

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

KELLY CAROLINA FRAUZINO ARAÚJO CORDEIRO

BIOTRANSFORMAÇÃO *IN VITRO* DE NOVOS CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE
FÁRMACOS ANTITUMORAIS N-FENILPIRAZÓIS

Goiânia

2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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

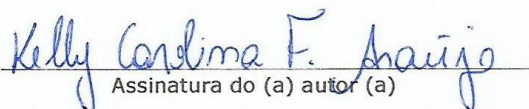
Nome completo do autor: Kelly Carolina Frauzino Araújo

Título do trabalho: Biotransformação in vitro de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais N-fenilpirazóis

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

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


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 26/04/2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

KELLY CAROLINA FRAUZINO ARAÚJO CORDEIRO

BIOTRANSFORMAÇÃO *IN VITRO* DE NOVOS CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE
FÁRMACOS ANTITUMORAIS N- FENILPIRAZÓIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria de Oliveira

Goiânia

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

FRAUZINO ARAUJO, KELLY CAROLINA
BIOTRANSFORMAÇÃO IN VITRO DE NOVOS CANDIDATOS A
PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS ANTITUMORAIS N-FENILPIRAZÓIS
[manuscrito] / KELLY CAROLINA FRAUZINO ARAUJO. - 2014.
cx, 110 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. VALERIA DE OLIVEIRA.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
Farmácia (FF) , Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2014.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. Biotransformação. 2. Mortierella isabellina. 3. LQFM 030. 4. LQFM
018. 5. N-oxidação. I. DE OLIVEIRA, VALERIA, orient. II. Título.



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): Kelly Carolina Frauzino Araújo

Orientador (a): Profa. Dra. Valéria de Oliveira

Título da Dissertação: "Biotransformação *in vitro* de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais N-fenilpiperazínicos".

Data: 28 de fevereiro de 2014

Horário: 09:00 horas

Local: sala de aula da pós-graduação, anexo II da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

O título será alterado para "Biotransformação *in vitro* de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais N-fenilpiperazínicos"

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Profa. Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFG) - Presidente	Aprovado	Valéria de Oliveira
Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (ICB/UFG)	Aprovado	Boniek Gontijo Vaz
Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos (FF/UFG)	Aprovado	Pierre Alexandre dos Santos
Prof. Dr. Ricardo Menegatti (FF/UFG)- Suplente		

Parecer Final	Aprovado/Reprovado	Aprovado
---------------	--------------------	----------

*Aos meus pais e meu marido,
pelo carinho, paciência e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Diogo Dias Cordeiro, pelo amor, compreensão, paciência e dedicação incondicional, sempre tentando entender minhas dificuldades e minhas ausências.

Aos meus pais pelo incentivo, palavras de apoio e por me ensinarem o valor da dedicação e da disciplina.

À minha orientadora, Dr^a Valéria de Oliveira, por despertar em mim o interesse pela ciência, pela confiança depositada e por contribuir com meu crescimento científico e pessoal.

Ao professor Ricardo Menegatti e professor Luciano Moraes Lião, pela contribuição com os espectros de RMN.

Ao professor Boniek Gontijo Vaz, pelas análises de espectrometria de massas e pela disponibilidade.

Ao amigo Flávio Silva de Carvalho, pela síntese dos compostos, e pela imensa contribuição e paciência nos momentos de dúvidas.

À Sarah Nunes, Telma de Matos, Jean Francisco, Liliane Silva, amigos do Labiocon que sempre foram prestativos.

Em especial à Paula de Melo, Kamila Bohne e Thais Rosa, pela amizade, compreensão, auxílio e palavras de apoio. Essa jornada teve outro brilho com a contribuição e carinho de vocês.

À servidora Fernanda Bellato por ser tão solícita e dedicada.

À CAPES pela bolsa concedida durante os anos de estudo.

À todos que de alguma forma tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O “Modelo Microbiano do Metabolismo Animal”, pode representar uma alternativa ao uso de animais nos estudos de metabolismo de novos candidatos a fármacos. Introduzido nos anos 70, este modelo, também denominado de biotransformação, apresenta várias vantagens para a sua aplicação como o baixo custo, a redução da utilização de animais de experimentação e maior quantidade e variedade de metabólitos produzidos. Os compostos 1-(4-((1-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-il)etanona (LQFM 030) e 4-((1-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-carboxilato de etila (LQFM 018) foram sintetizados a partir da simplificação molecular de uma série de compostos com atividade antiproliferativa frente à leucemia mielóide crônica já descrita, os protótipos Nutlins. O presente estudo objetivou a produção de prováveis metabólitos humanos do LQFM 030 e LQFM 018 através de biotransformação microbiana com fungos filamentosos. Para isso, foram desenvolvidas metodologias analíticas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de se monitorar a produção dos metabólitos. Após seleção dentre dez microrganismos a cepa *Mortierella isabellina* NRRL 1757 foi escolhida para obtenção de metabólitos em maior escala. A incubação foi realizada com 100 mL de meio de cultura de glicose, em cada Erlenmeyer. Ao término da incubação (96 horas) foi realizada a extração e purificação dos possíveis metabólitos. Em um ensaio independente foi adicionado cetoconazol (10, 20 e 30 mg) ao meio contendo LQFM 030 com o objetivo de inibir o citocromo P450. Em outra etapa foi adicionado 1 mL de etanol a cada 24 horas para induzir o citocromo, totalizando 96 horas de incubação. Para avaliar a melhor cinética reacional, um experimento foi conduzido em 168 horas, com diferentes concentrações do substrato, 0,25 mg/mL e 50 mg/mL. A biotransformação do LQFM 030 e do LQFM 018 produziu seus respectivos *N*-óxidos, caracterizados por RMN ¹H e ¹³C e EM. Uma provável participação da CYP 3A foi evidenciada através da inibição causada pela adição de cetoconazol capaz de inibir a formação do metabólito *N*-óxido na biotransformação do LQFM 030. A adição de etanol não induziu a produção do LQFM 030-*N*-óxido, contudo foi capaz de induzir a formação de outros metabólitos. O melhor tempo para término da incubação do LQFM 030 foi definido como 168 hrs e 0,25 mg/mL de concentração.

Palavras-chave: Biotransformação, *Mortierella isabellina*, LQFM 030, LQFM 018, *N*-oxidação.

ABSTRACT

The "Microbial Models of Mammalian Metabolism" represents an alternative to use of animals on metabolism studies. Introduced in the 70s this model, also called biotransformation, has several advantages for their application as low cost, reduction of animals for experimentation and and higher number and range of metabolites produced. 1-(4-((1-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethanone (LQFM030) and 4-((1-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-il)methyl)piperazin-1-ethyl carboxylate (LQFM018) compounds were synthesized by molecular simplification of a series of compounds with chronic myeloid leukemia antiproliferative activity already described, the Nutlins prototypes. This study aims to produce a probable human metabolites of LQFM 030 and LQFM 018 by microbial biotransformation with filamentous fungi. To do so, analytical methodologies were developed by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography in order to monitor metabolites production. After perform a screening of tem microorganisms *Mortierella isabellina* NRRL 1757 strain was selected to obtain metabolites on a larger scale. Incubations were carried out with 100 mL of glucose culture medium in each flask . At the end of incubation (96 h) extraction and purification of possible metabolites was performed . In an independent assay with LQFM 030, ketoconazole (10, 20 and 30 mg) was added to inhibit P450 cytochrome . In another test 1 mL of ethanol was added every 24 hours to induce cytochrome totaling 96 hours of incubation. To evaluate the best time to finalize incubation , an experiment was conducted in 168 hours with different concentrations of the substrate, 0.25 mg / mL and 50 mg / mL. A possible role of CYP 3A was evidenced by the inhibition caused by ketoconazole addition, that can inhibit the formation of *N*-oxide metabolite in LQFM 030 biotransformation. Ethanol addition does not induce LQFM 030-*N*-oxide production, but was able to induce other metabolites formation. The best time to end LQFM 030 incubation was defined as 168 hours and 0.25 mg/mL concentration.

Keywords: Biotransformation, *Mortierella isabellina*, LQFM 030, LQFM 018, *N*-oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biotransformação de um xenobiótico no hepatócito	17
Figura 2	Estrutura química da protoporfirina.	18
Figura 3	Hidroxilação da progesterona catalisada por <i>Rhizopus nigricans</i> .	21
Figura 4	Biotransformação do LASSBio-294 utilizando fungo filamentoso.	22
Figura 5	Biotransformação do LASSBio-579 por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC9244	22
Figura 6	Mecanismo proposto para a biotransformação do pantoprazol por <i>Cunninghamella blakesleeana</i> e comparação com metabólitos de mamíferos.	23
Figura 7	Metabólitos produzidos a partir da timoxamina por <i>Mucor rouxii</i> e <i>Mortierella isabellina</i> .	25
Figura 8	Hidroxilação do esteroide mexrenona por <i>Mortierella isabellina</i> ATCC 42613.	25
Figura 9	Metabolismo da daidzeína por <i>Mortierella isabellina</i> ATCC 38063.	26
Figura 10	Biotransformação do vicriviroc por microsossomas hepáticos e enzimas c-DNA de CYP humanas.	27
Figura 11	N-oxidação do enrofloxacino por <i>Mucor rammanianus</i>	27
Figura 12	N-oxidação por <i>Cunninghamella echinulata</i> var. <i>elegans</i> ATCC 9245.	28
Figura 13	Estrutura molecular dos Nutlins.	30
Figura 14	Nutlin-2 mimetizando os três grupamentos de aminoácidos da p53.	31
Figura 15	Estrutura molecular dos compostos LQFM 030 e LQFM 018.	31
Figura 16	Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional.	39
Figura 17	Espectrograma na região do UV do substrato LQFM 030 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.	50
Figura 18	Perfil cromatográfico do substrato LQFM 030 (0,25 mg/mL em metanol).	51

Figura 19	Perfil cromatográfico do branco de incubação contendo meio de cultura (MLG) e <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757 após período de 96 horas. Sistema gradiente 3 e comprimento de onda 263nm.	52
Figura 20	Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 030 com <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757 após período de 96 horas de incubação. Sistema gradiente 3 e comprimento de onda 263 nm.	53
Figura 21	Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 030 com <i>M. isabellina</i> NRRL 1757 com adição de etanol. Tempo de 96 horas de incubação. Sistema gradiente 3 e comprimento de onda 263nm.	57
Figura 22	CCD da purificação do extrato bruto de incubação do LQFM 030 com <i>Mortierella isabellina</i> .	60
Figura 23	Fórmula molecular do LQFM 030 com numeração dos átomos	62
Figura 24	Espectro de massas do Labiocon 382.	63
Figura 25	Espectro de massas do LQFM 030.	64
Figura 26	Biotransformação do LQFM 030 utilizando <i>Mortierella isabellina</i> .	64
Figura 27	Perfil cromatográfico do Labiocon 382.	65
Figura 28	Espectrograma na região UV do produto Labiocon 382 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.	66
Figura 29	Espectrograma na região do UV do substrato LQFM 018 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.	70
Figura 30	Perfil cromatográfico do substrato LQFM 018 (0,25 mg/mL em metanol).	71
Figura 31	Perfil cromatográfico do branco de incubação contendo MLG e <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757 após período de 96 horas de incubação.	72
Figura 32	Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 018 com <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757 após período de 96 horas de incubação.	72
Figura 33	CCD da purificação do extrato bruto de incubação do LQFM 018 com <i>Mortierella isabellina</i> . Fase móvel: DCM:MeOH (95:05).	74
Figura 34	Estrutura molecular do LQFM 018 com numeração dos átomos.	74
Figura 35	Espectro de massas do Labiocon 409	76
Figura 36	Espectro de massas do LQFM 018	77

Figura 37	Perfil cromatográfico do Labiocon 409 utilizando o sistema isocrático 3 e comprimento de onda 263nm. Tempo de retenção observado foi 2,76 minutos o mesmo observado para o metabólito 1.	77
Figura 38	Espectrograma na região UV do produto Labiocon 409 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.	78
Figura 39	Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 030 com <i>M. isabellina</i> NRRL 1757 com adição de etanol. Tempo de 96 horas de incubação. Sistema gradiente 3 e comprimento de onda 263nm.	79
Figura 40	Estrutura molecular do LASSBio 579 e dos compostos 45 e 46	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Substratos, inibidores e indutores de isoformas de citocromo P450.	20
Quadro 2	Morfologia dos microrganismos em meio de glicose para triagem.	48
Quadro 3	Análise por CCD da biotransformação do LQFM 030 após 96 horas de incubação com diferentes microrganismos em meio de glicose, 27 °C e 200 r.p.m.	49
Quadro 4	Análise por CCD da biotransformação do LQFM 010 após 96 horas de incubação com diferentes microrganismos em meio de glicose, 27 °C e 200 r.p.m	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Cinética de biotransformação do LQFM 030 por <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757.	54
Gráfico 2	Cinética de formação dos metabólitos com o tempo de 168 horas.	55
Gráfico 3	Concentração dos metabólitos e do LQFM 030 em incubações com diferentes concentrações de substrato no tempo de 168 horas.	56
Gráfico 4	Concentrações dos metabólitos e do LQFM 030 em diferentes incubações frente a adição de etanol. Tempo de incubação de 96 horas.	58
Gráfico 5	Concentração de metabólito 1 e 2 na presença e ausência do inibidor (cetoconazol) em diferentes concentrações. Tempo de incubação de 96 horas.	59
Gráfico 6	Viabilidade celular da linhagem leucêmica K-562, após 48h de incubação, frente ao composto Labiocon 382.	67
Gráfico 7	Cinética de biotransformação do LQFM 018 por <i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757.	73
Gráfico 8	Comparativo entre metabólitos obtidos no LaBiocon por biotransformação utilizando diferentes cepas.	81
Gráfico 9	Viabilidade celular da linhagem leucêmica K-562, após 48h de incubação, frente ao composto Labiocon 409.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema gradiente desenvolvido por Gomes (2007), adaptado.	41
Tabela 2	Sistema gradiente 3, bomba A (metanol) e bomba B (Tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M),	41
Tabela 3	Sistema gradiente 3, bomba A (metanol) e bomba B (Tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M), 263nm, coluna Lichrospher 100, RP 18 - MERCK 250 x 4,6 mm x 5µm.	51
Tabela 4	Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C do LQFM 030 e Labiocon 382.	61
Tabela 5	Sinais evidenciados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C do LQFM 018 e Labiocon 409.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B.O.D.	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYP	Citocromo P-450
DCM	Diclorometano
DHEA	Desidroepiandrosterona
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por Eletrospray
FMO	Flavina Monooxigenase
FTICR-MS	Espectrometria de massas com ressonância ciclotrônica de íons
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
LaBiocon	Laboratório de Bioconversão
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
MeOH	Metanol
MLG	Meio Líquido de Glicose
MTT	<i>3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl- tetrazolium bromide</i>
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
p.p.m.	Partes por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
r.p.m.	Rotações por minuto
TAE	Tumor Ascítico de Elrich
TMS	Tetrametilsilano
U _v	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS	16
1.1.1	CYP 450	17
1.1.2	Fatores que afetam o metabolismo	19
1.2	BIOTRANSFORMAÇÃO MICROBIANA	20
1.2.1	Reações de biotransformação com <i>Mortierella isabellina</i>	24
1.3	REAÇÕES DE N-OXIDAÇÃO	26
1.4	O TRATAMENTO ANTITUMORAL	28
1.4.1	Os Nutlins	29
1.4.2	LQFM 018 e LQFM 030	31
2	OBJETIVOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	SUBSTRATO	36
3.2	MICRORGANISMOS: MANUTENÇÃO E REPIQUE	36
3.3	MEIO DE CULTURA	37
3.4	TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS	37
3.5	ENSAIO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA	38
3.5.1	Filtração e extração	38
3.5.2	Purificação dos metabólitos	39
3.5.2.1	LQFM 030	39
3.5.2.2	LQFM 018	39
3.5.3	Cinética de formação dos metabólitos e consumo do substrato	40
3.5.3.1	LQFM 030	40
3.5.3.2	LQFM 018	41
3.5.4	Identificação e caracterização dos metabólitos	42
3.5.4.1	Espectrometria de massas com ressonância ciclotrônica de íons (FTICR-MS)	42
3.5.4.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	43
3.5.4.3	Espectrofotometria na região do UV	43
3.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA FORMAÇÃO DOS METABÓLITOS	43
3.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE INDUTOR E INIBIDOR DO CITOCROMO P450 NA FORMAÇÃO DOS METABÓLITOS	44
3.7.1	Avaliação da indução do CYP 2E1	44

3.7.2	Avaliação da inibição do CYP 3A	44
3.8	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS METABÓLITOS PELO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO O MÉTODO DE REDUÇÃO DE MTT	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	LQFM 030	47
4.1.1	Avaliação da morfologia e seleção das cepas	47
4.1.2	Desenvolvimento de metodologia analítica (CLAE) para monitoramento da biotransformação.	49
4.1.3	Biotransformação em escala semipreparativa do LQFM 030.	52
4.1.4	Cinética de formação dos metabólitos do LQFM 030.	53
4.1.4.1	Efeito do tempo de incubação na cinética de formação dos metabólitos	54
4.1.4.2	Efeito da concentração do substrato na cinética de formação dos metabólitos	55
4.1.5	Efeito da adição de indutores e inibidores do citocromo P450 na biotransformação do LQFM 030	56
4.1.5.1	Efeito de um indutor do CYP450	57
4.1.5.2	Efeito de um inibidor do CYP450	58
4.1.6	Purificação e caracterização estrutural do metabólito	59
4.1.7	Citotoxicidade do metabólito Labiocon 382 em ensaio de redução do MTT	67
4.2	LQFM 018	68
4.2.1	Avaliação da morfologia e seleção das cepas	68
4.2.2	Desenvolvimento de metodologia analítica (CLAE) para monitoramento da bioconversão.	70
4.2.3	Biotransformação em escala semipreparativa do LQFM 018	71
4.2.4	Cinética de formação dos metabólitos do LQFM 018.	73
4.2.5	Purificação e caracterização estrutural do metabólito	73
4.2.6	Citotoxicidade do metabólito Labiocon 409 em ensaio de redução do MTT	83
5	CONCLUSÕES	81
	PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXOS	96

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DE FÁRMACOS

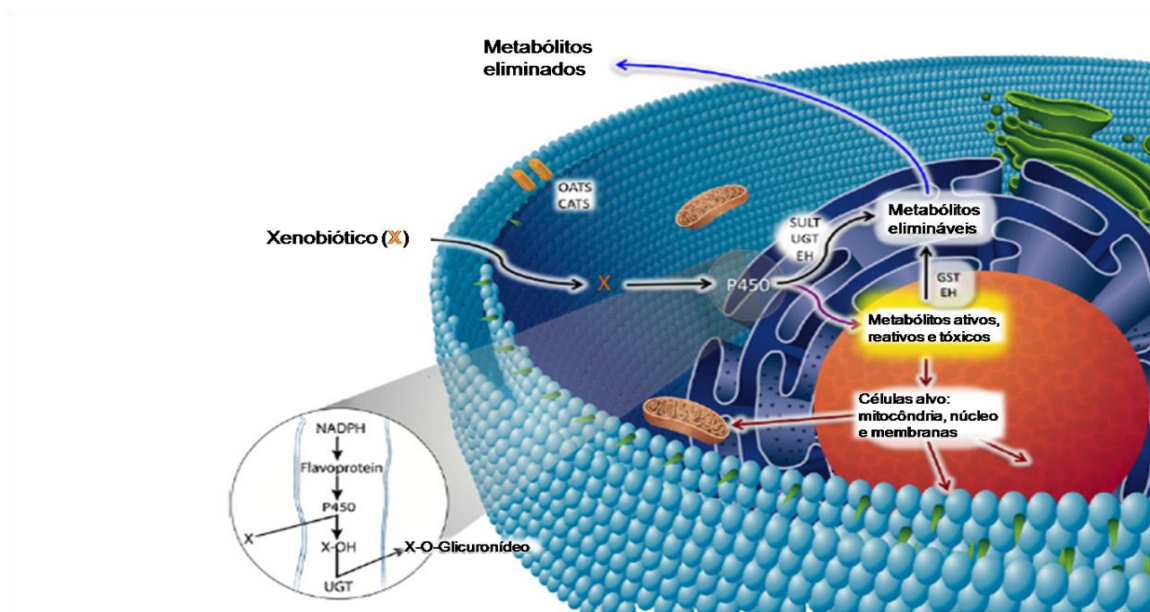
A biotransformação é de fundamental importância no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, pois é um fator determinante no perfil farmacocinético do potencial fármaco em estudo (KUMAR; SURAPANENI, 2001; WILLIAMS, 2002). Em muitos casos o metabolismo de xenobióticos objetiva a sua eliminação do organismo, através da inativação. Contudo, em alguns casos, há a produção de metabólitos ativos, que podem ser parcialmente ou totalmente responsáveis pela ação farmacológica. Por outro lado, a biotransformação pode conduzir à formação de intermediários reativos ou tóxicos (KUMAR; SURAPANENI, 2001).

O principal órgão de biotransformação é o fígado e envolvem enzimas como a citocromo P450 (CYP), epóxido hidrolase (EH), UDP-glicuronil transferase (UGT), sulfotransferase (SULT), glutathione S-transferase (GST), contudo outras enzimas metabolizadoras também são encontradas no tecido nervoso, rins, pulmão e trato gastrointestinal (WILLIAMS, 2002). Os hepatócitos são células do parênquima do fígado, e possuem várias funções, dentre elas a produção de proteínas intracelulares e enzimas responsáveis pelo processo de biotransformação (SELL, 2003).

O processo de biotransformação é dividido em reações de fase I e fase II. O sistema citocromo P450 (CYP) é o principal responsável pelas reações de fase I. As enzimas que realizam reações de fase II têm a habilidade de conjugar moléculas exógenas utilizando cofatores endógenos. A figura 1 ilustra a biotransformação de um xenobiótico no hepatócito (KITADA *et al.*, 1991; SEVIER *et al.*, 2012).

Dentre as enzimas responsáveis por reações de fase I, destacam-se o sistema citocromo P450 (CYP), as flavinas monooxigenases (FMO) e epóxido hidrolases (EH). Para reações de fase II, estão envolvidas as enzimas: glicuronil transferase (UGT), sulfotransferase, *N*-acetiltransferase (NAT), e glutathione S-transferase (GST) (SEVIER *et al.*, 2012).

Figura 1 - Biotransformação de um xenobiótico no hepatócito. Epóxido hidrolase (EH), UDP glicuronil transferase (UGT), sulfotransferase (SULT), glutathione s-transferase (GST) são outras enzimas responsáveis pelo metabolismo. As enzimas são dependentes de cofatores, como o NADPH (CYP), UDPG (UGT), PAPS (SULT), GSH (GST). São demonstrados também os transportadores de membrana: transportador de ânions orgânicos (OATS), transportadores de membrana do tipo *ATP-binding cassette* (ABC) e transportador de cátions orgânicos (OCTS).



Fonte: Adaptado de Sevier *et al.* (2012).

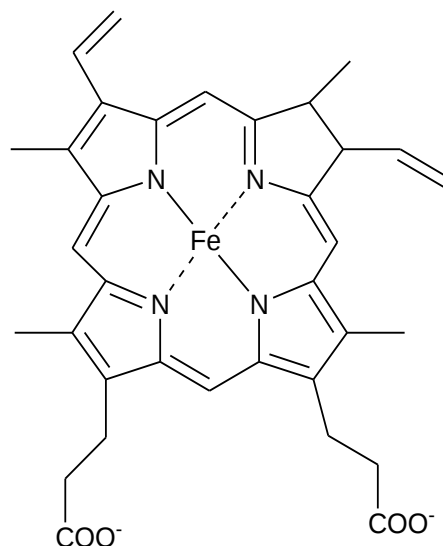
As reações de fase I incluem reações de oxidação, redução e hidrólise. As reações de fase II introduzem grupamentos polares aos metabólitos produzidos na fase I ou ao próprio fármaco a ser biotransformado. As vias metabólicas mais comuns em reações de fase II são as reações de conjugação com glutathione, glucuronidação e sulfatação (BERNHARDT, 2006).

CYP 450

O citocromo P450 (CYP) é uma superfamília de monooxigenases contendo o grupamento heme e possui especificidade para diversos substratos. Tais enzimas são as mais abundantes no fígado e objetivam a formação de metabólitos mais polares aumentando a hidrofiliabilidade e a excreção renal (URLACHER; GIRHARD, 2012). O sítio ativo da CYP consiste de um grupamento prostético ferro protoporfirina (heme) (Fig. 2) sendo um domínio de ligação ao substrato,

podendo ocorrer ativação do oxigênio molecular e a incorporação dos dois átomos de oxigênio numa molécula orgânica (SONO *et al.*, 1996; WILLIAMS, 2002).

Figura 2 - Estrutura química da protoporfirina.



Fonte: Adaptado de Sono *et al.* (1996).

As enzimas do CYP são responsáveis pela biotransformação de vários substratos endógenos (esteroides, prostaglandinas e ácidos biliares), assim como substratos exógenos (xenobióticos). Dessa forma, realizam diversas reações incluindo hidroxilação de carbonos aromáticos e alifáticos, epoxidação, oxidações e dealquilações de heteroátomos e desidrogenação (RENDIC; DI CARLO, 1997; WRIGHTON; STEVENS, 1992).

De acordo com a homologia na sequência de aminoácidos a superfamília de enzimas é dividida em subfamílias. Assim a nomenclatura das enzimas foi definida como um número arábico para a determinação da família (CYP1, CYP2, CYP3), uma letra que determina a subfamília (CYP1A, CYP2C, CYP3A) e outro número arábico para representar o gene individual (isoformas) (NELSON *et al.*, 1993).

As isoformas comumente envolvidas no metabolismo de fármacos são CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4. A CYP3A4 é a principal isoforma da subfamília CYP3A representando 30% do total de CYP existente no fígado. Estima-se que essa isoforma seja responsável pelo metabolismo de cerca de 50% dos fármacos utilizados em humanos. Os substratos metabolizados podem variar de moléculas pequenas, como o paracetamol, a moléculas maiores como a ciclosporina (ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2001; KUMAR; SURAPANENI, 2001).

Fatores que afetam o metabolismo

O metabolismo pode ser influenciado por determinantes como o sexo, idade, dieta, fatores genéticos e exposição a alguns fármacos (SOTANIEMI *et al.*, 1997; WILLIAMS, 2002).

Diferenças na taxa de metabolização de certos fármacos entre indivíduos podem ser explicadas pela biologia molecular, e o polimorfismo genético, presente em várias enzimas do CYP, também é responsável pela alteração na metabolização. Mecanismos moleculares podem levar à perda completa da atividade, redução ou aumento da capacidade catalítica (WILKINSON, 2003).

Alguns fármacos ou substâncias químicas podem se comportar como indutores ou inibidores catalíticos *in vivo* (Quadro 1). Esse comportamento altera o metabolismo de xenobióticos, levando a implicações farmacológicas ou toxicológicas. A capacidade de indução de enzimas não se aplica a todo o CYP, as isoformas humanas CYP1A1, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4 são conhecidamente induzíveis. A indução enzimática é um processo regulatório lento que pode reduzir as concentrações plasmáticas do fármaco e comprometer a eficácia do medicamento de modo tempo-dependente (LIN; LU, 1998; WILLIAMS, 2002).

Os inibidores do CYP podem ser divididos em três categorias: inibidores reversíveis, metabolizadores intermediários por complexação ou inativação do CYP. Inibidores reversíveis interagem reversivelmente com o centro ativo heme do CYP, sítios ativos da apoproteínas ou com ambos. Exemplos de inibidores reversíveis: fluorquinolonas, cimetidina, cetoconazol e diltiazem (WILLIAMS, 2002).

O processo chamado inibição intermediária por complexação ocorre quando fármacos não inibitórios sofrem oxidação mediada por CYP, formando metabólitos que possuem alta afinidade com o heme reduzido (ferroso) intermediário das subfamílias CYP2B, CYP2C e CYP3A formando um complexo estável. Dessa forma a isoforma fica indisponível para oxidação e a síntese de novas enzimas é necessária para restaurar a atividade do CYP. Exemplo desse processo é a oxidação de fármacos alquilamino, como os macrolídeos e análogos, sendo metabolizados a nitrosoalcanos (WILLIAMS, 2002).

Alguns fármacos não inibitórios contêm certos grupamentos funcionais que, quando oxidados pelo CYP, geram metabólitos que se ligam irreversivelmente à enzima. Esse processo é chamado de inibição baseada no mecanismo e requer ao menos um ciclo catalítico do CYP durante ou subsequente à transferência de oxigênio, onde o fármaco será ativado à espécie

inibitória. Cloranfenicol, ciclofosfamida e espironolactona são alguns fármacos que possuem inibição baseada no mecanismo de inativação do CYP (WILLIAMS, 2002).

Quadro 1 - Substratos, inibidores e indutores de isoformas de CYP.

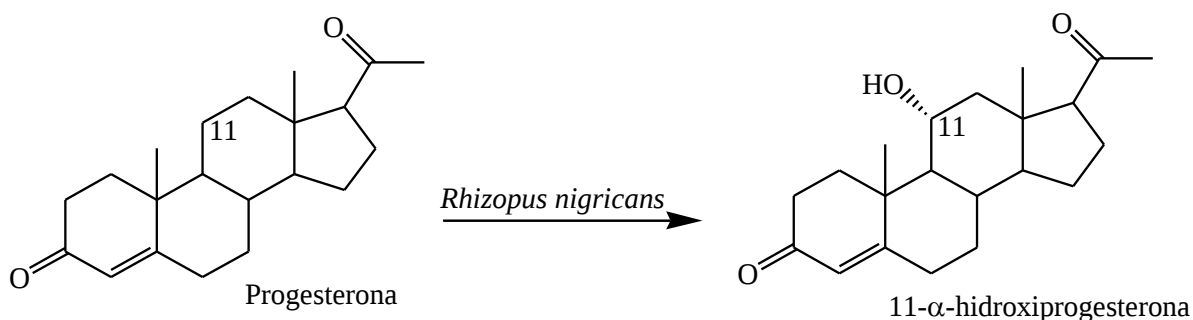
Isoforma do CYP	Fármaco substrato	Inibidor	Indutor
1A2	Paracetamol, cafeína, fenacetina, tamoxifeno	Furafilina, cimetidina, claritromicina.	Hidrocarbonetos da fumaça de cigarro, Fenitoína
2C9	Diclofenaco, losartana, tobultamida, piroxicam	Sulfafenazol, diazepam, diclofenaco	Rifampicina, carbamazepina.
2D6	Codeína, fluoxetina, haloperidol, imipramina, propranolol	Quinidina, amitriptilina, amiodarona.	-
2E1	Teofilina, paracetamol, cafeína	Cimetidina, dissulfiram	Etanol, isoniazida
3A4	Claritromicina, terfenadina, verapamil, indinavir, lovastatina	Cetoconazol, itraconazol, midazolam	Carbamazepina, dexametazona, primidona, omeprazol

Fonte: Adaptado de Williams (2002); Lin e Lu (1998).

1.2 BIOTRANSFORMAÇÃO MICROBIANA

A utilização de microrganismos na biotecnologia para produção de fármacos e esteroides foi realizada em escala industrial com sucesso na década de 50, quando Peterson e Murray (1952) patentearam o processo de hidroxilação da progesterona com espécie de *Rhizopus* (Fig. 3). Desde então, a aplicação de microrganismos para a transformação de esteroides vem se aprimorando e oferecendo ferramentas para a produção em larga escala de derivados (HE *et al.*, 2005).

Figura 3 - Hidroxilação da progesterona catalisada por *Rhizopus nigricans*.



Fonte: Adaptada de Peterson e Murray (1952).

A biotransformação microbiana com o objetivo de obtenção de metabólitos humanos teve início nos anos 70, quando Smith e Rosazza descreveram o “Modelo microbiano do metabolismo animal”. Segundos os autores o sistema enzimático microbiano poderia mimetizar o sistema enzimático dos mamíferos e assim produzir metabólitos de fármacos (SMITH; ROSAZZA, 1974).

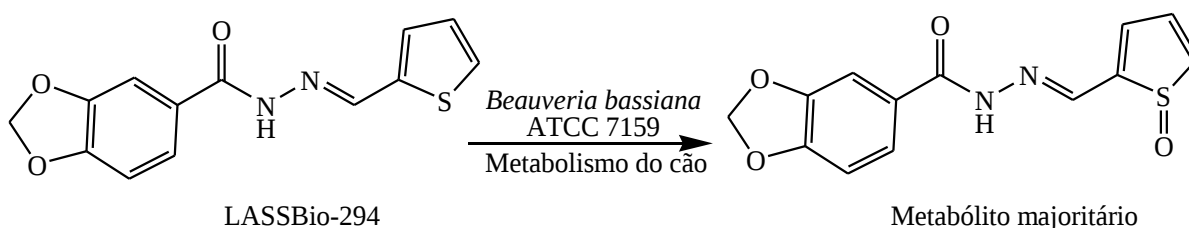
O estudo do metabolismo animal de fármacos ou novos compostos pode ser realizado utilizando ensaios *in vivo*, *in vitro* e *in silico* (PELKONEN et al., 2005). Tradicionalmente o estudo do metabolismo *in vivo* é realizado utilizando modelos animais como camundongos, ratos, coelhos, cães e macacos. Dessa forma, os fluidos biológicos (plasma e urina) são analisados para se verificar a presença do metabólito. Estudos *in vitro* são realizados com órgãos perfundidos, tecidos ou cultura de células microssomais e tem o objetivo de complementar o estudo *in vivo* (ASHA; VIDYAVATHI, 2009). Atualmente, com o avanço da tecnologia, estudos *in silico*, vêm sendo implantados com maior frequência, onde ferramentas computacionais são utilizadas para prever o metabolismo de fármacos ou candidatos a fármacos. Bancos de dados são utilizados por programas computacionais para determinar a natureza do metabólito, bem como sua importância e reatividade, predizendo os possíveis metabólitos através da estrutura química de diversos compostos (TESTA et al., 2004).

As técnicas *in vivo* e *in vitro* têm, contudo, algumas limitações como o custo dos animais e manutenção destes, conceitos éticos, variabilidade entre espécies e custo da técnica aplicada e sua complexidade. A toxicidade dos fármacos também é um fator limitante, uma vez que baixas doses devem ser administradas, ocasionando quantidades reduzidas dos metabólitos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009). Deste modo, o uso de microrganismos, como os fungos filamentosos, vem sendo estudado devido às suas várias vantagens de aplicação: técnica simples, fácil e de baixo custo; a triagem com várias cepas é um processo simples de ser realizado; a variedade e quantidade de metabólitos produzidos facilitam a detecção, o

isolamento, e a caracterização dos metabólitos; a manutenção de microrganismos é mais simples e de menor custo que a manutenção de cultura de células ou animais; novos metabólitos podem ser formados; as reações são régio e estéreo específicas (ABOURASHED *et al.*, 1999; SMITH; ROSAZZA, 1975; SRISILAM; VEERESHAM, 2003).

Estudos comparativos vêm sendo conduzidos para demonstrar a similaridade dos metabólitos em técnicas *in vivo* e *in vitro* com fungos filamentosos. Carneiro e colaboradores (2010) utilizaram a cepa *Beauveria bassiana* ATCC 7159 para obter o metabólito produto de sulfoxidação do candidato a protótipo de fármaco LASSBio-294 (3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilhidrazona), um potente agente cardioativo (Fig. 4). O metabólito sulfóxido foi o mesmo identificado em plasma de cão, demonstrando a aplicação do modelo microbiano.

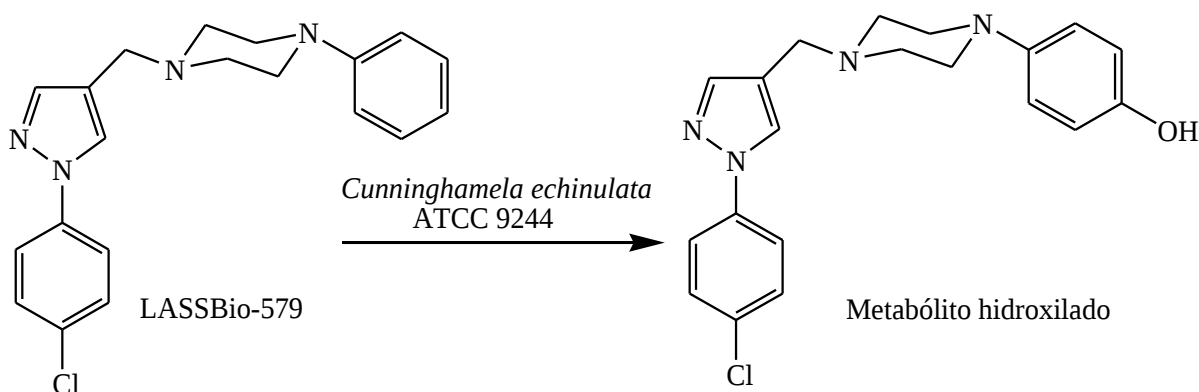
Figura 4 - Biotransformação do LASSBio-294 utilizando fungo filamentoso.



Fonte: Adaptado de Carneiro *et al.* (2010).

A biotransformação microbiana do LASSBio-579 (1-[1-(4-clorofenil)-1H-4-pirazolilmetil]), um candidato a agente antipsicótico, gerou um metabólito hidroxilado na posição *para* (Fig. 5). O mesmo metabólito foi identificado em plasma de camundongo e predito *in silico* (GOMES *et al.*, 2013).

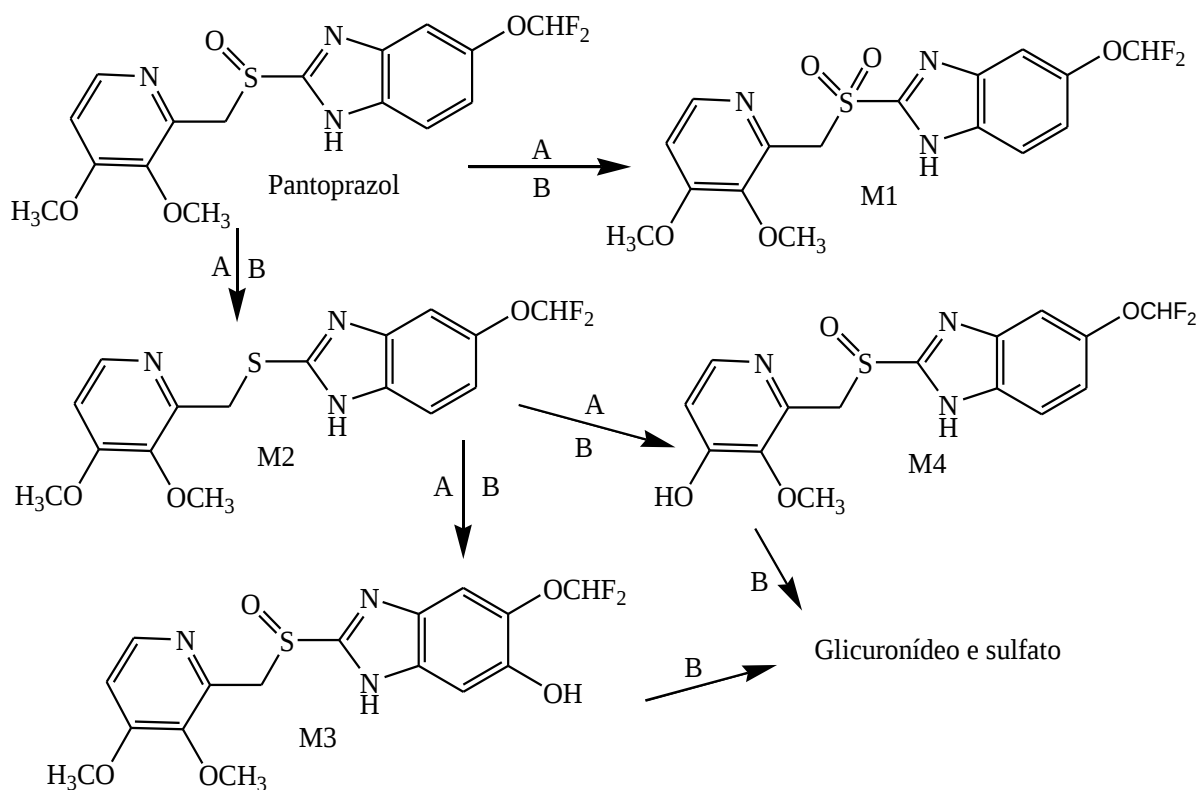
Figura 5 - Biotransformação do LASSBio-579 por *Cunninghamella echinulata* ATCC9244



Fonte: Adaptado de Gomes *et al.* (2013).

Fármacos já conhecidos podem ser submetidos ao processo de biotransformação microbiana com o objetivo de produzir padrões dos metabólitos em humanos. O pantoprazol, por exemplo, é um inibidor da bomba de prótons amplamente utilizado na clínica, sua biotransformação é realizada pelo CYP e as reações metabólicas mais comuns são: sulfoxidação, redução, demetilação e hidroxilação aromática. A utilização de cepas do gênero *Cunninghamella* demonstrou a capacidade de biotransformação microbiana desse fármaco. Os metabólitos pantoprazol sulfona (M1, 1,7%), pantoprazol tioeter (M2, 12,4%), 6-hidroxipantoprazol tioeter (M3, 1.3%), 4'-O-demetil-pantoprazol tioeter (M4, 48,1%) foram formados, sendo também encontrados no metabolismo animal (Fig. 6) (XIE *et al.*, 2005).

Figura 6 - Rota de biotransformação do pantoprazol por *Cunninghamella blakesleeana* e comparação com metabólitos de mamíferos. (A) *Cunninghamella blakesleeana*, (B) Mamíferos.



Fonte: Adaptado de Xie *et al.* (2005)

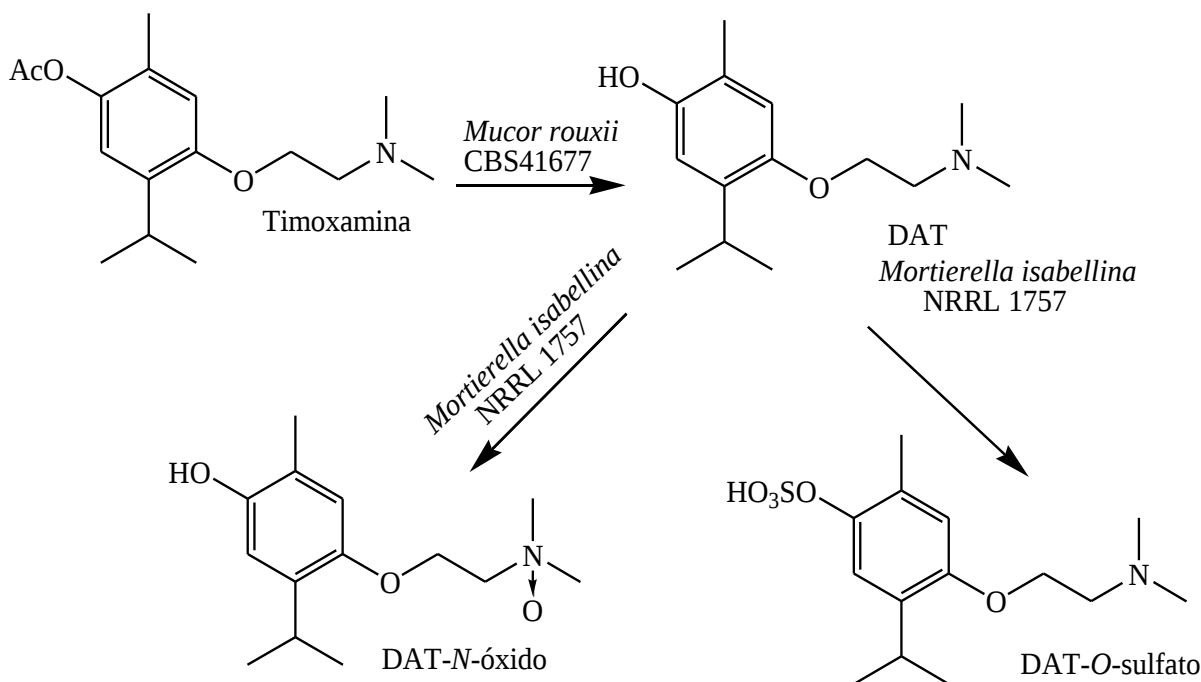
Reações de biotransformação com *Mortierella isabellina*

A espécie *Mortierella isabellina* é um fungo presente no solo, em restos ou raízes de plantas (TURNER, 1963). Inicialmente foi classificada como pertencente à família Mortierellaceae, subgênero *Micromucor* (também conhecido como grupo Isabellina). Devido às diferenças com o resto do gênero como a forma dos micélios e formação da colônia, o grupo foi transferido para a família Umbelopsidaceae, na ordem Mucorales, e classificado como gênero *Umbelopsis* (MEYER; GAMS, 2003; PETKOVITS *et al.*, 2011).

A aplicação de *Mortierella isabellina* em reações de biotransformação já é bastante descrita, sendo relatados diferentes tipos de reações. A sulfoxidação de sulfetos fenilmetil e benzilmetil, alquila substituídos, foi realizada por esse microrganismo e seu mecanismo foi proposto em 1982 (HOLLAND; CARTER, 1982). Reações de hidroxilação em compostos aromáticos também foram relatadas, o etilbenzeno e uma série de derivados *para*-substituídos foram convertidos para seu correspondente 1-feniletanol (HOLLAND *et al.*, 1987).

Moussa e colaboradores (1997) relataram a biotransformação da timoxamina, um bloqueador α -adrenérgico, em desacetiltimoxamina (DAT) por *Mucor rouxii*, sendo posteriormente oxidada a DAT-N-óxido por *Mortierella isabellina*. A DAT também foi biotransformada a seu éster de sulfato pelo mesmo microrganismo, indicando a possibilidade de reações de conjugação (Fig. 7).

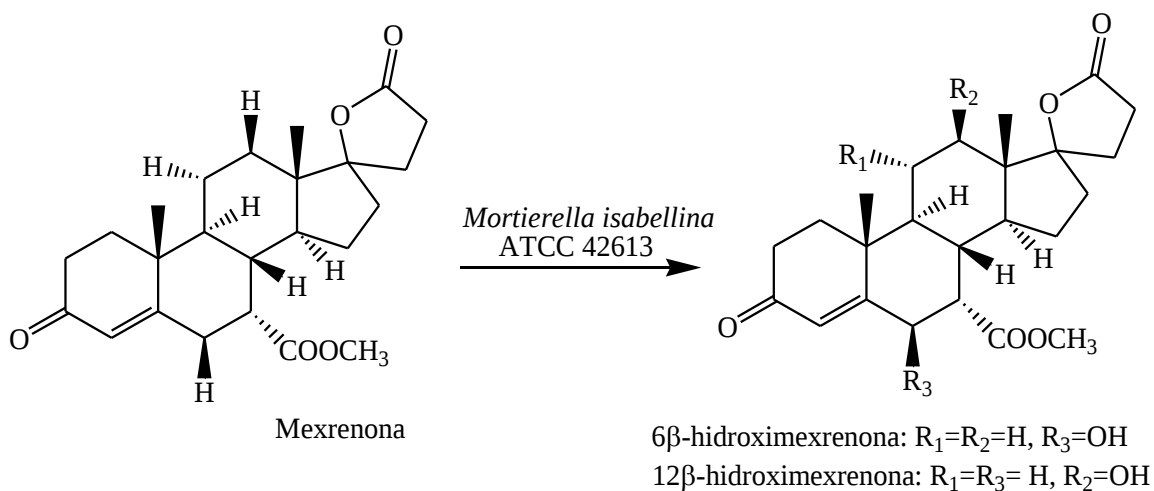
Figura 7 - Metabólitos produzidos a partir da timoxamina por *Mucor rouxii* e *Mortierella isabellina*.



Fonte: Adaptado de Moussa *et al.* (1997)

A mexrenona é um esteroide utilizado para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e para o tratamento da hipertensão arterial essencial. Sua biotransformação utilizando *Mortierella isabellina* ATCC 42613 resultou na produção de metabólitos 6 β e 12 β -hidroxilados, sendo o primeiro relato de hidroxilações nessas posições pela cepa (Fig. 8) (PREISIG *et al.*, 2003).

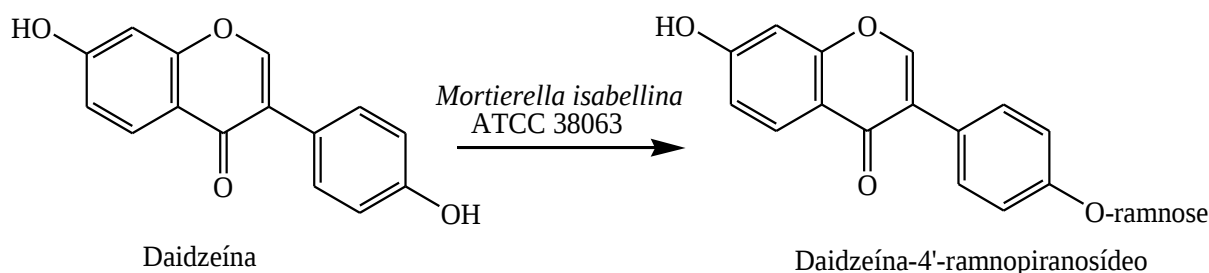
Figura 8 - Hidroxilação do esteroide mexrenona por *Mortierella isabellina* ATCC 42613.



Fonte: Adaptado de Preisig *et al.* (2003)

A isoflavona majoritária da soja, a daidzeína, possui atividades antioxidante, antitrombótica, antialérgica, anti-inflamatória e é um potencial agente anticâncer. A cepa *Mortierella isabellina* ATCC 38063 foi capaz de biotransformar a daidzeína em um metabólito incomum: a daidzeína-4'-ramnopiranosídeo (Fig. 9). Sendo este, o único metabólito formado no processo de biotransformação (MAATOOQ; ROSAZZA, 2005).

Figura 9 - Metabolismo da daidzeína por *Mortierella isabellina* ATCC 38063.



Fonte: Adaptado de Rosazza e Maatooq (2005).

Kolek e colaboradores (2011) investigaram a biotransformação dos hormônios esteroides desidroepiandrosterona (DHEA), androstenediol e epiandrosterona. Os substratos sofreram hidroxilação, sendo a DHEA e o androstenediol biotransformados a uma mistura de 7α e 7β -alil álcoois, e a epiandrosterona convertida a derivados 7α , 11α e 9α mono-hidroxilados.

1.3 REAÇÕES DE N-OXIDAÇÃO

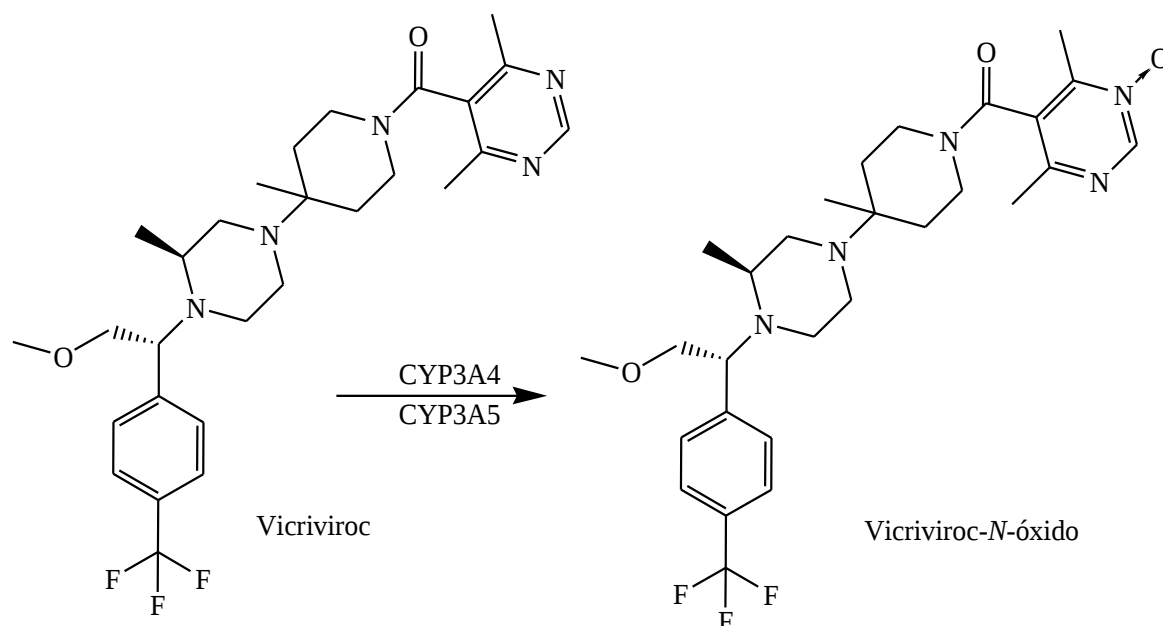
As aminas terciárias estão presentes em vários fármacos incluindo histaminas, analgésicos, anestésicos locais e antidepressivos tricíclicos e podem ser oxidadas para formar N-óxidos dipolares que, em casos isolados, podem ser submetidos à desalquilação para sua amina secundária correspondente (ROSE; CASTAGNOLI, 1983).

Estudos indicam que a formação de N-óxidos é catalizada pela enzima flavinamonooxigenase (FMO) (LAMBERT *et al.*, 1989; ZIEGLER, 1990). Contudo, outros autores afirmam que o CYP, principalmente a isoforma 3A4, estaria envolvida nas reações de N-oxidação (KOYAMA *et al.*, 1996).

Ghosal e colaboradores (2007) pesquisaram as enzimas do CYP hepático responsáveis pela biotransformação do vicriviroc, um antagonista de receptores CCR5 de quimiocinas. Utilizando microssomas hepáticos, enzimas humanas CYP 3A4 recombinantes e inibidores

específicos para CYP 3A4, foi identificada a participação deste citocromo na produção do metabólito *N*-oxidado (Fig. 10). O cetoconazol, por exemplo, foi capaz de inibir em 68% a produção deste metabólito.

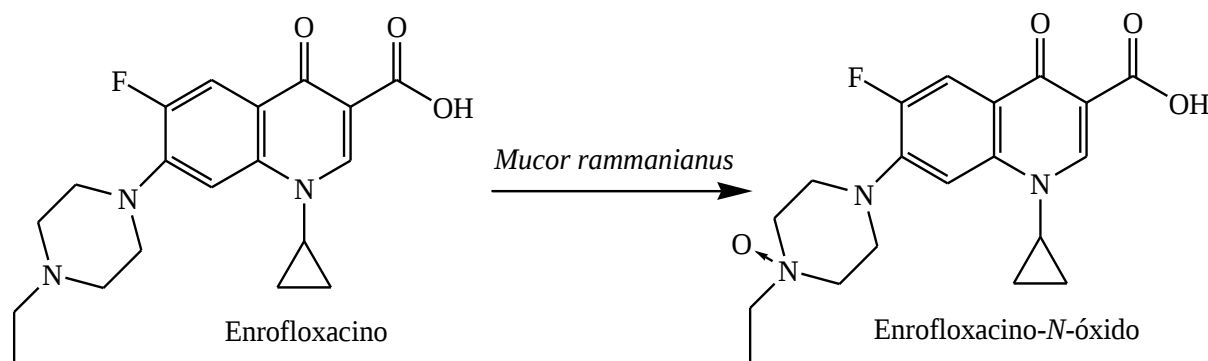
Figura 10 - Biotransformação do vicriviroc por microsomas hepáticos e enzimas c-DNA de CYP humanas.



Fonte: Adaptado de Ghosal *et al.* (2007).

A biotransformação de fármacos em seus metabólitos *N*-oxidados também pode ser realizada utilizando fungos filamentosos. O fármaco enrofloxacino, da classe das fluorquinolonas, foi biotransformado por *Mucor rammanianus* em seu metabólito *N*-óxido (Fig. 11). A incubação foi realizada durante 21 dias (PARSHIKOV *et al.*, 2000).

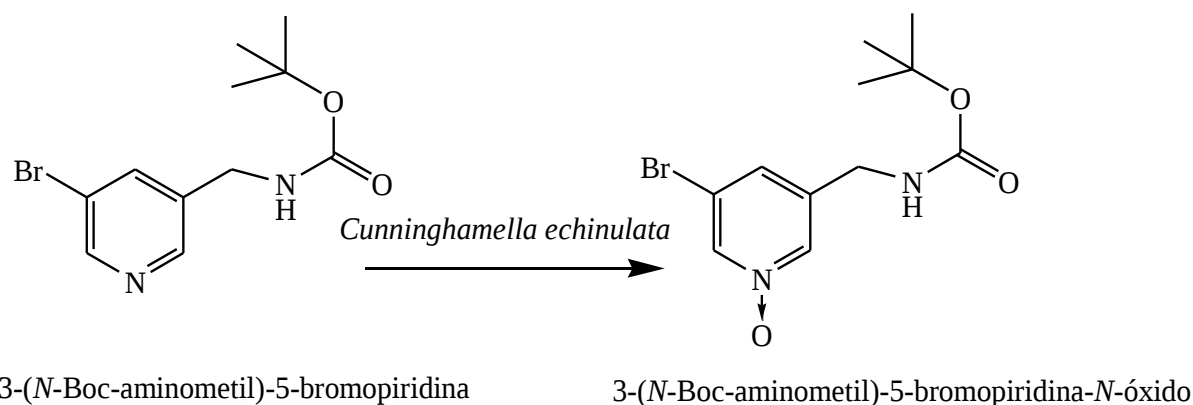
Figura 11 - *N*-oxidação do enrofloxacino por *Mucor rammanianus*.



Fonte: Adaptado de Parshikov *et al* (2000)

A produção de um *N*-óxido piridina foi descrito por Zeng e colaboradores (2012) utilizando o fungo *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 9245. O composto 3-(*N*-Boc-aminometil)-5-bromopiridina foi o substrato da reação (Fig. 12).

Figura 12 - *N*-oxidação por *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* ATCC 9245.



Fonte: Adaptado de Zeng *et al* (2012)

1.4 O TRATAMENTO ANTITUMORAL

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O tratamento para o câncer envolve três principais tipos de terapias: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (FOYE; SENGUPTA, 2002). O objetivo primário da quimioterapia é

destruir as células neoplásicas, preservando as normais, entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (MACHADO, 2000; PATRICK, 2009; SALMONM; KATZUNG, 1998).

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. Atualmente o uso de fármacos isolados, denominado monoquimioterapia, mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia mostrou-se eficaz na diminuição da resistência a fármacos e por promover maior resposta por dose administrada (PATRICK, 2009).

Os fármacos mais tradicionais no tratamento do câncer agem promovendo desregulação gênica sendo classificados como citotóxicos. Alguns agem diretamente no DNA, outros (antimetabólicos) agem indiretamente, inibindo enzimas envolvidas na síntese de DNA. Contudo, o campo de pesquisa na área de quimioterápicos é bastante amplo e os fármacos podem agir de diferentes formas para combater o crescimento tumoral. Novas estruturas vêm sendo investigadas, agindo em diferentes alvos ou em alvos ainda não identificados (PATRICK, 2009).

Dessa forma, o desenvolvimento de novas formas de intervenção terapêutica contra o câncer tem aumentado significativamente nos últimos anos. O estudo de novos medicamentos e vacinas aplicados ao tratamento antineoplásico tem sido estimulado pelo governo dos Estados Unidos com a intenção de acelerar o acesso a tratamentos inovadores (REICHERT; WENGER, 2008). O progresso na pesquisa vem crescendo também devido ao conhecimento da química celular envolvida em certos tipos de cânceres. Esses estudos propiciaram, por exemplo, o desenvolvimento de inibidores de quinase (imantinib) e o uso de anticorpos monoclonais na terapia (PATRICK, 2009).

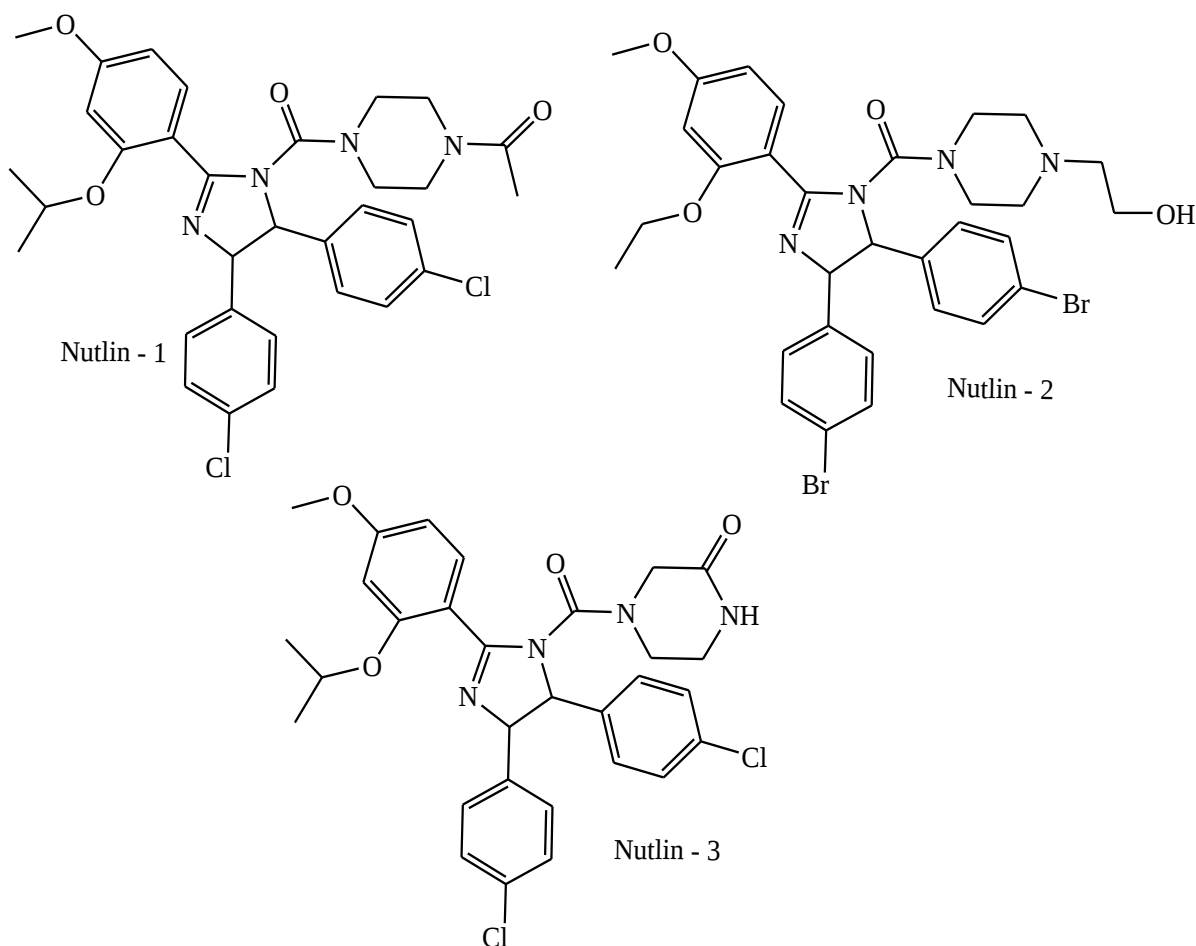
Os Nutlins

O gene supressor de tumor p53, também conhecido como “guardião do genoma” é ativado em resposta a sinais de dano celular. Dessa forma, é a proteína mais frequentemente inativada no câncer humano. Em condições de estresse, os níveis de p53 são elevados, levando à interrupção do ciclo celular ou apoptose. Sob condições normais, a p53 é controlada pela proteína MDM2 através de um *feedback* autoregulatório (VASSILEV *et al.*, 2004).

Uma superexpressão de gene MDM2 foi verificada em tumores humanos malignos, impedindo a ação da p53 e permitindo as células tumorais se replicarem sem controle. Assim, a ativação da p53 por meio da inibição da MDM2 tem sido uma nova estratégia terapêutica (PATRICK, 2009; VASSILEV *et al.*, 2004).

A fim de identificar compostos capazes de inibir a ligação p53-MDM2, foi realizada uma triagem computacional de uma série de compostos químicos através da técnica de *high-throughput screening* (HTS). Várias estruturas promissoras foram identificadas e otimizadas quanto a sua potência e seletividade. Assim, uma série de compostos análogos cis-imidazólico foram construídos e nomeados Nutlins (Fig.13) (VASSILEV *et al.*, 2004).

Figura 13 - Estrutura molecular dos Nutlins.

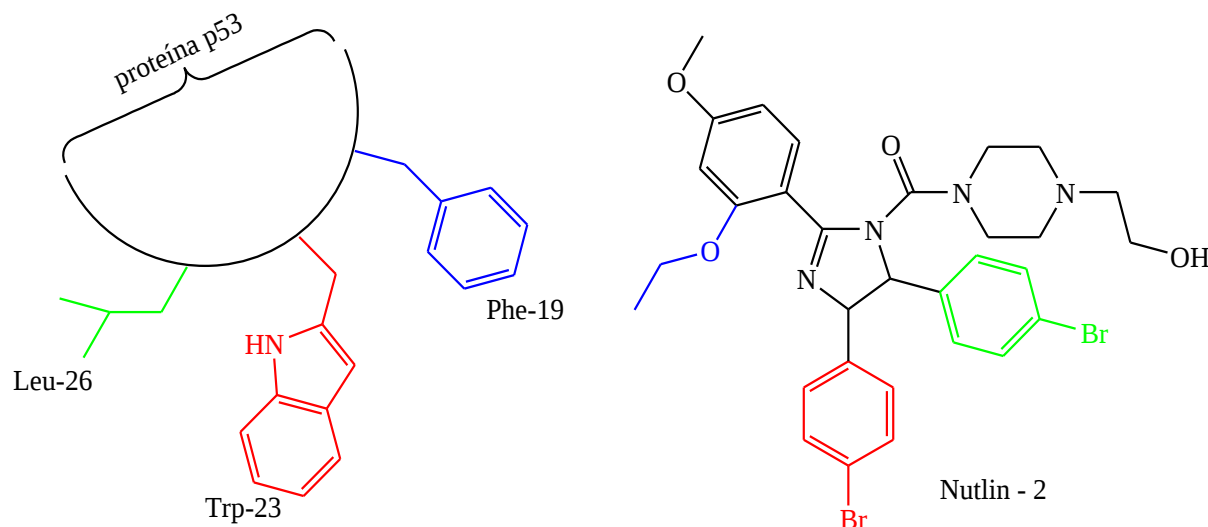


Fonte: Adaptado de Vassilev *et al.*, (2004)

Os Nutlins deslocaram proteína p53 recombinantes do seu complexo com a proteína MDM2 com valores de concentração inibitória (IC₅₀) média entre 100 a 300 nM (VASSILEV *et al.*, 2004). Essa série de compostos se ligam à região da MDM2 que está envolvida na ligação

com a p53, mimetizando as interações dos três aminoácidos presentes na p53 (Leu-26, Trp-23, Phe-19) (Fig14) (PATRICK, 2009; POPOWICZ *et al.*, 2011).

Figura 14 - Nutlin-2 mimetizando os três grupamentos de aminoácidos da p53.

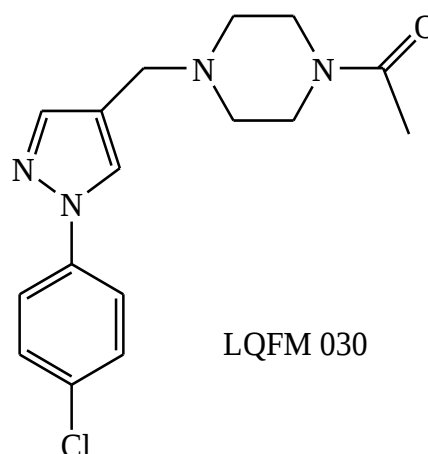
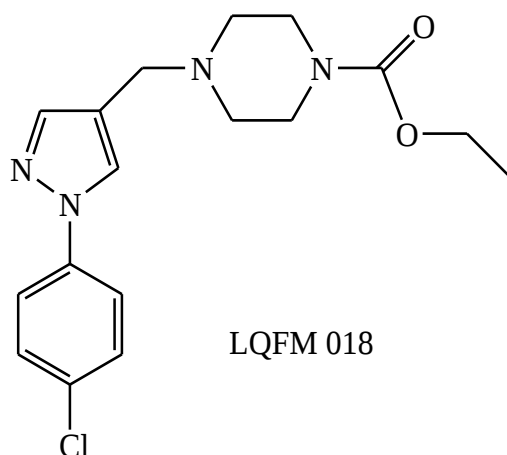


Fonte: Adaptado de Patrick (2009), Popowicz *et. al.* (2011)

LQFM 018 e LQFM 030

Os compostos LQFM 018 e LQFM 030 foram sintetizados no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Faculdade de Farmácia-UFG. Esses compostos foram desenvolvidos a partir de uma simplificação molecular dos Nutlins. Os compostos LQFM 018 e 030 são moléculas menores, aquirais e são obtidas em três etapas sintéticas, diferentemente dos Nutlins, tornando o processo de síntese mais simples e menos oneroso (Fig. 15) (MENEGATTI, 2011).

Figura 15 - Estrutura molecular dos compostos LQFM 018 e LQFM 030.



Fonte: Adaptado de Menegatti (2011).

Os compostos LQFM 018 e LQFM 030 apresentaram respectivamente valores de IC_{50} igual a 50,8 e 23,4 μM em linhagem de células K-562, resistente a outros quimioterápicos, após 72 horas de exposição. O estudo foi realizado pelo método de redução do MTT. Já para os testes de exclusão por azul de tripano os resultados foram de 119,1 e 49,0 μM após 72 horas de exposição, para o LQFM 018 e LQFM 030 respectivamente (MENEGATTI, 2011).

Em ensaios de toxicidade aguda, o composto LQFM 018 e o LQFM 030 foram classificados na categoria 5 ou não-tóxico de acordo com o *Globally Harmonized System* (GSH) (CARVALHO, 2011).

Ensaios *in vivo* foram realizados para avaliar a sobrevida de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tratados com 300, 150 ou 75 mg/kg do composto LQFM030. Os resultados demonstraram um aumento de sobrevida de 25% dos animais tratados com 150 mg/kg após 10 dias de tratamento. O grupo tratado com 75 e 300mg a sobrevida foi de 15%, sendo que os animais tratados com 300 mg/kg apresentaram maior morbidade, o que pode estar relacionado ao efeito tóxico do composto (CARVALHO, 2011).

Estudo farmacocinético do LQFM 030 demonstrou que o composto apresenta elevadas taxas de meia vida de eliminação, volume de distribuição e clearance plasmático. O elevado volume de distribuição pode indicar sua aplicação para o tratamento de tumores em tecidos profundos (LABRE, 2012).

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Produzir por biotransformação, utilizando cepas de fungos filamentosos, os prováveis metabólitos dos candidatos a protótipos de fármacos LQFM 018 e LQFM 030 para caracterização estrutural e avaliação da atividade antitumoral destes metabólitos

Objetivos específicos:

- 1- Selecionar as cepas da coleção do LaBiocon para biotransformação do LQFM 018 e LQFM 030 e produção *in vitro* de prováveis metabólitos
- 2- Selecionar a cepa mais promissora e avaliar os diferentes parâmetros envolvidos no processo
- 3- Desenvolver e aplicar metodologias de monitoramento das cinéticas reacionais por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
- 4- Realizar estudos *in vitro* do metabolismo, utilizando modelo microbiano do metabolismo animal para um estudo prospectivo dos prováveis metabólitos potencialmente ativos.
- 5- Desenvolver processo de purificação dos metabólitos de interesse por cromatografia líquida de em coluna.
- 6- Caracterizar estruturalmente os metabólitos obtidos.
- 7- Avaliar a influência da adição de inibidores e indutores do citocromo P450 na produção dos metabólitos.
- 8- Avaliar a atividade citotóxica frente a células leucêmicas K-562 dos principais metabólitos através do teste de redução do MTT.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUBSTRATO

Os candidatos LQFM 030 (1-(4-((1-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-il)etanona) e LQFM 018 (4-((1-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-carboxilato de etila foram desenvolvidos, sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia-UFG.

3.2 MICRORGANISMOS: MANUTENÇÃO E REPIQUE

Os dez microrganismos selecionados para os experimentos são provenientes de duas coleções.

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

- *Aspergillus candidus* ATCC 2023
- *Absidia blakesleana* ATCC 10148b
- *Beauveria bassiana* ATCC 7159
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244
- *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245
- *Cunninghamella elegans* ATCC 26169
- *Mucor griseocyanos* ATCC 1207a
- *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145
- *Fusarium roseum* ATCC 14717

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

- *Mortierella isabellina* NRRL 1757

Os microrganismos foram mantidos em ágar batata inclinado entre 2 e 4 °C, sendo repicados periodicamente com glicerol estéril 25% (v/v). A cada experimento as cepas eram novamente repicadas e mantidas em câmara germinativa do tipo *Biochemical oxygen demand*

(B.O.D.) (Modelo TE 401 Tecnal[®]) a 27 °C, por 7 dias para crescimento. Após esse período, as cepas foram avaliadas macroscopicamente.

3.3 MEIO DE CULTURA

O meio líquido de glicose (MLG) descrito por Gurram et al. (2009) foi o meio de cultura selecionado para realização dos experimentos. Cada 1000 mL de meio de cultura contém: 20 g de glicose anidra (Vetec[®]), 5 g de extrato de levedura (BD[®]), 5 g de peptona de soja (Himedia[®]), 5 g NaCl (Dinâmica[®]) e 5 g de K₂HPO₄ (Vetec[®]), q.s. água destilada.

Transferiu-se 100 mL do meio para Erlenmeyers de vidro de boca larga de 250 mL. Os frascos foram autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

3.4 TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS

A triagem foi realizada para verificar dentre os 10 microrganismos utilizados quais seriam capazes de biotransformar os substratos (LQFM 018 ou LQFM 030).

Uma gota de suspensão de esporos (em glicerol estéril 25%) foi transferida dos microrganismos cultivados em ágar batata para Erlenmeyers contendo o meio de cultura líquido (MLG), preparado conforme seção 3.3, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. Os Erlenmeyers foram identificados quanto ao microrganismo que continha e foram incubados em incubador rotativo (TE 420 Tecnal[®]) a 200 r.p.m., 27 °C durante 65 horas.

Finalizadas as 65 horas de incubação o substrato foi adicionado. O LQFM 018 e LQFM 030 foram pesados e solubilizados em etanol:dimetilformamida (Dinâmica[®]) (1:1) e etanol (Tedia[®]), respectivamente, para obtenção de soluções de concentração 25 mg/mL. Aos Erlenmeyers foram adicionados 1 mL da solução de LQFM 018 ou LQFM 030, em experimentos independentes, resultando na concentração final de 25mg/100mL de substrato.

Os Erlenmeyers foram novamente incubados a 200 r.p.m., 27 °C e alíquotas de 1 mL dos meios de incubação foram retiradas nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h e transferidas para Eppendorfs. Para análises por CCD as alíquotas foram saturadas com cloreto de sódio, extraídas com acetato de etila (Vetec[®]) e aplicadas em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄. As análises em CLAE foram realizadas com o sobrenadante de incubação obtido após centrifugação das alíquotas em micro centrífuga HT[®] modelo MCD-2000.

A fim de avaliar a influência de componentes do meio de cultura, dos microrganismos ou de uma possível degradação do substrato ao longo do tempo de incubação, dois diferentes experimentos de branco foram realizados. Um branco do microrganismo, contendo o meio de cultura e microrganismo, e outro do substrato, contendo meio de cultura e substrato.

3.5 ENSAIO EM ESCALA SEMIPREPARATIVA

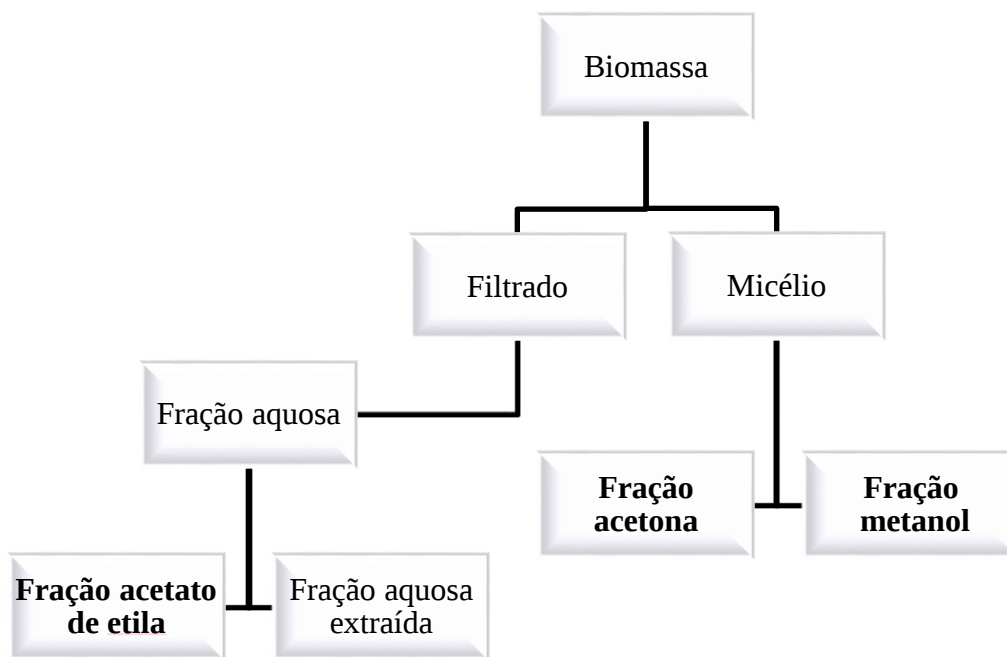
Finalizadas as análises de CCD e CLAE dos sobrenadantes de incubação, a cepa *Mortierella isabellina* NRRL 1757 foi selecionada para incubações em escala semipreparativa com o LQFM 030 e LQFM 018. O procedimento descrito para a triagem foi repetido em escala semipreparativa, utilizando 10 Erlenmeyers de 250 mL de boca larga com 100 mL de MLG e concentração de 25 mg/100mL de substrato. O procedimento empregado foi o mesmo para incubações com o LQFM 030 e LQFM 018.

Filtração e extração

Após o período de 96 horas de incubação o conteúdo dos 10 Erlenmeyers foi reunido e a biomassa foi filtrada em funil de Büchner com gaze sob vácuo. A solução filtrada foi saturada com cloreto de sódio (Vetec®) e posteriormente filtrada em funil de Buchner contendo Celite-545 (Tedia®) sob vácuo. O filtrado foi então denominado “Fração aquosa” e transferido para uma ampola de separação, onde foi extraído com três porções de 100 mL de acetato de etila. Após a extração foram obtidas duas frações: fração aquosa extraída e fração acetato de etila. A fração aquosa extraída foi descartada. Adicionou-se sulfato de magnésio anidro à fração acetato de etila e procedeu-se a filtração em funil de vidro sinterizado e o filtrado foi evaporado em evaporador rotativo Tecnal® modelo TE-211, acoplado a bomba de vácuo Tecnal® TE-058 resultando em um extrato bruto seco para posterior purificação (Fig.16).

A biomassa, separada na filtração, foi extraída com acetona (200 mL) em agitador magnético por 1 hora e filtrado em papel de filtro. Posteriormente a biomassa foi extraída com metanol (200 mL) em agitador magnético por 1 hora e filtrada novamente. Assim foram obtidas a fração metanol e a fração acetona. As frações foram evaporadas em evaporador rotativo originando dois extratos brutos secos para posterior purificação (Fig. 16).

Figura 16 - Fluxograma da metodologia empregada para extração do meio reacional.



Fonte: Autor

Purificação dos metabólitos

3.5.1.1 LQFM 030

A purificação dos extratos foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna, utilizando uma coluna de vidro de 220 x 15 mm, preenchida com fase estacionária sílica gel 60, Vetec®, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh) e fase móvel acetato de etila. O monitoramento foi realizado por CCD, utilizando AcOEt:MeOH (50:50) como eluente e luz UV (254 nm) como revelador.

Primeiramente foi purificado o extrato seco da fração acetato de etila, sendo este solubilizado em metanol, adicionado sílica gel 60, Vetec®, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh), seco para a formação da pastilha e transferido para a coluna de vidro previamente compactada com fase estacionária. Gradientes de solventes foram eluídos na coluna, iniciando com AcOEt 100%, passando por AcOEt:MeOH (50:50) e finalizando com MeOH 100%. Os produtos purificados tiveram seus solventes evaporados e foram mantidos em dessecador para posterior pesagem. O procedimento foi repetido para o extrato seco da fração metanol e acetona.

3.5.1.2 LQFM 018

A purificação foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna, utilizando uma coluna de vidro de 220 x 15 mm, preenchida com fase estacionária sílicagel 60, Vetec®, 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh) e fase móvel diclorometano. O monitoramento foi realizado por CCD, com fase móvel DCM:MeOH (95:05) e luz UV (254 nm) como revelador.

O extrato seco da fração acetato de etila foi solubilizado em metanol, incorporado à sílica e transferido para a coluna de vidro previamente compactada com fase estacionária. Gradientes de solventes foram eluídos na coluna, iniciando com DCM 100%, DCM:MeOH (70:30) e finalizando com MeOH 100%. Os produtos purificados tiveram seus solventes evaporados e mantidos em dessecador para pesagem posterior. O procedimento foi repetido para o extrato seco da fração metanol e acetona.

Cinética de formação dos metabólitos e consumo do substrato

Após purificação dos metabólitos a cinética de formação e consumo do substrato foi determinada por CLAE.

3.5.1.3 LQFM 030

Alíquotas do meio de incubação com *M. isabellina* obtidas conforme seção 3.4 foram centrifugadas por 5 minutos a 100.000 r.p.m. em microcentrifuga (HT MCD-2000) e injetadas (20 µL) em cromatógrafo a líquido da marca Gilson®, equipado com duas bombas modelo 321 da Gilson®, injetor manual Rheodyne® com capacidade de 20 µL, detector UV modelo 152 Gilson®, coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm). Foram desenvolvidos e testados quatro sistemas cromatográficos para análise do substrato e do meio de incubação.

As fases móveis foram preparadas utilizando água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore®, São Paulo, Brasil), metanol grau HPLC (J.T.BAKER®), fosfato de potássio monobásico P.A. (Synth). Sendo os solventes filtrados em membranas Millipore® de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, degaseificados em banho de ultrassom Thornton T7 por 15 minutos.

O substrato LQFM 030 foi solubilizado em metanol, para obter uma concentração final de 0,25 mg/mL e injetado em CLAE em triplicata.

A análise cromatográfica foi realizada empregando quatro diferentes sistemas cromatográficos:

- a) Sistema 1 desenvolvido por Gomes (2007): Sistema gradiente com fase móvel metanol (Bomba A) e mistura de metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M – 65:35 v/v (Bomba B) (Tabela 1).

Tabela 1 - Sistema gradiente desenvolvido por Gomes 2007, adaptado.

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)	Vazão (mL/min)
0 a 2	0 a 100	100 a 0	1,0
2 a 7	100	0	0,8
7 a 8	100	0	1,0
8 a 9	100 a 50	0 a 50	1,0

Fonte: Gomes (2007). Adaptado.

- b) Sistema isocrático 2: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B). (40:60),
- c) Sistema isocrático 3: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B).
- d) Sistema isocrático 4: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B) (70:30).

O sistema isocrático 4 foi alterado, adicionando um gradiente de incubação no início do tempo de corrida conforme tabela 2.

Tabela 2 - Sistema gradiente 4, bomba A (metanol) e bomba B (Tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M),

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)	Vazão (mL/min)
0 a 1	15 a 70	85 a 30	1,0
1 a 15	70	30	1,0

Fonte: Autor.

As alíquotas do meio de incubação foram obtidas conforme seção 3.4, centrifugadas e injetadas em CLAE. Os equipamentos e solventes utilizados foram os mesmos descritos em 3.5.3.1. O substrato LQFM 018 foi solubilizado em metanol, obtendo uma concentração final de 0,25 mg/mL para análise. A análise cromatográfica foi realizada empregando o sistema gradiente 3 descrito em 3.5.3.1 e outros três sistemas isocráticos:

- a) Sistema isocrático 1: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B) (80:20), vazão 1,0 mL/min.
- b) Sistema isocrático 2: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B) (70:30), vazão 1,0 mL/min.
- c) Sistema isocrático 3: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B) (75:25) vazão 1,2 mL/min.

Identificação e caracterização dos metabólitos

Os metabólitos que foram purificados e obtidos em quantidades suficientes para análise, foram identificados e caracterizados com o auxílio das técnicas de Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e ressonância magnética nuclear de duas dimensões: *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation* (HMBC). Análises de espectrofotometria na região do UV também foram realizadas para os substratos e metabólitos.

3.5.1.5 Espectrometria de massas com ressonância ciclônica de íons (FTICR-MS)

As análises de Espectrometria de massas foram realizadas no Centro de Pesquisas da Petrobras (CENPES) UFRJ. Um espectrômetro de massas de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier *Solarix 9,4T* (Bruker, Bremen, Alemanha) foi empregado nas análises de altíssima resolução. Previamente a aquisição dos espectros de ESI(+)-FT-ICR MS foram realizados após uma otimização experimental de parâmetros de aquisição como: concentração, TOF, *ion accumulation time*, *skimmer*, *collision voltage*). Preparou-se uma solução de 1 mg/mL da amostra em metanol, desta solução 10 μL foram transferidos para um vial contendo 990 μL de metanol com 0,1 % de hidróxido de amônia. O fluxo do *electrospray* foi de 4 mL/min. A faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR foi de m/z 200-2000. Os demais parâmetros da fonte de ESI(+) são: **i)** voltagem no capilar (cone): -3200 V; **ii)** *end plate offset*= -500 V; **iii)** temperatura e fluxo do gás de secagem: 250 °C e 4 L min $^{-1}$; **vi)** pressão

do gás nebulizador: 1 bar; **v)** *skimmer* = 75 V e **vi)** *collision voltage* = -10 V. Na transmissão de íons, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (*ion accumulation time*) e o TOF foram de 0,3 s e 0,8 ms, respectivamente. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 200 *scans* com um domínio de tempo de 4M (*mega-point*). Antes da aquisição, o equipamento foi externamente calibrado a partir de uma solução de NaTFA.

3.5.1.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Análises de RMN foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. O espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para ^1H e 75,46 MHz para ^{13}C), equipado com sonda HR-MAS de 4 mm foi utilizado. As análises foram feitas em metanol deuterado (CIL – Cambridge Isotope Laboratories) utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.5.1.7 Espectrofotometria na região do UV

A determinação do comprimento de onda de máxima absorção foi realizada no Labiocon – UFG utilizando Espectrofotômetro Cintra® 10e UV-visible Spectrometer de 200 a 400 nm. Os substratos e metabólitos foram solubilizados em metanol (Vetec®).

3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA FORMAÇÃO DOS METABÓLITOS

Para avaliar o efeito da concentração do substrato e do tempo de incubação na formação dos metabólitos do LQFM 030, experimentos foram conduzidos no Labiocon - UFG com diferentes concentrações dos substratos e variando o tempo de incubação.

Foi realizada a metodologia descrita na seção 3.4, porém com o tempo de incubação final de 168 horas. A mesma metodologia foi empregada para avaliar o efeito da concentração do substrato, contudo, duas concentrações diferentes de soluções de LQFM 030 foram utilizadas: 25 mg/mL e 50 mg/mL. Sendo adicionadas ao meio de incubação 1 mL da solução, atingindo uma concentração final de 25 mg/100mL e 50 mg/100mL de LQFM 030 nos Erlenmeyers. As alíquotas do meio de incubação foram analisadas em CLAE de acordo com a seção 3.5.3.1 utilizando o sistema gradiente 3.

3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE INDUTOR E INIBIDOR DO CITOCROMO P450 NA FORMAÇÃO DOS METABÓLITOS

Para avaliar o efeito da adição de indutores e inibidores do citocromo P450 na formação dos metabólitos do LQFM 030, experimentos independentes foram conduzidos. As alíquotas coletadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas foram analisadas em CLAE de acordo com a seção 3.5.3.1 utilizando o sistema gradiente 3.

Avaliação da indução do CYP 2E1

O etanol (Tedia®) foi utilizado como indutor do citocromo P450, experimentos foram realizados com a *Mortierella isabellina* de acordo com o descrito na seção 3.4, contudo, a cada 24 horas de incubação, 1 mL de etanol foi adicionado ao meio de cultura. O branco de incubação contendo somente meio de cultura, microrganismo e etanol também foi realizado. Experimentos foram conduzidos em triplicata.

Avaliação da inibição do CYP 3A

O cetoconazol (Sigma-Aldrich®) foi utilizado como inibidor do citocromo P450. Os experimentos foram conduzidos com *Mortierella isabellina*, conforme descrito na seção 3.4. Todavia, após adicionar o LQFM 030, também foram adicionados 1 mL de diferentes concentrações de cetoconazol: 10 mg/mL, 20 mg/mL e 30 mg/mL. O branco de incubação contendo meio de cultura, microrganismo e cetoconazol também foi realizado. Experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS METABÓLITOS PELO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO O MÉTODO DE REDUÇÃO DE MTT

Em uma placa de Elisa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), foi adicionado aos poços correspondentes 90 µL de suspensão celular na concentração de 1×10^6 células viáveis/mL da linhagem leucêmica K-562 mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma®) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram expostas a 10 µL do composto teste em oito concentrações feitas a partir de diluições seriadas. Além dos poços com células expostas ao composto em questão, em cada placa foi realizado um controle de célula a fim de avaliar a viabilidade celular. Após o período de incubação de 48 horas em estufa úmida a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, cada poço recebeu 10 µL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 5 mg/mL. A placa foi novamente incubada por quatro horas e, em seguida, centrifugada a 800 rpm por 10 minutos, com o propósito de permitir que os possíveis cristais de formazan fossem precipitados. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada poço foi desprezado e, então, adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC,RJ, BRASIL) para a solubilização dos possíveis cristais de formazan. A placa de Elisa foi cuidadosamente homogeneizada e a intensidade de coloração quantificada espectroscopicamente por leitor de Elisa (STAT FAX 2100, Awareness Technology, Dusseldorf, Germany) em um comprimento de onda de 545 nm. A média da absorção das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular.

Para cada composto em suas diferentes concentrações, foram realizados dois experimentos independentes sendo quatro poços de cada concentração. Os resultados de viabilidade obtidos foram submetidos a uma análise estatística usando o Software GraphPad Prism 5.01 e demonstrados em gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 LQFM 030

Avaliação da morfologia e seleção das cepas

Os fungos filamentosos são microrganismos morfológicamente complexos e exibem diferentes formas estruturais ao longo do seu ciclo de vida. Fatores como temperatura de incubação, composição do meio de cultura, pH e agitação podem contribuir para diferentes morfologias (PAPAGIANNI, 2004). Desta forma, o crescimento e aspecto das cepas foram observados durante todo o processo de incubação, também foram verificadas temperatura e agitação. As cepas apresentaram durante todo o tempo a formação do halo de crescimento, antes e depois da adição do substrato (LQFM 030) o que indica que sua viabilidade não foi prejudicada pela adição do composto a ser biotransformado.

A composição do meio de cultura pode influenciar na formação dos metabólitos. O meio líquido utilizado para as incubações de todos os microrganismos foi o meio de glicose, rico em nutrientes necessários para o crescimento do fungo. Estudos de biotransformação do albendazol com *Cunninghamella blakesleeana* NCIM 687 em diferentes meios líquidos demonstrou que a capacidade de biotransformação quando utilizado o meio de glicose foi superior aos experimentos com outros meios de cultura (GURRAM *et al.*, 2009). Em meio líquido a estrutura micelar dos fungos filamentosos pode se desenvolver em forma de “pellets” (filamentos de micélios entrelaçados) ou como uma massa amorfa (filamentos de micélios dispersos). O quadro 2 demonstra a formação micelar em meio líquido de glicose dos fungos utilizados na triagem para a biotransformação do LQFM 030.

Quadro 2 - Morfologia dos microrganismos em meio de glicose para triagem.

Microrganismo	“Pellets”	Massa amorfa	Halo
<i>Absidia blaklesleana</i> ATCC 10148b	++	-	+
<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023	-	+	+
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	-	+	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	+	-	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	++	-	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	++	-	+
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	-	+	+
<i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757	+	-	+
<i>Mucor griseocyanos</i> ATCC 1207a	-	+	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	-	+	+

Legenda: (-) ausência, (+) presença e/ou “pellets” pequenos, (++) “pellets” grandes.

Fonte: Autor.

Para a seleção das cepas capazes de biotransformar o LQFM 030, alíquotas do meio de incubação foram retiradas a cada 24 horas para verificar a formação de metabólitos e analisadas através de CCD (Fase móvel: AcOEt:MeOH, 50:50).

Os microrganismos *Absidia blaklesleana* ATCC 10148b e *Mortierella isabellina* NRRL 1757 foram capazes de biotransformar o substrato em dois metabólitos mais e menos polares comparado à polaridade do substrato. Não foram verificados metabólitos nas incubações com os outros oito microrganismos. Foi observado que o substrato não foi totalmente consumido no tempo total de incubação (96 horas). A cepa *Mortierella isabellina* NRRL 1757 foi selecionada para incubação em escala semipreparativa por ter biotransformado o LQFM 030 em maior número de metabólitos. O quadro 3 apresenta os resultados da triagem com as cepas utilizadas.

Quadro 3 - Análise de CCD da biotransformação do LQFM 030 após 96 horas de incubação com diferentes microrganismos em meio de glicose, 27 °C e 200 r.p.m.

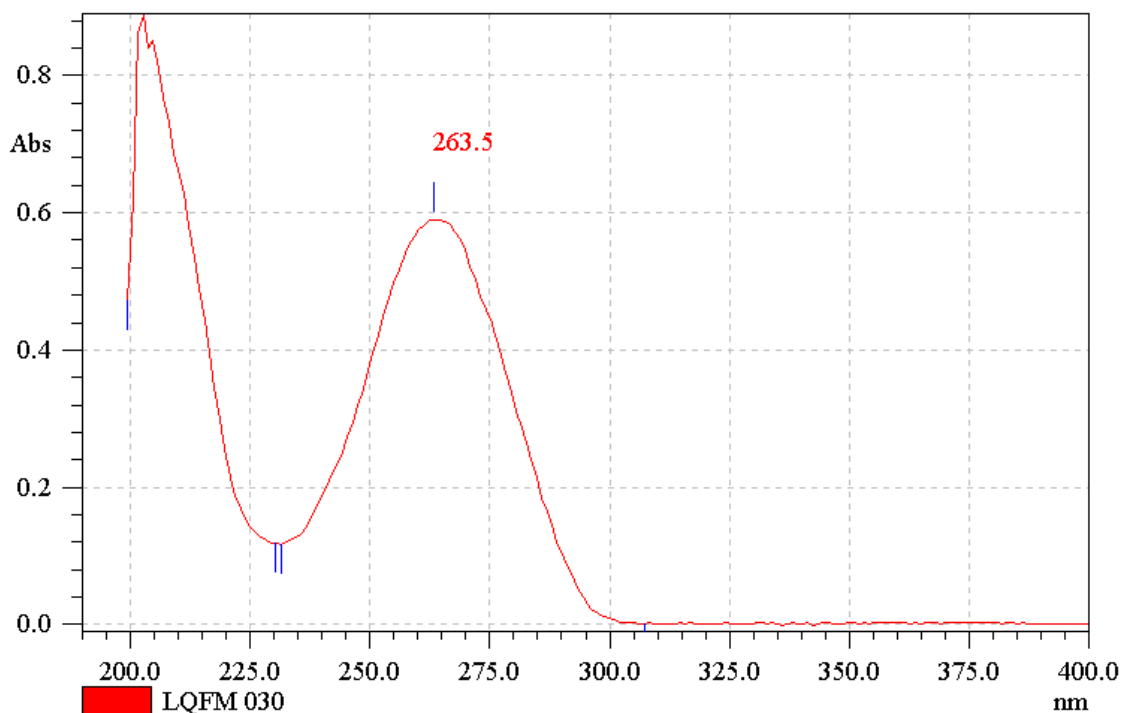
Microrganismo	Metabólito 1	Metabólito 2	LQFM 030
	Rf: 0,62	Rf:0,07	Rf:0,47
<i>Absidia blaklesleana</i> ATCC 10148b	-	+	+
<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023	-	-	+
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	-	-	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	-	-	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	-	-	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	-	-	+
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	-	-	+
<i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757	+	+	+
<i>Mucor griseocyanos</i> ATCC 1207a	-	-	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	-	-	+

Legenda: O símbolo (-) indica ausência e (+) presença dos metabólitos. Fase móvel: AcOEt:MeOH (50:50), fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,25 cm de espessura e visualização por UV 254 nm. Fonte: Autor.

Desenvolvimento de metodologia analítica (CLAE) para monitoramento da biotransformação.

O composto LQFM 030 foi analisado em espectrofotômetro Cintra 10^e UV-visible Spectrometer para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção na região do UV. O resultado demonstrou absorção máxima em 263nm (Fig. 17), sendo este o comprimento de onda utilizado nas análises por CLAE desenvolvidas para o monitoramento da reação e a fim de verificar a formação dos metabólitos ao longo do tempo de incubação.

Figura 17 - Espectrograma na região do UV do substrato LQFM 030 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.



Fonte: Autor. Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV-visible Spectrometer

O LQFM 030 é um composto fenil-pirazólico que possui estrutura semelhante ao composto LASSBio 579 já estudado no LaBiocon. Dessa forma, a metodologia analítica desenvolvida por Gomes (2007) foi testada para o LQFM 030. O método é composto de um sistema gradiente (metanol: tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M) vazão de 1 mL/min e coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5µm). Contudo, a resolução dos picos não foi satisfatória e o método foi alterado em relação ao seu gradiente. Assim, três sistemas isocráticos com proporções diferentes de metanol: tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M foram testados para verificar a separação dos picos, sendo eles: Sistema 1 (40:60), Sistema 2 (50:50), Sistema 3 (70:30).

A proporção 70:30 (Sistema 3) se mostrou satisfatória sendo necessário um ajuste de gradiente no início do tempo de corrida para a melhor separação dos picos. Dessa forma, o método descrito na tabela 3 foi selecionado para o monitoramento da bioconversão em escala semipreparativa com a cepa *Mortierella isabellina* NRRL 1757.

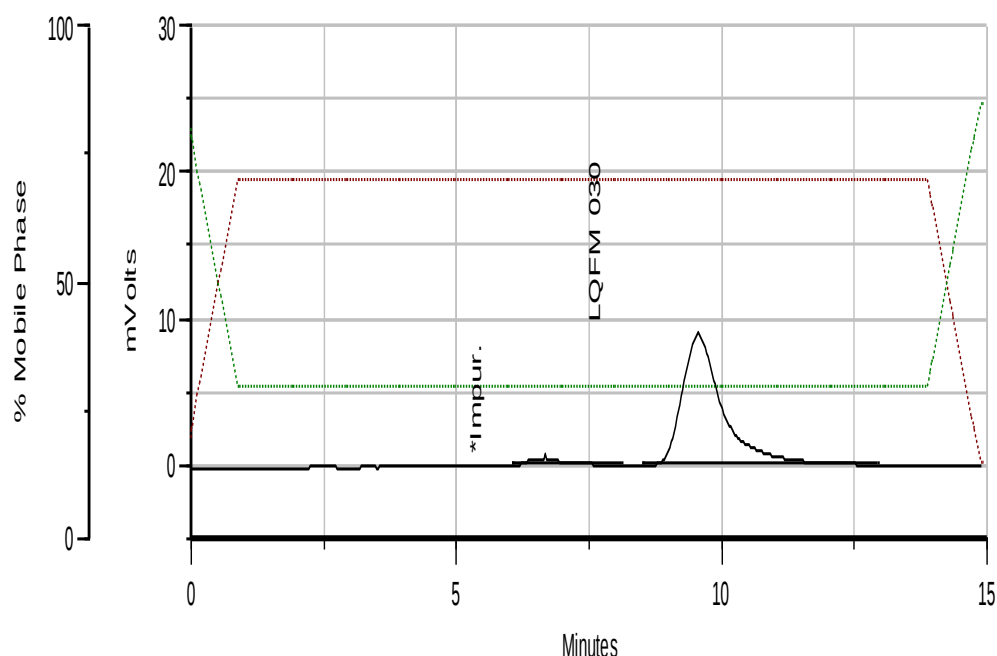
Tabela 3 - Sistema gradiente 3, bomba A (metanol) e bomba B (Tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M), 263nm, coluna Lichrospher 100, RP 18 - MERCK 250 x 4,6 mm x 5µm.

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)	Fluxo (mL/min)
0	15	85	1,0
0 a 1	15 a 70	85 a 30	1,0
1 a 15	70	30	1,0
15 a 16	70 a 15	30 a 85	1,0

Fonte: Autor

A análise do substrato LQFM 030 por CLAE utilizando o sistema gradiente resultou no cromatograma apresentado na figura 18. Verificou-se a presença do pico do LQFM 030 em 9,5 minutos e a presença de uma impureza em 6,6 minutos. A impureza identificada é, provavelmente, um subproduto da síntese. Não foi observado aumento da concentração da impureza ao longo do tempo de estoque da solução padrão e durante o tempo de incubação.

Figura 18 - Perfil cromatográfico do substrato LQFM 030 (0,25 mg/mL em metanol).



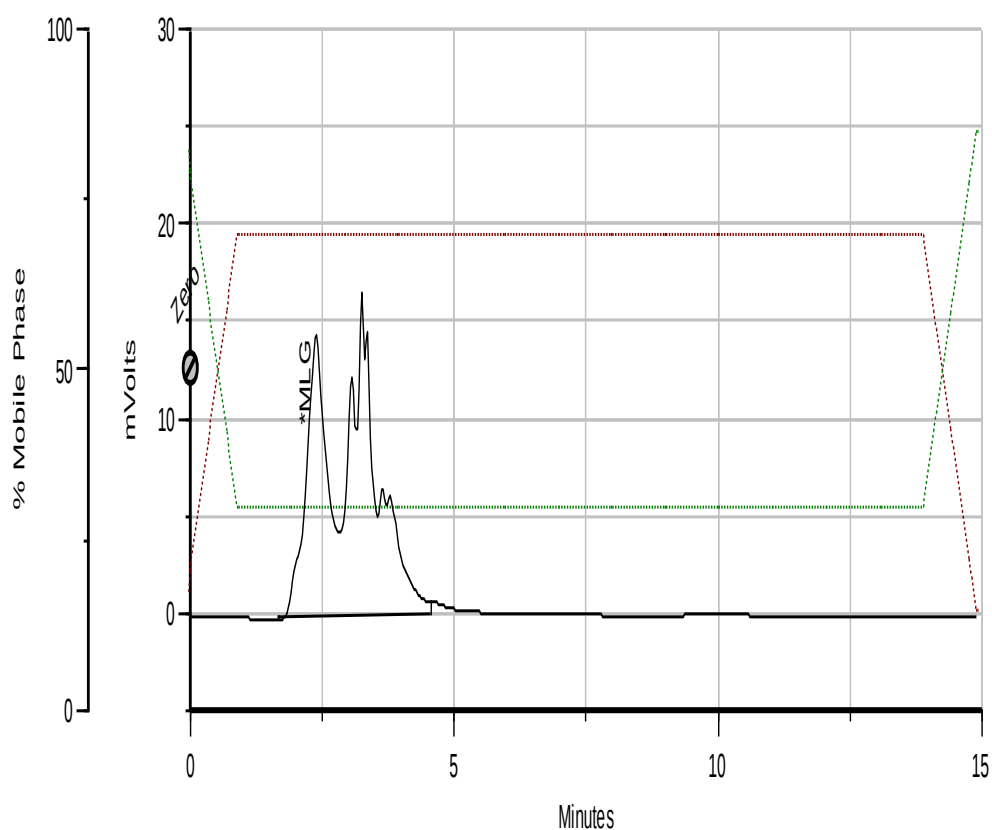
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3. (--- Bomba A, --- Bomba B)

Biotransformação em escala semipreparativa do LQFM 030.

A cepa selecionada para incubação em escala semipreparativa, *M. isabellina* NRRL 1757, já é descrita na literatura como um microrganismo promissor para reações de biotransformação (ABOURASHED *et al.*, 1999). Na incubação com o LQFM 030 o microrganismo foi capaz de produzir dois metabólitos quando analisados por CCD e CLAE.

A análise por CLAE do meio de glicose resultou no cromatograma apresentado na figura 19. O meio reacional apresentou vários picos entre 1 e 4 minutos, identificados como MLG (meio líquido de glicose).

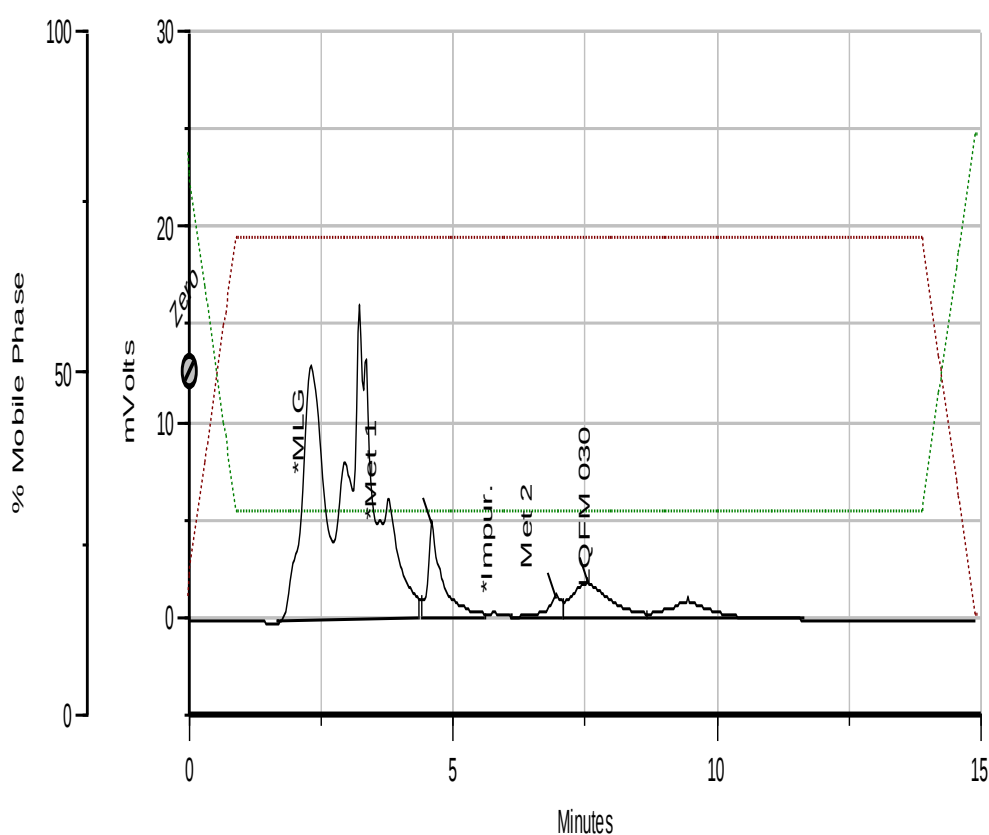
Figura 19 - Perfil cromatográfico do branco de incubação contendo meio de cultura (MLG) e *Mortierella isabellina* NRRL 1757 após período de 96 horas.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3. (--- Bomba A, --- Bomba B)

As alíquotas retiradas de cada tempo de incubação (24, 48, 72 e 96 horas) foram analisadas por CLAE com o sistema gradiente 3. Os cromatogramas foram analisados e verificada a presença de dois metabólitos mais polares que o LQFM 030 como mostra o cromatograma da Figura 20. O metabólito 2 foi identificado como majoritário na reação de biotransformação.

Figura 20 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 030 com *M. isabellina* NRRL 1757 após período de 96 horas de incubação.



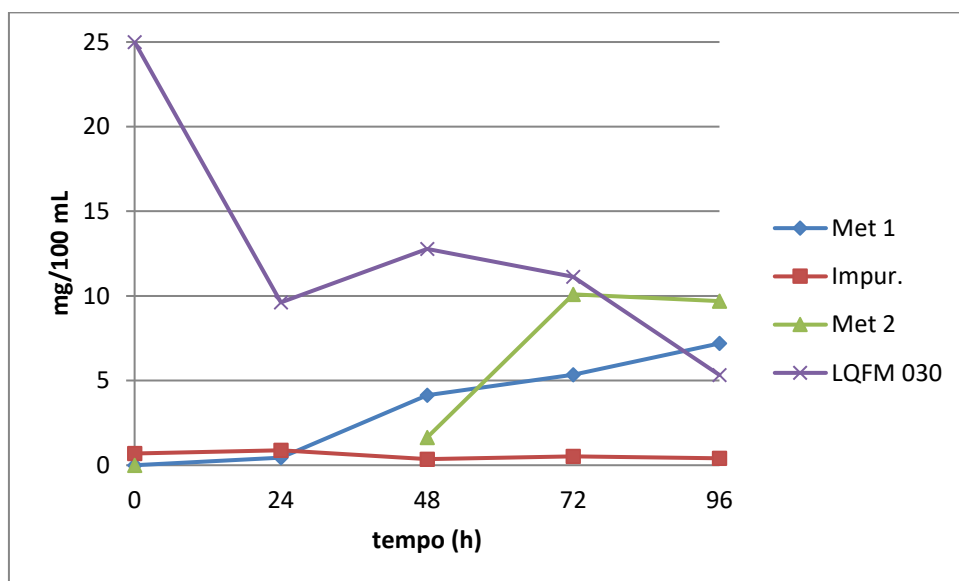
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3. (--- Bomba A, --- Bomba B)

Cinética de formação dos metabólitos do LQFM 030.

As análises em CLAE dos tempos de reação permitiram a construção da cinética de formação dos metabólitos e de consumo do LQFM 030 ao longo do tempo de incubação. Observada a cinética de formação dos metabólitos (Gráfico 1) pode-se verificar que o pico de concentração do metabólito 1 ocorre no tempo de 96 horas e o metabólito 2 atinge seu máximo

em 72 horas, se mantendo até 96 horas. O substrato LQFM 030 decai em 60% nas primeiras 24 horas, possivelmente devido à adsorção ou internalização do substrato pela célula fúngica, seguida de uma diminuição em aproximadamente 50% no intervalo entre 48 e 96 horas, coincidindo com o período de formação dos metabólitos. Não houve variação na concentração da impureza durante o tempo de incubação.

Gráfico 1 - Cinética de biotransformação do LQFM 030 por *Mortierella isabellina* NRRL 1757.



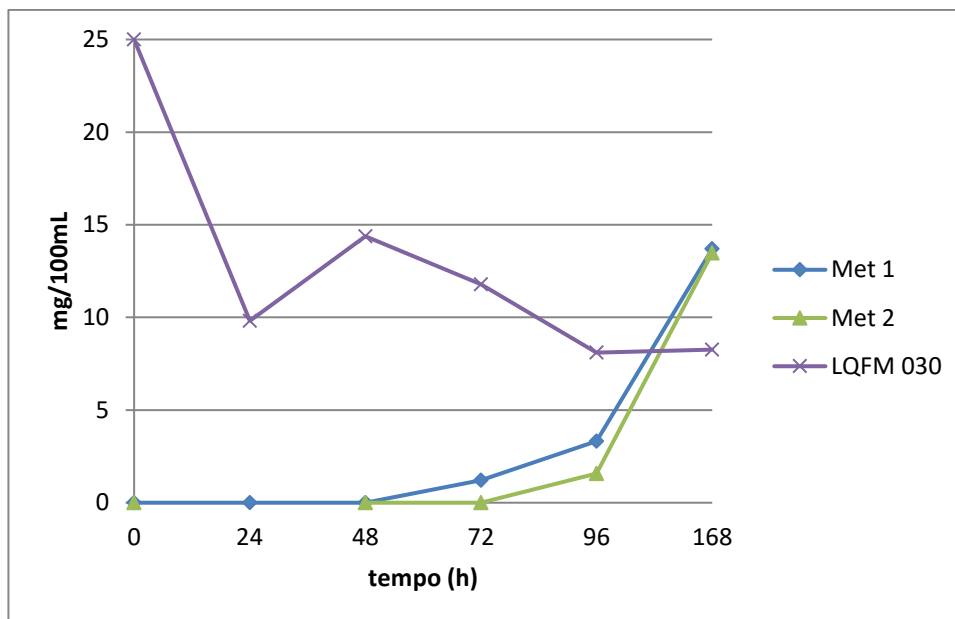
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3.

4.1.1.1 Efeito do tempo de incubação na cinética de formação dos metabólitos

A fim de avaliar o efeito do tempo de incubação na formação dos metabólitos, experimentos com o tempo prolongado de reação foram realizados (168 horas). Observou-se que após o período de 96 horas os metabólitos 1 e 2 continuavam sendo formados, portanto, com um período maior de incubação a formação dos metabólitos seria mais eficaz.

O gráfico 2 mostra a formação dos metabólitos 1 e 2 frente ao aumento do tempo de incubação do LQFM 030.

Gráfico 2 - Cinética de formação dos metabólitos com o tempo de 168 horas.



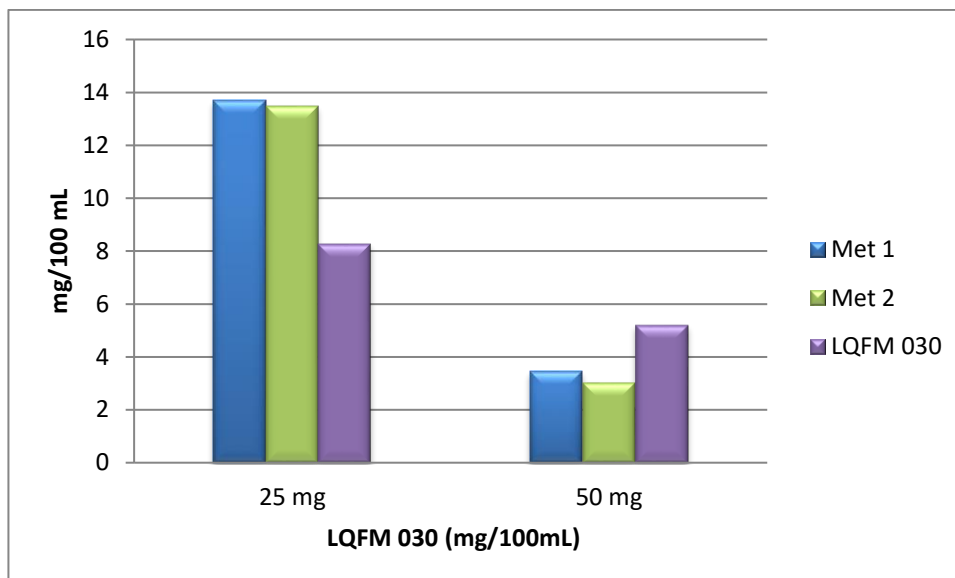
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3.

Observou-se que ocorreu um aumento de até 4 vezes na concentração dos metabólitos no período de 96 a 168 horas, sendo assim, podemos propor que o maior tempo de incubação é favorável à formação dos metabólitos 1 e 2.

4.1.1.2 Efeito da concentração do substrato na cinética de formação dos metabólitos

Para avaliar o efeito da concentração do substrato (LQFM 030) frente à formação dos metabólitos, experimentos com diferentes concentrações de LQFM 030 (25 mg e 50 mg em cada Erlenmeyer) foram realizados. O gráfico 3 mostra a formação dos metabólitos frente à comparação dos experimentos realizados com diferentes concentrações no tempo de 168 horas.

Gráfico 3 - Concentração dos metabólitos e do LQFM 030 em incubações com diferentes concentrações de substrato no tempo de 168 horas.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3.

Observa-se que quando a incubação foi conduzida com a concentração mais alta de substrato (50 mg/100 mL) houve uma diminuição significativa (cerca de 70%) na formação dos metabólitos 1 e 2. Indicando assim que a concentração de 25 mg/100mL é mais viável na realização dos experimentos.

Zhao e colaboradores (2009) testaram diferentes concentrações de ginsenosídeo Rb1 (0,15mg/mL a 1,0 mg/mL), utilizando *Cladosporium fulvum*, para biotransformação em ginsenosídeo Rd. A concentração de 0,25 mg/mL do substrato resultou em maior rendimento do metabólito. Concentrações superiores a essa reduziram a taxa de biotransformação. Estudo utilizando *Fusarium oxysporum* NCIM 1282 na biotransformação da ciclohexanona a ϵ -caprolactona revelou que concentrações acima de 100 mg/100mL do substrato reduziram a taxa de formação do metabólito, provavelmente devido a uma ação tóxica da ciclohexanona quando em altas concentrações (MANDAL *et al.*, 2002). Na utilização de uma cepa do gênero *Mortierella* sp. (*Mortierella minutíssima*) na biotransformação do *D*-limoneno a concentração de 0,8% (v/v) desse substrato foi a melhor na formação do álcool perílico. Concentrações superiores de *D*-limoneno reduziram a produção do metabólito (TRYTEK; FIEDUREK, 2005).

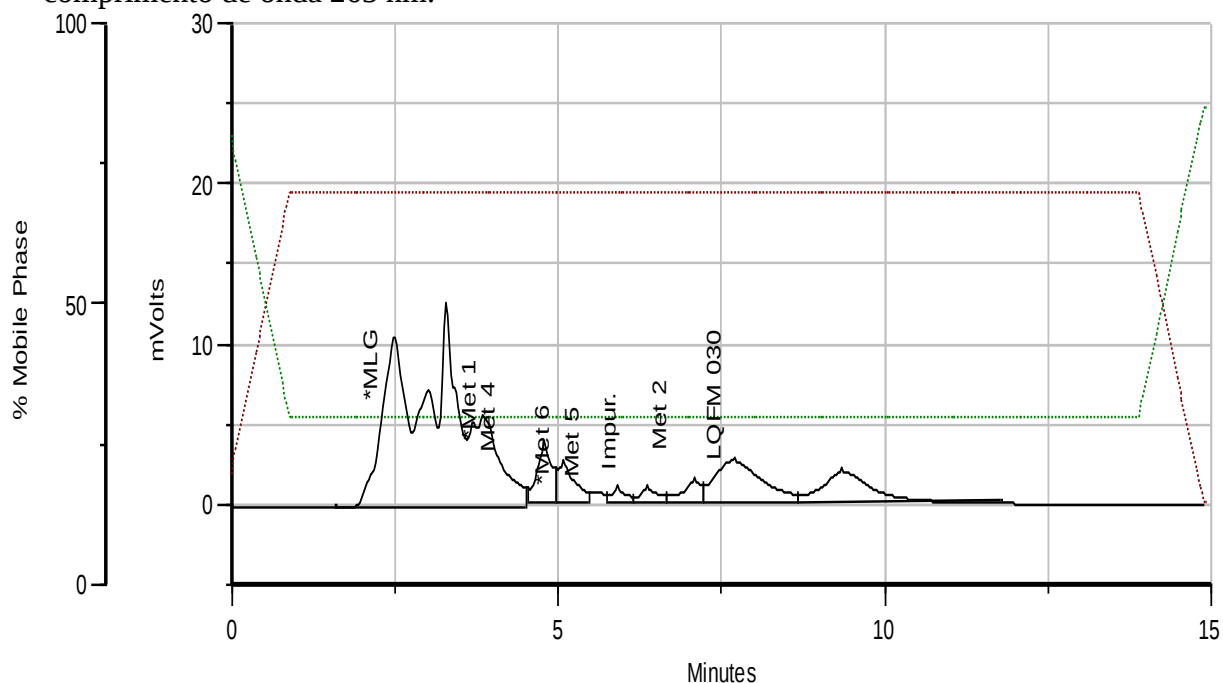
Efeito da adição de indutores e inibidores do citocromo P450 na biotransformação do LQFM 030

A atividade das enzimas da família do citocromo P450 pode ser afetada por fatores genéticos, endógenos e ambientais. Compostos que causam a inibição ou indução dessas enzimas são alvos de vários estudos, uma vez que essa alteração na sua atividade pode alterar o metabolismo de fármacos e xenobióticos (KAVITHA *et al.*, 2012; LIN; LU, 1998; PELKONEN *et al.*, 2008).

4.1.1.3 Efeito de um indutor do CYP450

O etanol foi utilizado como indutor do CYP para a reação de biotransformação do LQFM 030 com *M. isabellina* NRRL 1757. Aliquotas de 1 mL de etanol foram adicionadas a cada 24 horas nos meios de incubação até finalização do experimento (96 horas). A análise em CLAE do meio de incubação no tempo de 96 horas indicou a formação de outros 3 metabólitos que não foram identificados nas incubações sem a adição de etanol. (Fig 21)

Figura 21 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 030 com *Mortierella isabellina* NRRL 1757 com adição de etanol. Tempo de 96 horas de incubação. Sistema gradiente 3 e comprimento de onda 263 nm.

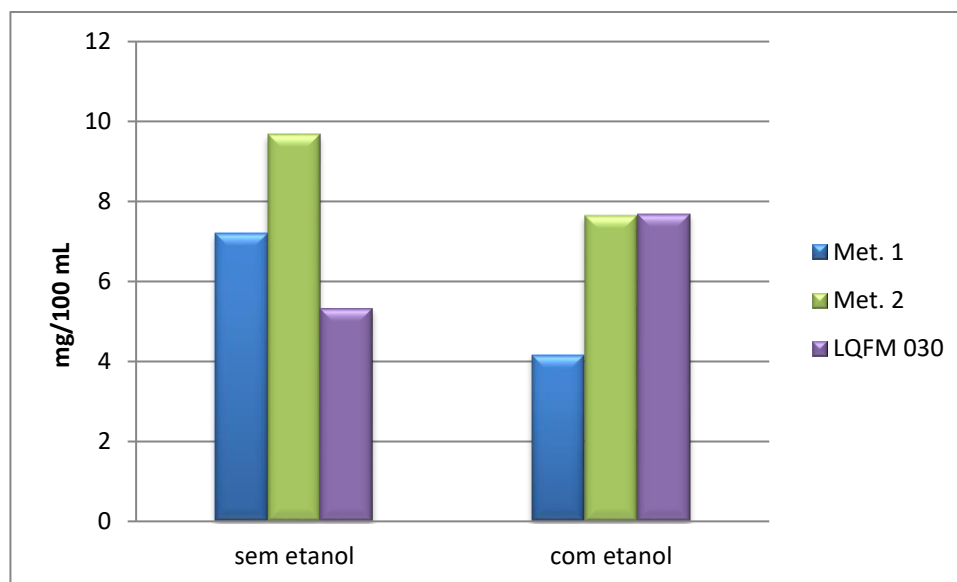


Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3. (---- Bomba A, ---- Bomba B)

A cinética de formação do metabólito 1 e 2 mostrou que não houve aumento na concentração destes metabólitos (Gráfico 4). A diminuição nas concentrações pode ser

decorrente do consumo do substrato para a formação dos outros metabólitos observados no meio reacional.

Gráfico 4 - Concentrações dos metabólitos e do LQFM 030 em diferentes incubações frente à adição de etanol. Tempo de incubação de 96 horas.



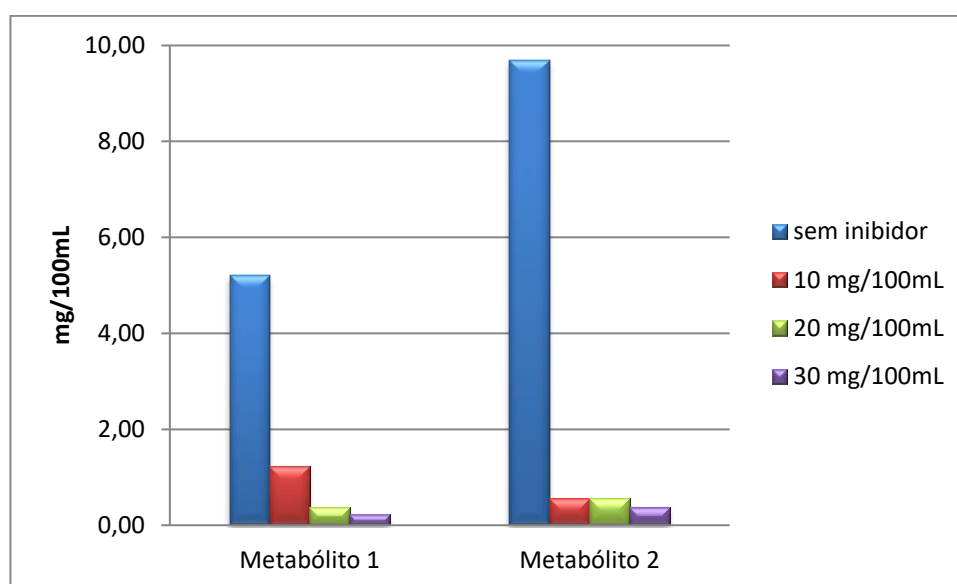
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3.

O etanol é um indutor da isoforma 2E1 do CYP, e sua indução *in vivo* é conhecida como um processo lento que pode desencadear em alterações na concentração de fármacos no sangue (LIN; LU, 1998). Apesar da CYP2E1 ser abundante no fígado somente alguns poucos fármacos são metabolizados por essa via, sendo esta, por exemplo, responsável pelo efeito hepatotóxico do paracetamol (RUMACK, 2004). A presença de diferentes metabólitos no meio reacional (Metabólitos 3, 4 e 5) pode indicar que estes seriam formados por essa isoforma específica. A manutenção das concentrações dos metabólitos 1 e 2 indica que eles não são influenciados pela indução da isoforma 2E1, sendo assim, uma outra CYP seria, provavelmente, a responsável pela sua formação.

4.1.1.4 Efeito de um inibidor do CYP450

O cetoconazol foi utilizado como indutor da isoforma 3A do CYP. Diferentes quantidades (10, 20 e 30 mg) do composto foram adicionados a 100 mL do meio reacional contendo *M. isabellina* NRRL 1757 antes da adição do substrato (LQFM 030). As análises realizadas em CLAE mostraram uma significativa diminuição da concentração dos metabólitos 1 e 2 quando comparados à incubação sem o inibidor. A concentração do metabólito 1 em meio reacional foi diminuída em cerca de 76% e do metabólito 2 em 94%. (Gráfico 5.)

Gráfico 5 - Concentração de metabólito 1 e 2 na presença e ausência do inibidor (cetoconazol) em diferentes concentrações. Tempo de incubação de 96 horas.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3.

O cetoconazol atua no CYP através da inibição competitiva, onde o nitrogênio deste agente antifúngico se liga ao ferro do sítio ativo das enzimas P450, impedindo o metabolismo de fármacos co-administrados (GOLAN *et al.*, 2009).

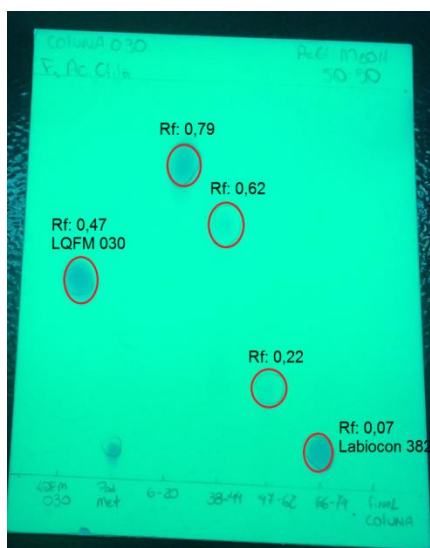
Roh e colaboradores (2009) utilizaram o cetoconazol como inibidor do CYP450 na biotransformação da daidizeína com *Streptomyces avermitilis* MA-4680 e verificaram 90% de inibição de seu metabólito hidroxilado.

A hidroxilação da progesterona foi reduzida em 50% quando adicionado cetoconazol na biotransformação com *Streptomyces roseochromogenes* NCIB 10984 (BERRIE *et al.*, 1999).

Purificação e caracterização estrutural do metabólito

A purificação dos metabólitos foi realizada em coluna cromatográfica de vidro de 22 cm e 2,5 cm de diâmetro com sílica gel 60 (Merck) como fase estacionária. A fase móvel utilizada foi AcOEt (100%), seguido de uma proporção AcOEt:MeOH (50:50%) e finalizando com metanol (100%). Partindo de 150 mg de extrato bruto foi possível purificar 10 mg do metabólito denominado Labiocon 382 (Fig. 22) que foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas alta resolução. Os outros produtos formados não foram obtidos em quantidades suficientes para sua caracterização.

Figura 22 - CCD da purificação do extrato bruto de incubação do LQFM 030 com *Mortierella isabellina*.



Fonte: Autor. Fase móvel: AcOEt:MeOH (50:50), visualização em luz UV (254 nm).

As análises de RMN ^1H e ^{13}C foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para o ^1H e 75,46 MHz para o ^{13}C). Os espectros foram registrados em CD_3OD , com TMS como padrão interno, sendo o espectro RMN do padrão (LQFM 030) também registrado para fins de comparação. A tabela 4 demonstra as atribuições dos deslocamentos químicos obtidos do espectro de RMN ^1H e ^{13}C do LQFM 030 (Fig. 23) e seu metabólito.

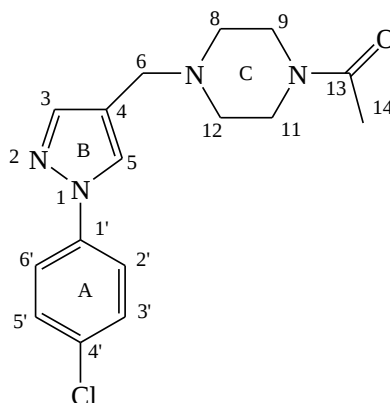
Tabela 4 - Sinais evidenciados no espectro de ^1H e ^{13}C RMN do LQFM 030 e Labiocon 382.

Posição	LQFM 030		Labiocin 382	
	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C
3	7,69 (<i>d</i> , 0,6)	143,8	7,88 (<i>d</i> , 0,6)	144,6
4	-	120,4	-	112,5
5	8,18 (<i>d</i> , 0,6)	129,2	8,43 (<i>d</i> , 0,6)	131,9
6	3,56 (<i>s</i>)	53,0	4,44 (<i>s</i>)	65,8
8	2,47 (<i>tl</i> , 5,2)	53,6	3,16-3,07 (<i>m</i>)	63,2
9	3,55 (<i>dd</i> , 5,4; 10,4)	47,5	4,50-4,44 (<i>m</i>) 3,46-3,39 (<i>m</i>)	36,9
11	3,60 (<i>dd</i> , 5,4; 10,4)	42,8	3,89 (<i>dd</i> , 8,5; 2,2)	41,6
12	2,52 (<i>tl</i> , 5,2)	53,9	3,49-3,35 (<i>m</i>)	63,2
13	-	171,8	-	171,4
14	2,08 (<i>s</i>)	21,2	2,14 (<i>s</i>)	20,5
1'	-	140,3	-	139,2
2'	7,73 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,5	7,79 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,5
3'	7,47 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	131,3	7,52 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	130,5
4'	-	133,3	-	133,4
5'	7,47 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	131,3	7,52 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	130,5
6'	7,73 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,5	7,79 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,5

Legenda: ^1H e ^{13}C RMN baseados em ^1H - ^{13}C HMBC. Dados obtidos em CD_3OD em 500 MHz e 125 MHz. Multiplicidades: singlete (*s*), singlete largo (*sl*), dubleto (*d*), duplo dubleto (*dd*), tripleto (*t*), tripleto largo(*tl*), multiplete (*m*).

Fonte: Autor.

Figura 23 - Fórmula molecular do LQFM 030 com numeração dos átomos.



Fonte: Autor.

O espectro de RMN ^1H do Labiocon 382 demonstra não haver alterações quanto a quantidade de hidrogênios quando comparado ao espectro do LQFM 030.

Não foram observados deslocamentos químicos significativos para os hidrogênios dos anéis A e B (cloro-fenilpiperazínico) do Labiocon 382 quando comparados ao LQFM 030 indicando que não ocorreram alterações nessa parte da molécula. O deslocamento dos hidrogênios referente ao grupamento metila também se mantiveram constantes. O mesmo aconteceu para os deslocamentos dos sinais referentes ao carbono.

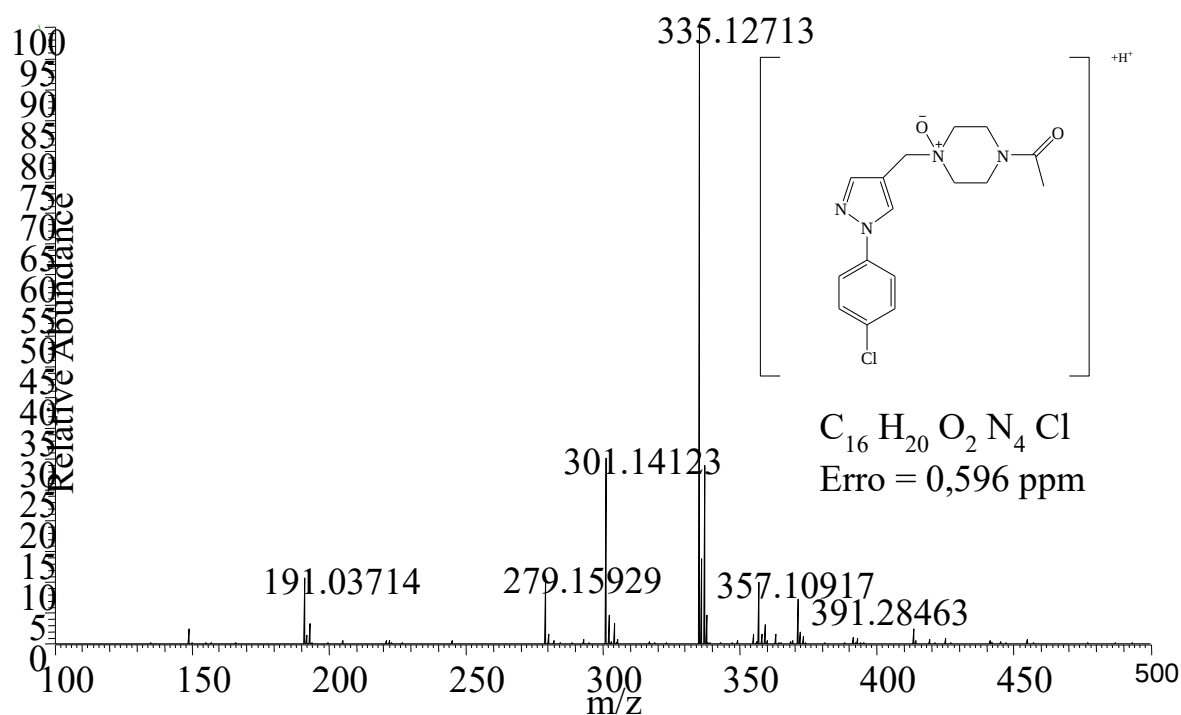
Já na porção referente ao anel piperazínico (C) ocorreu um desdobramento dos sinais, indicando uma perturbação no ambiente químico deste anel. Sendo assim, é provável que alguma alteração na subunidade piperazínica da molécula tenha ocorrido. Foi observado um deslocamento de 2,47 para 3,06-2,97 ppm, na posição 8 no ^1H RMN do Labiocon 382, quando comparado com o LQFM 030. Também foi verificada alteração no deslocamento dos hidrogênios da posição 12 para campo mais alto (δ 2,52 para δ 3,39-3,25), assim como para os hidrogênios da ponte metilênica (δ 3,56 para δ 4,34). Dessa forma, os sinais foram deslocados para uma região mais desprotegida, indicando uma maior desproteção dos hidrogênios. Deslocamentos dos sinais dos carbonos também foram identificados (Anexos A, B, C, D, E e F).

O ^1H RMN do enrofloxacino *N*-óxido, resultado da biotransformação do enrofloxacino por *Mucor ramannianus*, demonstrou o mesmo perfil de deslocamento dos sinais. Os hidrogênios do anel piperazínico próximos ao nitrogênio oxidado foram desprotegidos obtendo valores de deslocamentos maiores do que o enrofloxacino não oxidado (PARSHIKOV *et al.*, 2000).

A oxidação da mirtazapina também levou ao deslocamento dos sinais próximos ao *N*-óxido, indicando uma desproteção dos hidrogênios próximos ao nitrogênio oxidado (MOODY *et al.*, 2002).

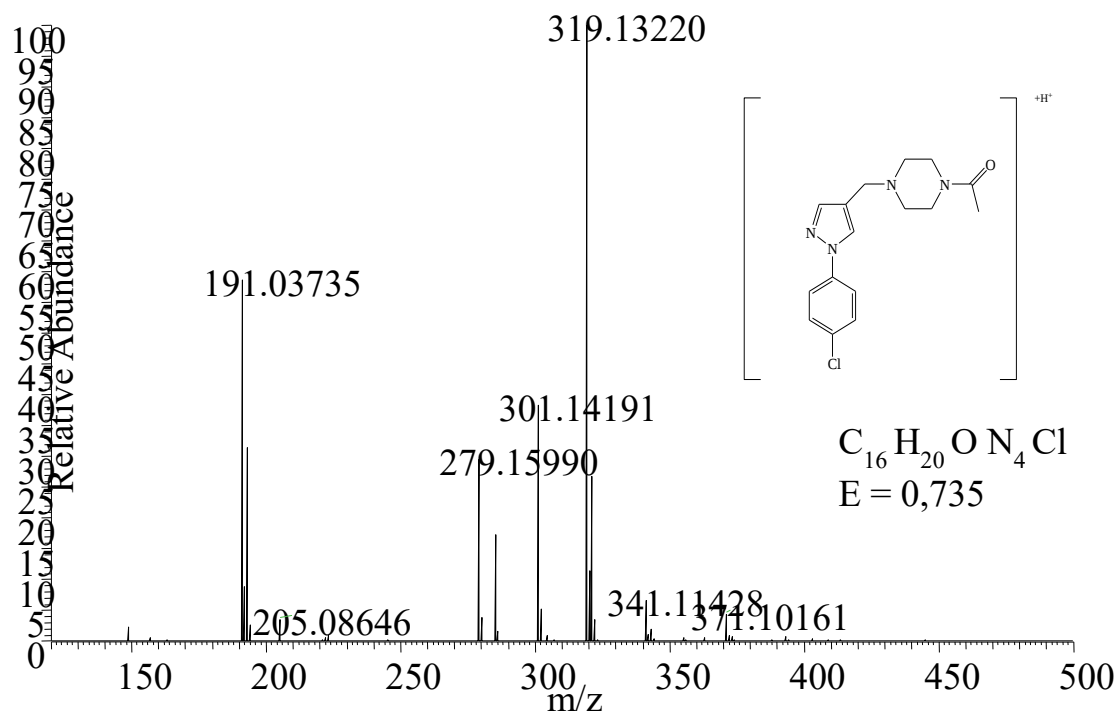
Análises de espectrometria de massas de altíssima resolução foram realizadas para se obter a fórmula molecular do metabólito e confirmar a sua estrutura. No espectro, figura 24, nota-se majoritariamente o íon m/z 335,12713 correspondente ao *N*-óxido e fórmula molecular $C_{16}H_{20}O_2N_4Cl$ com erro de 0,596 ppm. Já a análise do composto LQFM 030 $[M+H]^+$ revelou massa de m/z 319,13220, erro de 0,735 ppm ($C_{16}H_{20}ON_4Cl$) (Fig 25). A fragmentação EM/EM revelou o fragmento m/z 191, referente ao anel A e B da molécula (cloro-fenilpiperazínico) para o metabólito (Anexo G). Isso vai ao encontro dos resultados obtidos por RMN que indicam não haver ocorrido modificações nessa subunidade da molécula. Dessa forma, acredita-se que a biotransformação do LQFM 030 com *Mortierella isabellina* tenha produzido um metabólito *N*-óxido (Fig. 26).

Figura 24 - Espectro de massas do Labiocon 382.

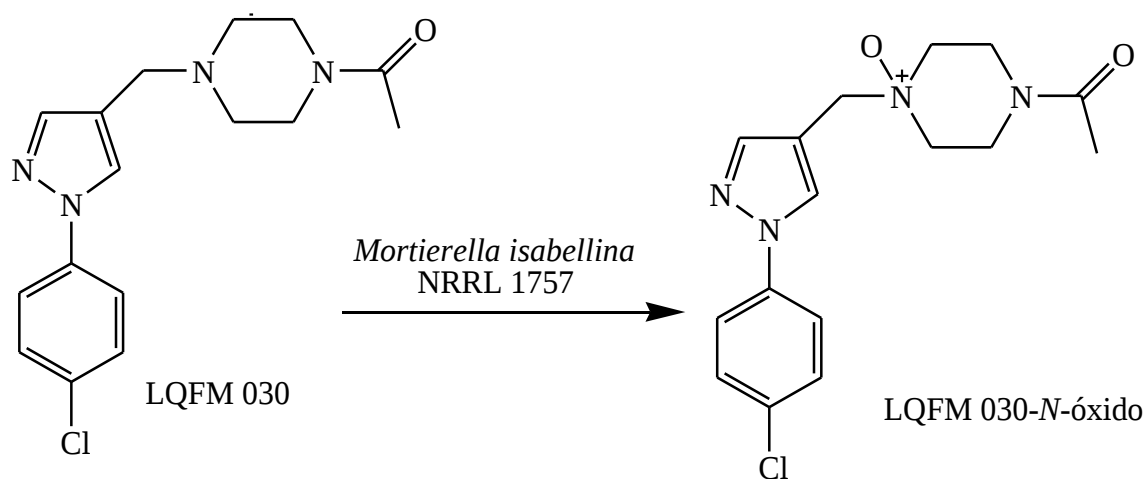


Fonte: Autor.

Figura 25 - Espectro de massas do LQFM 030.



Fonte: Autor.

Figura 26 - Biotransformação do LQFM 030 utilizando *Mortierella isabellina*.

Fonte: Autor.

Vários estudos demonstram a formação de *N*-óxidos em moléculas que possuem o anel piperazínico, tanto em biotransformações *in vivo* como *in vitro*. Rose e Castagnoli (1983) relataram a ocorrência do metabólito *N*-óxido da clorpromazina em microsomas de fígado de rato; também relatam a ciproheptadina *N*-óxido como sendo o metabólito majoritário encontrado na urina de cães.

A clozapina e olanzapina são fármacos antipsicóticos que possuem em sua estrutura o anel piperazínico. Estudos relatam que estes fármacos são metabolizados principalmente a *N*-óxidos em sua porção piperazínica em ensaios *in vivo* e *in vitro*. (LIN *et al.*, 1996; RING *et al.*, 1996).

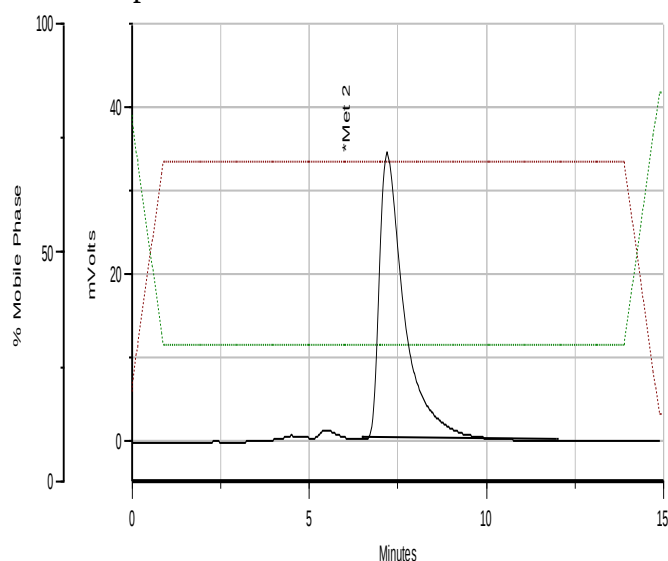
A influência do citocromo P450 na formação da bupirona *N*-óxido em microsomas hepáticos humanos foi investigada por Zhu e colaboradores (2005). Vários inibidores de diferentes isoformas do CYP foram utilizados e como resultado observou-se uma redução expressiva na formação do metabólito bupirona *N*-óxido quando utilizado o cetoconazol como inibidor da CYP 3A4.

As biotransformações utilizando fungos filamentosos também são capazes de formar *N*-óxidos. A utilização de *Cunninghamella elegans* na biotransformação da mirtazapina gerou o metabólito mirtazapina *N*-óxido (MOODY *et al.*, 2002).

Moussa e colaboradores (1997) relatam a bioconversão da timoxamina em desacetiltimoxamina (DAT) por *Mucor rouxii* e posteriormente a DAT *N*-óxido pelo microrganismo *Mortierella isabellina*, o mesmo utilizado neste estudo.

Para identificar e verificar a presença do Labiocon 382 no meio reacional, este depois de purificado, foi analisado por CLAE para comparação do seu tempo de retenção com os metabólitos 1 e 2 já identificados por cromatografia. O resultado da análise indica que o Labiocon 382 se refere ao metabólito 2 encontrado nos meios de incubação. (Fig.27)

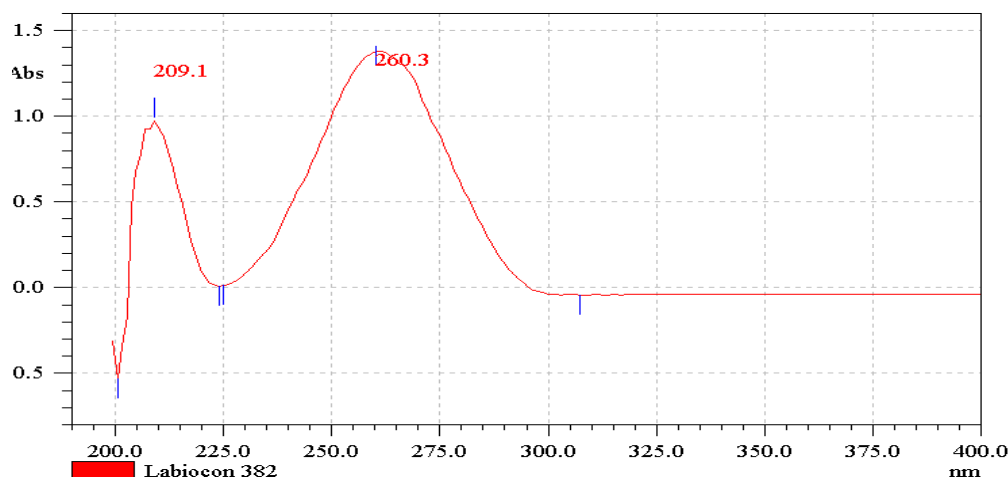
Figura 27 - Perfil cromatográfico do Labiocon 382. Tempo de retenção observado foi 7,19 minutos o mesmo observado para o metabólito 2.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson[®], equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema gradiente 3.

O espectrograma obtido para o Labiocon 382 (Fig. 28) evidencia o comprimento de onda em 260 nm como o de absorção máxima desse composto, sem diferenças significativas comparado ao LQFM 030.

Figura 28 - Espectrograma na região UV do produto Labiocon 382 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.



Fonte: Autor. Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV Spectrometer

A formação de metabólitos *N*-óxidos de fármacos já foi bastante investigada e a participação da enzima flavinamonooxigenase (FMO) já foi definida (LAMBERT *et al.*, 1989; ZIEGLER, 1990).

A biotransformação do fármaco antipsicótico perazina utilizando microsomas hepáticos e enzimas CYP recombinantes demonstraram o envolvimento da enzima FMO na formação do metabólito perazina-*N*-óxido. Inibidores da FMO, como o metimazol, foram utilizados. A incubação com inibidores da CYP (cetoconazol a 4 μ M) também foi realizada e não foi observado inibição. (STORMER *et al.*, 2000)

Porém, os resultados obtidos na seção 4.1.5.2 indicam que o CYP 3A pode estar envolvido na formação do metabólito LQFM 030-*N*-óxido, uma vez que a adição de cetoconazol (inibidor da CYP) diminuiu a formação do metabólito. Koyama e colaboradores (1996) comprovaram o envolvimento do CYP na formação do metabólito *N*-óxido da mianserina, utilizando a troleandomicina como um inibidor do CYP 3A.

Pirmohamed e colaboradores (1995) estudaram a formação do metabólito clozapina *N*-óxido *in vitro* utilizando microsomas hepáticos. O cetoconazol foi utilizado como um inibidor da CYP450 isoforma 3A4, e foi observado uma redução de 50% na formação do metabólito

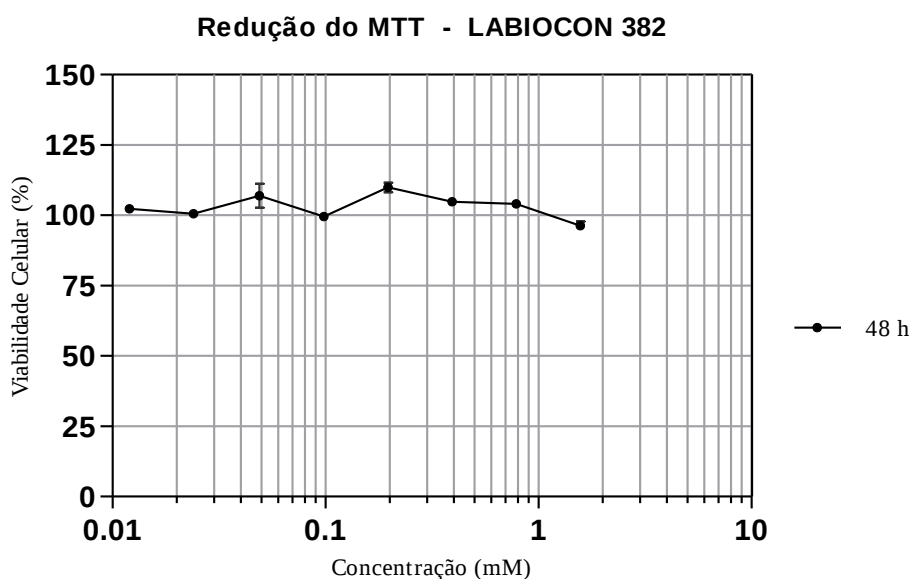
quando utilizado 39 μM de inibidor. O LQFM 030-*N*-óxido (metabólito 2) biotransformado pela *Mortierella isabelina* teve uma redução de aproximadamente 94% quando utilizado 10 mg/100mL de inibidor (188 μM) o que indica que o LQFM 030 possivelmente é metabolizado a LQFM 030 *N*-óxido através da isoforma 3A4 do CYP450.

Citotoxicidade do metabólito Labiocon 382 em ensaio de redução do MTT

Para avaliar a citotoxicidade do metabólito Labiocon 382, foi realizado o ensaio de redução do MTT, frente a linhagem leucêmica K-562, no intervalos de tempo de 48 horas de exposição, em diferentes concentrações (1,568 – 0,012 mM). O gráfico 6 representa os resultados do teste de redução do MTT.

Os resultados demonstraram viabilidade celular aproximadamente igual ou maior que 100% para todas as concentrações do composto testadas, dessa forma não foi possível o cálculo do IC_{50} o que indica que o LQFM030 *N*-óxido não possui citotoxicidade celular para células de K-562 pelo teste de redução do MTT. Outros ensaios devem ser realizados a fim de avaliar sua atividade frente a outras linhagens de células.

Gráfico 6 - Viabilidade celular da linhagem leucêmica K-562, após 48h de incubação, frente ao composto Labiocon 382.



4.2 LQFM 018

Avaliação da morfologia e seleção das cepas

As cepas utilizadas na triagem para o LQFM018 foram as mesmas utilizadas para o LQFM 030, sendo utilizado também o mesmo meio de cultura. Dessa forma o aspecto morfológico das cepas foi semelhante àquele apresentado no Quadro 2, na seção 4.1.1., p. 48.

A fim de verificar o perfil de biotransformação das cepas utilizadas, alíquotas do meio de incubação foram retiradas a cada 24 horas e analisadas através de CCD (Fase móvel: AcOEt:MeOH, 50:50).

Apenas o *Aspergillus candidus* ATCC 2023 não foi capaz de biotransformar o LQFM 018. Todas as outras cepas utilizadas na triagem produziram metabólitos menos polares que o produto de partida que não foi totalmente consumido ao final do tempo de incubação (96 horas). O quadro 4 apresenta os resultados da triagem com as cepas utilizadas e os metabólitos formados.

A cepa *Mortierella isabellina* foi selecionada para incubações em maior escala com o objetivo de se comparar os metabólitos produzidos através de bioconversões com o LQFM 030 e com o LQFM 018.

Quadro 4 - Análise de CCD da biotransformação do LQFM 018 após 96 horas de incubação com diferentes microrganismos em meio de glicose, 27°C e 200 r.p.m.

Microrganismo	Met. 1 (Rf:0,26)	Met. 2 (Rf:0,33)	Met. 3 (Rf:0,65)	Met. 4 (Rf:0,70)	Met. 5 (Rf:0,75)	LQFM 018 (Rf:0,81)
<i>Absidia blaklesleana</i> ATCC 10148b	+	-	+	+	-	+
<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023	-	-	-	-	-	+
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	+	-	-	-	+	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	+	-	-	-	-	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	-	-	-	+	-	+
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	-	-	-	+	-	+
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	-	-	-	+	-	+
<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	+	-	-	+	-	+
<i>Mucor griseocyanos</i> ATCC 1207a	-	+	-	+	-	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	+	-	-	-	-	+

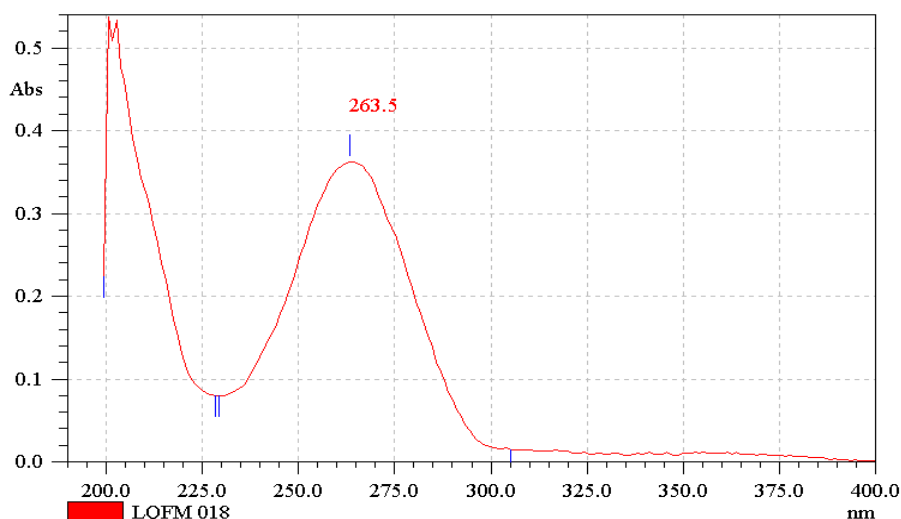
Legenda: O símbolo (-) indica ausência e (+) presença dos metabólitos. A fase móvel utilizada foi AcOEt:MeOH, na proporção 50:50, fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,25cm de espessura e visualização em UV 254 nm.

Fonte: Autor.

Desenvolvimento de metodologia analítica (CLAE) para monitoramento da bioconversão.

Para a determinação do máximo de absorção na região do UV-visível o LQFM 018 foi analisado em espectrofotômetro Cintra 10^e UV-visible Spectrometer. O espectro na região do UV mostrou absorção máxima em 263 nm (Fig. 29), o mesmo observado para o LQFM 030 (Fig. 17, p. 50).

Figura 29 - Espectrograma na região do UV do substrato LQFM 018 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.



Fonte: Autor. Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV-visible Spectrometer

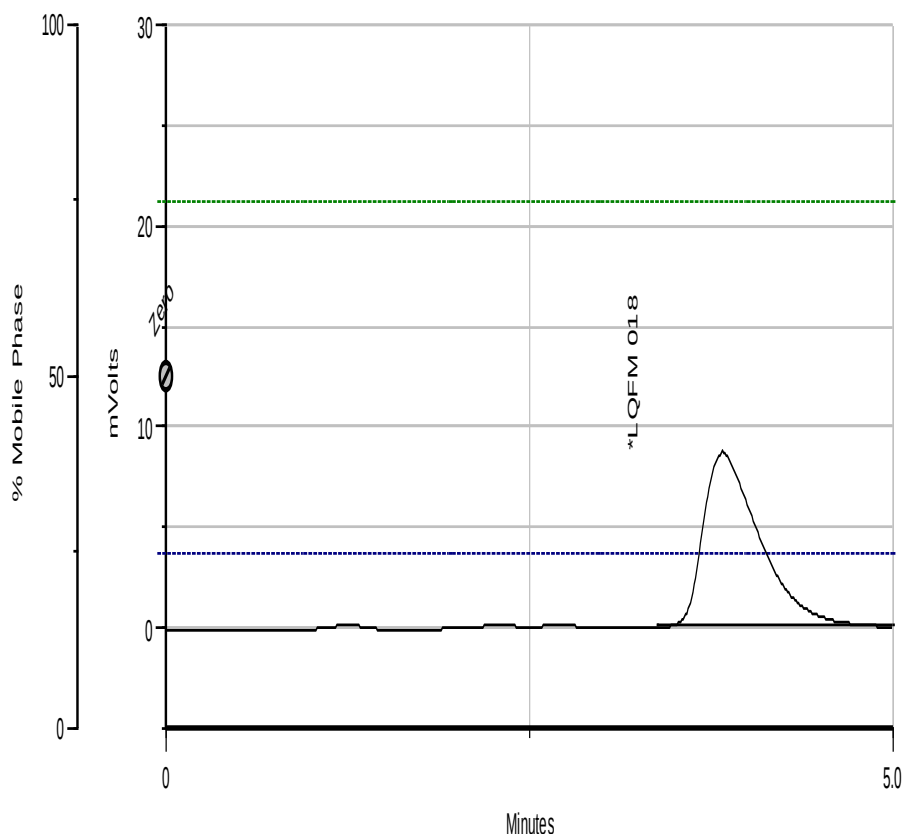
A metodologia utilizada para monitoramento do LQFM 030 (Seção 3.5.3.1, p.41) foi testada para o composto LQFM 018 e seus metabólitos. Contudo, não ocorreu uma boa resolução entre os picos e o método foi alterado, retirando o gradiente de solvente, utilizando um método isocrático e aumentando a vazão. Outros três sistemas foram testados:

- Sistema isocrático 1: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B) (80:20), vazão 1,0 mL/min.
- Sistema isocrático 2: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B) (70:30), vazão 1,0 mL/min.
- Sistema isocrático 3: Fase móvel metanol (Bomba A) e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02M (Bomba B) (75:25) vazão 1,2 mL/min.

O método que utilizou uma proporção de 75:25 para metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,02 M, respectivamente, e vazão 1,2 mL/min foi o mais adequado,

devido à melhor resolução entre os picos sendo selecionado para monitoramento das reações (Sistema isocrático 3) (Fig 30).

Figura 30 - Perfil cromatográfico do substrato LQFM 018 (0,25 mg/mL em metanol).



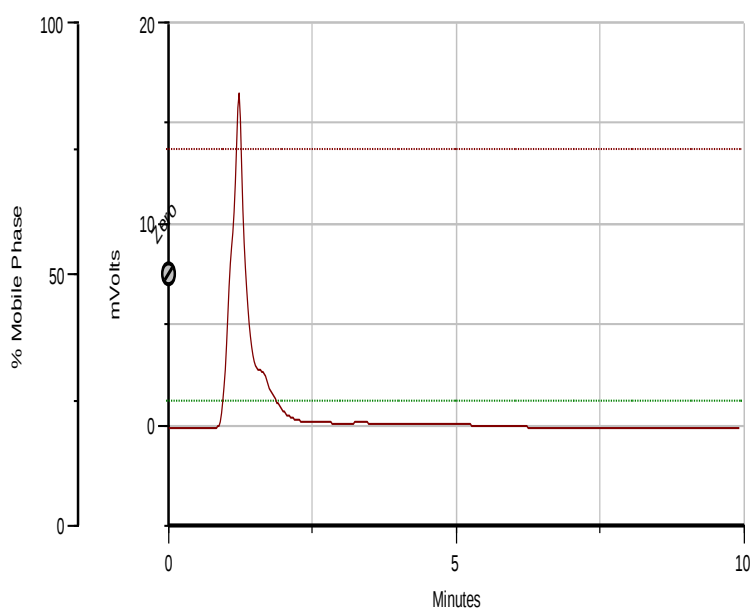
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema isocrático 3.

Biotransformação em escala semipreparativa do LQFM 018

Na incubação do LQFM 018 com a cepa *Mortierella isabellina* NRRL 1757, verificou-se a produção de dois metabólitos quando analisados por CCD e CLAE.

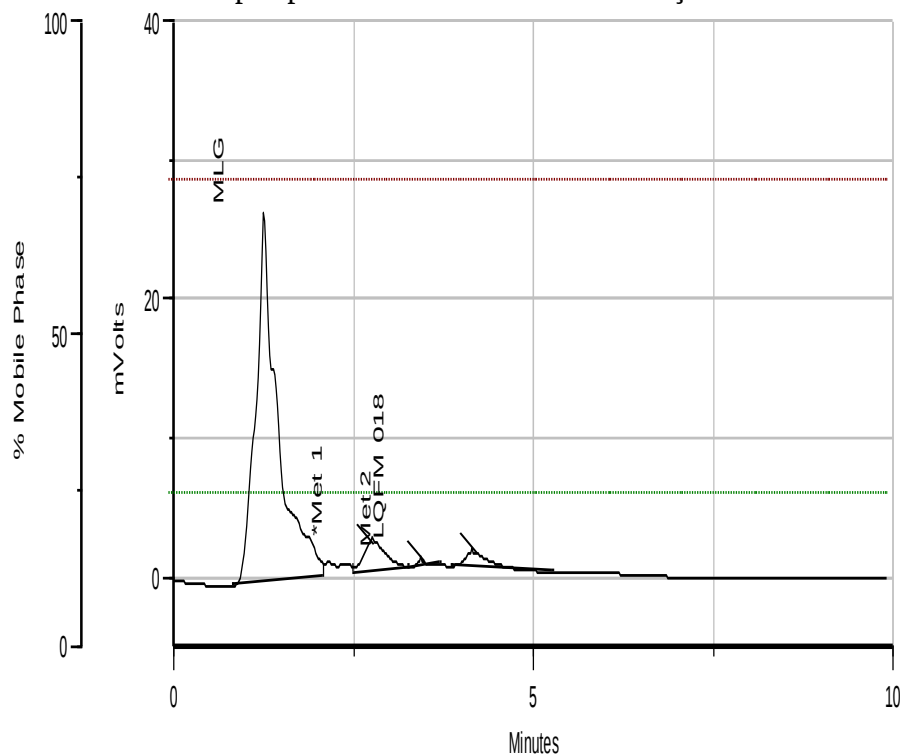
O meio de glicose (MLG) apresentou um pico em 1,5 minutos, não influenciando na identificação dos metabólitos (Fig. 31). A análise do meio de incubação no tempo de 96 horas por CLAE mostra a presença de dois metabólitos mais polares que o LQFM 018. (Fig 32).

Figura 31 - Perfil cromatográfico do branco de incubação contendo MLG e *Mortierella isabellina* NRRL 1757 após período de 96 horas de incubação.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema isocrático 3.

Figura 32 - Perfil cromatográfico de biotransformação do LQFM 018 com *Mortierella isabellina* NRRL 1757 após período de 96 horas de incubação.

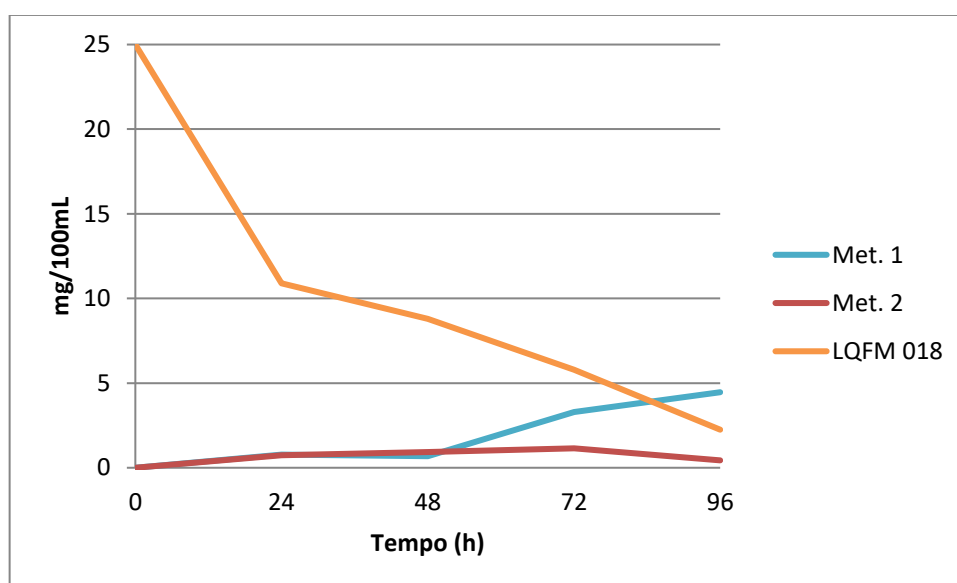


Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema isocrático 3.

Cinética de formação dos metabólitos do LQFM 018.

A cinética de formação dos metabólitos foi construída a partir das análises realizadas em CLAE. No gráfico 7 é possível observar o decaimento da concentração de LQFM 018 e a formação dos metabólitos já nas primeiras 24 horas de incubação. O metabólito 1 tem pico de concentração do tempo de 96 horas. Já o metabólito 2 tem seu máximo de concentração no tempo de 72 horas e depois sofre uma diminuição (cerca de 60%), sugerindo sua degradação ao longo do tempo. Através da cinética de formação podemos inferir que o melhor tempo para finalizar a reação a fim de se obter maior concentração do metabólito 2 seria 72 horas. É necessário verificar se a concentração do metabólito 1 continua a aumentar ao longo do tempo de incubação para se afirmar o melhor momento para finalizar a reação.

Gráfico 7 - Cinética de biotransformação do LQFM 018 por *Mortierella isabellina* NRRL 1757.



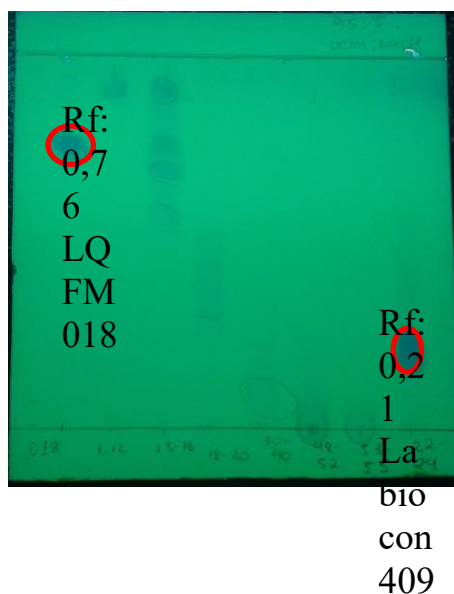
Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 μ) e sistema isocrático 3.

Purificação e caracterização estrutural do metabólito

Para a purificação dos metabólitos foi utilizada coluna cromatográfica de vidro (22 cm x 2,5 cm) com sílica gel 60 (Merck) como fase estacionária. A fase móvel utilizada foi DCM (100%), seguido de uma proporção DCM:MeOH (70:30) e finalizando com metanol (100%). Foi possível a purificação de 10 mg de metabólito puro quando se partiu de 100 mg de extrato

bruto (Fig. 33). O metabólito foi denominado Labiocon 409 e caracterizado por ^1H e ^{13}C RMN e FTICR-MS. Os outros produtos purificados não foram obtidos em quantidades suficientes para sua caracterização.

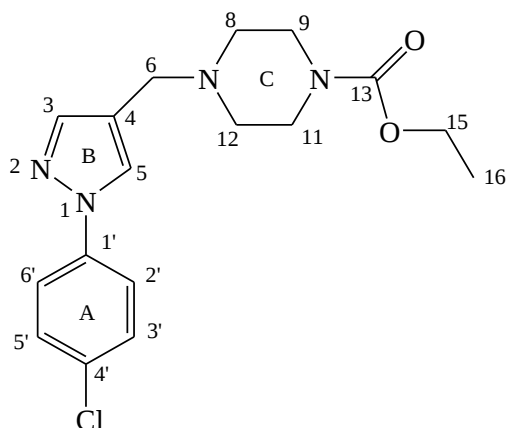
Figura 33 - CCD da purificação do extrato bruto de incubação do LQFM 018 com *Mortierella isabellina*. Fase móvel: DCM:MeOH (95:05).



Fonte: Autor.

As análises de RMN ^1H e ^{13}C foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o ^1H e 75,46 MHz para o ^{13}C). Os espectros foram registrados em CD_3OD , com TMS como padrão interno, sendo o espectro RMN do padrão (LQFM 018) também registrado para fins de comparação. A tabela 5 demonstra as atribuições dos deslocamentos químicos obtidos do espectro de ^1H e ^{13}C RMN do LQFM 018 (Fig. 34) e seu metabólito.

Figura 34 - Estrutura molecular do LQFM 018 com numeração dos átomos.



Fonte: Autor

Tabela 5 - Sinais evidenciados no espectro de ^1H e ^{13}C RMN do LQFM 018 e Labiocon 409.

Posição	LQFM 018		Labiocon 409	
	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C
3	7,68 (<i>d</i> , 0,6)	143,6	7,87 (<i>d</i> , 0,6)	144,9
4	-	120,1	-	113,0
5	8,17 (<i>d</i> , 0,6)	129,3	8,42 (<i>d</i> , 0,6)	132,0
6	3,54 (<i>s</i>)	53,1	4,43 (<i>s</i>)	65,8
8	2,47 (<i>tl</i> , 5,1)	53,4	3,09 (<i>dl</i> , 12,0)	63,1
9	3,49 (<i>tl</i> , 4,7)	44,5	4,05 (<i>dl</i> , 13,0)	39,0
11	3,49 (<i>tl</i> , 4,7)	44,5	3,60 (<i>sl</i>)	39,0
12	2,47 (<i>tl</i> , 5,1)	53,4	3,40 (<i>dt</i> , 12,0; 3,7)	63,1
13	-	157,3	-	156,8
14	4,11 (<i>q</i> , 7,1)	62,9	4,15 (<i>q</i> , 7,0)	62,9
15	1,24 (<i>t</i> , 7,1)	15,2	1,26 (<i>t</i> , 7,0)	14,5
1'	-	140,1	-	139,6
2'	7,72 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,4	7,78 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,5

3'	7,46 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	131,1	7,51 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	130,6
4'	-	133,1	-	133,7
5'	7,46 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	131,1	7,51 (<i>dd</i> , 9,1; 3,0)	130,6
6'	7,72 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,4	7,78 (<i>dd</i> , 9,8; 2,2)	121,5

Legenda: ^1H e ^{13}C RMN baseados em ^1H - ^{13}C HMBC. Dados obtidos em CD_3OD em 500 MHz e 125 MHz. Multiplicidades: singleto (s), singleto largo (sl), dubleto (d), dubleto largo (dl), duplo dubleto (dd), tripleto (t), tripleto largo (tl), quadrupletto (q) multipletto (m).

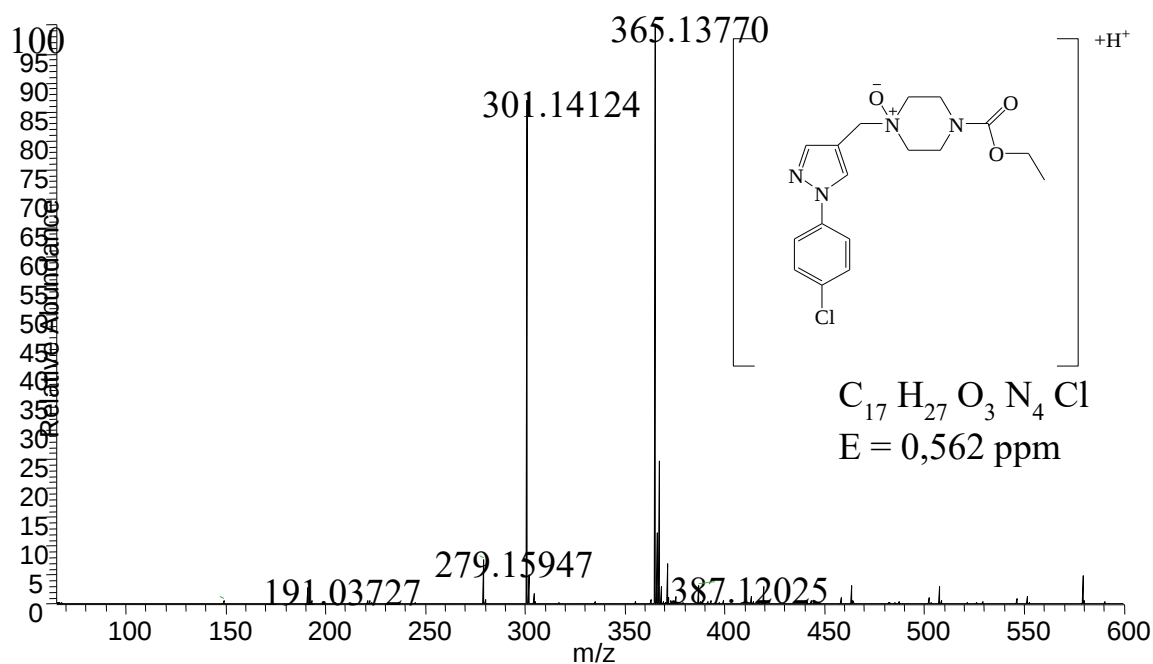
Fonte: Autor.

A quantidade de hidrogênios referente ao espectro do Labiocon 409 se mantém quando comparada ao LQFM 018, porém desdobramentos de sinais podem ser observados na porção referente ao anel piperazínico, sugerindo uma perturbação do ambiente químico dessa parte da molécula (Anexos H, I, J, K, L e M).

Foram observados deslocamentos dos sinais referentes aos hidrogênios nas posições 6, 8 e 12. Indicando uma possível alteração no nitrogênio do anel piperazínico. Possivelmente uma *N*-oxidação, já que foi verificado o mesmo perfil para o metabólito do LQFM 030.

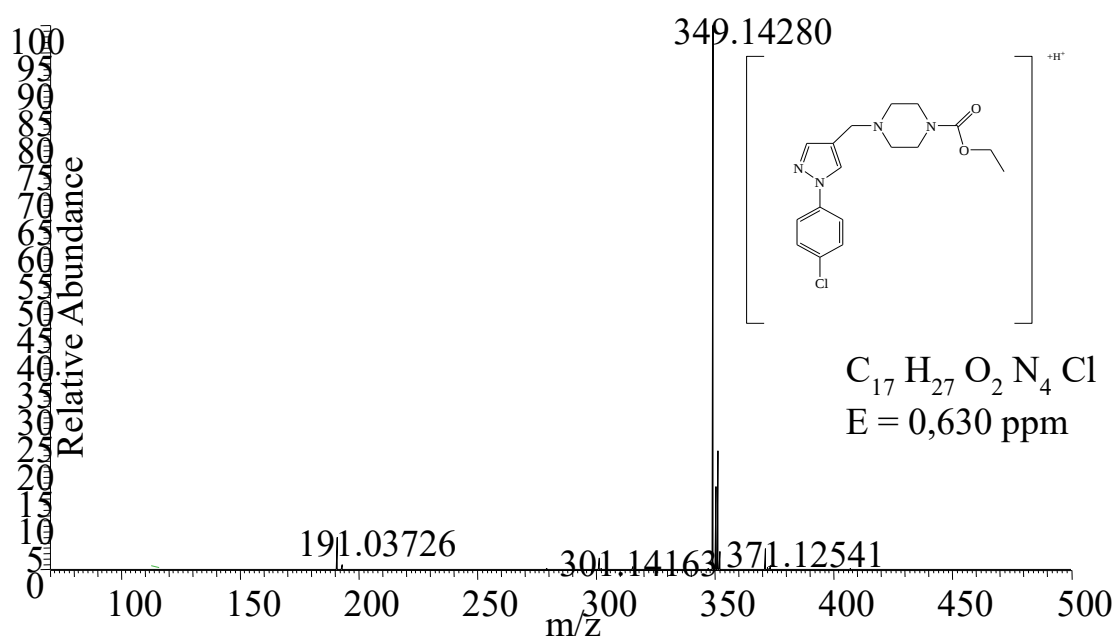
Fez-se necessário realizar análise de massas para se obter a fórmula molecular do metabólito e confirmar a sua estrutura. Os resultados demonstraram o valor referente à m/z 365.13770, fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N}_4\text{Cl}$ com erro de: 0,562 ppm (Fig. 35). A massa obtida indica o aumento referente a um oxigênio $[\text{MH}+16]^+$ quando comparado à massa obtida para o padrão. A análise do LQFM 018 $[\text{MH}]^+$ resultou em valores de m/z 349,14280 com erro de 0,630 ppm ($\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_4\text{Cl}$) (Fig.36). O fragmento m/z 191 obtido através da fragmentação EM/EM para ambos os compostos refere-se ao anel A e B da molécula (cloro-fenilpiperazínico) (ANEXO N). Dessa forma, verifica-se que não ocorreram modificações nesses anéis. Acredita-se que o metabólito se refira a um *N*-óxido do LQFM 018, resultado semelhante ao obtido para o LQFM 030, uma vez que a diferença entre os dois compostos se resume a presença do grupamento etoxila na porção terminal da molécula. (Fig 23 e 34)

Figura 35 - Espectro de massas do Labiocon 409



Fonte: Autor.

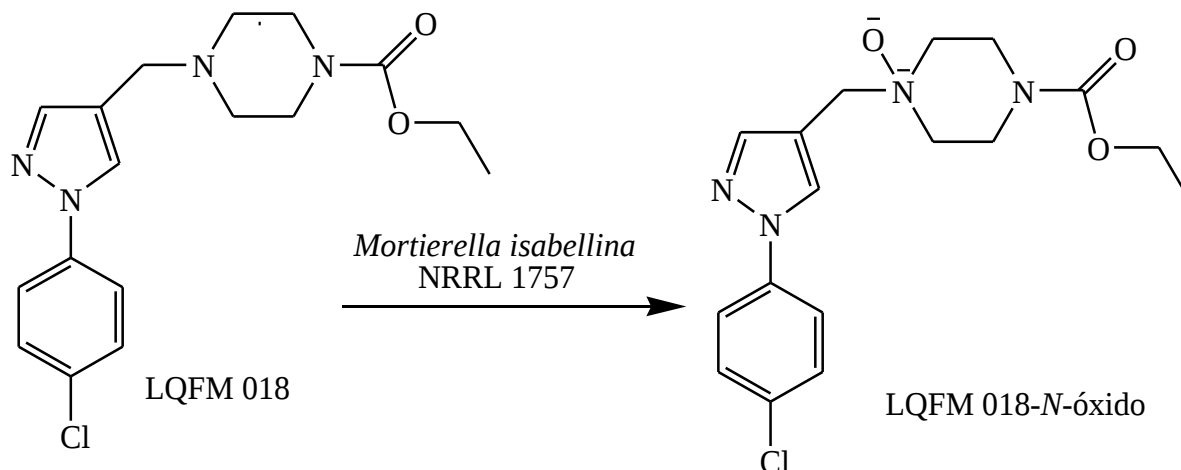
Figura 36 - Espectro de massas do LQFM 018



Fonte: Autor

A partir dos resultados obtidos, podemos inferir que o perfil metabólico do LQFM 018 seria semelhante ao do LQFM 030, sendo o sistema CYP 450 da cepa *M. isabellina* o responsável pela reação de N-oxidação no anel piperazínico (Fig; 37).

Figura 37 - Biotransformação do LQFM 018 por *Mortierella isabellina*.

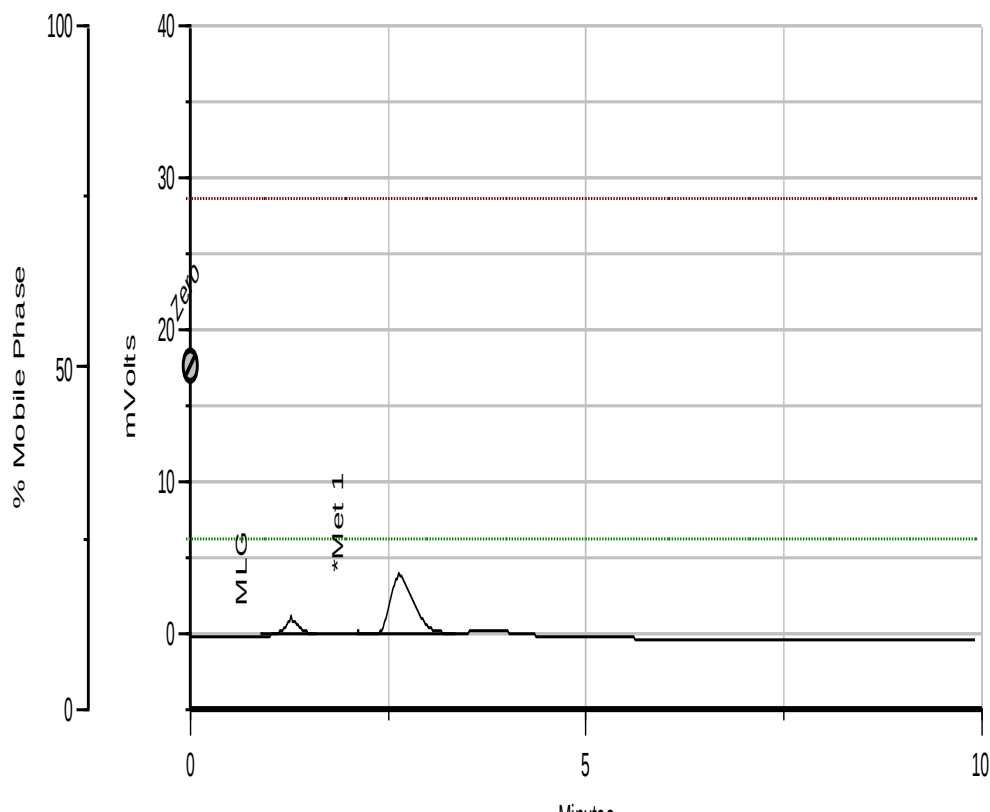


Fonte: Autor

O Labiocon 409 foi analisado por CLAE para comparação do seu tempo de retenção com os metabólitos 1 e 2 anteriormente detectados nas análises de CLAE, a fim de identificar e verificar sua presença no meio reacional.

O resultado da análise indica que o Labiocon 409 se refere ao metabólito 1 encontrado nos meios de incubação. Pequenas concentrações de componentes do meio de cultura também foram encontradas, demonstrando a necessidade de outra purificação do Labiocon 409 (Fig.38).

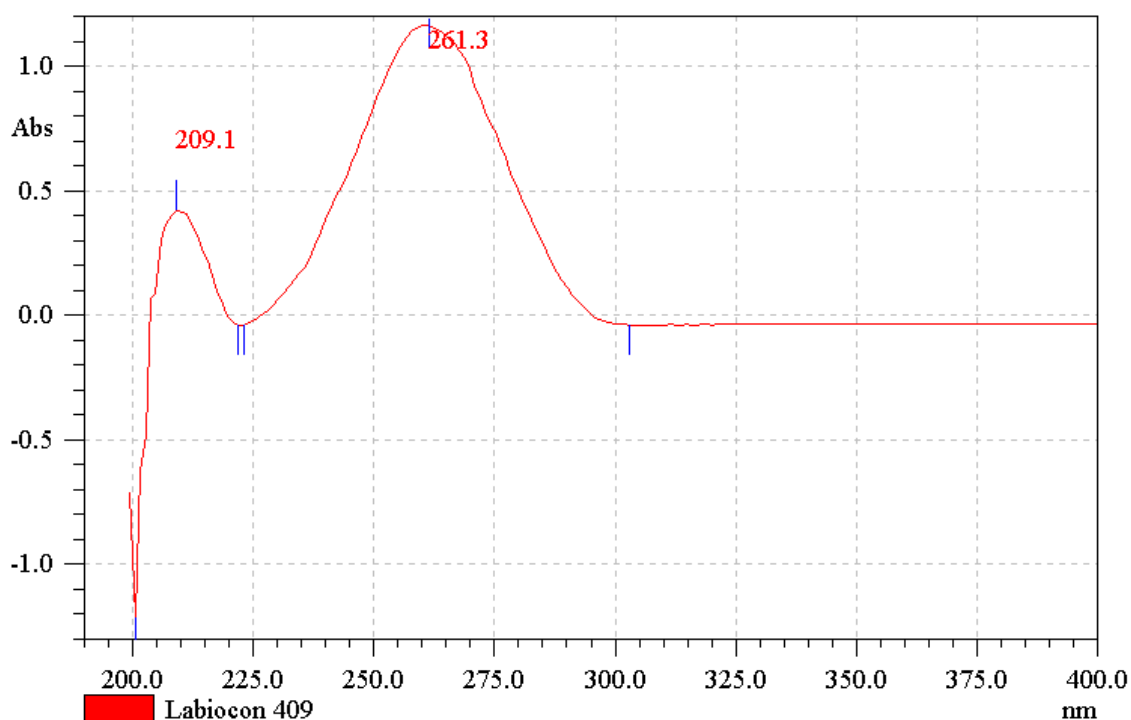
Figura 38 - Perfil cromatográfico do Labiocon 409 utilizando o sistema isocrático 3 e comprimento de onda 263nm. Tempo de retenção observado foi 2,76 minutos o mesmo observado para o metabólito 1.



Fonte: Autor. Análise realizada em cromatógrafo Gilson®, equipado com coluna Lichrospher 100 RP-18 MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µm) e sistema isocrático 3.

O espectrograma obtido para o Labiocon 409 (Fig. 39) evidencia o comprimento de onda de 261 nm como o de absorção máxima desse composto, sem diferenças significativas comparado ao LQFM 018 (Fig. 29, p.70).

Figura 39 - Espectrograma na região UV do produto Labiocon 409 0,01 mg/mL em metanol, na faixa de comprimento de onda de 200,0 a 400,0 nm.



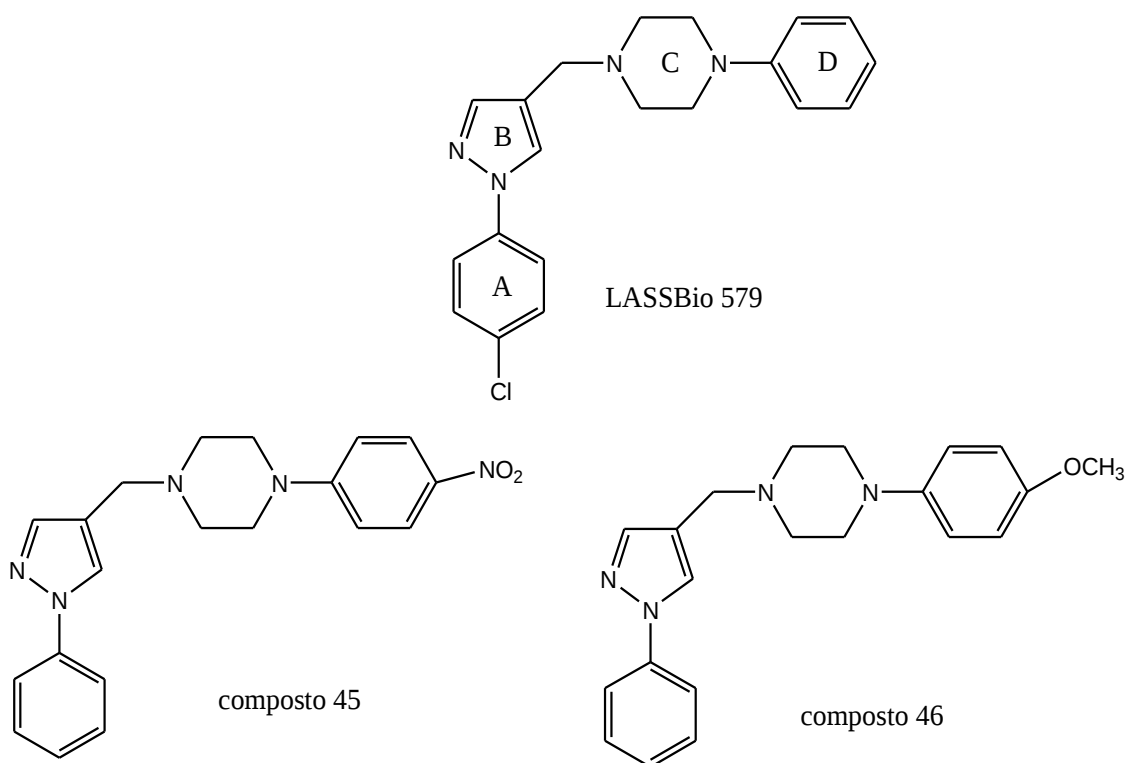
Fonte: Autor. Análise realizada em espectrofotômetro Cintra 10e UV-visible Spectrometer

Estudos com compostos *N*-fenilpirazóis já foram conduzidos no LaBiocon. Gomes (2007) realizou a biotransformação de um composto *N*-fenilpiperazínico denominado LASSBio 579 (Fig. 40). Este potencial candidato a protótipo de fármaco foi desenhado a partir do

antipsicótico clozapina e sua estrutura difere dos candidatos descritos nesse trabalho pela adição de um grupamento fenil ligado à porção piperazínica. As mesmas cepas foram empregadas na etapa de triagem na biotransformação do LASSBio 579, LQFM 018 e LQFM 030, porém foi possível observar uma diferença na variedade de metabólitos formados, provavelmente devido à modificações na interação com a enzima fúngica decorrente das modificações estruturais nas moléculas.

Silva (2010) realizou a biotransformação de outros dois compostos *N*-fenilpirazóis (44) e (45) desenhados a partir da clozapina e do LASSBio 579 (Fig. 40). As mesmas cepas foram utilizadas e novamente foi observadas diferenças no perfil de biotransformação com o emprego de compostos estruturalmente modificados. O número de metabólitos foi diminuído uma vez que os compostos 44 e 45 tiveram o anel D protegidos.

Figura 40 - Estrutura molecular do LASSBio 579 e dos compostos 45 e 46.

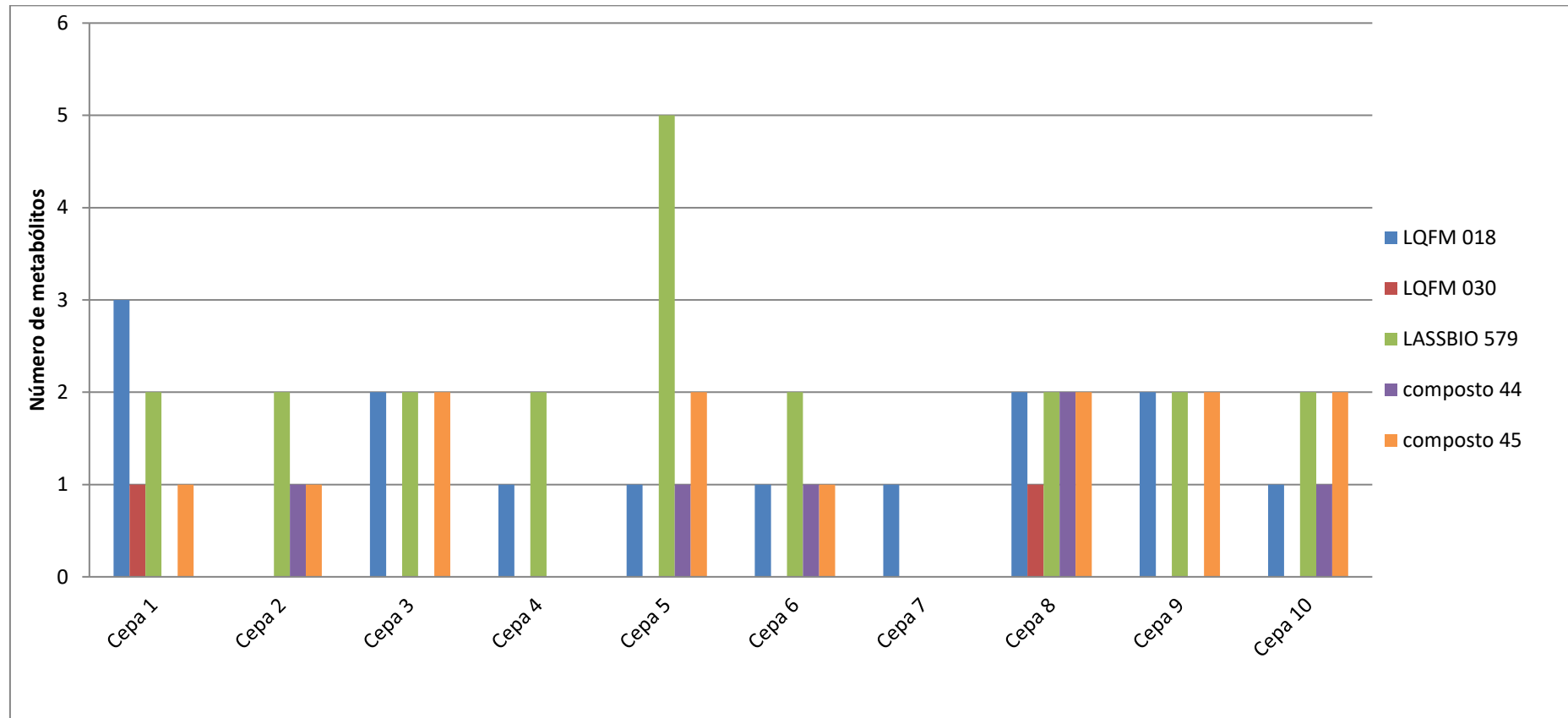


Fonte: Adaptado de Gomes (2007) e Silva (2010)

O gráfico 8 demonstra o número de metabólitos formados por diferentes microrganismos. É possível observar a diferença nos metabólitos produzidos quando o composto tem sua estrutura modificada quanto ao ligante do anel piperazínico. A presença do

grupamento etoxila no LQFM 018 possibilitou um aumento do número de metabólitos formados quando comparado ao LQFM 030, porém ainda menor comparado aos compostos que possuem o anel D.

Gráfico 8 - Comparativo entre metabólitos obtidos no LaBiocon por biotransformação utilizando diferentes cepas.



Fonte: Autor. Legenda: *Absidia blaklesleana* ATCC 10148b (cepa 1), *Aspergillus candidus* ATCC 2023 (cepa 2), *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (cepa 3), *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 (cepa 4), *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 (cepa 5), *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 (cepa 6), *Fusarium roseum* ATCC 14717 (cepa 7), *Mortierella isabellina* NRRL 1757 (cepa 8), *Mucor griseocyanos* ATCC 1207a (cepa 9), *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 (cepa10).

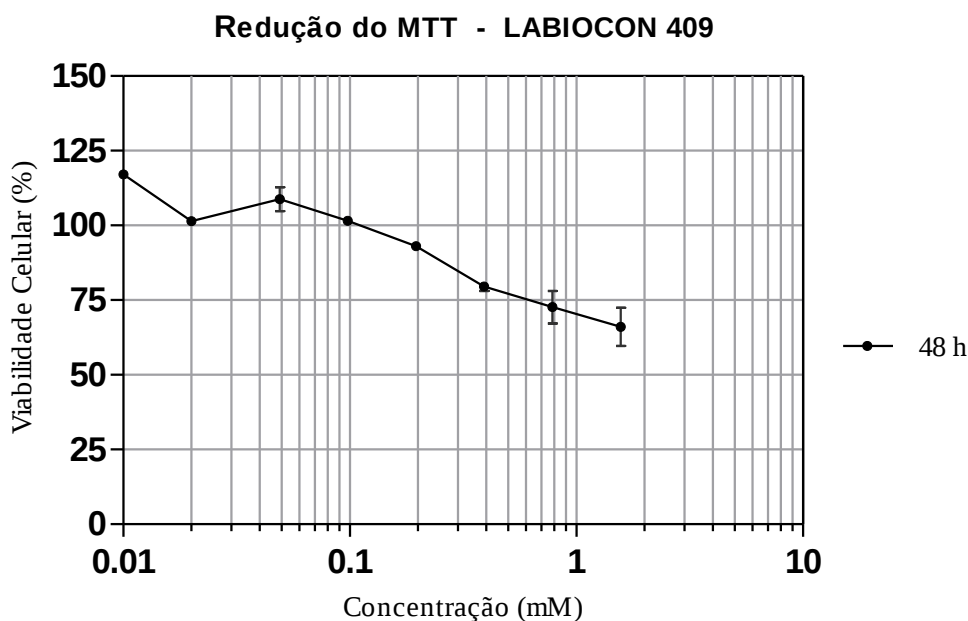
Citotoxicidade do metabólito Labiocon 409 em ensaio de redução do MTT

O ensaio de redução do MTT foi realizado a fim de se avaliar a citotoxicidade do metabólito Labiocon 409 frente a linhagem leucêmica K-562, no intervalos de tempo de 48 horas de exposição, em diferentes concentrações (1,43– 0,011 mM). O gráfico 9 representa os resultados do teste de redução do MTT.

A partir das diferentes concentrações utilizadas não foi possível determinar o IC₅₀ do Labiocon 409 uma vez que a maior concentração do composto testado (1,43 mM) foi responsável por uma viabilidade celular de aproximadamente 66%. Para o cálculo do IC₅₀ testes com maiores concentrações deverão ser realizados.

Ensaios com outras linhagens celulares são necessários para se melhor avaliar o perfil citotóxico do metabólito.

Gráfico 9 - Viabilidade celular da linhagem leucêmica K-562, após 48h de incubação, frente ao composto Labiocon 409.



CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Dentre as dez cepas avaliadas, duas foram capazes de biotransformar o LQFM 030 e nove biotransformaram o LQFM 018.

A cepa *Mortierella isabellina* NRRL 1757 foi selecionada para biotransformação dos compostos LQFM 030 e LQFM 018.

O microrganismo foi capaz de produzir dois metabólitos diferentes verificados nas análises por CLAE para cada substrato utilizado (LQFM 030 e LQFM 018). O metabólito majoritário de cada um dos respectivos substratos foi isolado e identificado como Labiocon 382 e Labiocon 409.

As metodologias em CLAE desenvolvidas para o monitoramento da biotransformação do LQFM 030 e LQFM 018 foram satisfatórias para a separação, identificação e quantificação para análise da cinética da reação.

O processo de purificação por cromatografia em coluna proporcionou o isolamento e purificação dos metabólitos com rendimentos de 10%.

Os metabólitos foram caracterizados por RMN ^1H , ^{13}C e EM, sendo identificados como LQFM 030 *N*-óxido (Labiocon 382) e LQFM 018 *N*-óxido (Labiocon 409).

Foi estabelecido o tempo de 168 horas e a concentração 0,25 mg/mL de substrato como as melhores condições para a obtenção de LQFM 030 *N*-óxido.

O cetoconazol inibiu a produção do metabólito LQFM 030 *N*-óxido, o que pode indicar o envolvimento do CYP 3A na reação de oxidação.

A adição de etanol não induziu a produção do metabólito oxidado, porém foi verificada a formação de novos metabólitos em quantidades insuficientes para purificação e caracterização.

O composto Labiocon 382 não apresentou perfil citotóxico contra células K-562 em ensaios de redução do MTT nas concentrações testadas. O metabólito Labiocon 409 apresentou perfil de aproximadamente 66% de viabilidade celular no ensaio de redução do MTT quando utilizado na maior concentração teste (1,43 mM).

PERSPECTIVAS



PERSPECTIVAS

Realizar ensaios de citotoxicidade dos metabólitos frente a outras linhagens de células.

Realizar testes *in vivo* em camundongos a fim de avaliar os metabólitos formados para comparação com os testes *in vitro*.

Purificação, caracterização e testes de atividade dos outros metabólitos formados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 359-74, 1999.

ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 5-6, p. 737-47, 2001.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella*--a microbial model for drug metabolism studies--a review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16-29, 2009.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 128-45, 2006.

BERRIE, J. R.; WILLIAMS, R. A.; SMITH, K. E. Microbial transformations of steroids-XI. Progesterone transformation by *Streptomyces roseochromogenes*-purification and characterisation of the 16 α -hydroxylase system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, n. 3-4, p. 153-65, 1999.

CARNEIRO, E. O.; ANDRADE, C. H.; BRAGA, R. C.; TORRES, A. C.; ALVES, R. O.; LIAO, L. M.; FRAGA, C. A.; 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. 3734-6, 2010.

CARVALHO, F. S. **Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

FOYE, W. O.; SENGUPTA, S. K. Cancer Chemoterapy. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L., *et al* (Org.). **Principles of Medicinal Chemistry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2002.

GHOSAL, A.; RAMANATHAN, R.; YUAN, Y.; HAPANGAMA, N.; CHOWDHURY, S. K.; KISHNANI, N. S.; ALTON, K. B. Identification of human liver cytochrome P450 enzymes involved in biotransformation of vicriviroc, a CCR5 receptor antagonist. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 12, p. 2186-95, 2007.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOMES, T. C. F. **Bioconversão do derivado N-fenilpiperazínico LaSSBio 579, um potencial candidato a protótipo de fármacos**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

GOMES, T. F.; POMPEU, T. E.; RODRIGUES, D. A.; NOEL, F.; MENEGATTI, R.; ANDRADE, C. H.; SABINO, J. R.; GIL, E. S.; DALLA COSTA, T.; BETTI, A. H.; ANTONIO, C. B.; RATES, S. M.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J.; DE OLIVEIRA, V. Biotransformation of LASSBio-579 and pharmacological evaluation of p-hydroxylated metabolite a N-phenylpiperazine antipsychotic lead compound. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 214-21, 2013.

GURRAM, S. P.; KOLLU, N. R.; SIVADEVUNI, G.; SOLIPURAM, M. R. Biotransformation of albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: influence of incubation time, media, vitamins and solvents. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 205-215, 2009.

HE, X.; WANG, X.; LIU, B.; SU, L.; WANG, G.; QU, G.; YAO, Z.; LIU, R. H.; YAO, X. Microbial transformation of methyl protodioscin by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, n. 1-3, p. 33-40, 2005.

HOLLAND, H. L.; BERGEN, E. J.; CHENCHAIAH, P. C.; KHAN, S. H.; MUNOZ, B.; NINNISS, R. W.; RICHARDS, D. Side chain hydroxylation of aromatic compounds by fungi.: 1. Products and stereochemistry. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 3, p. 502-507, 1987.

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.

KAVITHA, K.; VIDYAVATHI, M.; ASHA, S.; BINDU, T. V. L. H. Microbial Metabolism and Inhibition Studies of Phenobarbital. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 1, p. 62-68, 2012.

KITADA, M.; TANEDA, M.; ITAHASHI, K.; KAMATAKI, T. Four forms of cytochrome P-450 in human fetal liver: purification and their capacity to activate promutagens. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 82, n. 4, p. 426-32, 1991.

KOLEK, T.; MILECKA, N.; SWIZDOR, A.; PANEK, A.; BIALONSKA, A. Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212. Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7alpha- as well as 7beta-hydroxylations of 5-ene substrates. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 15, p. 5414-22, 2011.

KOYAMA, E.; CHIBA, K.; TANI, M.; ISHIZAKI, T. Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the stereoselective metabolism of mianserin enantiomers. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 1, p. 21-30, 1996.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 5, p. 397-411, 2001.

LABRE, L. V. Q. **Avaliação pré-clínica do perfil farmacocinético do protótipo antitumoral LQFM 030 em roedores**. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

LAMBERT, C.; PARK, B. K.; KITTERINGHAM, N. R. Activation of mianserin and its metabolites by human liver microsomes. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 17, p. 2853-8, 1989.

LIN, G.; MCKAY, G.; MIDHA, K. K. Characterization of metabolites of clozapine *N*-oxide in the rat by micro-column high performance liquid chromatography/mass spectrometry with electrospray interface. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 11, p. 1561-77, 1996.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 35, n. 5, p. 361-90, 1998.

MAATOOQ, G. T.; ROSAZZA, J. P. Metabolism of daidzein by *Nocardia species* NRRL 5646 and *Mortierella isabellina* ATCC 38063. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1007-11, 2005.

MACHADO, A. E. D. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.

MANDAL, D.; AHMAD, A.; KHAN, M. I.; KUMAR, R. Biocatalytic transformation of cyclohexanone by *Fusarium* sp. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 181, n. 1-2, p. 237-241, 2002.

MENEGATTI, R. **Uso de novos derivados ((fenil-1H-pirazol-4-il)metil)piperazínicos como anti-tumorais, composições farmacêuticas contendo os mesmos e processos de preparação**. Relatório enviado ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) para requerimento de patente, protocolo nº 0000221106814546, abril 2011.

MEYER, W.; GAMS, W. Delimitation of *Umbelopsis* (Mucorales, Umbelopsidaceae fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data. **Mycological Research**, v. 107, n. Pt 3, p. 339-50, 2003.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; FU, P. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 11, p. 1274-9, 2002.

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. 301-10, 1997.

NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D. J.; GUENGERICH, F. P.; ESTABROOK, R. W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSALUS, I. C.; GOTOH, O.; ET AL. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA and Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-51, 1993.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PARSHIKOV, I. A.; FREEMAN, J. P.; LAY, J. O., JR.; BEGER, R. D.; WILLIAMS, A. J.; SUTHERLAND, J. B. Microbiological transformation of enrofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2664-7, 2000.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2009.

PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; HAKKOLA, J.; HONKAKOSKI, P.; HUKKANEN, J.; RAUNIO, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 10, p. 667-715, 2008.

PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; UUSITALO, J.; RAUTIO, A.; RAUNIO, H. Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of in vitro investigations. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n. 3, p. 167-75, 2005.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C. MICROBIOLOGICAL OXYGENATION OF STEROIDS AT CARBON 11. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 7, p. 1871-1872, 1952.

PETKOVITS, T.; NAGY, L. G.; HOFFMANN, K.; WAGNER, L.; NYILASI, I.; GRIEBEL, T.; SCHNABELRAUCH, D.; VOGEL, H.; VOIGT, K.; VAGVOLGYI, C.; PAPP, T. Data partitions, Bayesian analysis and phylogeny of the zygomycetous fungal family Mortierellaceae, inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27507, 2011.

PIRMOHAMED, M.; WILLIAMS, D.; MADDEN, S.; TEMPLETON, E.; PARK, B. K. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, n. 3, p. 984-90, 1995.

POPOWICZ, G. M.; DOMLING, A.; HOLAK, T. A. The structure-based design of Mdm2/Mdmx-p53 inhibitors gets serious. **Angewandte Chemie**, v. 50, n. 12, p. 2680-8, 2011.

PREISIG, C. L.; LAAKSO, J. A.; MOCEK, U. M.; WANG, P. T.; BAEZ, J.; BYNG, G. Biotransformations of the cardiovascular drugs mexrenone and canrenone. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 350-6, 2003.

REICHERT, J. M.; WENGER, J. B. Development trends for new cancer therapeutics and vaccines. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 1-2, p. 30-7, 2008.

RENDIC, S.; DI CARLO, F. J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. **Drug Metabolism Reviews**, v. 29, n. 1-2, p. 413-580, 1997.

RING, B. J.; CATLOW, J.; LINDSAY, T. J.; GILLESPIE, T.; ROSKOS, L. K.; CERIMELE, B. J.; SWANSON, S. P.; HAMMAN, M. A.; WRIGHTON, S. A. Identification of the human cytochromes P450 responsible for the in vitro formation of the major oxidative metabolites of the antipsychotic agent olanzapine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 276, n. 2, p. 658-66, 1996.

ROH, C.; SEO, S. H.; CHOI, K. Y.; CHA, M.; PANDEY, B. P.; KIM, J. H.; PARK, J. S.; KIM, D. H.; CHANG, I. S.; KIM, B. G. Regioselective hydroxylation of isoflavones by *Streptomyces avermitilis* MA-4680. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 41-6, 2009.

ROSE, J.; CASTAGNOLI, N., JR. The metabolism of tertiary amines. **Medicinal Research Reviews**, v. 3, n. 1, p. 73-88, 1983.

RUMACK, B. H. Acetaminophen misconceptions. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 10-5, 2004.

SALMONM, S. E.; KATZUNG, B. G. **Farmacología Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1998.

SELL, S. The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 3, p. 267-71, 2003.

SEVIOR, D. K.; PELKONEN, O.; AHOKAS, J. T. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 2, p. 257-61, 2012.

SILVA, M. A. **Planejamento, síntese, biotransformação e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 161, n. 2, p. 551-8, 1974.

SMITH, R. V.; ROSAZZA, J. P. Microbial systems for study of the biotransformations of drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 6, p. 785-814, 1975.

SONO, M.; ROACH, M. P.; COULTER, E. D.; DAWSON, J. H. Heme-Containing Oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2841-2888, 1996.

SOTANIEMI, E. A.; ARRANTO, A. J.; PELKONEN, O.; PASANEN, M. Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 61, n. 3, p. 331-9, 1997.

SRISILAM, K.; VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 1, p. 3-39, 2003.

STORMER, E.; BROCKMOLLER, J.; ROOTS, I.; SCHMIDER, J. Cytochrome P-450 enzymes and FMO3 contribute to the disposition of the antipsychotic drug perazine in vitro. **Psychopharmacology** v. 151, n. 4, p. 312-20, 2000.

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.

TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 3, p. 149-53, 2005.

TURNER, M. Studies in the genus *Mortierella*: I. *Mortierella isabellina* and related species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 262-IN6, 1963.

URLACHER, V. B.; GIRHARD, M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 26-36, 2012.

VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARVAJAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E. A. In

vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science**, v. 303, n. 5659, p. 844-8, 2004.

WILKINSON, G. R. Farmacocinética: Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, G. S. e LIMBIRD, L. E. (Org.). **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. New York: McGraw-Hill, 2003. p.3-23.

WILLIAMS, D. A. Drug Metabolism. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L., *et al* (Org.). **Principles of Medicinal Chemistry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2002.

WRIGHTON, S. A.; STEVENS, J. C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 1-21, 1992.

XIE, Z. Y.; HUANG, H. H.; ZHONG, D. F. Biotransformation of pantoprazole by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Xenobiotica**, v. 35, n. 5, p. 467-77, 2005.

ZENG, J.; GAGE, D.; ZHAN, J. Production of a new pyridine N-oxide by bioconversion with *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 5, p. 497-9, 2012.

ZHAO, X.; WANG, J.; LI, J.; FU, L.; GAO, J.; DU, X.; BI, H.; ZHOU, Y.; TAI, G. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb1 to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 721-6, 2009.

ZHU, M.; ZHAO, W.; JIMENEZ, H.; ZHANG, D.; YEOLA, S.; DAI, R.; VACHHARAJANI, N.; MITROKA, J. Cytochrome P450 3A-mediated metabolism of buspirone in human liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 4, p. 500-7, 2005.

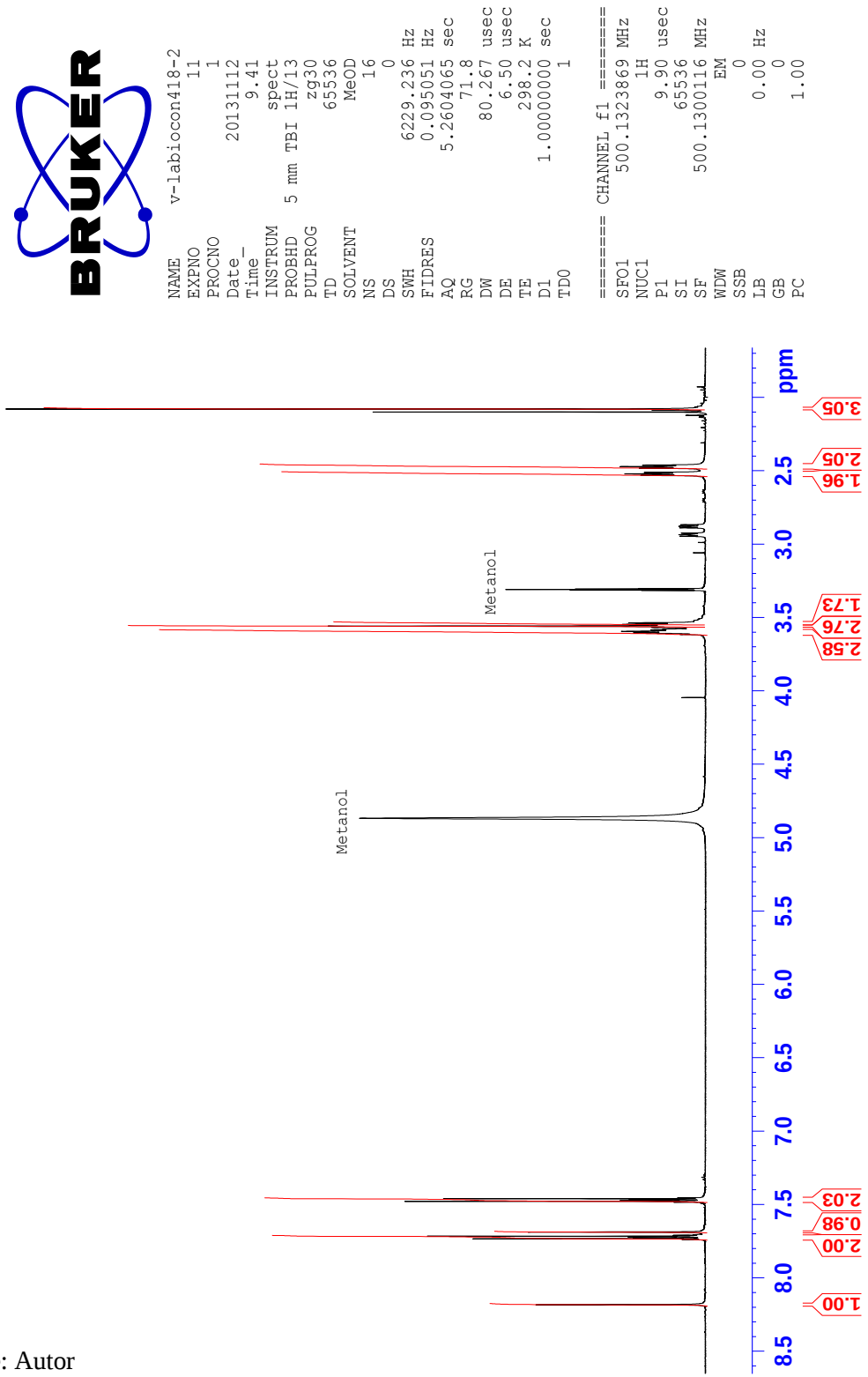
ZIEGLER, D. M. Bioactivation of xenobiotics by flavin-containing monooxygenases. In: WITMER, C. M.; SNYDER, R. R., *et al* (Org.). **Biological Reactive Intermediates. IV. Molecular and Cellular Effects and Their Impact on Human Health**. New York: Plenum Press, 1990. p.41-45.

ANEXOS



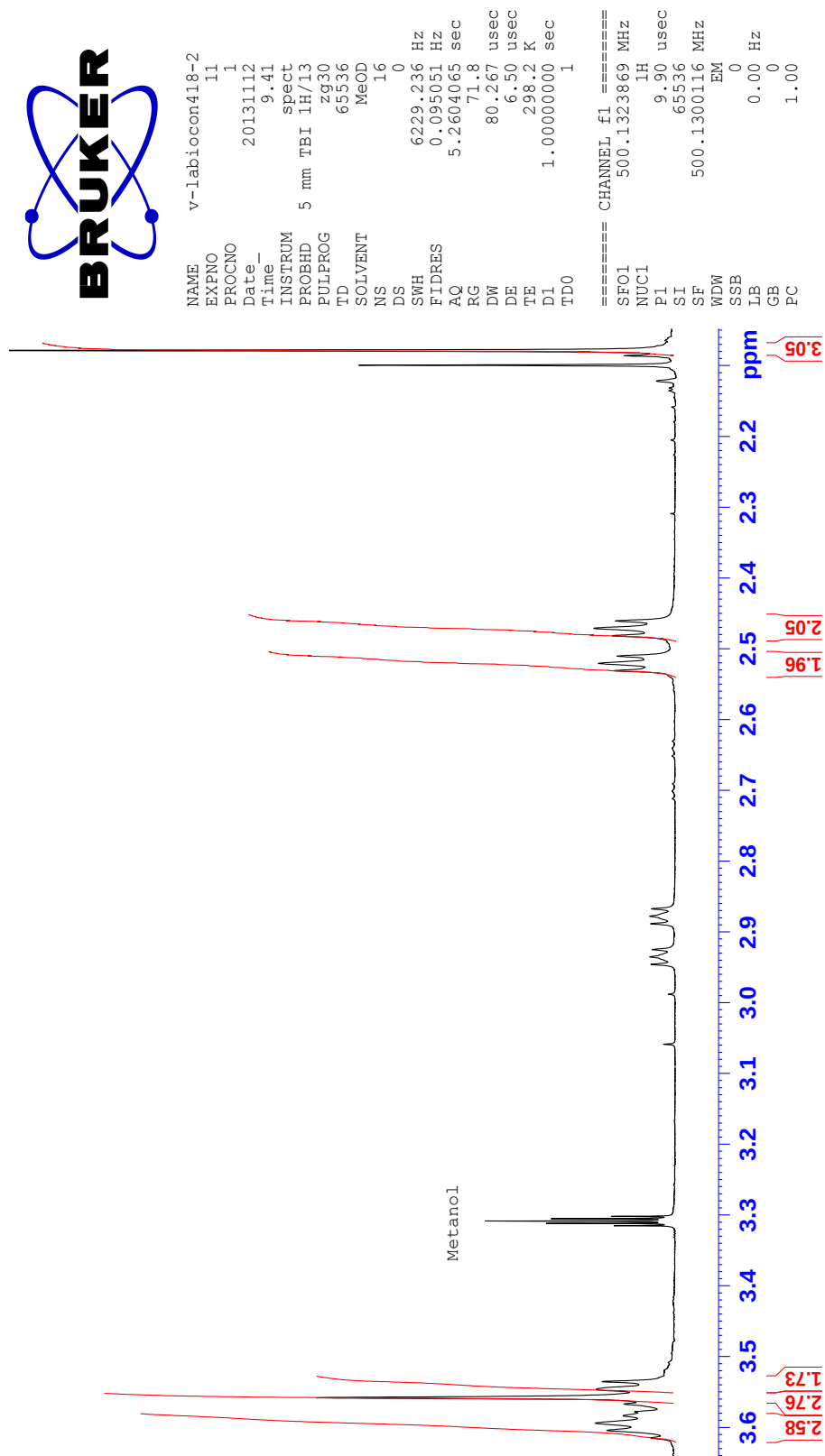
ANEXOS

ANEXO A – Espectro integrado de 1H RMN do substrato LQFM 030 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



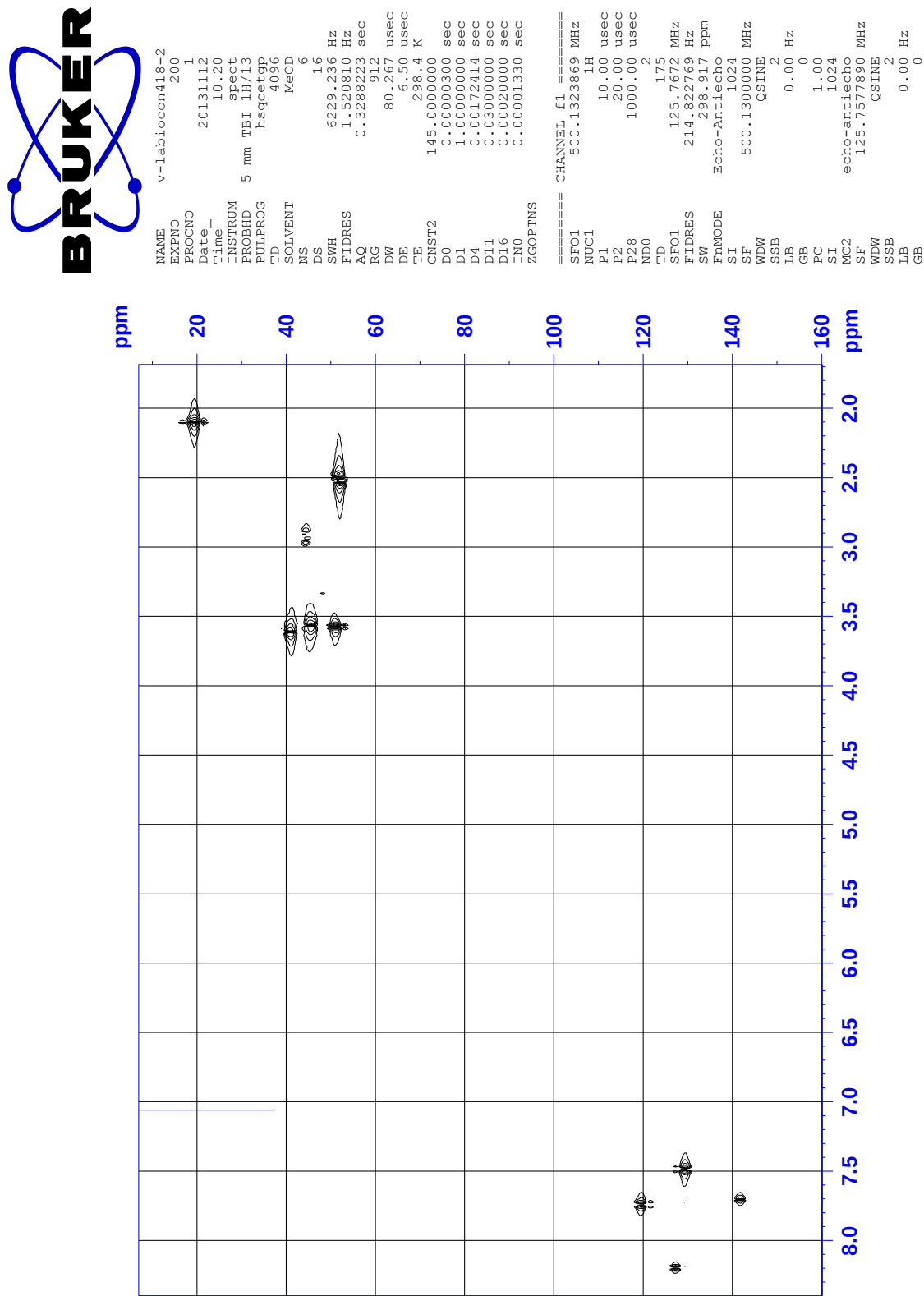
Fonte: Autor

ANEXO B – Espectro ampliado (3.74 a 2.15 ppm) de ^1H RMN do substrato LQFM 030 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



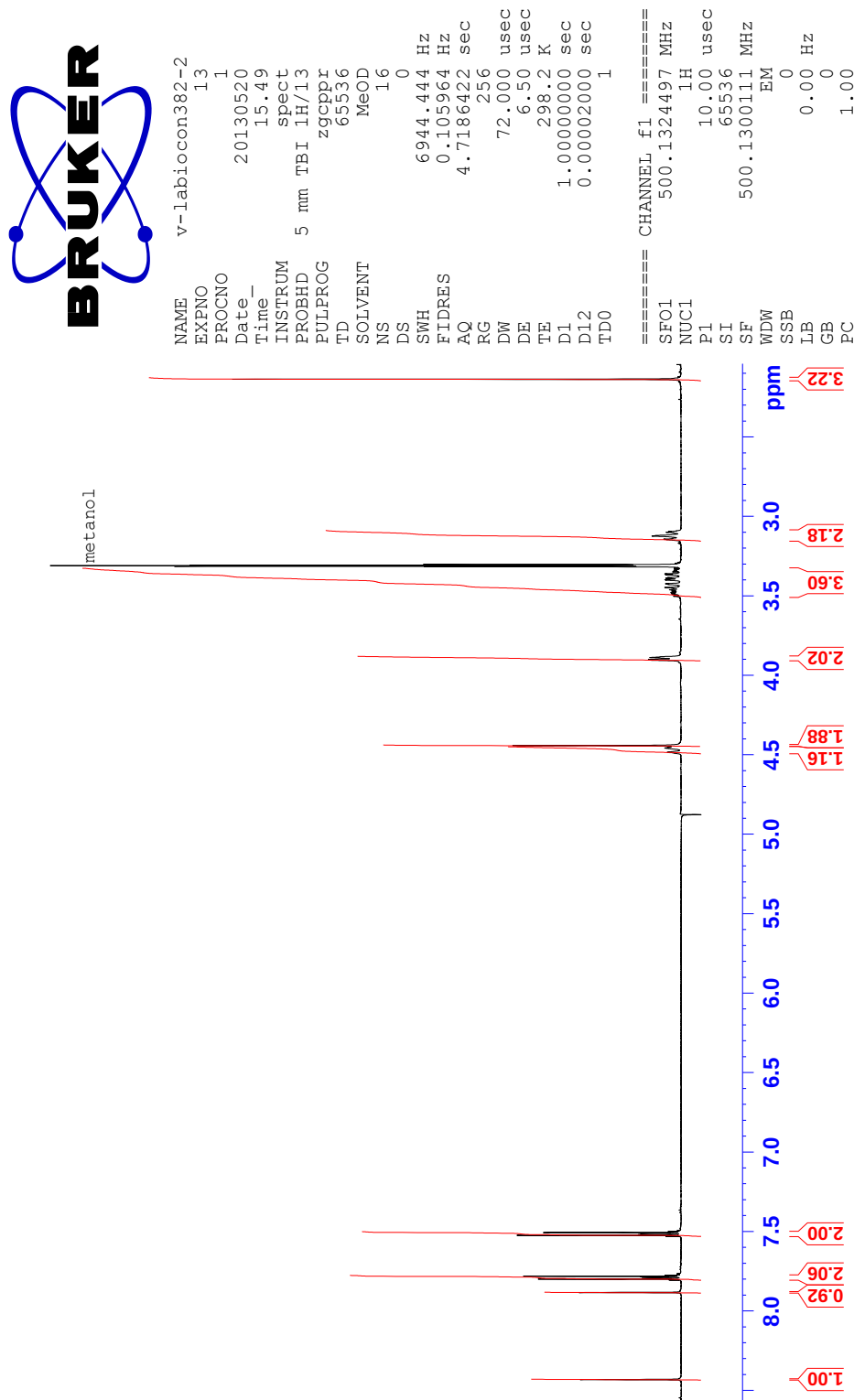
Fonte: Autor

ANEXO C – Espectro HSQC do substrato LQFM 030 obtido em metanol deuterado com TMS.



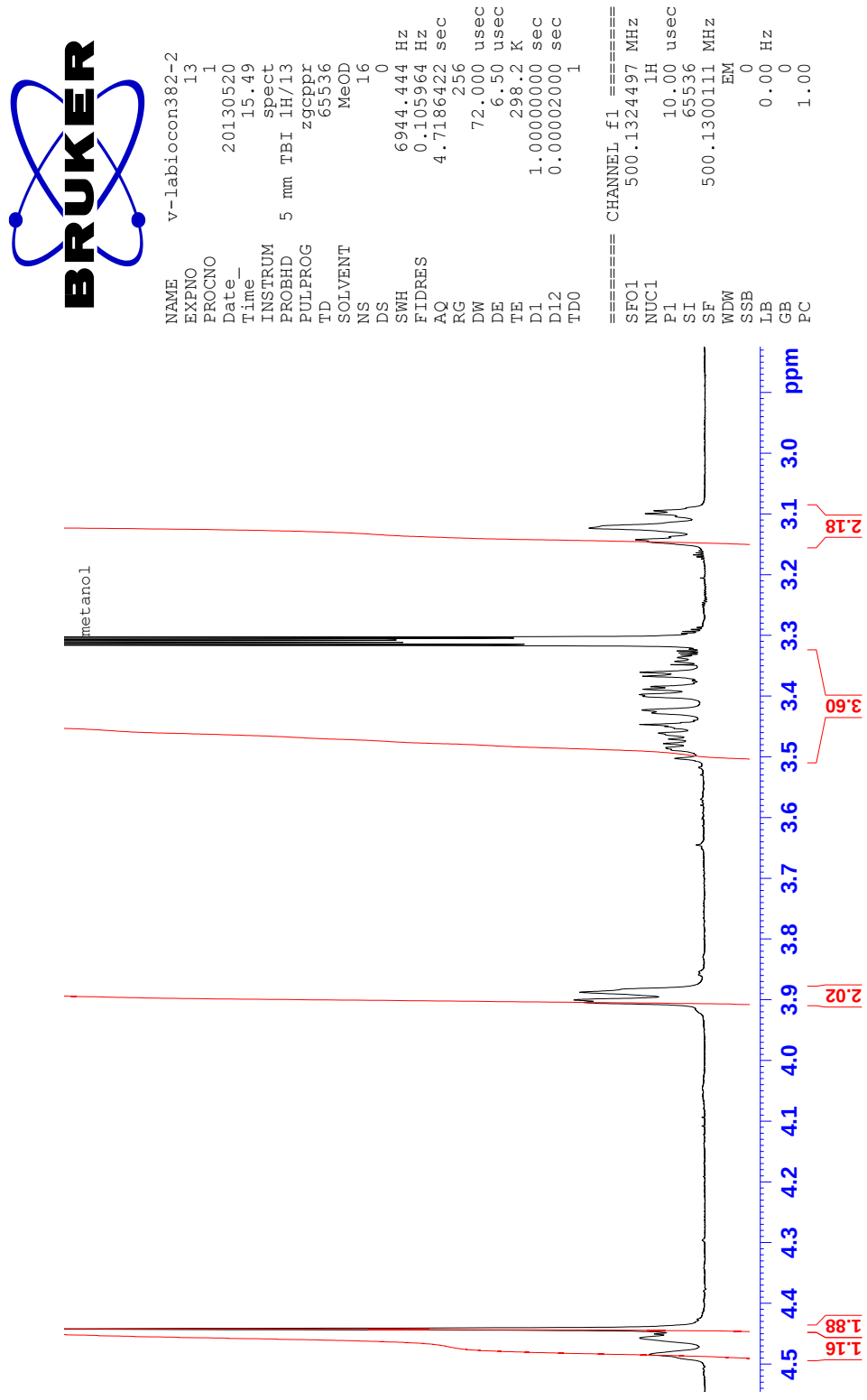
Fonte: Autor

ANEXO D – Espectro integrado de 1H RMN do metabólito LaBiocon 382 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



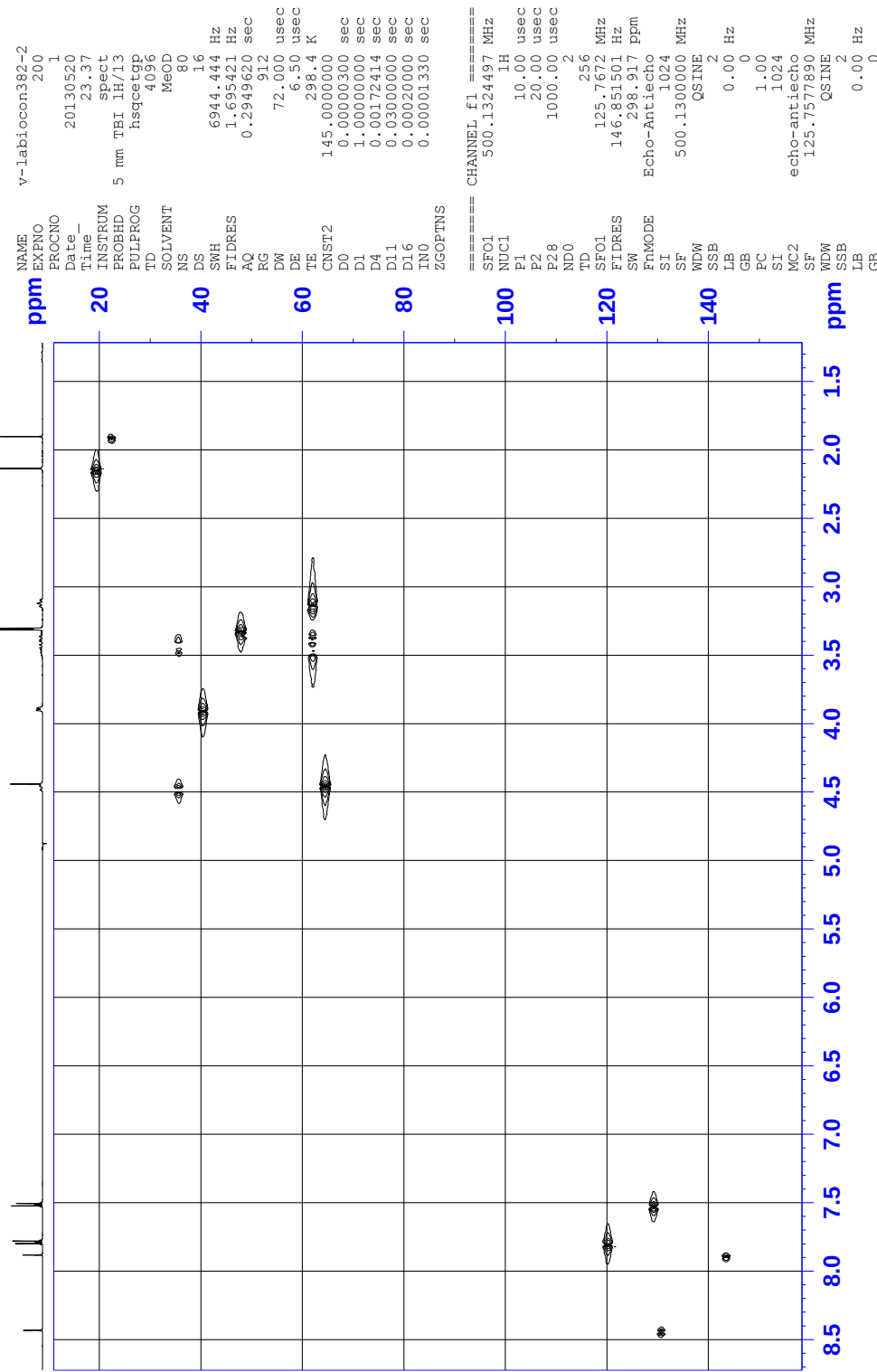
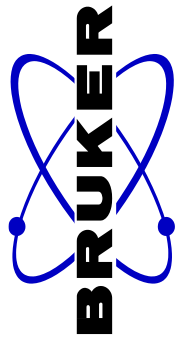
Fonte: Autor

ANEXO E – Espectro ampliado (4.5 a 2.9ppm) de 1H RMN do metabólito LaBiocon 382 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



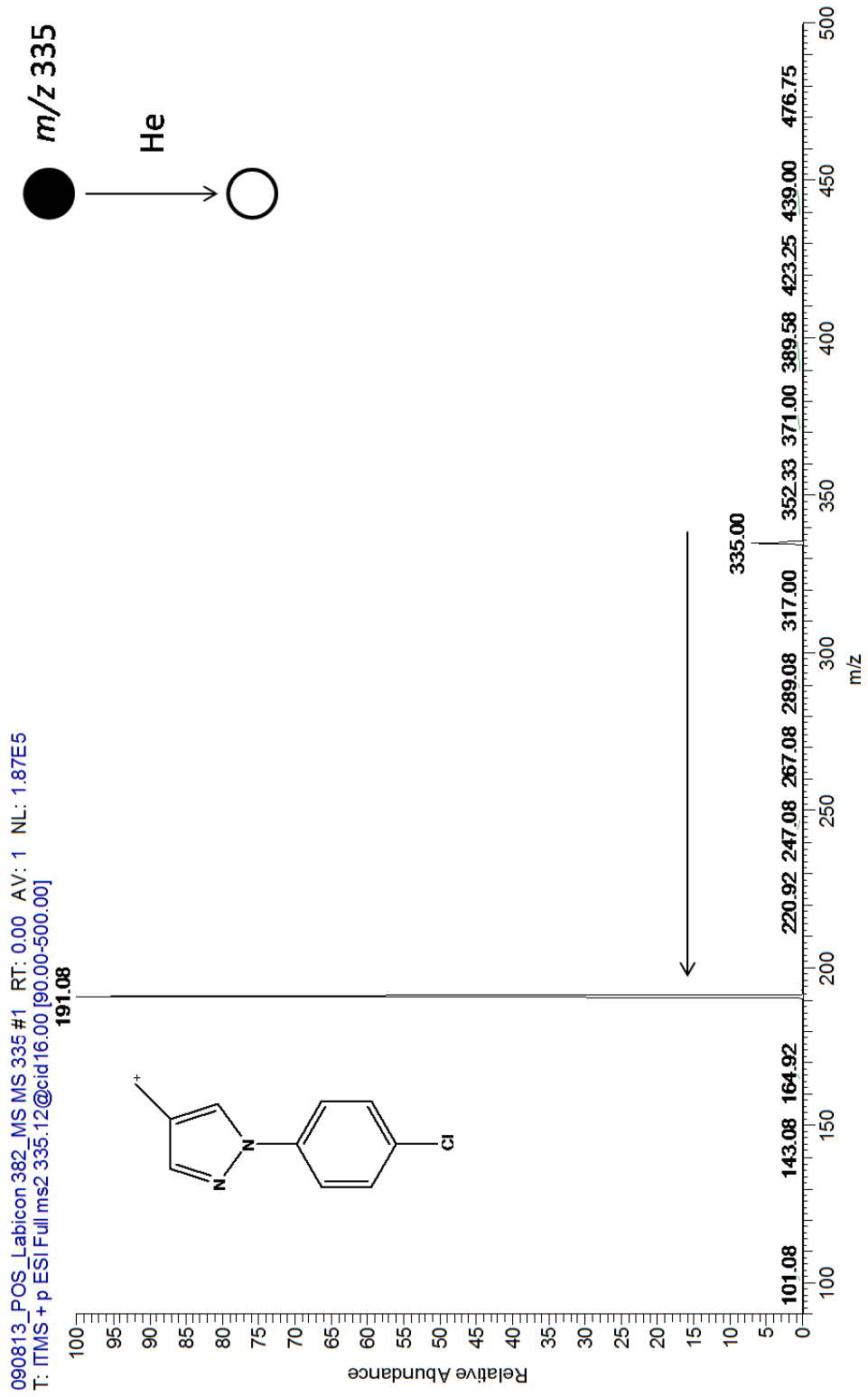
Fonte: Autor

ANEXO F – Espectro HSQC do metabólito LaBiocon 382 obtido em metanol deuterado com TMS.

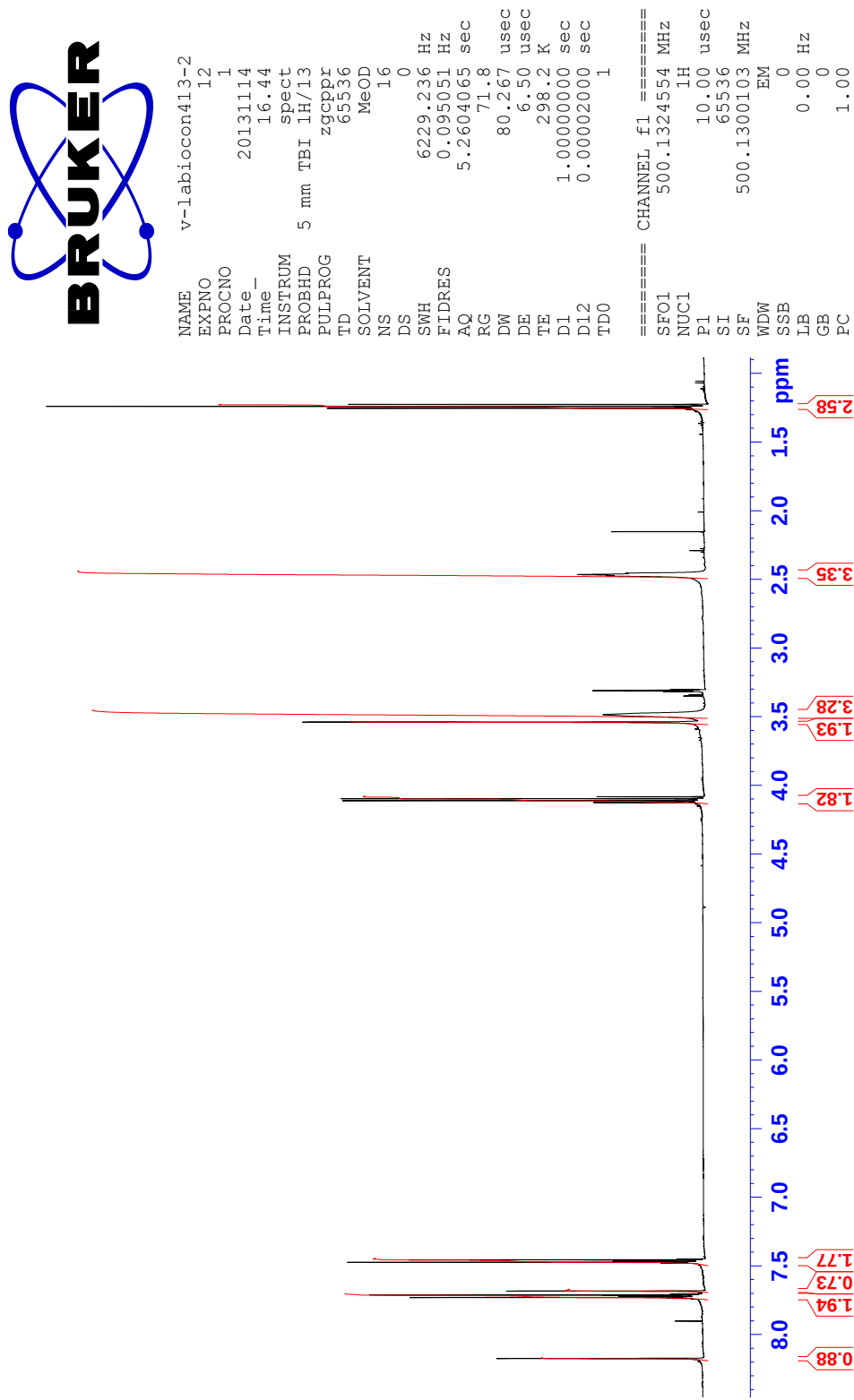


Fonte: Autor

ANEXO G – Espectro EM/EM do íon majoritário m/z 335,12713 referente à análise do metabólito Labiocon 382

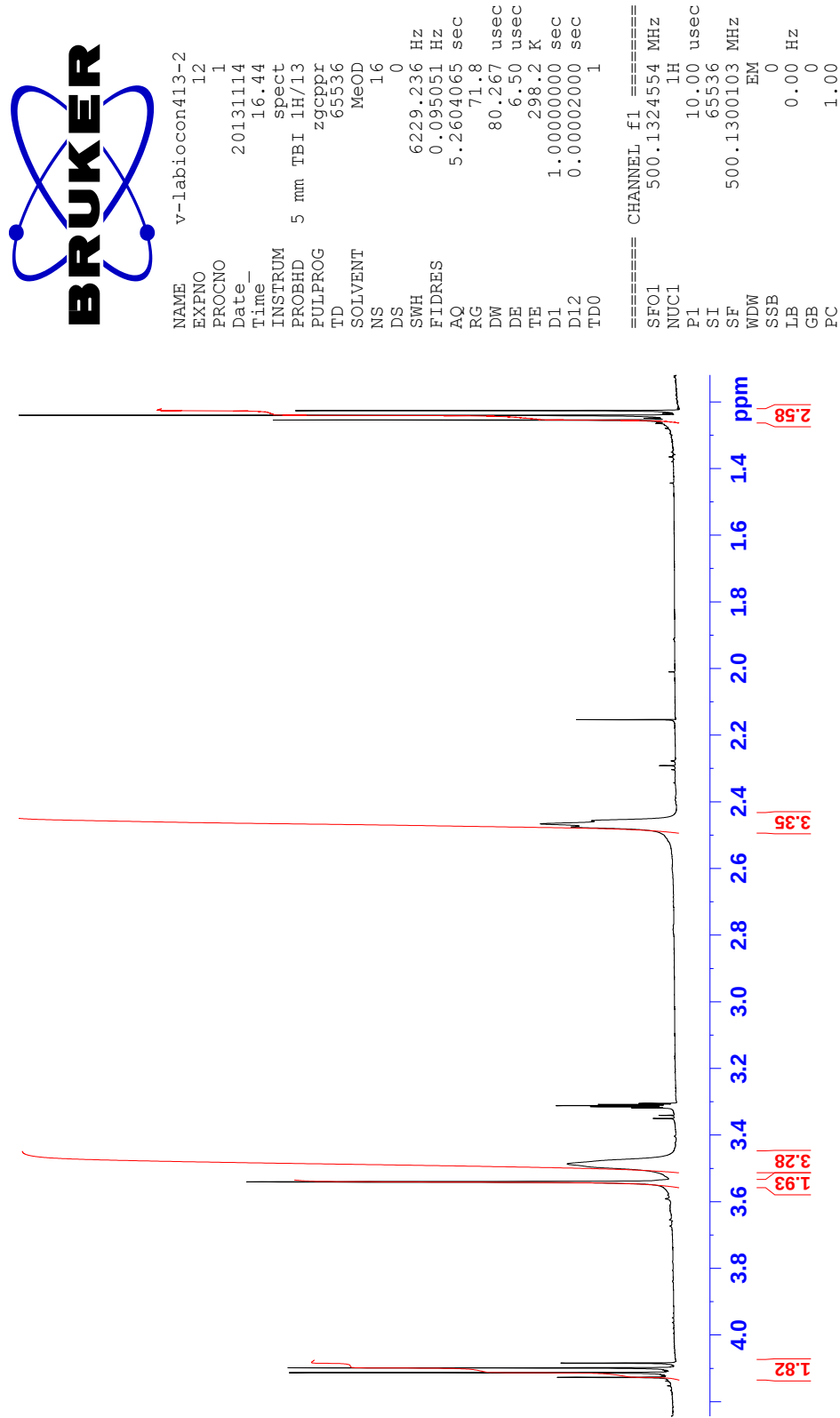


ANEXO H – Espectro integrado de 1H RMN do substrato LQFM 018 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



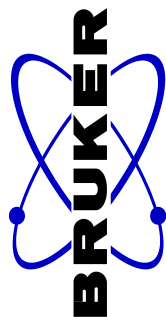
Fonte: Autor

ANEXO I – Espectro ampliado (4.2 a 1.2 ppm)de 1H RMN do substrato LQFM 018 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



Fonte: Autor

ANEXO J – Espectro HSQC do substrato LQFM 018 obtido em metanol deuterado com TMS.

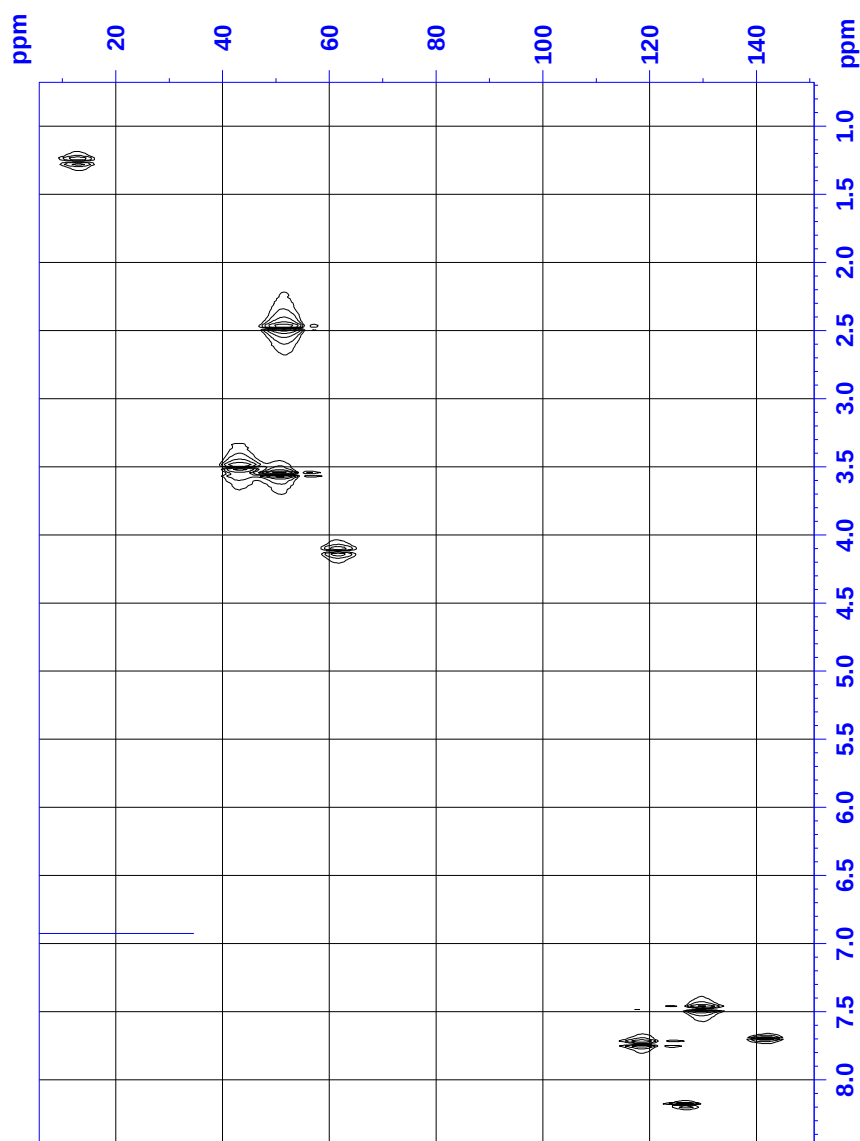


```

NAME v-labiocor413-2
EXPNO 200
PROCNO 1
Date_ 20131114
Time_ 17.47
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG hsqcetgp
TD 4096
SOLVENT MeOD
NS 12
DS 16
SWH 6229.236 Hz
FIDRES 1.520810 Hz
AQ 0.3288223 sec
RG 912
DW 80.267 usec
DE 6.50 usec
TE 298.4 K
CNST2 145.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 1.00000000 sec
D4 0.00172414 sec
D11 0.03000000 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00001330 sec
ZGPGTNS

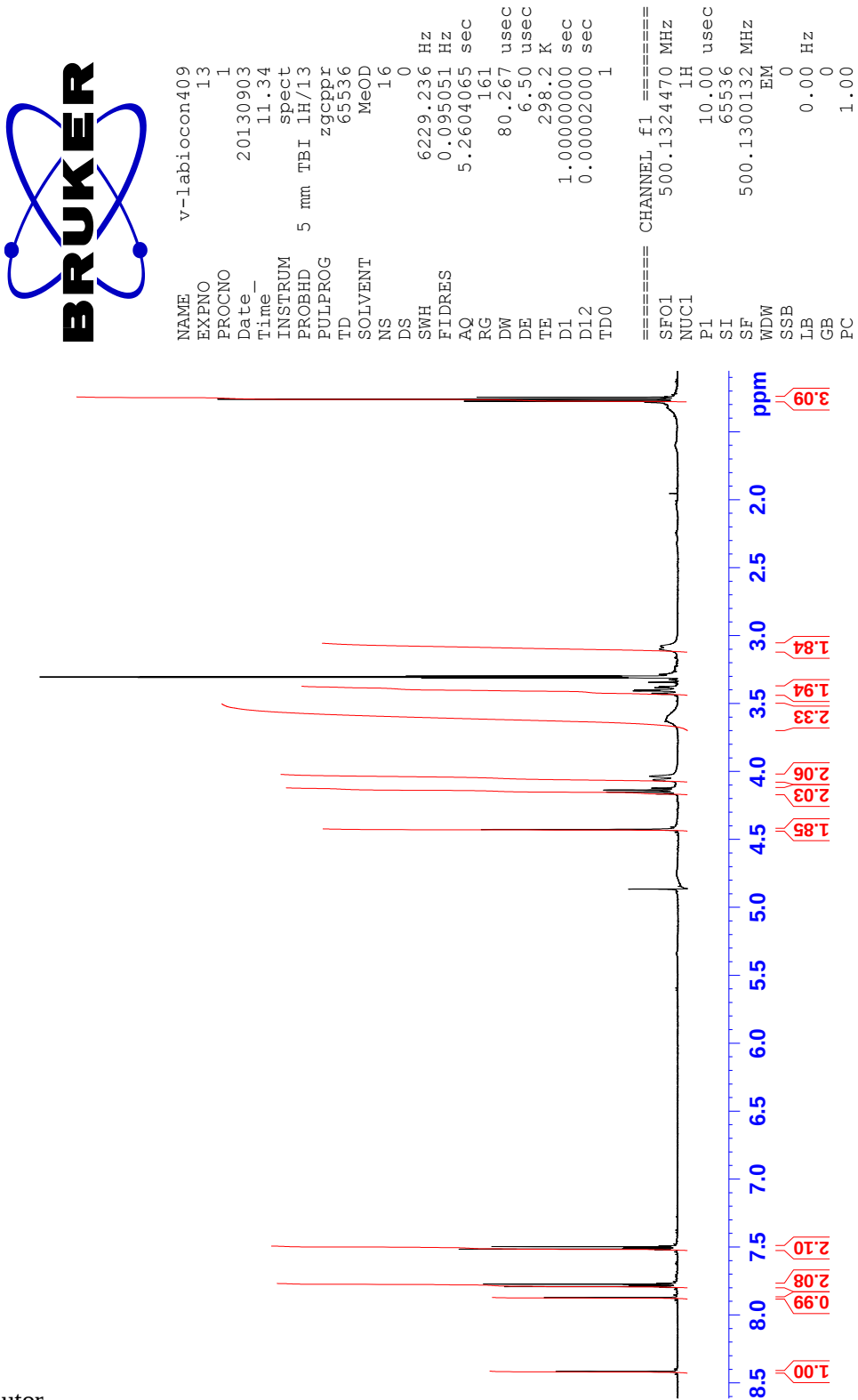
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 500.1324554 MHz
NUC1 1H
P1 10.00 usec
P2 20.00 usec
P28 1000.00 usec
ND0 2
TD 62
SFO1 125.7672 MHz
FIDRES 606.354614 Hz
SW 298.917 ppm
FMODE Echo-Antiecho
SI 1024
SF 500.1300000 MHz
WDW QSI
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
SI 1024
MC2 echo-antiecho
SF 125.7577890 MHz
WDW QSI
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0

```



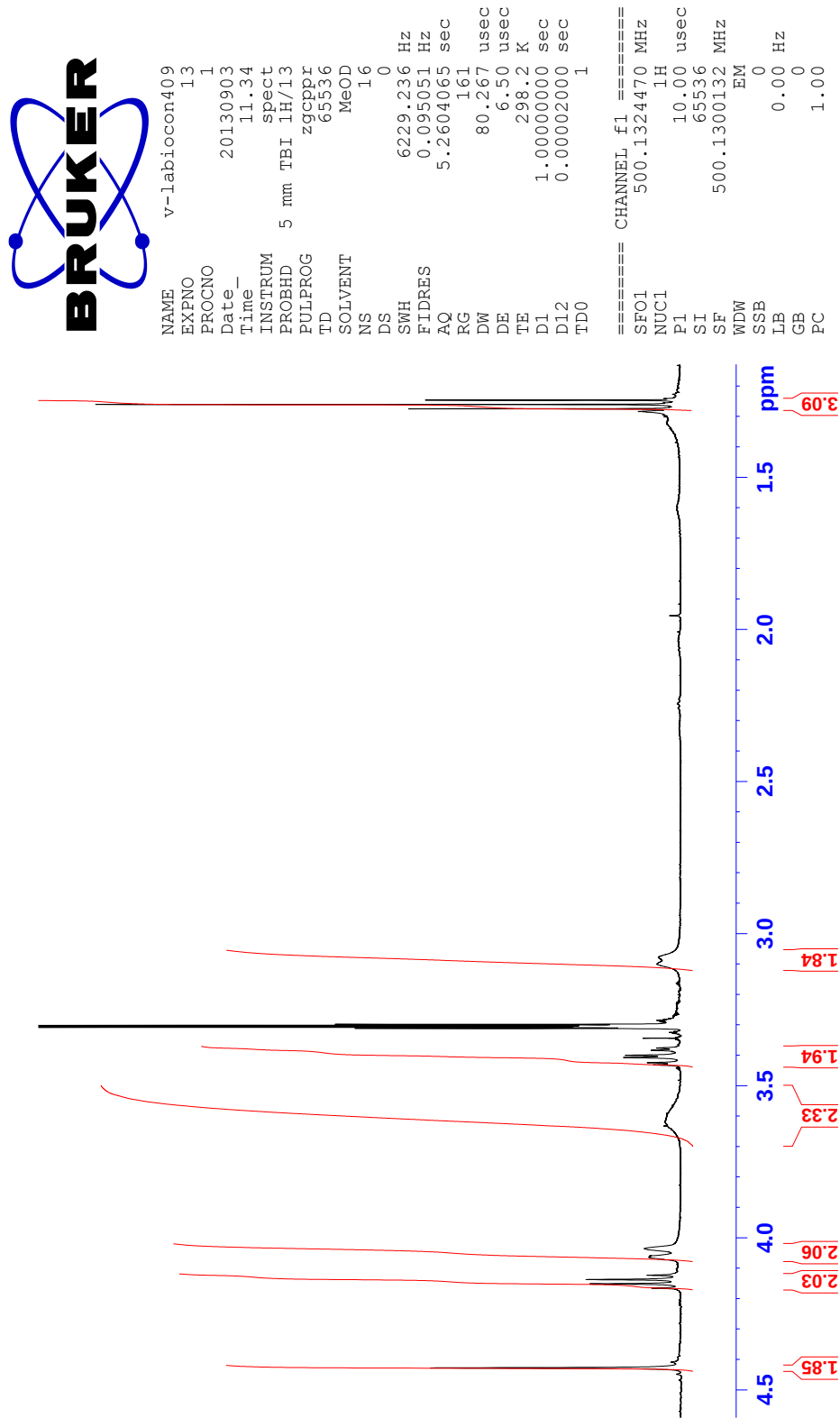
Fonte: Autor

ANEXO K – Espectro integrado de ¹H RMN do metabólito LaBiocon 409 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



Fonte: Autor

ANEXO L – Espectro ampliado (4.5 a 1.2 ppm) de 1H RMN do metabólito LaBiocon 409 obtido em metanol deuterado com TMS. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz)



Fonte: Autor

ANEXO M – Espectro HSQC do substrato LQFM 018 obtido em metanol deuterado com TMS.

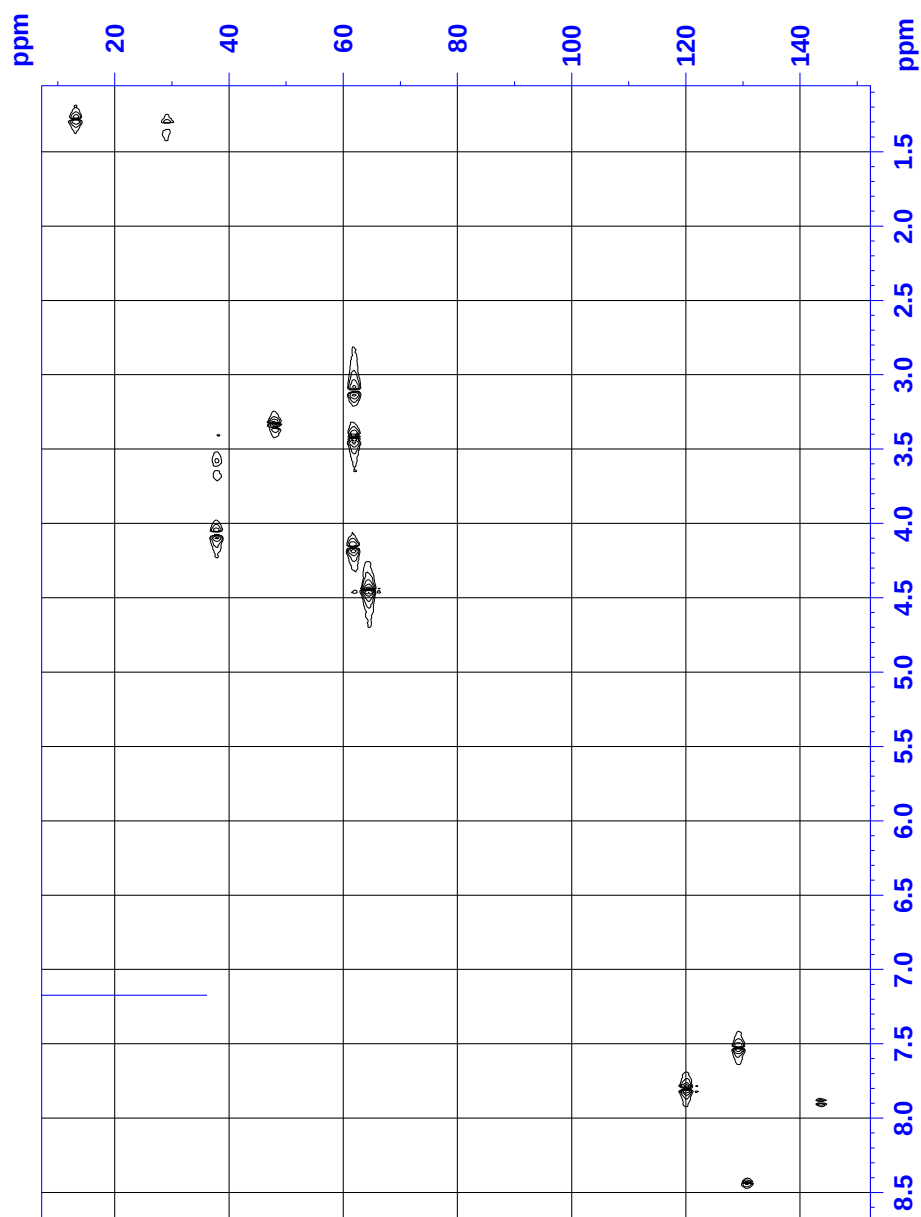


```

NAME v-labiocon409
EXPNO 200
PROCNO 1
Date_ 20130903
Time_ 14.35
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG hsqcetgp
TD 4096
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 16
SWH 6229.236 Hz
FIDRES 1.520810 Hz
AQ 0.3288223 sec
RG 912
DW 80.267 usec
DE 6.50 usec
TE 298.4 K
CNST2 145.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 1.00000000 sec
D4 0.00172414 sec
D11 0.03000000 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00001330 sec
ZGPTNS

===== CHANNEL f1 =====
SF01 500.132470 MHz
NUC1 1H
P1 10.00 usec
P2 20.00 usec
P28 1000.00 usec
ND0 2
TD 200
SF01 125.7672 MHz
FIDRES 187.969925 Hz
SW 298.917 ppm
FnmODE Echo-Antiecho
SI 1024
SF 500.1300000 MHz
WDW QSI
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
SI 1024
MC2 echo-antiecho
SF 125.7577890 MHz
WDW QSI
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0

```



Fonte: Autor

ANEXO N – Espectro EM/EM do íon majoritário m/z 365.13770 referente à análise do metabólito Labiocon 409

