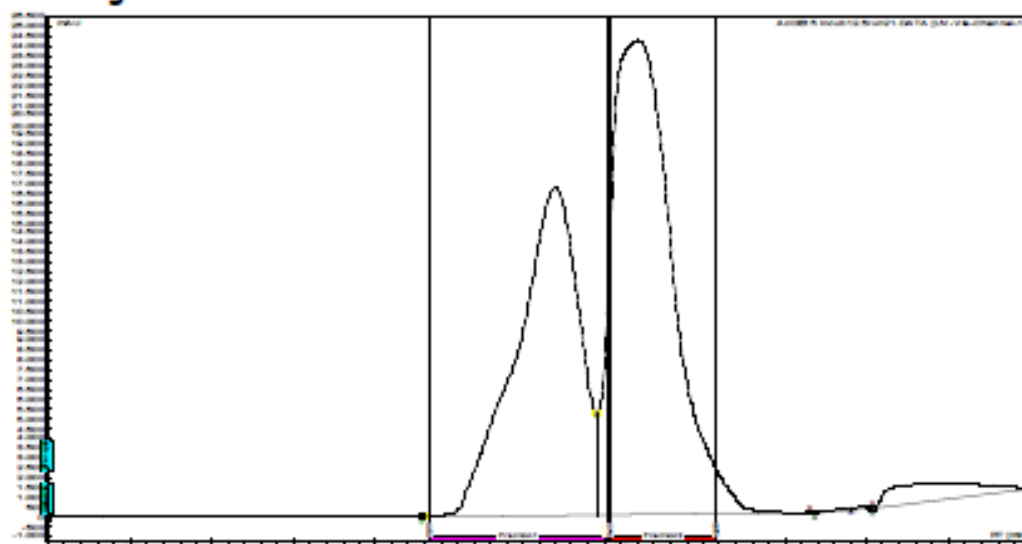
LABIOCON



Equipamento : HPLC
Método : 596prepMeOH

Data e Hora: 9/3/2011 14:10:45
Analista : Valeria de Oliveira

Cromatograma



Resultados :

AcOEt 5 Incub12.5run21.DAT [UV-Vis-Channel-1]

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [mAU]	Area [mAU.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	3.10	39.94	16701.4	7413.4	39.938
2	UNKNOWN	3.60	56.75	24178.7	10533.4	56.746
3	UNKNOWN	4.84	0.06	111.4	11.4	0.062
4	UNKNOWN	4.97	0.07	209.0	12.9	0.069
5	UNKNOWN	5.23	3.18	980.8	591.1	3.184
Total			100.00	42181.3	18562.2	100.000

Anexo G – Separação do pico 1.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

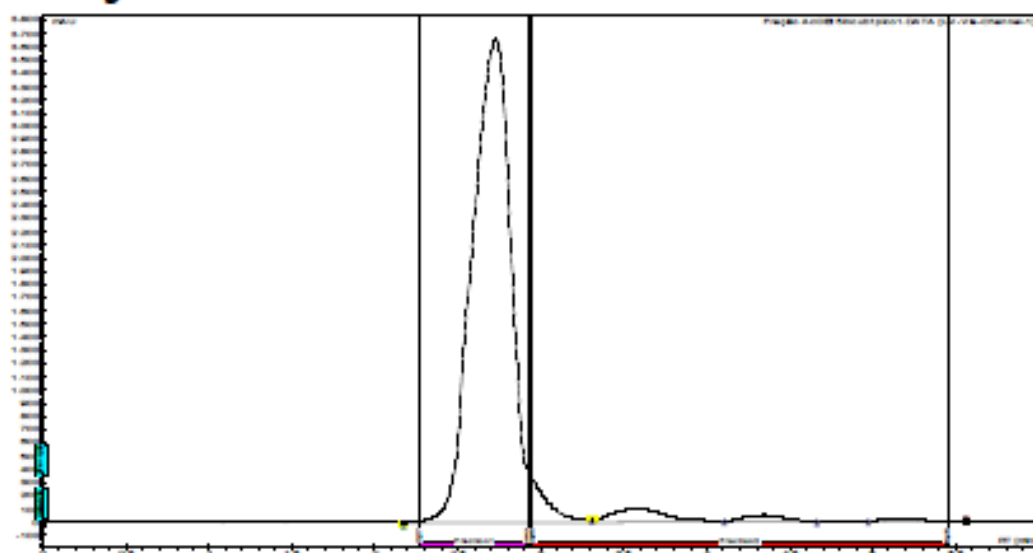
LABIOCON



Equipamento : HPLC
Método : 596prepMeOH

Data e Hora: 9/3/2011 14:46:29
Analista : Valeria de Oliveira

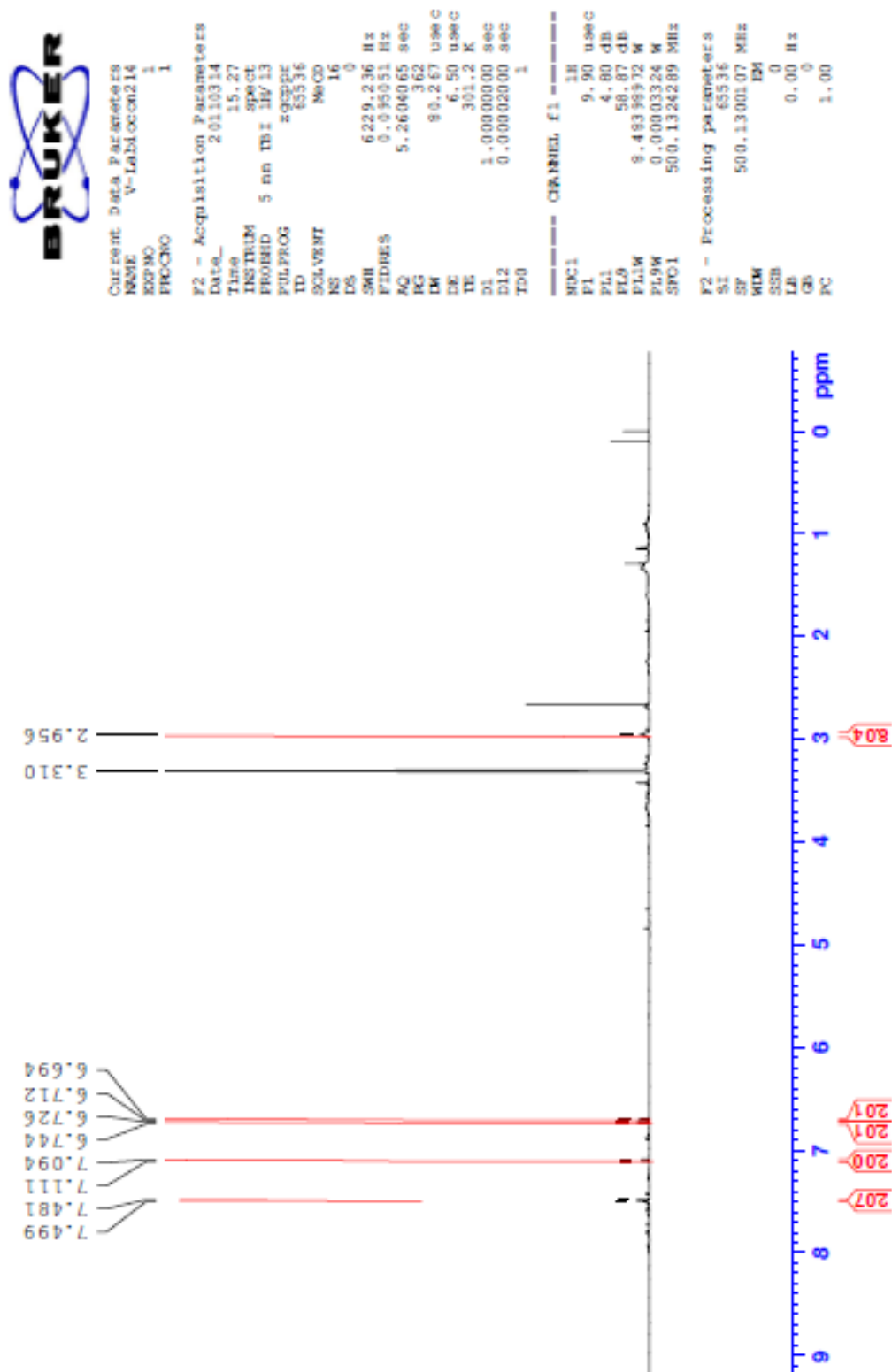
Cromatograma



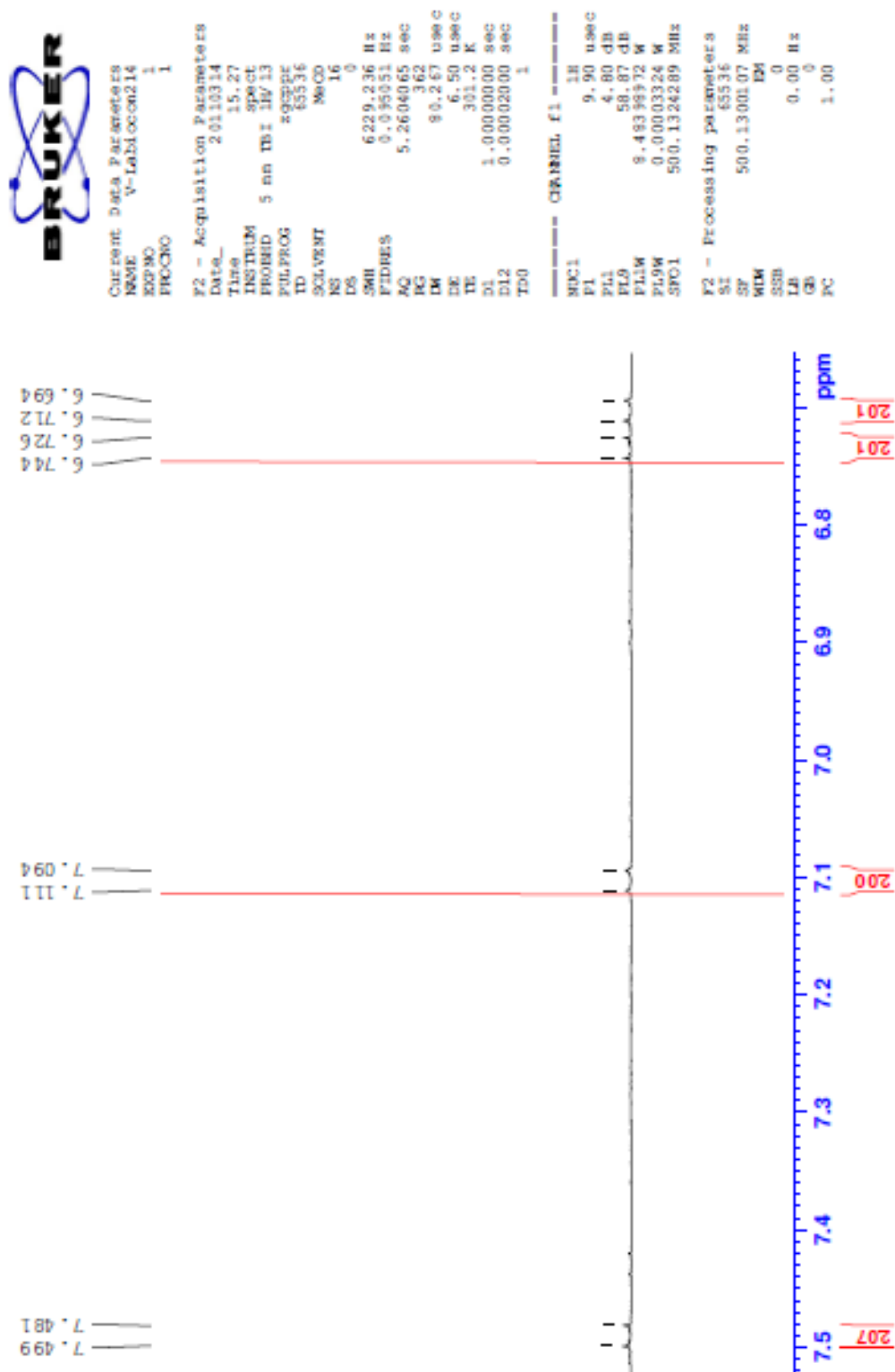
Resultados :

Fração AcOEt Sincub1pico1.DAT (UV-Vis-Channel-1)

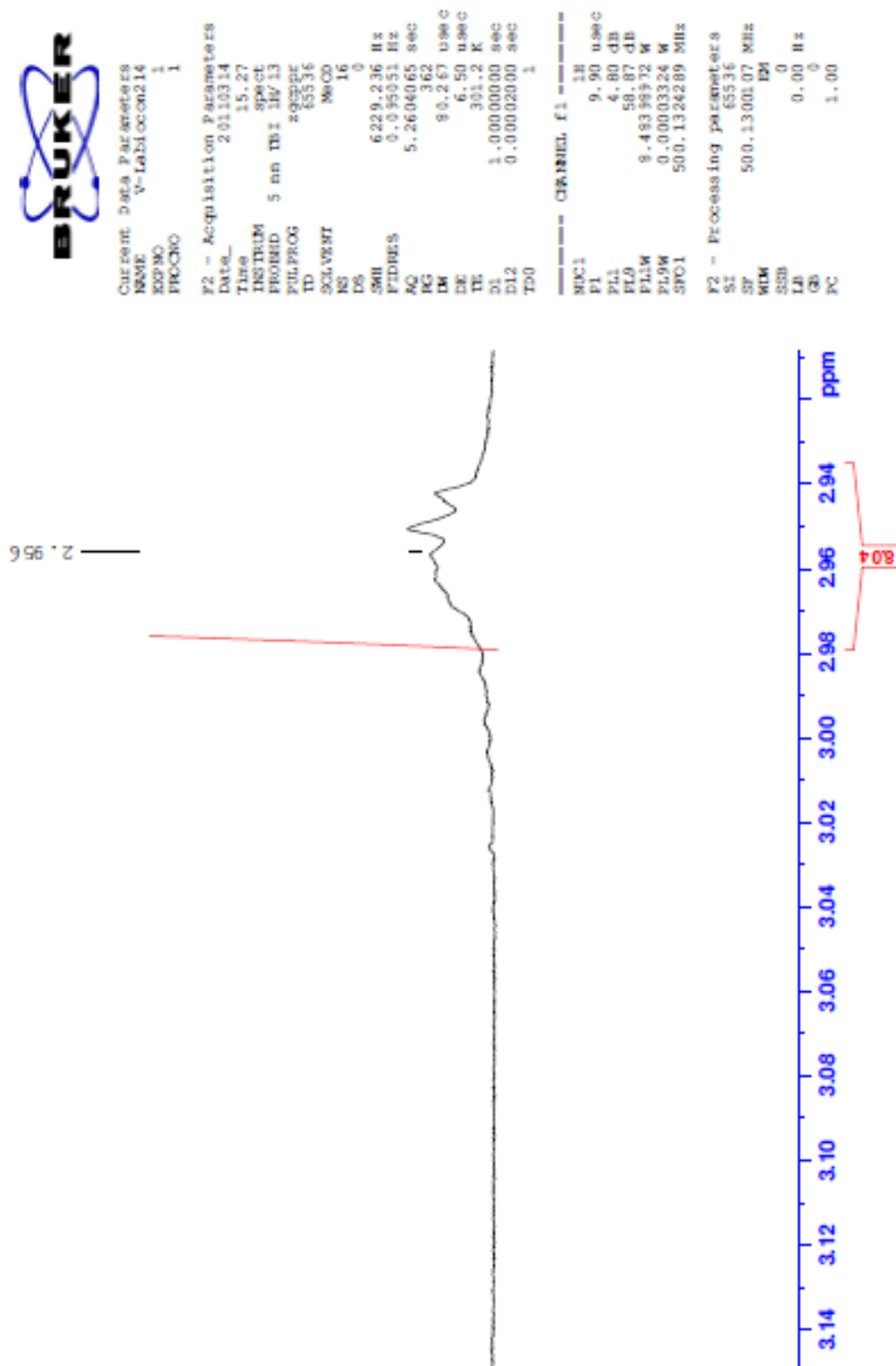
Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (mAU)	Area (mAU.Min)	Area % (%)
1	UNKNOWN	2,73	93,90	3659,9	1022,5	93,904
2	UNKNOWN	3,58	3,68	109,4	40,1	3,683
3	UNKNOWN	4,35	1,49	52,2	16,2	1,489
4	UNKNOWN	4,88	0,28	11,5	3,1	0,285
5	UNKNOWN	5,18	0,64	21,6	7,0	0,640
Total			100,00	3854,6	1088,9	100,000

Anexo H – Espectro de RMN ^1H do LaBioCon 214.

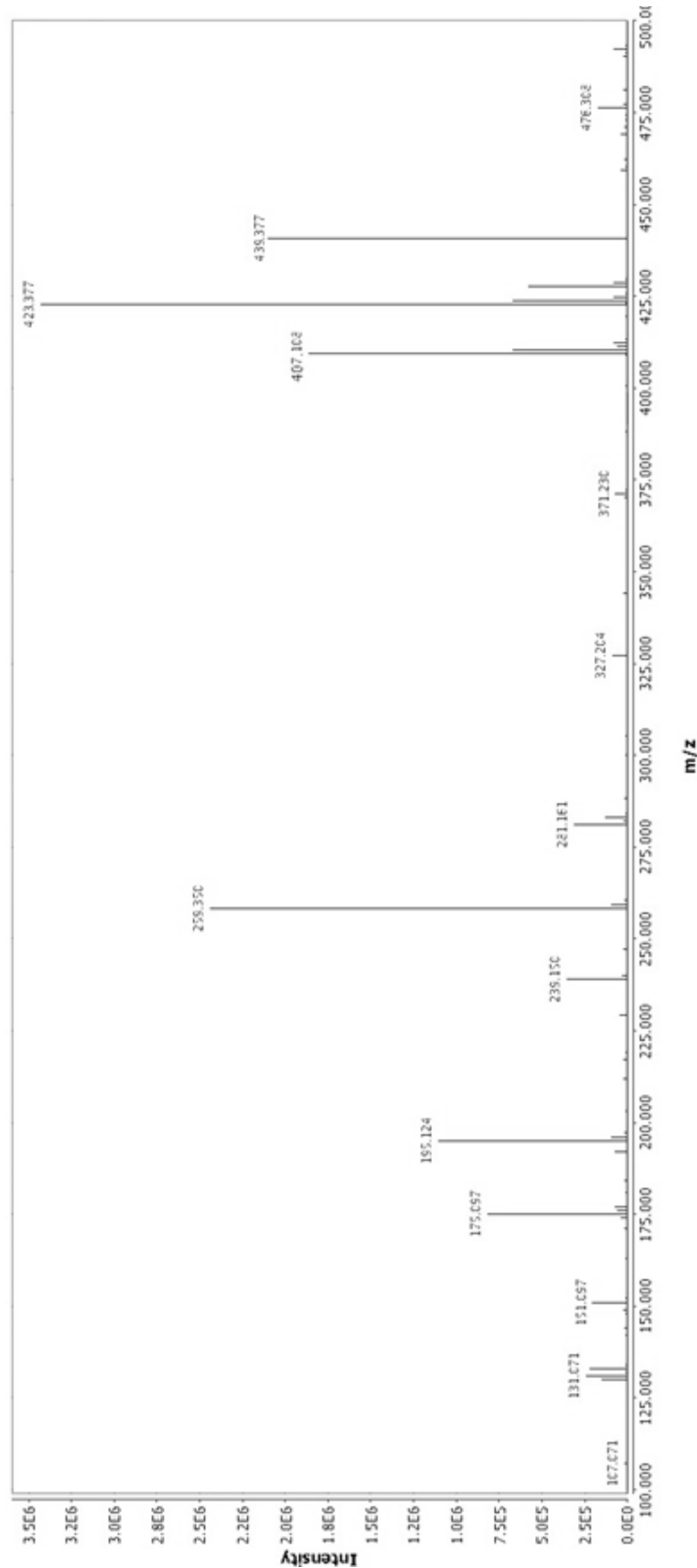
Anexo I – Expansão da região dos hidrogênios presentes nos anéis aromáticos do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 214.



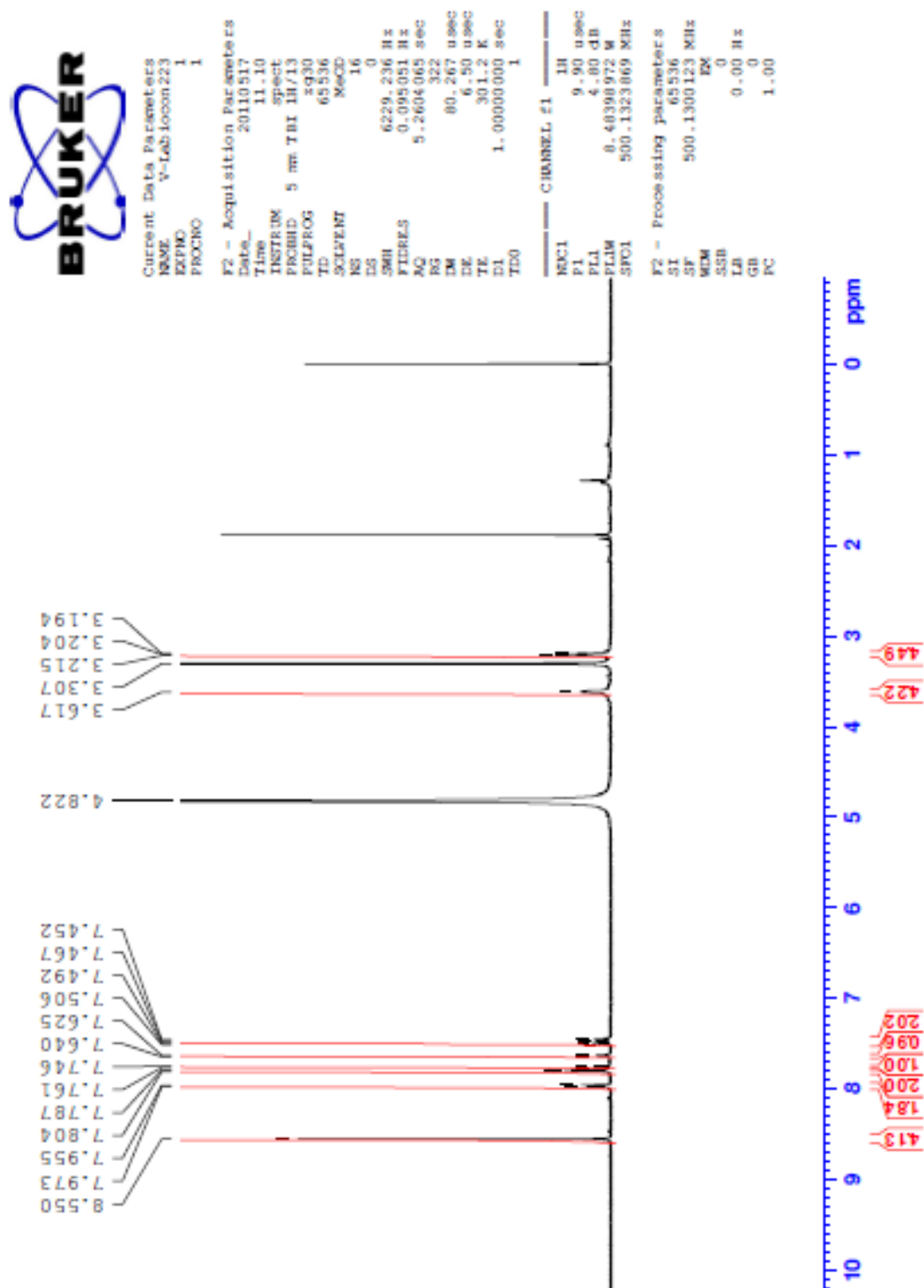
Anexo J – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel tiomorfolina do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 214.



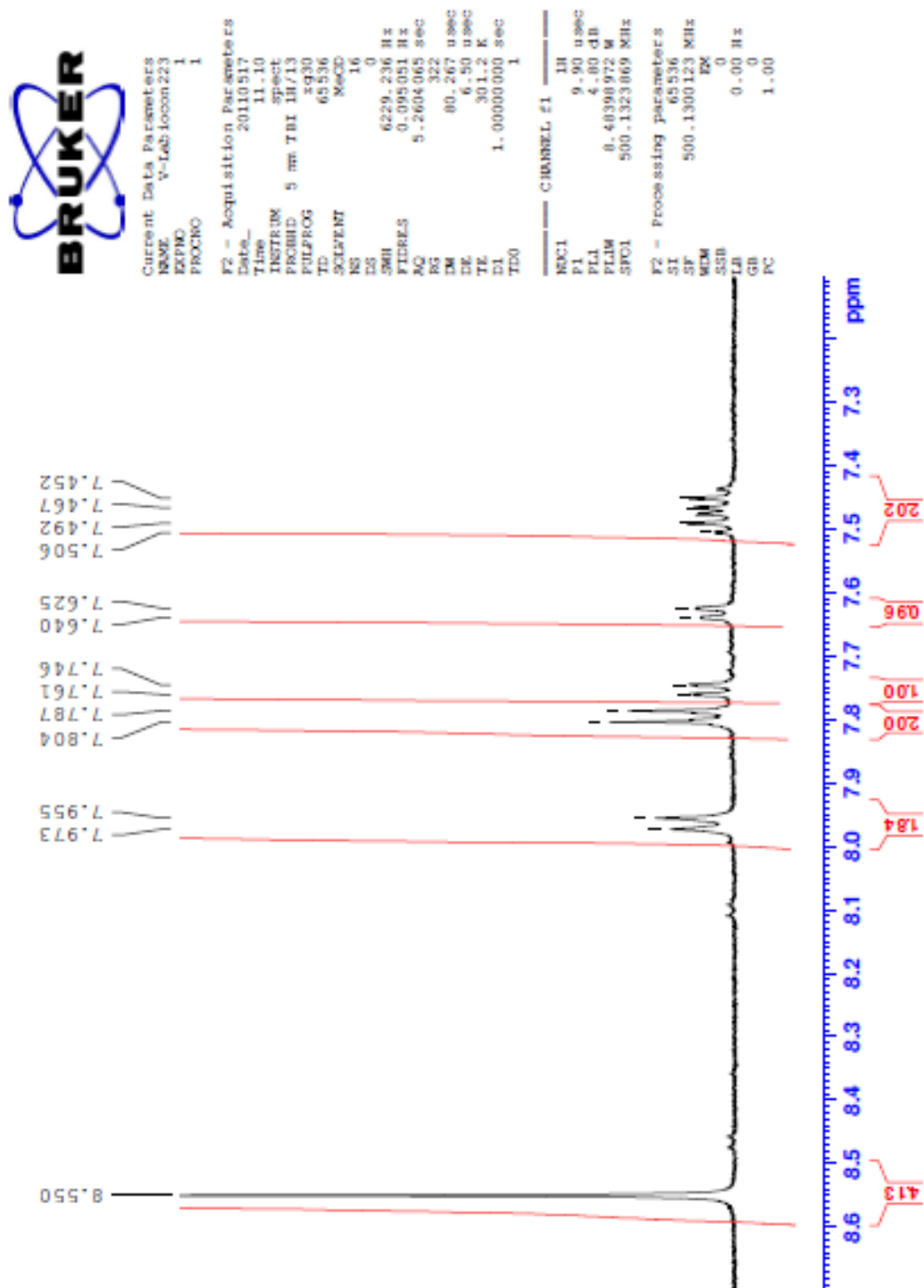
Anexo K – Espectro de massas do LaBioCon 214.



Anexo L – Espectro de RMN ^1H do LaBioCon 223.



Anexo M – Expansão da região dos hidrogênios presentes nos anéis aromáticos do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 223.



Anexo N – Expansão da região dos hidrogênios presentes no anel tiomorfolina do espectro de RMN ^1H do LaBioCon 223.

