



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Oxidação do anti-inflamatório sulindaco catalisada por  
complexos metálicos como modelos biomiméticos e bioinspirados  
do Citocromo P-450**

**TAHYANA MARA CHAGAS CARVALHO RANGEL**

Salvador

2019

TAHYANA MARA CHAGAS CARVALHO RANGEL

**Oxidação do anti-inflamatório sulindaco catalisada por complexos metálicos como modelos biomiméticos e bioinspirados do Citocromo P-450**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração: Química Inorgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Joicy Santamalvina dos Santos

Salvador

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carvalho Rangel, Tahyana Mara Chagas  
Oxidação do anti-inflamatório sulindaco catalisada  
por complexos metálicos como modelos biomiméticos e  
bioinspirados do Citocromo P-450 / Tahyana Mara  
Chagas Carvalho Rangel. -- Salvador, 2019.  
100 f. : il

Orientadora: Joicy Santamalvina dos Santos.  
Dissertação (Mestrado - Programa de pós graduação em  
química) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto  
de Química UFBA, 2019.

1. Biomimética. 2. Bioinspirado. 3. Citocromo P-  
450. 4. Sulindaco. I. Santamalvina dos Santos, Joicy.  
II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

TAHYANA MARA CHAGAS CARVALHO RANGEL

“OXIDAÇÃO DO ANTI-INFLAMATÓRIO SULINDACO CATALISADA POR  
COMPLEXOS METÁLICOS COMO MODELOS BIOMIMÉTICOS E BIOINSPIRADOS  
DO CITOCROMO P450”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,  
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Joicy Santamalvina dos Santos Joicy Santamalvina dos Santos  
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Eliane de Oliveira Silva Eliane de Oliveira Silva  
Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Valéria Priscila de Barros Valéria Priscila de Barros  
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal de Sergipe

Salvador, 28 de novembro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar forças e superar as provações desses anos de graduação e pós-graduação.

À minha mãe Cleuze, pelo apoio e amor incondicional dado a mim desde sempre, por ser minha melhor amiga e por ter me feito a pessoa quem sou hoje. E à minha família meus irmãos: Bruno e Manuela, meus tios: Cláudio e Anselmo e minha sobrinha Giovanna.

Ao Felipe, pelo apoio, pela ajuda principalmente na parte tecnológica, pelo amor e sem deixar de mencionar a paciência comigo durante esse e outros trabalhos.

Aos meus sogros: Nice e Raimundo por terem me acolhido como filha e por me apoiarem desde o primeiro momento que eu apareci na família.

À minha orientadora, Profa. Dra. Joicy Santamalvina dos Santos, por ter me aceitado e por me apresentar a essa área de catálise biomimética que contribuiu muito para minha formação e meu enriquecimento profissional.

Aos professores que contribuíram para construção desse trabalho, incluindo professor Dr. Lucas Bonfim Bolzon que por muitas vezes dedicou seu tempo para me ajudar.

Às Professoras Dra. Adriane Viana e Dra. Valéria Fernandes do GPEEM pelo uso dos equipamentos e por estarem à disposição para me ajudar sempre que precisei.

À Profa. Dra. Adelaide Vieira que desde a graduação ter me apoiado e me escutado todas as vezes que eu precisei.

Aos alunos do GPBioCat, a Ana Luísa, Fayla e especialmente a Karol, a Gustavo e a Tamires por toda contribuição e ajuda que foi me dada, por ouvirem minhas reclamações e pela amizade.

Aos alunos do GPEEM: Nadja, Najara, Hannah, Andrei, Wilson, Luis Henrique, Rodrigo, por tornarem meu dia mais leve nos dias trabalho com as conversas divertidas. Um agradecimento especial a Luíza Maria por toda ajuda com o trabalho e pela amizade desenvolvida e Pedro Magalhães por sempre se mostrar disposto a me ouvir, por me fazer pensar por outros ângulos e também pela amizade.

À Profa. Dra. Eliane Silva e ao Valmore Henrique pela contribuição com o trabalho biotransformação e por se mostrarem disponíveis a minhas dúvidas.

À Profa. Dra. Elisângela Boffo e ao Heiter Boness pelas análises de RMN feitas no

LABAREMN.

À Profa. Dra. Renata Rambo e à Railda pelas análises de espectrometria no infravermelho.

Ao Prof. Dr. Silvio Cunha também pelas análises de infravermelho, e pelo empréstimo de reagentes ocasionalmente.

Aos meus amigos da UFBA e fora dela que me deram apoio quando eu precisei. À Ícaro e Akácia que me acompanharam no início dessa jornada, a amizade e o apoio e pela ajuda de Ícaro com minhas dúvidas na síntese do FeCyclam.

Aos funcionários terceirizados e do instituto de química, que permitem que o prédio continue funcionando. Em especial a Valter, que sempre considereei um amigo dentro do instituto.

Às agências de fomento: CNPq, por custear a minha bolsa por 24 meses, bem como reagentes e equipamentos necessários a pesquisa. CAPES, sob a forma do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) por financiar passagens e hospedagem para evento científico durante o curso, além da disponibilização de acesso a literatura pelo periódico CAPES. FAPESB por financiar compras e manutenção de equipamentos do instituto de química UFBA, necessários a pesquisa.

## RESUMO

As enzimas do citocromo P-450 (CYP) estão presentes em todas as formas de vida e participam do metabolismo de fase I de fármacos, poluentes e outros xenobióticos. Uma forma mais prática, econômica e ética de estudar os metabólitos formados por essas enzimas pode ser feita através do uso de catalisadores biomiméticos e bioinspirados, estruturalmente semelhantes as enzimas do CYP, em substituição de métodos *in vitro/ in vivo*. Neste trabalho estudou-se a oxidação do fármaco sulindaco (um anti-inflamatório não esteroidal utilizado para o tratamento de artrite reumatoide) utilizando-se catalisadores biomiméticos e bioinspirados: metaporfirinas, metalossalens (isômeros Jacobsen) e ciclam (tetraazociclotetradecano), com centros de ferro (III) e manganês (III). Iodosilbenzeno, peróxido de hidrogênio, ácido meta-cloroperbenzóico e hipoclorito de sódio foram utilizados como doadores de oxigênio para as reações. Todas as reações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os catalisadores utilizados nesse estudo mostraram-se eficientes na oxidação do sulindaco. A melhor conversão do sulindaco (38,2%) foi atingida pelo sistema utilizando FeCyclam como catalisador e o NaClO na proporção 1:40:400, seguido da reação utilizando FeTFPP e NaClO na mesma proporção (31,1% de conversão). Observou-se boas conversões nos sistemas utilizando catalisadores Cyclam e NaClO como oxidante. Os resultados dos estudos de catálise mediados por sistemas biomiméticos/bioinspirados foram comparados aos obtidos por biotransformação do sulindaco utilizando-se o fungo *Cunninghamella elegans*, analisados também pelo mesmo método de CLAE. Os produtos de oxidação deste fármaco, obtidos pelos dois métodos foram separados por cromatografia clássica em coluna e analisados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Foi identificado um produto da biotransformação por *C. elegans*, confirmado também como produto de oxidação de um dos sistemas biomiméticos (Fe e MnCyclam e NaClO), identificado como Ácido 2- (5- fluoro-1- (hidroxi- (4- (metilsulfinil) fenil) metil) -2-metil-1H-inden-3-il) acético.

Palavras-chave: Citocromo P-450; sulindaco; catalise biomimética;

## ABSTRACT

Cytochrome P-450 (CYP) enzymes are present in all living organisms and participate of phase I metabolism of drugs, pollutants and other xenobiotics. A more practical, economical and ethical way to study these enzymes metabolites can be done through the use of biomimetic and bioinspired catalysts, structurally similar to CYP enzymes, instead of in *vitro* / *in vivo* methods. In this work we studied the sulindac drug oxidation (a non-steroidal anti-inflammatory used for the treatment of rheumatoid arthritis) using biomimetic and bioinspired catalysts: metalloporphyrins, metallosalens (Jacobsen isomers) and cyclam (tetraazocyclotetradecane) with iron centers. (III) and manganese (III). Iodosilbenzene, hydrogen peroxide, meta-chloroperbenzoic acid and sodium hypochlorite were used as oxygen donors for the reactions. All reactions were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The catalysts used in this study were efficient in sulindac oxidation and better yields (38.2%) was achieved by the system using FeCyclam with NaClO at 1:40:400 molar ratio, followed by FeTFPP and NaClO system at the same molar ratio (31.1%). Good system conversions were observed using Cyclam and NaClO catalysts as oxidant. The results of catalytic studies mediated by biomimetic / bioinspired systems were compared to those obtained by sulindac biotransformation using the fungus *Cunninghamella elegans*. Oxidation products obtained by biotransformation were separated by classical column chromatography and analyzed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and compared to results obtained by biomimetic catalysis. It was possible to separate only one of the biotransformation products, named P7 herein, and identified as 2-(5-fluoro-1-(hydroxy-(4-(methylsulfinyl)phenyl)methyl)-2-methyl-1H-inden-3-yl)acetic acid. This compound was also confirmed as a sulindac oxidation product for biomimetic reactions using Fe/ MnCyclam and NaClO.

Keywords: Cytochrome P-450; sulindac; biomimetic catalysis; bio-inspired

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Metabolismo e excreção de AINEs em mamíferos, através de mecanismos de oxidação pelas enzimas do citocromo P450, por diferentes processos.....	21
Quadro 1 - Informações físico-químicas do sulindaco.....	23
Figura 2 – Estrutura química dos metabólitos do sulindaco: a) Sulindaco sulfona (Ácido 2 - [(3Z) -6-fluoro-2-metil-3 - [(4-metilsulfonilfenil) metilideno] inden-1-il] acético) e b)Sulindaco sulfeto (Ácido 2 - [(3Z) -6-fluoro-2-metil-3 - [(4-metilsulfanilfenil) metilideno] inden-1-il] acético).....	24
Figura 3 – Produtos de metabolização do sulindaco, e indicação das enzimas envolvidas na formação dos produtos sulindaco sulfona e sulindaco sulfeto.....	25
Esquema 1 – Etapas do metabolismo de xenobióticos, catalisado pelas enzimas da superfamília P450, em organismos aeróbicos.....	27
Figura 4 - Sítio ativo das enzimas do CYP: à esquerda encontra-se uma representação do enovelamento proteico e a cavidade na qual encontra-se o sítio ativo (em destaque). À direita encontra-se a estrutura química desse sítio ativo heme (ferroprotoporfirina IX) .....	29
Figura 5 - Ciclo catalítico do Citocromo P-450 detalhado em 8 etapas, na qual o xenobiótico é oxidado e o sítio ativo reestabelece a sua configuração original .....	30
Figura 6 - Correlação entre os modelos biomiméticos e os modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para estudo do mecanismo de metabolização de xenobióticos.....	33
Figura 7 - As três gerações de catalisadores porfirinicos: a) Porfirinas de 1ª geração com grupos meso-fenílicos, b) Porfirinas de 2ª geração com fenil substituintes do R <sub>2-6</sub> , doadores ou retiradores de elétrons, e c) 3ª geração com substituintes β-pirrólicos, retiradores de elétrons.....	35
Figura 8 - Estrutura geral de um complexo salen .....	35
Figura 9 - Estrutura da mercaptopiridina, ligante axial utilizando, que coordena ao centro metálico por meio do par de elétrons do enxofre.....	38
Figura 10 - Estrutura química correspondente ao isômero S, S Jacobsen, complexo salen com centro metálico de Mn(III) e substituintes terc-butila.....	39

Figura 11 - Sistemas biomiméticos e bioinspirados de entrega de medicamentos e genes: a evolução nos anos de 2004 a 2018, mostrando os sistemas nanoestruturado, inspirado em células e baseados em fungos.....	42
Figura 12 - Espectroscopia de UV-VIS da H <sub>2</sub> TFPP, MnTFPP e FeTFPP em acetonitrila..	58
Figura 13 - Espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR) do ligante cyclam.....	60
Figura 14 - Espectro de Infravermelho por transformada de Fourier com pastilha de KBr do MnCyclam.....	60
Figura 15 - Espectro UV-VIS do trans-MnCyclam, em meio de metanol, analisado em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.....	61
Figura 16 - Voltamograma do complexo MnCyclam feito em solução de KCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup> v=50mV s <sup>-1</sup> , varredura de -5 a 1,3V. Potencial de circuito aberto 0,42V.....	62
Figura 17 – Espectroscopia no infravermelho com refletância difusa total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR) do FeCyclam.....	64
Figura 18 - Espectro de UV-VIS do FeCyclam, em meio de metanol, analisado em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.....	65
Figura 19 - Curva de calibração do sulindaco em metanol (Equação da reta y=2.1010x – 29283 R <sup>2</sup> =0,9986), obtida a partir da análise por CLAE utilizando coluna C18 e metanol e 0,1 %TFA como fase móvel, no método otimizado descrito na parte experimental) .....	67
Figura 20 - Cromatograma de reação de oxidação do sulindaco analisado após a otimização das condições finais de reação. Foi utilizada a razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), PhIO como oxidante, MnTFPP como catalisador, proporção molar 10 vezes menor que a inicial. Pico com tempo de retenção em 11,607 minutos correspondente ao sulindaco.....	68
Figura 21 - Cromatograma de reação de oxidação do sulindaco, analisado em reação 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando PhIO como oxidante e (MnTFPP como catalisador na primeira otimização das condições de reação. O pico com tempo de retenção em 11 minutos corresponde ao sulindaco.....	69

Figura 22 - Comparação dos sistemas utilizando MnTFPP e S, S Jacobsen com PhIO como oxidante em 4 horas e 24horas, na razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), em meio de metanol, analisado por CLAE.....	71
Figura 23 - Estudo da evolução da reação de oxidação do sulindaco ao longo de 24, realizado em reação 1:40:80 (catalisador: oxidante: substrato), utilizando-se MnCyclam e NaClO como oxidante, em meio de metanol, analisada por CLAE em diferentes períodos.....	72
Figura 24 - Cromatograma obtido pela reação de oxidação do sulindaco utilizando razão molar 1:40:400 (catalisador: oxidante: substrato), R, R Jacobsen como catalisador e PhIO como oxidante, em meio de metanol, após 24 h em agitação magnética.....	75
Figura 25 - Proposta de aproximação do substrato em relação ao catalisador Jacobsen(N, N'-bis (3,5-di-terc-butilsalicilideno) -1,2-cyclohexanodiaminomanganês (III)), adaptado de Jacobsen e colaboradores (1991).....	76
Figuras 26 - Comparação da conversão do sulindaco em sistemas nas condições padrão, utilizando-se MnTFPP como catalisador e na presença dos co-catalisadores acetato de amônio e imidazol, na razão molar 1:10:40:400 (catalisador: ligante axial: substrato: oxidante), em meio de metanol, após 24 h de reação e na presença dos oxidantes: A) NaClO, B) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , C) <i>m</i> -cpba e D) PhIO.....	77
Figura 27 - Comparação de dois sistemas de reação utilizando FeTFPP como catalisador, na razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando como solvente metanol, analisado por CLAE após 24h de reação. A) O gráfico à esquerda apresenta a distribuição de produtos nas reações utilizando NaClO como oxidante e B) O gráfico à direita apresenta a distribuição de produtos nas reações utilizando PhIO como oxidante.....	81
Figura 28 - Cromatograma de reação da biotransformação conduzida por <i>C. elegans</i> , após 15 dias de inoculação, obtidos a partir da filtragem, extração e secagem do caldo, e separação por CCD, nos quais foram identificados os produtos denominados P7 e P8.....	83

Figura 29 - Cromatograma da reação de oxidação do sulindaco, na razão molar 1:40:400 (catalisador:substrato:oxidante), utilizando como catalisador MnCyclam e oxidante NaClO, em metanol, no qual identifica-se os produtos P7 e P8 comuns à biotransformação por <i>C. elegans</i> .....	83
Figura 30- Cromatograma da reação de oxidação do sulindaco, na razão molar 1:40:400 (catalisador:substrato:oxidante), utilizando como catalisador MnTFPP e oxidante PhIO, em metanol, no qual identifica-se o produto P7 e outros comuns à biotransformação por <i>C. elegans</i> .....	84
Figura 31 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do fármaco sulindaco em CD <sub>3</sub> OD: Q= quintopletto em 3,40ppm S=singlete em 2,20; 2,90; 2,60 e 7,30 ppm DD=duplo dubleto em 7,80 e 7,70ppm D= dubleto em 7,15 e 6,90ppm. Frequência 550 MHz.....	85
Figura 32- Representação da estrutura química do sulindaco com os picos atribuídos.....	85
Figura 33- Espectro de RMN do <sup>1</sup> H em CD <sub>3</sub> OD do produto P7 obtido após biotransformação por <i>C. Elegans</i> : S=singlete em 2,20; 3,20 3,40 e 7,28 ppm DD=duplo dubleto em 7,90 e 8,00 ppm D= dubleto em 7,12; 6,90 e 6,60 ppm QD= quadrupletto em 3,0 ppm com ampliação dos picos abaixo. Frequência 550 MHz....	86
Figura 34 - Proposta de metabólito formado pela biotransformação por <i>C. Elegans</i> , correspondente ao produto P7 obtido através da catálise biomimética, identificado como Ácido 2- (5- fluoro-1- (hidroxi- (4- (metilsulfinil) fenil) metil) -2-metil-1H-inden-3-il) acético .....	87

## LISTA DE TABELAS

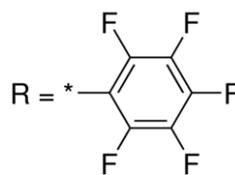
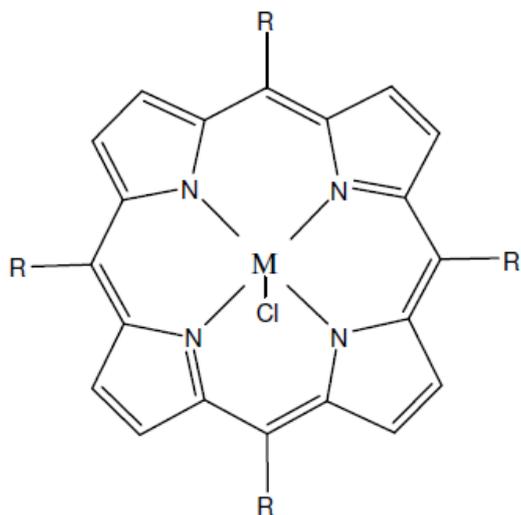
Tabela 1 - Classificação e comparação de estruturas químicas de anti-inflamatórios não esteroidais.....	19
Tabela 2 – Descrição das condições de preparo das reações de oxidação do sulindaco utilizando NaClO e <i>m</i> -cpba como oxidantes.....	53
Tabela 3 - Descrição das condições de preparo das reações de oxidação do sulindaco utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como oxidante.....	53
Tabela 4 - Descrição das condições de preparo das reações de oxidação do sulindaco utilizando PhIO como oxidante.....	54
Tabela 5 - Condições cromatográficas de separação das reações de oxidação do sulindaco: tempo de análise, solventes, fase estacionária, fluxo e temperatura.....	55
Tabela 6 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.....	72
Tabela 7 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se <b><i>m</i>-CPBA</b> como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.....	73
Tabela 8 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se <b>PhIO</b> como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.....	73
Tabela 9 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se <b>NaClO</b> como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.....	74
Tabela 10 - Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE.....	79

Tabela 11 - Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando <i>m</i> -CPBA como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE. ....	79
Tabela 12 - Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando PhIO como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE.....	80
Tabela 13 - Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando NaClO como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE.....	80

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

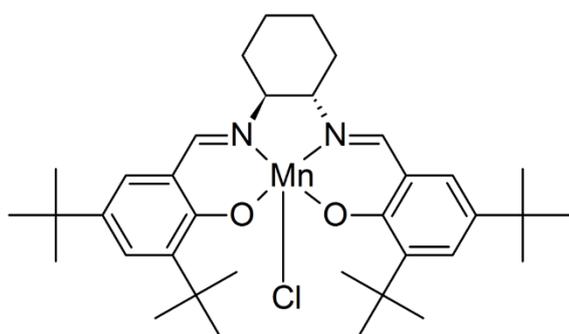
- AINEs** Anti-inflamatórios não esteroidais
- BDA** Batata-Dextrose-Ágar
- BOD** Demanda Bioquímica de Oxigênio
- CCD** Cromatografia em camada delgada
- CLAE-DAD** Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
- Cyclam** tetraazociclotetradecano
- CYP** Citocromo P-450
- DMSO** Dimetil sulfóxido
- FePs** Ferroporfirinas
- FTIR-ATR** Espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa total atenuada por transformada de Fourier
- Q-** quintuplete **Qd-** Quadruplete
- S-** Singleto
- DD-** Duplo duplete **D-** Dubleto
- Jacobsen** Cloreto de N, N'-bis (3,5-di-terc-butilsalicilideno) -1,2-ciclohexanodiaminomanganês (III)
- m-CPBA** Ácido meta-cloroperbenzoico
- MeOH** Metanol
- MsR** Metiona sulfóxido-redutase
- MePs** Metaloporfirinas
- MnPs** Manganês porfirinas
- NADPH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
- PhIO** Iodosilbenzeno
- RMN** Ressonância Magnética Nuclear
- Salen** N, N-bis (salicilideno) Etilenodiamina
- TFA** Ácido trifluoroacético
- TPPs** Tetrafenilporfirinas
- TFPP** Tetrafluorofenilporfirinas
- UDP** Uridina-5'-difosfato
- UGTs** Glucuronosiltransferases
- UV-VIS** Espectroscopia vibracional na região do ultravioleta e visível

## LISTA DE CATALISADORES

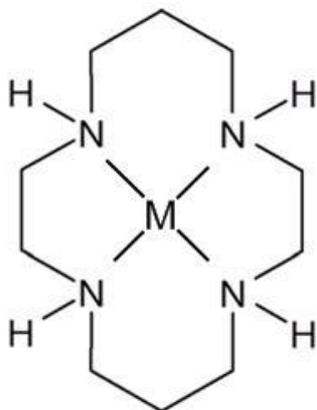


TFPP

M= Mn (III) ou Fe (III)



R, R e S, S Jacobsen



Cyclam

M= Mn (III) ou Fe (III)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES).....	18
1.2 PRÓ-FARMÁCO.....	21
1.3 SULINDACO.....	22
1.4 CITOCROMO P-450.....	26
1.5 CATÁLISE BIOMIMÉTICA E BIOINSPIRADA.....	32
1.6 BIOTRANSFORMAÇÃO POR FUNGOS- <i>Cunninghamella elegans</i> .....	43
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	47
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>48</b>
3.1 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS.....	48
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	48
3.3 INSERÇÃO DE MANGANÊS (II) NA 5,10,15,20 TETRAQUIS- PENTAFLUOROFENIL- PORFIRINA.....	49
3.4 INSERÇÃO DE METAL A BASE LIVRE CYCLAM(TRETRAZOCICLOTETRADECANO).....	50
<b>3.4.1 Inserção de Mn (II) ao Cyclam.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4.2 Inserção de Fe(III) ao Cyclam.....</b>	<b>50</b>
3.5 SÍNTESE DO IODOSILBENZENO.....	51
3.6 REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DO SULINDACO.....	52
3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	54
3.8 BIOTRANSFORMAÇÃO POR FUNGOS - <i>Cunninghamella elegans</i> .....	55
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>58</b>
4.1 INSERÇÃO DE MANGANÊS A BASE LIVRE PORFIRINA.....	58
4.2 INSERÇÃO DE METAL A BASE LIVRE CYCLAM.....	59
<b>4.2.1 Inserção de Mn(II) ao Cyclam.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.2 Inserção de Fe(III) ao Cyclam.....</b>	<b>63</b>
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO E SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO SULINDACO E PRODUTOS.....	65

4.4 ESTUDO DA OXIDAÇÃO DO SULINDACO MONITORADO POR CLAE- DAD.....	69
4.5 REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO E COMPARAÇÃO COM OS ESTUDOS DA CATÁLISE BIOMIMÉTICA E BIOINSPIRADA.....	82
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINEs): ASPECTOS

#### GERAIS

A dor crônica representa um grande problema de saúde pública no mundo (BRUNE, PATRIGNANI 2015) atingindo em média 35,5% da população mundial. Estudos recentes mostram que no Brasil, a prevalência de dor crônica pode atingir de 29,3% da população (Santa Catarina) a 73,3% (Bahia), afetando mais mulheres que homens, e sendo prevalente na região dorsal/lombar (VASCONCELOS; ARAÚJO, 2018).

Em adicional, a dor crônica afeta a qualidade de vida, qualidade de sono e a produtividade das pessoas. Há duas principais opções para o tratamento da dor: Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e analgésicos (BRUNE, PATRIGNANI, 2015). Os AINEs estão entre os medicamentos mais utilizados do mundo, sendo que em alguns países são consumidos majoritariamente sem receitas médicas. Estima-se que mais de 30 milhões de pessoas façam uso de AINEs diariamente, apenas nos Estados Unidos são vendidos mais de 30 milhões de unidades por ano (LUZ et al., 2006).

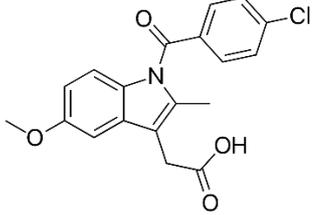
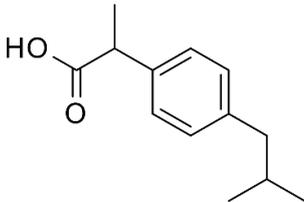
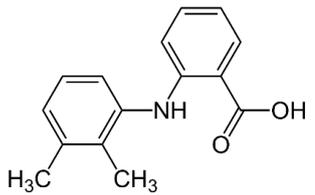
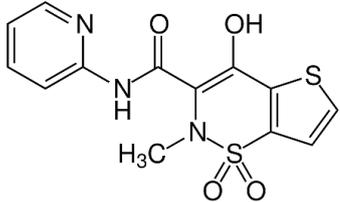
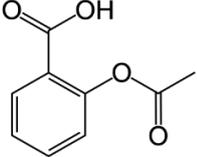
No Brasil, os AINEs também são vendidos sem receitas médicas, e estão presentes em grande parte das associações medicamentosas disponíveis no mercado farmacêutico. Uma prova disso é que estes fármacos aparecem no *ranking* de medicamentos mais consumidos no país, indicado por diferentes estudos (RIBEIRO,2007).

Apesar do amplo uso de anti-inflamatórios na vida cotidiana dos brasileiros, por vezes seu uso é incorreto e indiscriminado, e ainda são poucos os estudos específicos sobre essa classe de medicamentos que sejam voltados para as implicações médicas e sociais do seu uso. Esses estudos seriam de grande importância, visto que os efeitos colaterais dos fármacos anti-inflamatórios não podem ser ignorados (RIBEIRO, SEVALHO e CÉSAR, 2007).

No grupo dos AINEs utilizados no tratamento de sinais e sintomas da inflamação e no tratamento de doenças reumatoides estão incluídos: aspirina, sulindaco, indometacina, ibuprofeno, entre outros (URILCH, BIGLER e POTTER 2006). Além do efeito anti-inflamatório, estes fármacos também possuem ação analgésica e antipirética, além de ação antiplaquetária, o que explica a grande procura por estes fármacos (JIANG e CHANG, 1999). A Tabela 1 apresenta alguns tipos de AINEs

classificados de acordo com a estrutura química: derivados do ácido acético e propiônico, antranílicos, fenólicos e também derivados do salicilato.

Tabela 1 - Classificação e comparação de estruturas químicas de anti-inflamatórios não esteroidais.

Classes	Drogas	Estrutura Química
Derivados do ácido acético	Indometacina, sulindaco, stodolac, tolmetina, diclofenaco, aceclofenaco, Cetorolaco	<p>Indometacina</p> 
Derivados do ácido propiônico	Ibuprofeno, naxproxeno, flubirprofeno, cetoprofeno, ioxoprofeno, oxaprozina	<p>Ibuprofeno</p> 
Ácidos antranílicos (fenamatos)	Ácido mefanâmico, ácido meclofenâmico	<p>Ácido mefanâmico</p> 
Derivados do ácido enólico	Piroxicam, tenoxicam, meloxicam	<p>Tenoxicam</p> 
Salicilatos	Aspirina, diflunisal	<p>Aspirina</p> 

Fonte: Adaptado de BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006

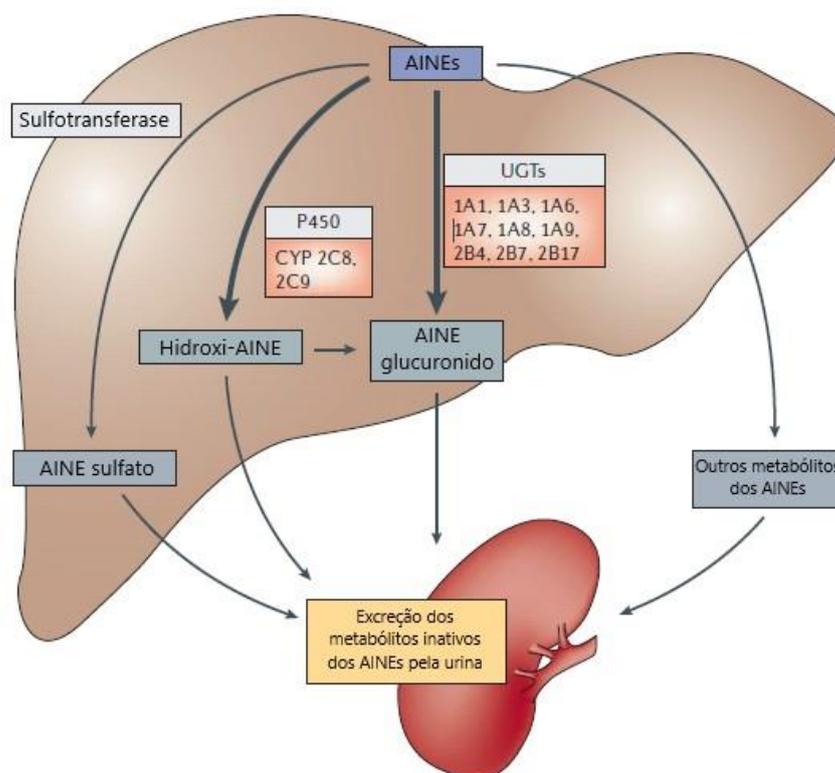
Além dos usos nos tratamentos citados, estes tipos de anti-inflamatórios são por vezes indicados no tratamento de dor associada ao câncer, pós-operatória, analgesia, proteinúria e dismenorreia. Segundo Jiang e Chang (1999), ainda são aplicados no tratamento da fibrose cística e da Alzheimer, podendo retardar um componente inflamatório e a progressão dessas doenças.

Apesar de possuírem inúmeras vantagens, também são relatados efeitos colaterais prejudiciais à saúde. Dentre os estes efeitos relatados na literatura, encontram-se: danos no sistema gastrointestinal como dispepsia e sangramento no estômago ou no duodeno, úlceras; também são relatados danos no sistema hepático e renal e um aumento no risco de acidentes vasculares. Alguns estudos também incluem casos em que pacientes apresentaram danos ao sistema nervoso central (SNC), incluindo reações psiquiátricas adversas como: mudanças de estado mental e de humor, e até precipitar ou exacerbar sintomas psiquiátricos existentes (JIANG e CHANG, 1999; KERNEY et al., 2006).

Com relação à estrutura, este grupo de anti-inflamatórios consiste em compostos com um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido, e são classificados de acordo com a Tabela 1. Assim, eles atuam na inibição da ação da enzima ciclooxigenase (COX) e afeta a síntese das prostaglandinas que estão envolvidas no processo de inflamação de tecidos no organismo humano (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006; MONTEIRO et al., 2008).

Embora os mecanismos de atuação dos AINEs sejam similares (inibição da COX), as propriedades farmacocinéticas e formas de eliminação variam para cada substância. O mecanismo de inativação e eliminação dos AINEs são promovidos pela oxidação pelas enzimas do Citocromo P-450 que estão presentes no fígado, pela conjugação de glucuronido (uridina-5'-difosfato (UDP), glucuronosiltransferases (UGTs) e, em menor grau, conjugação de sulfato (sulfotransferases), como mostrado na Figura 1. A maioria dos AINES são administrados na forma ativa, porém alguns como o sulindaco, requerem ativação metabólica, que acontece no processo de oxidação pelas enzimas do citocromo P-450 (URILCH; BIGLER; POTTER 2006).

Figura 1 - Metabolismo e excreção de AINEs em mamíferos, através de mecanismos de oxidação pelas enzimas do citocromo P450, por diferentes processos.



Adaptado de URILCH, BIGLER e POTTER 2006.

O metabolismo dos AINEs e de outras drogas, que seguem os processos semelhantes aos apresentados anteriormente, produzem metabólitos com diferentes propriedades físico-químicas, fisiológicas, farmacológicas e toxicológicas. Dessa forma, as enzimas do Citocromo P450 destacam-se por promoverem oxidação destes compostos com alta proporção de metabólitos reativos e/ou tóxicos (TYZACK; KIRCHMAIR, 2018).

## 1.2 PRÓ-FARMÁCO

O termo pró-fármaco foi introduzido por Adrien Albert em 1958, porém começou a ser popularizado na década de 1960. Esses pró-fármacos podem ser definidos como “derivados bioreversíveis de moléculas de fármacos que sofrem uma transformação enzimática e/ou química *in vivo* para liberar o composto progenitor ativo, que pode então exercer o efeito farmacológico desejado” (WERMUTH, 2008). Por essa definição encaixam-se medicamentos que foram desenvolvidos sem a intenção primária de interagir como pró-fármaco (salicila e ácido salicílico), metabólitos ativos (imipramina e desmetiliprimamina) e compostos intencionalmente preparados para

melhorar o perfil farmacocinético de uma molécula ativa (QANDIL, 2012, WERMUTH, 2008).

A definição excessivamente ampla do termo levou a classificar os pró-fármacos em duas categorias: pró-fármaco transportador e bioprecursores. Os transportadores implicam em uma ligação temporária da molécula ativa com uma porção de transporte que é frequentemente de natureza lipofílica. Uma reação de hidrólise simples cliva essa porção de transporte no momento adequado. Esse tipo de pró-droga é menos ativo que o composto original ou até inativo, já que a porção do transporte é escolhida por sua não-toxicidade e por sua capacidade de garantir a liberação do princípio ativo com cinética eficiente (WERMUTH, 2008). O princípio do pró-fármaco transportador consiste na “ligação de um grupo transportador ao fármaco ativo para alterar suas propriedades físico-químicas e, em seguida ocorre um ataque enzimático para liberar a porção ativa da droga. Isto quer dizer que os pró-fármacos são medicamentos contendo grupos protetores não-tóxicos usados para eliminar ou alterar as propriedades indesejadas da molécula precursora. Exemplos desses fármacos são: pivampicilina e bacampicilina (WERMUTH, 2008).

Já os bioprecursores são pró-fármacos resultantes da modificação molecular do princípio ativo. Essa modificação gera um novo composto, que é um substrato metabolizado por enzimas, levando a um metabólito que é o princípio ativo desejado (WERMUTH, 2008).

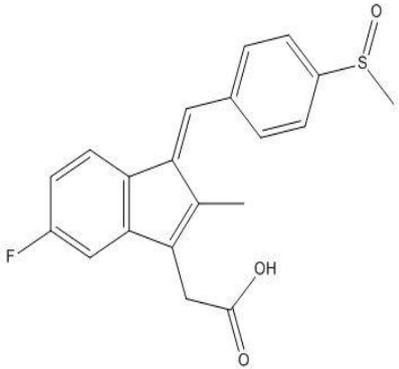
Uma pesquisa mostra que vários exemplos de metabólitos ativos, são derivados exclusivamente da Fase I da metabolização, e geralmente resultam de reações de oxidação, redução ou reações que não resultam na mudança de estado de oxidação (hidrólise, clivagem heterolítica, hidratação e etc). Um exemplo típico de um pró-fármaco bioprecursor eficaz é o medicamento anti-inflamatório sulindaco (WERMUTH, 2008).

### 1.3 SULINDACO

O sulindaco (ácido 2-[(3Z) -6-fluoro-2-metil-3-[(4-metilsulfinilfenil) metilideno inden-1-il] acético) é um anti-inflamatório da classe dos não esteroidais (AINEs), sintetizado pela primeira vez em 1972. Pertence ao grupo de derivados heterocíclicos do ácido acético (Quadro 1), juntamente com a indometacina e o etnolaco, e funciona como uma pró-droga bioprecursora, conforme anteriormente apresentado. O

sulindaco é biotransformado *in vivo* e o metabólito biologicamente ativo reduz a síntese de prostaglandinas, atuando na inibição da COX, que são responsáveis pelo processo de inflamação (GUERRA, 2016).

Quadro 1 - Informações físico-químicas do sulindaco

	<p><b>Fórmula molecular:</b> C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>FO<sub>3</sub>S</p> <p><b>Massa molecular:</b> 356,412 g/mol</p> <p>Propriedades físicas: sólido amarelo, inodoro</p> <p><b>Solubilidade:</b> solúvel em metanol, e 95% solúvel em etanol, parcialmente solúvel em acetato de etila e praticamente insolúvel em água. A solubilidade em água aumenta com o aumento do pH.</p> <p><b>Polimorfo:</b> Forma I, a temperatura de fusão 191°C, Forma II, a temperatura de fusão é 186°C</p>
--	---

Fonte: PLAKOGIANNIS e McCAULEY, 1984

O sulindaco, como a maioria dos anti-inflamatórios não esteroidais tem ação antipirética, analgésica e anti-inflamatória. É geralmente utilizado no tratamento da artrite reumatoide, osteoartrite, espondilite anquilosante, e gota aguda. Seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios são comparáveis àqueles alcançados com aspirina (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

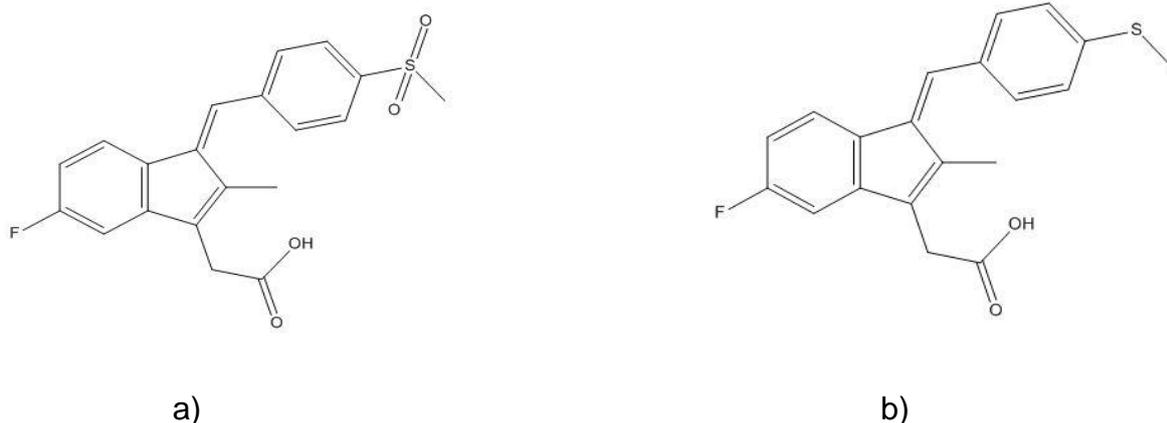
Embora desenvolvido para atuar como anti-inflamatório existem estudos que ligam o sulindaco à indução de apoptose de células cancerígenas, além de estudos ligados a utilização deste fármaco no tratamento de Alzheimer (LEITE, 2006). Em um estudo mais recente, conclui-se que um dos metabólitos do sulindaco pode ser um meio seguro de quimioprevenção viável do câncer de cólon (AONO et al., 2018).

Este fármaco foi desenvolvido para ser uma alternativa menos tóxica e eficaz à indometacina. Embora a incidência de toxicidade seja menor, reações adversas ao sulindaco são comuns. Os efeitos gastrointestinais estão presentes em quase 20%

dos pacientes, mas acredita-se que sejam menos graves em doses comuns comparando-se aos efeitos da indometacina. Foram relatados também efeitos no sistema nervoso central como: dor de cabeça por longos períodos, tonturas, vertigens e até mesmo alucinação, depressão e psicose, efeitos observados em até 10% dos pacientes em tratamento com este medicamento (BRUNTON; LAZO; PARKER,2006)

Para entender a atuação do sulindaco como fármaco no organismo, e os efeitos colaterais produzidos, é necessário entender seu processo de metabolização. Segundo Brunell e colaboradores (2011), o sulindaco, ao ser metabolizado pelo sistema hepático transforma-se no metabólito ativo: sulindaco sulfeto que além de atuar no tratamento da doença, pode também apresentar alguns efeitos tóxicos como danos ao sistema gastrointestinais. O sulindaco também produz outro metabólito que é o sulindaco sulfona, eliminado pelos rins, este não apresenta nenhum efeito tóxico relatado, sendo utilizado em pesquisas com células cancerígenas (DUPERRON; CASTONGUAY, 1997) (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura química dos metabólitos do sulindaco: a) Sulindaco sulfona (Ácido 2 - [(3Z) -6-fluoro-2-metil-3 - [(4-metilsulfonilfenil) metilideno] inden-1-il] acético) e b) Sulindaco sulfeto (Ácido 2 - [(3Z) -6-fluoro-2-metil-3 - [(4-metilsulfanilfenil) metilideno] inden-1-il] acético)



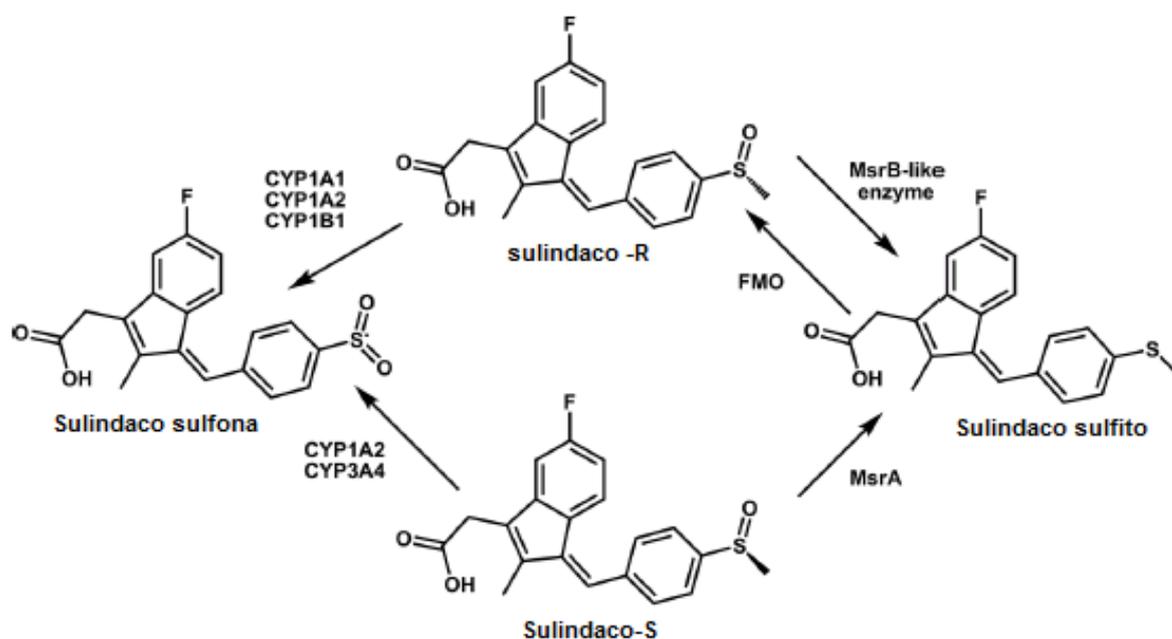
Os estudos do mecanismo de metabolização do sulindaco mostram que a metionina sulfóxido-redutase A, membro da família de enzimas metionina sulfóxido-redutase (MSr), reduz o sulindaco a sulindaco sulfeto, que é o metabólito ativo

(ETIENNE et al., 2003) enquanto que enzimas do citocromo P-450 são responsáveis por oxidar o sulindaco a sulindaco sulfona. (BRUNELL et al., 2011)

Embora o sulindaco sulfona não seja o metabólito que atua nos processos anti-inflamatórios, existem estudos que mostram que ele pode induzir a apoptose de células tumorais. Além disso há relatos que o sulindaco sulfona reduz significativamente os pólipos em pacientes com polipose adenomatosa colorretal em ensaios clínicos (AONO et al., 2018). Um estudo feito em comparação com o sulindaco e outros anti-inflamatórios frente a células de tumores de pele, mostra que apoptose celular induzida pelo sulindaco não está relacionada com os processos anti-inflamatórios (MARCHETTI et al., 2009).

Levando em consideração estes fatores, estudos foram realizados utilizando os isômeros ópticos do sulindaco para descobrir se as mesmas enzimas estavam envolvidas na formação dos metabólitos em ambos os isômeros, já que geralmente o sulindaco é administrado em mistura racêmica (BRUNELL et al., 2011). Estes estudos foram realizados com a utilização de ratos e identificam algumas das enzimas P-450 envolvidas no processo de oxidação dos isômeros ópticos do sulindaco. Além disso também mostra que outras MSr (Metiona sulfóxido- redutase) podem estar envolvidas no processo de redução do sulindaco a sulindaco sulfeto, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 – Produtos de metabolização do sulindaco, e indicação das enzimas envolvidas na formação dos produtos sulindaco sulfona e sulindaco sulfeto.



Fonte: Brunell et al. 2011

Conforme apresentado na Figura 3, o citocromo P-450 tem um importante papel no metabolismo e eliminação do sulindaco, e por isso torna-se importante aprofundar o estudo sobre essas superfamílias de enzimas, assim como o estudo metabólico de fármacos.

#### 1.4 CITOCROMO P-450

O citocromo P-450 (CYP) é uma superfamília de enzimas monooxigenases (transferem um único átomo de oxigênio para o substrato). Estas enzimas utilizam xenobióticos como substratos, ou seja, compostos que não fazem parte da composição habitual do organismo. Estes compostos por possuírem em sua maioria natureza lipofílica podem penetrar nas células permitindo uma interferência com os processos metabólicos normais a nível celular. Alguns exemplos de xenobióticos são drogas, pesticidas e poluentes (GONZÁLEZ; GUERRA, 2014).

As enzimas do CYP encontram-se amplamente distribuídas em diferentes seres vivos, desde bactérias a mamíferos, também em plantas e protistas. A sequência do genoma para essas enzimas varia para diferentes organismos, de forma que o número de sequências conhecidas aumente à medida que desenvolvem-se as pesquisas sobre essas enzimas. Dentro de um mesmo organismo encontram-se P450s em diferentes tecidos como rins, pulmão, pele e cérebro, porém as encontradas no fígado e no intestino delgado são as mais importantes (GONZÁLEZ; GUERRA, 2014) para a detoxificação de xenobióticos.

A função das enzimas do citocromo P-450 é catalisar reações com xenobióticos a fim de torná-los mais hidrossolúveis, portanto, mais facilmente excretáveis (GONZÁLEZ; GUERRA, 2014). A identificação dos metabólitos formados pelas enzimas do citocromo P-450 a partir dos xenobióticos, torna-se importante para o entendimento dos efeitos colaterais e toxicidade de fármacos (GUNARATNA, 2000).

As vias metabólicas utilizadas para biotransformar e eliminar xenobióticos são semelhantes para diferentes organismos como: mamíferos, plantas e microorganismos. Em todos os processos de desintoxicação desses organismos ocorre a etapa de funcionalização que geralmente resulta na monoxigenação do



destas enzimas: com a descoberta reações de isomerização, desidratação, desidrogenação, e reações de redução catalisadas por P450s, muito embora as reações de monooxidação permanecerem como a ação catalítica mais frequente. (MANSUY, 2007, 2011).

É importante destacar que as primeiras etapas da atuação do catalisador P-450 na oxidação do substrato foram determinadas com base em estudos enzimáticos realizados em frações microssômicas e P450<sub>cam</sub> purificada. Estes estudos preliminares foram posteriormente confirmados e compreendidos em mais detalhes, utilizando outros tipos de P450 (MANSUY, 2007).

Existem inúmeras variantes na família de enzimas do Citocromo P450, que além de serem responsáveis por metabolizar xenobióticos, ainda atuam no metabolismo de substâncias endógenas como esteroides e vitaminas, como no caso da vitamina D, sendo de grande importância para estudo da farmacologia, medicina e química (KAIM, SCHWEDERSKI, KLEIN, 2013).

As famílias e subfamílias de enzimas do citocromo P-450, são classificadas de acordo com sequências de aminoácidos homólogos, designados da sigla CYP seguindo por um número correspondente a família, e uma letra correspondente à subfamília. Cada tipo de enzima é responsável pela catálise da oxidação de determinada droga, ou outro tipo de xenobióticos. No entanto, algumas vezes, determinado tipo de fármaco sofre ação de mais de uma enzima. (GUANARATNA,2000)

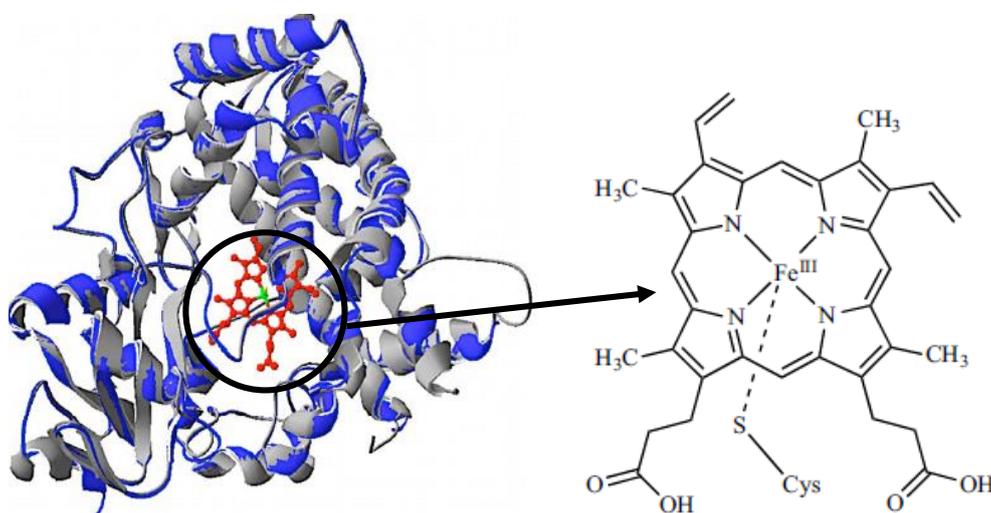
É também por causa das enzimas do CYP que ocorrem interações medicamentosas, ou seja, quando o efeito de um fármaco é alterado pela presença de outros fármacos, alimentos, bebidas ou pesticidas e poluentes. Essa interação pode ocorrer de três formas: a primeira é do tipo inibidora de enzima, competindo com o substrato pelo sítio ativo da enzima; a segunda é do tipo inibidora não competitiva, ligando-se ao complexo substrato-enzima ou ao grupo heme; e a terceira forma é do tipo irreversível, na qual a enzima é inativada pela ligação com a proteína ou com o grupo heme. (GUANARATNA,2000)

O estudo envolvendo o processo de catálise pelas enzimas do CYP é de interesse não apenas metabólico, mas também no ponto de vista da química fina, pelo desafio da transferência de um átomo de oxigênio do O<sub>2</sub> a substratos orgânicos considerados inativos, como hidrocarbonetos. Isso torna o estudo dos CYP ainda mais desafiador já que os estudos mostram que o ciclo catalítico que envolve as enzimas

do CYP segue um padrão característico de outras reações catalisadas por metais (KAIM, SCHWEDERSKI, KLEIN, 2013)

Para entender o funcionamento deste processo catalítico, é necessário destacar primeiramente que todas as enzimas do Citocromo P-450 tem um sítio ativo (heme) em comum, ou seja, uma protoporfirina IX coordenada ao ferro, que no caso das enzimas CYP possuem um ligante cisteínato coordenado a este centro metálico (Figura 4).

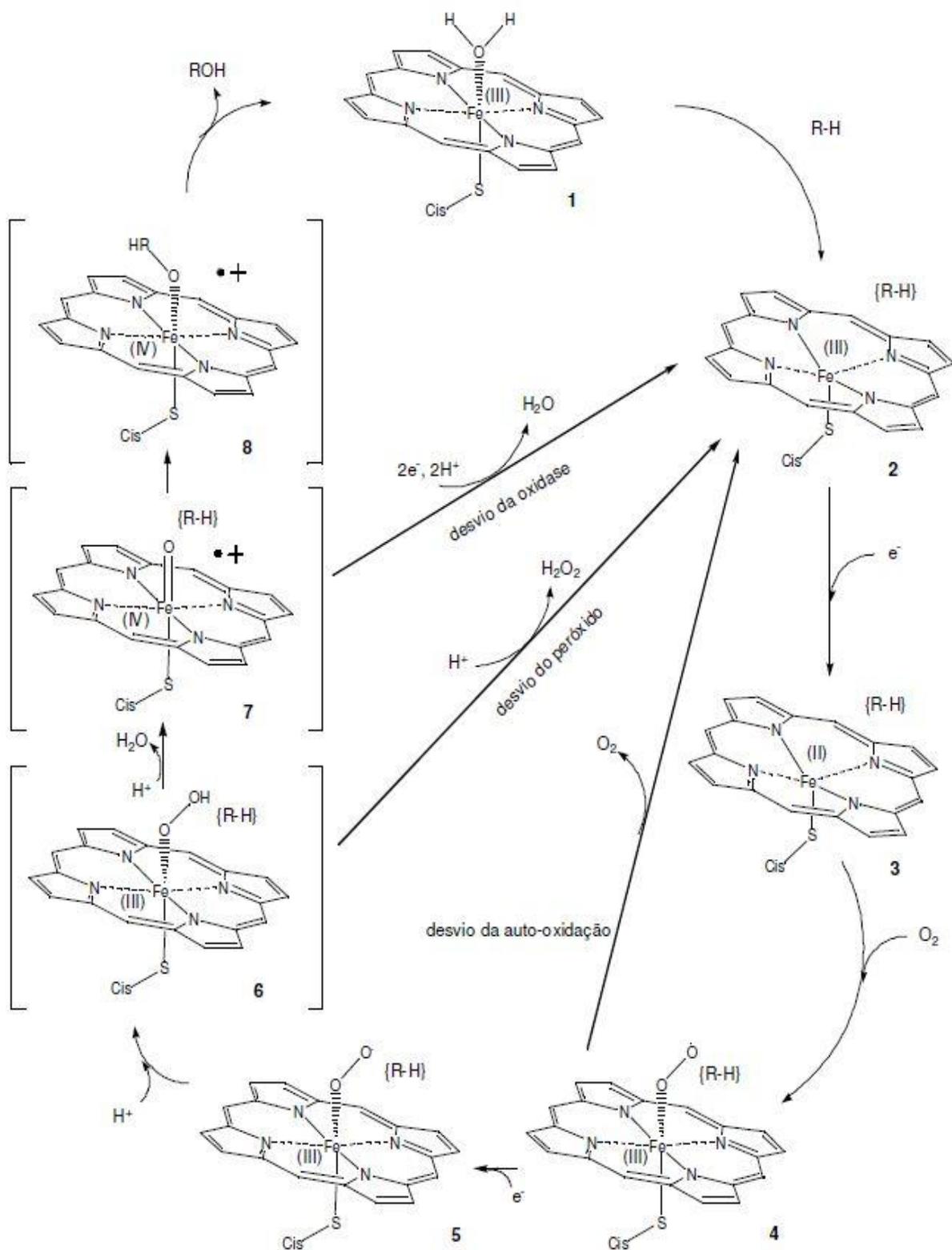
Figura 4-Sítio ativo das enzimas do CYP: à esquerda encontra-se uma representação do enovelamento proteico e a cavidade na qual encontra-se o sítio ativo (em destaque). À direita encontra-se a estrutura química desse sítio ativo heme (ferroprotoporfirina IX)



Fonte: Adaptado de CHAPMAN, JONES 2015a

O sítio ativo (ferroprotoporfirina IX, chamado também de grupo heme) é o centro metálico que catalisa os processos de oxidação dos xenobióticos nos organismos vivos. Assim, após algumas etapas do processo catalítico o resultado é a transferência de um oxigênio ao substrato, o que corresponde ao metabolismo de fase I, na qual também podem ocorrer redução e hidrólise, e torna o substrato hidrofílico de forma a ser facilmente excretável. Caso esta etapa não seja eficiente no processo de eliminação ocorre o metabolismo de fase II, no qual há a catalise por enzimas transferases na etapa de conjugação (CHAPMAN, 2015 a). A figura 5 apresenta as etapas do ciclo catalítico no qual atuam as enzimas do CYP na oxidação de um substrato.

Figura 5 - Ciclo catalítico do Citocromo P-450 detalhado em 8 etapas, na qual o xenobiótico é oxidado e o sitio ativo reestabelece a sua configuração original



Fonte: Adaptado de MANSUY, 2007

O ciclo catalítico do Citocromo P450 parte do estado predominante do sítio ativo da enzima, o centro metálico Fe(III) hexacoordenado pelo anel porfirínico, o cisteinato e uma molécula de água como ligantes axiais. Segundo Kaim, Schwederski e Klein (2013), o substrato liga-se a proteína por meio de interações hidrofóbicas dentro da cavidade proteica e próximo ao local de coordenação axial do sistema heme, causando uma transformação para o sistema 2, no qual há a perda simultânea do ligante água e formação de ferro(III) alto spin pentacoordenado. Assim, apresenta-se em uma estrutura fora do plano com um anel de porfirina abobadada.

O próximo passo, consiste na redução do ferro via NADPH (proveniente da Citocromo P-450 redutase), até o estado 3 do ciclo catalítico, que é um complexo de Fe(II) de alto spin. Esta etapa é seguida diretamente pela coordenação do oxigênio molecular ao ferro, formando um complexo oxi-saturado de Fe (III) em 4. Em seguida, ocorre uma segunda transferência de elétrons para o complexo, que fornece uma carga negativa ao complexo peroxo de ferro nucleofílico em 5. (KAIM, SCHWEDERSKI e KLEIN, 2013 e LOHMANN; KARST, 2008)

A espécie formada em 5, é um peroxo-ferro (III) muito lábil e de baixa rotação. São adicionados dois prótons a esta espécie, permitindo a clivagem da ligação O-O, e libera uma molécula de água em 6. Porém, essa clivagem requer dois equivalentes de oxidação, que podem ser disponibilizados via intramolecular, formando o complexo em 7,  $\text{Fe(V)}=\text{O}^{-2}$  ou combinações de  $\text{Fe (IV)}-\text{O}^{-1}$  e que colapsam para produzir um produto e um estado inicial heme, possivelmente levando à transferência de um radical monooxigênio (oxil) para o substrato. O centro oxo-ferro de alta valência é estabilizado pela doação de elétrons do grupo tiolato (cisteína) (KAIM, SCHWEDERSKI, KLEIN, 2013)

Nas etapas 7 e 8 do ciclo catalítico da figura 5, acontece a quebra homolítica da ligação C-H do substrato representado, que forma um complexo  $\text{Fe(IV)}-\text{OH}$  e então ocorre uma doação do par de elétrons do oxigênio para o orbital vazio do carbono do substrato representado na figura, reestabelecendo o catalisador e formando o produto.

Pode ocorrer uma etapa que concorre com a formação da espécie 5, nessa etapa o complexo 4 libera a molécula do oxigênio, regenerando a espécie inicial, sendo chamada de desvio de auto oxidação. Na presença de agentes externos como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), pode ocorrer o desvio do peróxido, na qual o peróxido

coordena-se ao centro metálico da espécie 6 e dissocia-se do ferro regenerando a espécie 2, sem formação de produtos. Além desses dois desvios, pode ocorrer o desvio da oxidase, na qual o complexo 7 libera uma molécula de água regenerando o complexo 2.

Conforme abordado nos parágrafos anteriores, as enzimas do citocromo P-450 são fundamentais no processo de metabolização de xenobióticos em organismos vivos. Devido a isto, estudar esse processo para criação de novos fármacos e até entender efeitos colaterais e toxicidade destes compostos é de extrema importância.

Nesta linha de pesquisa, muitos estudos foram discutidos na literatura. No entanto, maioria desses estudos envolvem técnicas *in vitro* que simulam o ambiente *in vivo*. Esses métodos geralmente são baseados em matrizes que abrangem desde o uso de fatias de fígado até o uso de microsomas em placas, que necessitam a adição de cofatores NADPH, com alto custo financeiro e dependem de aprovação de comitês de ética dos centros de pesquisa (CHAPMAN, JONES, 2015b). Esses sistemas podem apresentar pouca praticidade devido à dificuldade de manusear, no caso do fígado, e pouca reprodutibilidade, já em relação aos microsomas, embora eles forneçam um rápido levantamento dos centros metabolicamente ativos de uma droga, a situação *in vivo* que este representa é incompleta. (LOHMANN; KARST, 2008)

Assim, em busca de minimizar as desvantagens de trabalhar com esses sistemas, surgiu um campo de estudo no qual busca-se catalisadores sintéticos que mimetizem a ação dessas enzimas CYP, chamado de catálise biomimética.

## 1.5 CATÁLISE BIOMIMÉTICA E BIOINSPIRADA

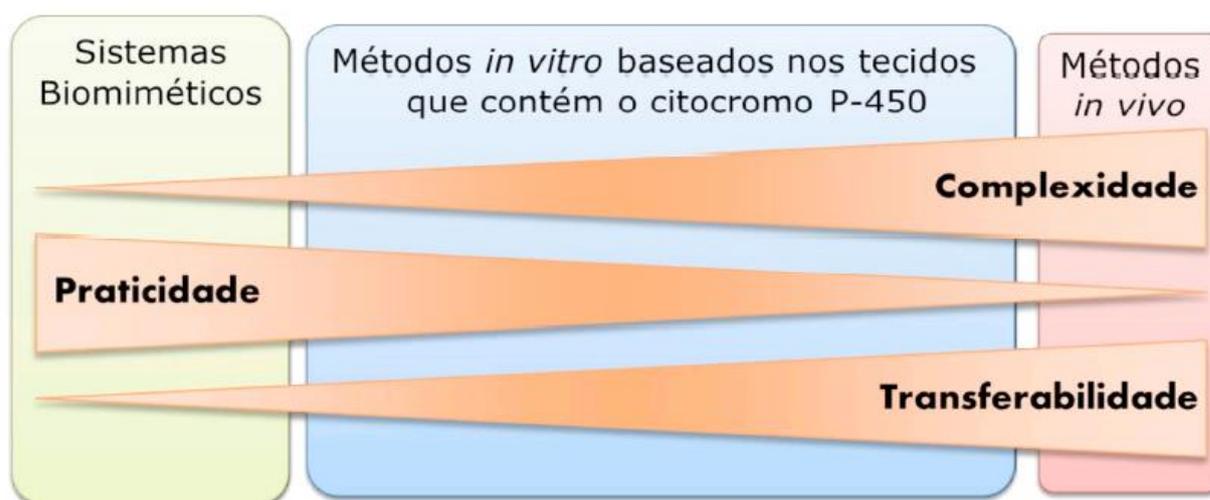
Os estudos realizados com as enzimas do CYP em relação ao metabolismo de xenobióticos, geralmente são realizadas de forma *in vitro* que simulam o ambiente *in vivo*. Nos métodos *in vitro*, geralmente são utilizados pedaços de tecidos, ou células hepáticas, neste caso os metabólitos são quantificados e identificados na maioria das vezes por espectrometria de massas. Também são utilizados microsomas em placas, que necessitam a adição de cofatores. No caso dos pedaços de tecidos, embora possam ser utilizados cérebro, coração e rins, o fígado é o órgão mais comumente

usados por possuir uma quantidade maior de P450s (GUNARATNA, 2000 SANTOS, 2012).

Os métodos utilizando pedaços de tecidos tem algumas vantagens em relação a outros métodos *in vitro*. No caso dos tecidos a junção célula-célula permanece intacta e há a presença dos cofatores em concentrações relevantes. Os tecidos do fígado, são reproduzidos de forma rápida e fácil. Porém possui algumas desvantagens como: esses tecidos degradam-se facilmente e tem um número limitado de período experimental, além de ter uma inadequada penetração do meio (GUNARATNA, 2000).

Um outro aspecto a ser destacado é que esses sistemas *in vitro*, no geral apresentam outras desvantagens: pouca praticidade devido à dificuldade de manusear, no caso do fígado, e pouca reprodutibilidade, já em relação aos microsomas, embora eles forneçam um rápido levantamento dos centros metabolicamente ativos de uma droga, a situação *in vivo* que estes representam é incompleta. Nesses sistemas a praticidade é inversamente proporcional a transferabilidade que é diretamente proporcional a complexidade dos processos (ver Figura 6) (LOHMANN; KARST ,2008).

Figura 6 - Correlação entre os modelos biomiméticos e os modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo do mecanismo de metabolização de xenobióticos.



Fonte: Adaptado de LOHMANN; KARST ,2008

Considerando-se as desvantagens de trabalhar com sistemas *in vitro/ in vivo*, são feitos esforços para simular o metabolismo de fármacos e outros xenobióticos

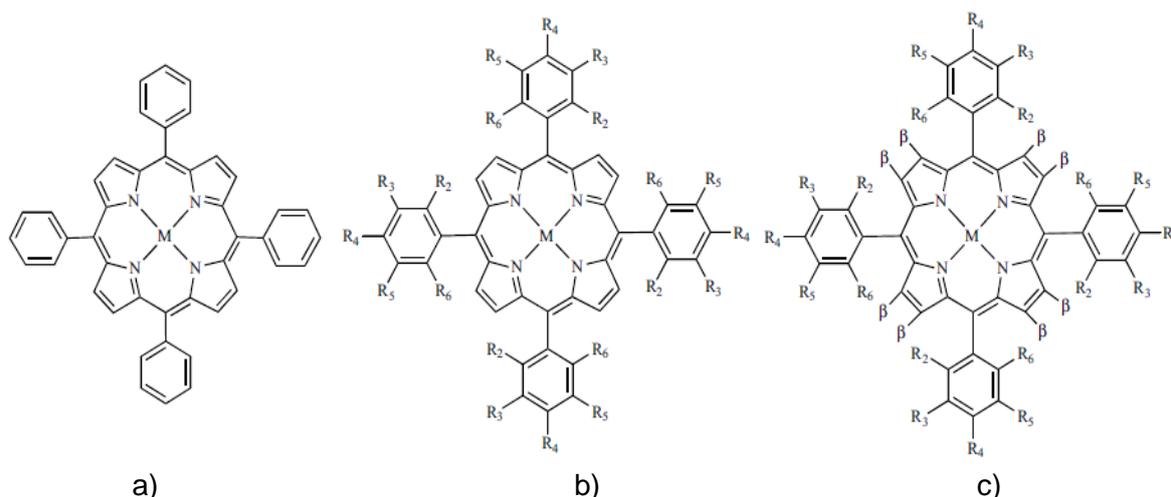
com catalisadores que são modelos sintéticos biomiméticos ou bioinspirados (LOHMANN e KARST,2008). Esses catalisadores são desenvolvidos com base na semelhança estrutural com o centro ativo análogo a todas as enzimas do CYP, ferro protoporfirina IX (Figura 4).

A catálise biomimética tem como objetivo mimetizar as características mais eficientes das enzimas do CYP: como o *turnover catalítico* e a seletividade, procurando evitar os problemas relacionados às reações em meio biológico, em especial os aspectos econômicos e bioéticos destes processos (CHAPMAN,2015 b).

A primeira geração dos catalisadores biomiméticos do CYP, foram desenvolvidos e publicados no final da década de 1970, no qual tetrafenilporfirinas (TPPs) (Figura 7), macrociclos com anéis fenílicos na posição meso-carbono e mostraram-se facilmente suscetíveis a degradação oxidativa. Estas desvantagens foram contornadas com o desenvolvimento de uma nova geração de porfirinas (CHAPMAN, 2015/ LOHMANN, 2008).

À segunda geração de metaloporfirinas (MePs), foram adicionados substituintes periféricos para evitar os problemas anteriormente relatados, já que os substituintes periféricos doadores ou retiradores de elétrons aumentariam a seletividade e estabilizariam os macrociclos. Esta segunda geração, embora tenha apresentado um sucesso significativo, ainda não apresentava bons resultados na oxidação de hidrocarbonetos. Para contornar este problema foi desenvolvida uma terceira geração de MePs. A esta geração de macrociclos adicionou-se substituintes  $\beta$ -pirrólicos retiradores de densidade eletrônica para aumentar a reatividade (Figura 7), com eficiência (CHAPMAN,2015).

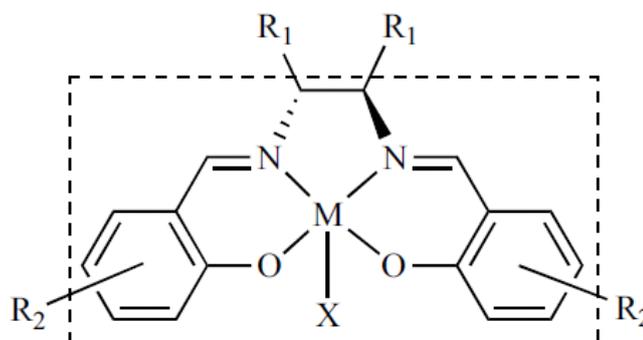
Figura 7 – As três gerações de catalisadores porfirinicos: a) Porfirinas de 1ª geração com grupos meso-fenílicos, b) Porfirinas de 2ª geração com fenil substituintes do  $R_{2-6}$ , doadores ou retiradores de elétrons, e c) 3ª geração com substituintes  $\beta$ -pirrólicos, retiradores de elétrons.



Fonte: CHAPMAN, 2015b

Um outro tipo de catalisador biomimético que vem sendo usado em conjunto com metaloporfirinas são os complexos salen (acrônimo para N, N-bis (salicilideno) etilenodiamina e seus derivados), devido às semelhanças funcionais, de forma intercambiável ou comparativamente. Os complexos salen (Figura 8), por possuírem estrutura diferente dos macrociclos, são chamados complexos bioinspirados. Eles possuem algumas vantagens em relação às MePs: maior estabilidade sob condições de reação oxidativa, catálise mais simples e barata, e enantiosseletividade excepcional, particularmente em relação à epoxidação de olefinas. (CHAPMAN, JONES, 2015b).

Figura 8 - Estrutura geral de um complexo salen



Fonte: CHAPMAN, 2015b

Os complexos salen foram alvos de vários estudos na oxidação de xenobióticos ao longo dos anos, no qual foram avaliados comparativamente sua capacidade de

conversão e a seletividade frente aos substratos. Por esse motivo, o campo da catálise biomimética tem crescido rapidamente, e mostrado a sua importância na elucidação de mecanismos de reação de xenobióticos em organismos vivos.

Os estudos da catálise biomimética apresentam a aplicação de catalisadores biomiméticos ou bioinspirados à oxidação de fármacos, corantes, pesticidas e até hidrocarbonetos. Dentre esses trabalhos é possível destacar alguns: o estudo da oxidação da simazina, que é um herbicida largamente utilizado no Brasil e Estados Unidos, e tem toxicidade crônica relacionado a anorexia, distúrbios endócrinos e é potencialmente carcinogênico, por Santos e colaboradores (2011).

Neste estudo foram aplicadas diferentes metaloporfirinas (MePs) de segunda geração, utilizando diferentes doadores de oxigênio, com o objetivo de auxiliar o estudo de mecanismos de oxidação deste pesticida (SANTOS et al, 2011). Neste trabalho foram utilizados peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido meta-cloroperbenzóico (*m*-cpba), e iodosilbenzeno (PhIO) como oxidantes, na proporção molar de 1:20:60 e 1:60:60, na ordem catalisador, oxidante, substrato. Essas reações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e quando separadas foram analisadas por espectrometria de massas. O estudo de oxidação da simazina mostrou que MePs podem ser considerados modelos biomiméticos para enzimas do citocromo P-450 e com isso foi possível elucidar o mecanismo de oxidação desta *in vivo* por meio da catálise biomimética (SANTOS et al., 2011).

A catálise biomimética utilizando MePs também podem ser exploradas em outro tipo de aplicação, como é o caso do trabalho de Linhares e colaboradores (2014), no qual foram usadas diferentes MePs de manganês (III), de segunda geração, na oxidação do indol, com o objetivo de obter uma nova rota para a formação do corante índigo. O indol é um componente nuclear de várias estruturas, com foco principal nas atividades biológicas de moléculas que contém esta estrutura. Um dos produtos da oxidação do indol é o índigo, um pigmento de cor azul.

As enzimas da família Citocromo P-450 estão associadas a oxidação do indol a índigo em organismos vivos. E por isso foi proposto um trabalho utilizando MePs com centro metálico manganês (III), que estão entre os modelos mais eficientes e fáceis de obter de enzimas P-450. A utilização destes complexos de manganês (III) tetraarilporfirinas mostrou-se eficiente para obter os produtos de oxidação do indol: o índigo e indirubina. Embora estes compostos não sejam os produtos principais da oxidação por P450s, a catálise biomimética mostrou-se uma alternativa de produção

desses corantes em processos com condições facilitadas e com custo de produção menor (LINHARES et al., 2014). A oxidação do indol neste trabalho também produz Indirubin, que é um pigmento rosa, que pode apresentar propriedades citotóxicas (LINHARES et al., 2014).

Um dos trabalhos mais recentes em catálise biomimética utilizando MePs é o trabalho de Silva e colaboradores (2016), no qual utilizou-se porfirinas de primeira, segunda e terceiras gerações na oxidação do ciclohexano, nesta publicação, foram utilizadas como doadores de oxigênio utilizou iodossilbenzeno e iodobenzeno diacetato, além de imidazol para avaliar o efeito do ligante axial.

O iodossilbenzeno tornou-se um dos mais populares doadores de oxigênio em sistemas biomiméticos porque produz espécies ativas em uma única etapa, porém existem algumas desvantagens na utilização deste como oxidante, dentre elas: a baixa solubilidade em solventes orgânicos e seu potencial explosivo. O iodobenzeno diacetato, reagente utilizado na síntese do iodossilbenzeno, não enfrenta as desvantagens citadas, o que torna um oxidante potencialmente mais vantajoso que o iodossilbenzeno (SILVA et al., 2016).

Como já citado no tópico anterior, o sítio ativo das enzimas do CYP consiste em um ferro protoporfirina IX que possui ligantes coordenados em posição axial, que consiste em átomo de enxofre e resíduos de aminoácidos, e segundo a literatura estes ligantes podem afetar diretamente a reatividade dos catalisadores de forma a aumentar o rendimento e a seletividade, pois a relação entre o centro metálico ferro e do enxofre da cisteína cria um efeito “push-pull” atribuído ao poder oxidante da CYP. Isso é justificado parcialmente pela química quântica e pelo efeito de campo, resultante da mistura de orbitais e da carga do ligante axial. (CHAPMAN et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Assim, no trabalho de Silva e colaboradores (2016) as reações foram realizadas na proporção molar de 1:10:4650, catalisador, oxidante e substrato e foram analisadas após noventa minutos a temperatura de 25°C por cromatografia a gás, utilizando bromobenzeno como padrão interno, e os tempos de retenção do produto comparados com amostras dos padrões dos produtos de oxidação.

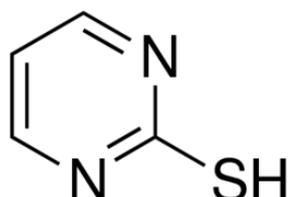
Nesse estudo chegou-se à conclusão que existe uma concentração ótima de imidazol na qual a eficiência do catalisador é maximizada, e após essa concentração há uma queda, que se atribui a precipitação do catalisador. Com relação as reações na ausência do imidazol é possível concluir o que já foi relatado na literatura: que as

porfirinas de terceira geração mostram-se mais eficientes que a de segunda, que são mais eficientes do que as de primeira.

Outros trabalhos avaliam o efeito do ligante axial em sistemas biomiméticos. Um dos mais recentes é de Chapman e colaboradores (2016), em que foram avaliados diferentes ligantes axiais que variam em pKa, em tamanho e em natureza na oxidação dos fármacos: fentacetina, metacetina e acetanilida, utilizando metaloporfirinas como catalisadores biomimético, e ácido meta-cloroperbenzóico (*m*-cpba) como doador de oxigênio. Foram avaliados além dos ligantes que são heterocíclicos de nitrogênio, ligantes com enxofre para comparação.

Este estudo concluiu que a mercaptopiridina, um heterociclo com nitrogênio e enxofre (Figura 9), foi o único ligante eficiente em todos os três substratos e catalisadores empregados. Além disso não foi observada a formação de dímeros ou de produtos de decomposição, o que aconteceu nos sistemas utilizando ligantes axiais de enxofres: benzenomercaptano e benzenotiol.

Figura 9 - Estrutura da mercaptopiridina, ligante axial utilizando, que coordena ao centro metálico por meio do par de elétrons do enxofre

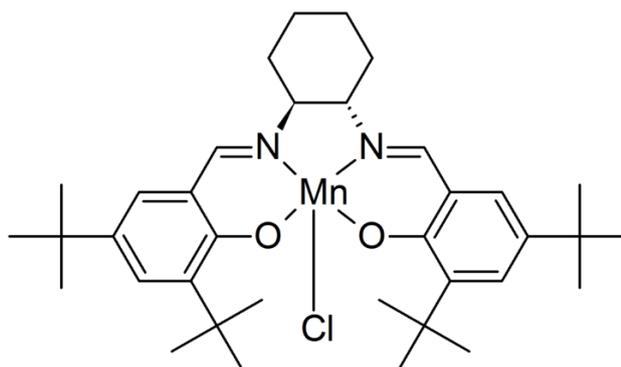


Com base na revisão da literatura as MePs são amplamente utilizadas como modelos biomiméticos, devido a sua semelhança estrutural com o sítio ativo das enzimas CYP. Porém, na catálise biomimética também são empregados catalisadores bioinspirados nas enzimas CYP, principalmente os compostos com ligantes Salen. São chamados de bioinspirados porque possuem a estruturas diferentes do sítio ativo da CYP quando comparada às MePs, porém reproduzem sua ação catalítica.

Há muitos relatos na literatura sobre o uso de salen empregados como catalisadores. Em um destes trabalhos, investigou-se os complexos Jacobsen (Figura 10) cloreto de (N, N'-bis (3,5-di-terc-butilsalicilideno) -1,2-cyclohexanodiaminomanganês (III), que são complexos de salen com centro metálico manganês (III) na oxidação do fármaco carbamazepina (CBZ). Este fármaco é um antiepiléptico, utilizado no tratamento de convulsões parciais, cujo metabólitos foram

elucidados nas últimas décadas, sendo o principal deles a carbamazepina-10,11 epóxido (CBZ-EP) (MACLEOD et al., 2007).

Figura 10 – Estrutura química correspondente ao isômero S, S Jacobsen, complexo salen com centro metálico de Mn(III) e substituintes terc-butila



No trabalho de MacLeod e colaboradores (2007) investigou-se a oxidação da carbamazepina por Jacobsen (Mn(salen)) em meio homogêneo e em meio heterogêneo, suportado em membrana polimérica, pois embora em meio homogêneo o rendimento do produto seja maior, o meio heterogêneo ainda oferece vantagens como: facilidade de purificação, a possibilidade de reciclar o catalisador, e a habilidade de imitar o sítio ativo da enzima. Como doadores de oxigênio foram utilizados peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido meta-cloroperbenzóico (*m*-cpba) e terc-butil hidroperóxido (t-BuOOH). Também foi investigado o efeito do ligante axial (MACLEOD et al., 2007).

Utilizando-se de técnicas como CLAE para análise das reações foi possível determinar diferentes parâmetros que podem modificar os rendimentos e seletividade do catalisador, dentre eles: o efeito do pH, e de diferentes oxidantes; o efeito de diferentes solventes nas reações utilizando *m*-cpba como oxidante, o efeito do ligante axial nas reações utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante, e também a comparação entre o sistema homogêneo e heterogêneo utilizando os diferentes oxidantes (MACLEOD et al., 2007).

Esse estudo concluiu que a formação do principal metabólito CBZ-EP é alta, independente do oxidante, solvente ou catalisador. Que os oxidantes utilizados foram mais eficientes em baixos valores de pH, embora a influência deste seja pequena para os sistemas de *m*-cpba e t-BuOOH. Além disto, o trabalho mostra que os sistemas

heterogêneos mimetizam adequadamente a cavidade proteica da enzima, embora as reações utilizando  $H_2O_2$  não tenham sido capazes de epoxidar a CBZ (no caso dos sistemas heterogêneos). Neste caso a membrana hidrofóbica criou uma barreira contra o peróxido de hidrogênio hidrofílico, impedindo sua sorção e, portanto, impossibilitando a oxidação da carbamazepina (MACLEOD et al., 2007).

Um outro estudo do mesmo grupo de pesquisa compara a oxidação da primidona por MePs e catalisadores Jacobsen. A primidona (PRM, 5-etil-hexa-hidro-4,6-dioxo-5-fenilpirimidina) é um medicamento anti-convulsivante em uso desde o início dos anos 50. De acordo com a literatura é convertido em feniletilmalondiamida (PEMA) e fenobarbital (FENO) pelo Citocromo P450, que possuem ações farmacológicas semelhantes ao composto inicial para que os metabólitos mantenham o efeito por mais tempo (MACLEOD et al., 2008).

Esse trabalho propôs a oxidação desse fármaco utilizando tanto MePs como complexo Jacobsen em meio homogêneo, e como doadores de oxigênio: PhIO, m-cpba e t-BuOOH, com o objetivo de auxiliar na compreensão do mecanismo de formação dos metabólitos já elucidados na literatura (MACLEOD et al., 2008).

De acordo com os dados relatados neste trabalho, em todos os sistemas formam os metabólitos PEMA e FENO, ainda que em alguns casos como no PhIO com catalisador Jacobsen, formou apenas traços de PEMA. Em comparação com os catalisadores utilizados os de maior rendimento foi a MnTFPP (5,10,15, 20 tetraquis (Pentafluorofenil) porfirina) e em segundo o complexo Jacobsen. Ao avaliar o efeito do ligante axial, o imidazol aumentou a formação de FENO, e diminui a de PEMA nos sistemas que utiliza-se MnSalen como catalisador. Já com relação ao pH, as formações destes produtos foram favorecidas em pH menores, ainda considerando os sistemas com MnSalen (MACLEOD et al., 2008). Neste estudo concluiu-se que a formação dos metabólitos foi altamente dependente das condições de pH, ligante axial (co-catalisador) e oxidante. E também foi possível perceber que a aplicação desses modelos biomiméticos tem potencial para síntese de metabólitos de drogas podendo vir a diminuir os estudos *in vitro* no futuro (MACLEOD et al., 2008).

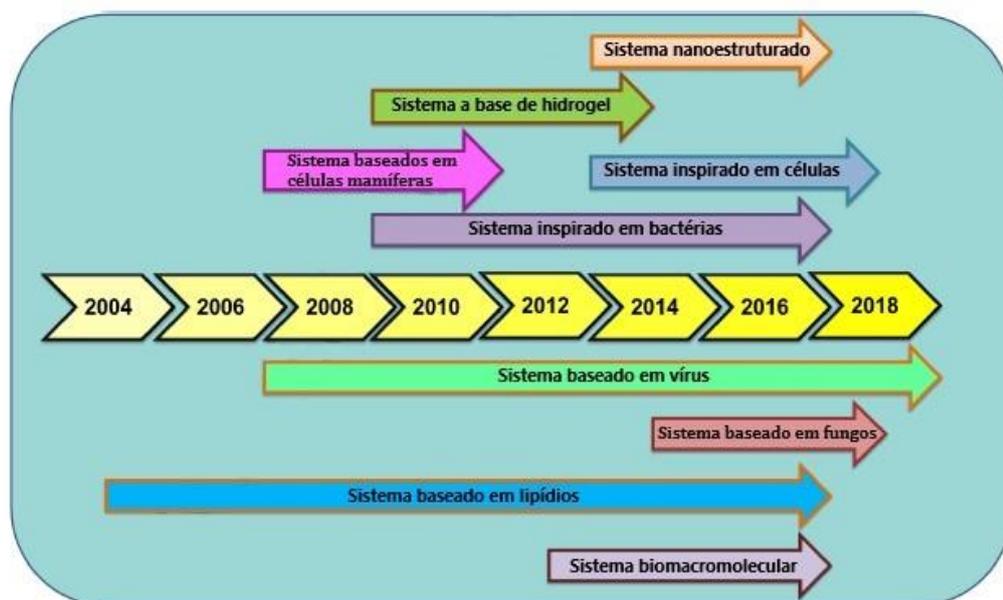
Um estudo recente mostrou outros tipos de catalisadores bioinspirados como complexos de aminopiridina, derivados da L-prolina, com centro metálico de

manganês (III) na epoxidação assimétrica de olefinas, utilizando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como oxidante (WANG et al., 2018). Neste trabalho os ligantes foram sintetizados, caracterizados e posteriormente metalados com manganês, e as reações foram efetuadas utilizando  $H_2O_2$  e ácido carboxílico como aditivo e analisadas por cromatografia gasosa aplicada a espectrofotometria de massas (CG-MS). Em conclusão, o trabalho concluiu que dois complexos sintetizados fornecem produtos alvos de excelentes enantiosseletividade (WANG et al., 2018).

Apesar dos estudos citados anteriormente terem focado suas pesquisas no Citocromo P450, é importante destacar que o campo da catálise biomimética, não envolve apenas mimetizar as enzimas do CYP. Devido aos materiais da natureza envolverem uma série de propriedades que as tornam interessante para pesquisa como: miniaturização, resistência e adaptabilidade; um sistema biomimético ou bioinspirado pode buscar mimetizar qualquer propriedade, ou um conjunto de propriedades que sejam interessantes em sistemas biológicos. E em alguns casos ao mimetizar essas propriedades há a possibilidade de desenvolver materiais que altamente sofisticados e que sejam recicláveis, com impactos ambientais reduzidos (SANCHEZ et al., 2005).

Alguns exemplos de estudos de sistemas biomiméticos e bioinspirados ao longo dos anos estão apresentados na Figura 11. Segundo Sabu e colaboradores (2018), os portadores biomiméticos e bioinspirados são uma abordagem promissora para entrega de medicamentos e genes. Um outro aspecto a ser destacado nesse campo de pesquisa é o desenvolvimento de nanotransportadores bioinspirados. Estes são considerados nanotransportadores mais eficientes que os convencionais devido a sua especificidade em transportar a porção terapêutica para o local alvo, o que é de grande aplicação no diagnóstico clínico (SABU et al., 2018)

Figura 11 - Sistemas biomiméticos e bioinspirados de entrega de medicamentos e genes: a evolução nos anos de 2004 a 2018, mostrando os sistemas nanoestruturados, inspirados em células e baseados em fungos.



Fonte: Adaptado de SABU et al., 2018

Um outro exemplo de estudo que se enquadra no campo da biomimética são desenvolvimento de metal-orgânico biomiméticos (MOMs). Esses MOMs têm se destacado nas últimas décadas devido a diversas aplicações. Um exemplo disto são fogos de artifícios de metal-orgânico (MOF) e poliedro de metal orgânico (MOPs) (SHEIKHPOUR; BARANI; KASAEIAN, 2017). Os MOFs são materiais promissores para armazenamento de gás, processo de separação, seqüestro de carbondóxido, sensores, administração de medicamentos, materiais fotossensíveis, materiais magnéticos, catalisadores heterogêneos, entre outras aplicações. Os MOPs, por outro lado, são conjuntos de coordenação discretos que normalmente possuem estruturas bem definidas e cavidades confinadas” (SHEIKHPOUR; BARANI; KASAEIAN, 2017).

Sheikhpour, Barani e Kaseian (2017) apresentam um trabalho no qual MOFs são usados na catálise biomimética. A aplicação destes em catálise biomimética é recente quando comparada ao desenvolvimento de pesquisa na área terapêutica, porém mostra que podem vir em a contribuir significativamente nesta nova área.

Os estudos com MOFs por exemplo vão desde a imitação do ambiente de coordenação existentes no grupo heme ou na cobalamina (vitamina B12), ao encapsulamento de metaloporfirinas como catalisadores biomiméticos e ao desenvolvimento de sensores. Assim, chega-se à conclusão que o desenvolvimento do trabalho com MOMs biomiméticos pode crescer e contribuir muito para área de catálise biomimética (SHEIKHPOUR; BARANI; KASAEIAN, 2017).

O campo da biomimética pode ser de imensa contribuição para o desenvolvimento de novos materiais que imitem essas propriedades biológicas. Porém, destaca-se principalmente no campo da catálise, a possibilidade de contribuir para os estudos que buscam a elucidação do metabolismo de drogas *in vivo*, e com isso contribuir também para o desenvolvimento de novos fármacos, pesticidas que sejam menos tóxicos e mais eficientes.

Um dos catalisadores bioinspirados propostos nesta dissertação são os complexos com ligantes cyclam. Embora os trabalhos com o cyclam como catalisador bioinspirado no CYP ainda não tenham sido publicados, existem relatos na literatura do uso destes complexos em epoxidação e reações de hidroxilação C-H. Eventualmente, os autores concluíram que complexos não-heme (como os do cyclam) são oxidantes fortes, capazes de oxidar hidrocarbonetos mais rapidamente do que a conversão em oxo-ferro, o que motiva a estudar a ação desses complexos como catalisador bioinspirado (LYAKIN, 2019).

Em uma revisão da literatura não foram encontrados trabalhos com anti-inflamatórios derivados do ácido acético ( ex: sulindaco, indometacina, cetnolaco, etc- Tabela 1). Considerando que como já foi mencionado no tópico 1.1 esses AINEs são de uso comum, e vendidos sem receitas médicas, é necessário que os estudos sobre seus possíveis efeitos colaterais sejam extensos e de conhecimento da população.

No caso do sulindaco destaca-se que além do seu uso como anti-inflamatório, este fármaco tem tido sucesso em pesquisa em apoptose celular de células cancerígenas (LEITE, 2006). Por isso torna-se importante, estudar e entender o mecanismo envolvido no metabolismo deste fármaco, que neste trabalho será o foco por meio da catálise biomimética.

## 1.6 BIOTRANSFORMAÇÃO POR FUNGOS - *Cunninghamella elegans*

O estudo do metabolismo de xenobióticos envolvem experimentos *in vitro* que simulam o ambiente *in vivo*. Esses experimentos podem ser feitos utilizando tecidos de órgãos, microsomas entre outros que envolvem o uso de animais, como ratos. Como alternativa para diminuir esse uso de cobaias vivas pode-se substituir por um sistema microbiano de biotransformação por fungos, devido a capacidade biocatalítica do fungo para biotransformar pequenas moléculas (ZHANG et al., 1995 e HÜTTEL e HOFFMEISTER, 2014).

Dentre as vantagens de se utilizar o sistema microbiano encontram-se: baixo custo, facilidade de manuseio, capacidade de expansão e potencial para reduzir o uso de animais (ZHANG et al., 1995).

É importante destacar que o termo biotransformação diz respeito a transformação de um composto químico por um organismo. Em um sentido mais restrito pode-se dizer que a biotransformação ocorre apenas dentro da célula viva, porém as reações com fungos muitas vezes não se distinguem daquelas que ocorrem nas células ou em processos catalisados por enzimas (HÜTTEL e HOFFMEISTER, 2014).

Essas biotransformações podem ser do tipo xenobióticas, na qual o substrato é totalmente desconhecido pelo organismo, ou do tipo transformações biossinteticamente padronizadas nas quais o substrato está relacionado a um intermediário natural de uma via biossintética intrínseca ao organismo (HÜTTEL e HOFFMEISTER, 2014).

Uma das espécies de fungos utilizados em biotransformações é *Cunninghamella elegans*. Trabalhos apontam que estes fungos possuem a capacidade de metabolizar xenobióticos de forma semelhante aos mamíferos e prever as vias metabólicas de medicamentos (ZHANG et al., 1995). Assim, o fungo *C. elegans* metaboliza uma série de xenobióticos de maneira estéreo e régiosseletiva (MOODY, FREEMAN e CERNIGLIA, 1999).

Este fungo também tem demonstrado a capacidade de catalisar biotransformações do tipo de fase I e fase II do CYP. (LISOWSKA et al., 2006). Existem na literatura muitos trabalhos relacionados a biotransformações de xenobióticos por *C. elegans*, incluindo medicamentos, pesticidas e outros tipos. Em

um desses trabalhos encontram-se a biotransformação da doxepina. A doxepina (3-(6H-dibenzo [c, f] oxepin-11-ilideno) propil) dimetilamina) é um antidepressivo, comercializada na forma 85:15 da forma *trans* (*E*) para *Cis* (*Z*), sendo a forma *cis Z* mais ativa farmacologicamente (MOODY, FREEMAN e CERNIGLIA, 1999). Este fármaco é utilizado no tratamento da depressão, ansiedade, fibromialgia e dores crônicas. Neste trabalho de biotransformação por *C. elegans* obteve-se 14 metabólitos que foram separados por CLAE e identificados por Ressonância magnética nuclear de hidrogênio <sup>1</sup>HRMN e por espectrometria de massas (MOODY, FREEMAN e CERNIGLIA, 1999).

Os autores deste estudo concluíram que o metabolismo de fase I e a estereosseletividade desse fungo corresponde ao que acontece com a droga no corpo humano. Destaca-se que de acordo com estudos anteriores indicaram que o fungo é altamente eficiente em sua produção de metabólitos a partir de antidepressivos tricíclicos e drogas. Além disso, capacidade de *C. elegans* em imitar metabolismo de mamíferos e realizar novas biotransformações demonstra claramente que os sistemas microbianos representam uma alternativa ao uso de sistemas mamíferos reais ou substâncias químicas (MOODY, FREEMAN e CERNIGLIA, 1999).

Encontram-se na literatura trabalhos semelhantes que levam a mesma conclusão. O estudo feito por ZHANG et. al, 1996 mostra que a biotransformação desse fungo aplicado a clorpromazina, um antipsicótico utilizado no tratamento de psicose, depressão, náusea e vômitos, são obtidos os potenciais metabólitos dos mamíferos (ISMAIL et al., 2015).

Em um dos estudos mais recentes que envolve a biotransformação de compostos da furanocumarina, que representa compostos ativos contra herbívoros presentes em mais de 13 famílias de plantas. Esses compostos foram relatados no uso de tratamentos de distúrbios de pele como psoríase e despigmentação (ISMAIL et al., 2015). Neste estudo observa-se que o *C. elegans* foi capaz de metabolizar as furanocumarinas analisadas: xautotoxinas, bergapten e imperatorine em derivados fenólicos correspondentes a elas, via desalquilação, reação muito comum em sistemas utilizando *C. elegans* (ISMAIL et al., 2015).

Não foram encontradas na literatura investigações referentes a biotransformação de sulindaco por *C. elegans* ou outros fungos. É possível, ao realizar esse estudo fazer a comparação dos produtos obtidos pela *C. elegans*, que como já foi mencionado, se aproxima mais do metabolismo de mamíferos, com a catalise biomimética proposta. Assim, a junção dessas duas técnicas forneceria um maior suporte para propor os mecanismos envolvidos na metabolização do fármaco escolhido, o sulindaco, para o estudo proposto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade catalítica de complexos biomiméticos e bioinspirados (5,10,15, 20 tetraquis- tetrafluorofenilporfirinas de Fe(III) e Mn(III), Cyclam com Fe(III) e Mn(III) e os isômeros R, R e S, S Jacobsen) no Citocromo P-450 na oxidação do fármaco sulindaco e compará-los com os produtos obtidos a partir de estudos *in vitro* por meio da biotransformação com uso do fungo *C. elegans*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar comparativamente as condições de catálise propostas na oxidação do fármaco, nas quais são variados a natureza e a concentração dos oxidantes (iodosilbenzeno, ácido metacloroperbenzóico, água oxigenada, e hipoclorito de sódio), a natureza dos catalisadores (5,10,15, 20 tetraquis- tetrafluorofenilporfirinas de Fe(III) e Mn(III), Cyclam com Fe(III) e Mn(III) e os isômeros R, R e S, S Jacobsen) e a adição de co-catalisadores (Imidazol e Acetato de amônio).
- Comparar os produtos obtidos nos sistemas biomiméticos propostos com sistemas *in vitro*, através estudo de Biotransformação utilizando-se o fungo *Cunninghamella elegans* em diferentes condições.
- Identificar os metabólitos formados pela biotransformação, comparar os produtos obtidos na biotransformação com os produtos biomiméticos e propor mecanismos de reações para formação desses compostos;

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS

- Sulindaco (99%, Supelco)
- Peróxido de hidrogênio 200 volumes (Fluka)
- Ácido meta-cloroperbenzóico 70% (Acros Organics)
- Iodobenzeno diacetato (98%) foi adquirido da Sigma-Aldrich
- A porfirina de base livre[5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil) porfirina - H<sub>2</sub>(TFPP)Cl] foi adquirido da Mid Century.
- Os solventes metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) grau HPLC foram utilizados da J. T. Baker.
- Placas de TLC em alumina (Supelco).
- O co-catalisador acetato de amônio foi adquirido da Sigma-Aldrich.
- Imidazol 99% (Acros Organics).
- Ácido trifluoroacético (99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich.
- Metanol deuterado (Merse).
- 1,4,8, 11 Tetraazociclodecano – ciclam- (98%) foi adquirido da Strem-Chemicals.
- Cloreto de manganês (II) – MnCl<sub>2</sub> (Acros Organics).
- Cloreto de Ferro (III) – FeCl<sub>3</sub> (Acros Organics)
- Hipoclorito de sódio – NaClO (10 a 12%) – da Nalgon: Equipamentos Científicos

#### 3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- O equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é da marca Shimadzu, equipado com duas bombas modelo LC-20AT, com detector espectrofotométrico SPD-M20A de arranjo de diodos, acoplado a um forno de coluna CTO-20A e controlador de sistema CBM-20A. Foi utilizada a coluna C18 Zorbax ODS (Agilent) com tamanho de partícula de 5 µm (4.6 x 250mm). A coluna analítica foi precedida de pré-coluna C18 Agilent.

- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, empregando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm.
- Espectrômetro Bruker, modelo Vertex 70, FTIR.
- Aparelho de água ultra pura da Gehaka.
- Balança analítica Quimis-líquido Q500L210C com precisão de 4 casas decimais.
- Balança analítica Shimadzu AUW220D com precisão de 5 casas decimais.
- Banho Ultrassom – Quimis – Q3360.
- Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio –  $^{13}\text{CRMN}$ ,  $^1\text{HRMN}$  – feita do LABAREMN (Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear). Varian. Inova 500 de 11, 7 Tesla.
- Potenciostato/ Galvanostato PGSTAT 128N-Autolab
- Vortex Tecnal
- AutoClave Tecnal

### 3.3 INSERÇÃO DE MANGANÊS (II) NA 5,10,15,20-TETRAQUIS (PENTAFLUOROFENIL) PORFIRINA (MnTFPP)

A metalação seguiu procedimento consultado na literatura (ADLER et al, 1970). Foi feita em um balão de 2 bocas adicionando-se uma solução da base livre, contendo 28,3 mg de 5,10,15,20-tetraquis (pentafluorofenil) porfirina ( $\text{H}_2\text{TFPP}$ ) em 25 mL de acetonitrila e 5 mL de DMF. Esta solução foi purgada em atmosfera de argônio por 30 min. Em seguida, foram adicionados 73,2 mg de acetato de manganês, a reação permaneceu em um sistema de refluxo a  $60^\circ\text{C}$ , em atmosfera de argônio por 5 dias e foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD).

Após o término da reação, o solvente foi eliminado por rotaevaporação, mantendo-se o balão com a porfirina metalada no dessecador por uma semana para garantir a secagem da amostra. Ao fim do processo a amostra foi pesada, o sólido foi retirado do balão por raspagem, e caracterizado por espectrofotometria do UV-Vis.

Assim, com a intenção de separar o complexo obtido da base livre residual, purificou-se o sólido por cromatografia em coluna com fase estacionária sílica e fase móvel metanol: diclorometano na proporção volumétrica 10:1. As frações foram

monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e analisada por espectrofotometria do UV-Vis

### 3.4 INSERÇÃO DE METAIS AO LIGANTE CYCLAM (TETRAAZOCICLOTETRADECANO) BASE LIVRE

#### 3.4.1 Inserção de Manganês (II) ao cyclam

Em um balão foram adicionados uma solução de cyclam (tetraazociclotetradecano): 100mg de cyclam em 5 mL de metanol, e a esta solução foi adicionada uma outra solução contendo cloreto de manganês II: 100 mg de  $MnCl_2$  em 5 mL de metanol. Obteve-se imediatamente um sólido verde que foi filtrado à vácuo e deixado no dessecador por uma semana (LÉTUMIER et al, 1998).

Caracterizou-se por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectrofotometria molecular na região UV-VIS, utilizando metanol como solvente e por voltametria cíclica.

A voltametria foi realizada utilizando-se uma solução de KCl 0,1 mol  $L^{-1}$  e a concentração do complexo na ordem de  $10^{-3}$  mol.  $L^{-1}$ . O eletrodo de trabalho foi o carbono vítreo o de referência Ag/AgCl, e o eletrodo auxiliar foi uma rede de platina. A velocidade varredura foi de  $50mV.s^{-1}$  e o potencial aplicado foi de -5 a 1,3V.

#### 3.4.2 Inserção de Ferro (III) ao cyclam

A Metalação do ferro ao ligante cyclam foi baseada no trabalho de Guillard e colaboradores (1997). Em um balão foram adicionados uma solução de cyclam: 105mg de cyclam em 8 mL de metanol, e a esta solução foi adicionada outra de cloreto de ferro III: 156mg de  $FeCl_3$  em 8 mL de metanol. Observou-se a formação de um sólido marrom, e então adicionou-se 2mL de ácido clorídrico seguida da imediata mudança de cor do sistema para um líquido amarelo e um sólido branco. Manteve-se o sistema em refluxo por 24h a  $50^{\circ}C$  sem alterações visíveis. O sólido branco obtido foi filtrado à vácuo. Ao filtrado foi adicionado hexafluorofosfato de amônio ( $NH_4PF_6$ ) e foi observado a precipitação de um sólido amarelo. Este sólido amarelo foi filtrado à vácuo, lavado com metanol gelado, e deixado no dessecador por uma semana.

Caracterizou-se Espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR) e espectrofotometria na região UV-VIS, utilizando-se metanol como solvente.

### 3.5 SÍNTESE DO IODOSILBENZENO

O iodossilbenzeno (PhIO) foi sintetizado conforme procedimento descrito na literatura (SHAREFKIN, 1973).

Pesou-se 2,96g de iodobenzenodiacetato em um béquer de 250mL em seguida adicionou-se lentamente 100mL de hidróxido de sódio (NaOH) 3 mol L<sup>-1</sup> com agitação vigorosa. A massa pastosa foi agitada durante 15 minutos com um bastão de vidro. Esta mistura foi deixada em repouso por 45 minutos e então adicionou-se 20 mL de água com agitação vigorosa observando a formação de um sólido amarelo pálido. Esse sólido foi filtrado à vácuo e em seguida retirado do funil, triturado com 20 mL de água e filtrado novamente. Por fim, o sólido foi lavado com 10mL de clorofórmio e filtrado à vácuo novamente. O sólido obtido foi deixado no dessecador por 24 horas.

Após esse tempo, seguiu-se com o procedimento de determinação de pureza do PhIO, baseando-se em Lucas e colaboradores (1963). Essa metodologia tem por base que o iodossilbenzeno na presença de iodeto de potássio em meio ácido forma iodo, que é titulado com tiosulfato de sódio na presença de um indicador.

Inicialmente procedeu-se a padronização do tiosulfato de sódio, segundo Baccan e colaboradores (1964), utilizando-se dicromato de potássio como padrão primário. Preparou-se uma solução de 101,5mg de dicromato em 200mL de água (1,72x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) e retirou-se 3 alíquotas de 5mL para cada titulação. A cada um dos erlenmeyers com dicromato adicionou-se 200mg de KI e 0,8mL de ácido clorídrico concentrado e procedeu-se a titulação utilizando tiosulfato de sódio como titulante, solução de aproximadamente 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Utilizou-se solução de amido como indicador para determinação visual do ponto de viragem (1g de amido em 105mL de água, reação preparada no momento da utilização) (MORITA e ASSUNÇÃO, 1980).

Após a determinação da concentração real de tiosulfato de sódio, utilizou-se a solução padronizada para determinação de pureza do iodossilbenzeno. Pesou-se cerca de 6,5 mg PhIO e foram dissolvidos em 1mL de metanol em um erlenmeyer de 25mL fechado. Em sequência foram adicionados 4mL de água deionizada e fervida, 1mL

de ácido sulfúrico ( $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ), 0,10g de bicarbonato de sódio, 0,2g de iodeto de potássio e uma pequena porção de iodeto de potássio.

Agitou-se a mistura magneticamente por 20 minutos, em banho de gelo, na ausência de luz. Em seguida titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio padronizada, até observar mudança de coloração do amarelo intenso para amarelo claro. Ao observar esta mudança adicionou-se gotas da solução de amido e a solução mudou para cor azul. Prosseguiu a titulação até desaparecimento da cor. As titulações foram feitas em triplicata, e o resultado final foi obtido a partir da média entre as três análises.

### 3.6 REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DO SULINDACO

As reações de oxidação do sulindaco foram feitas em frascos com aproximadamente 3mL com tampa rosqueadas e avaliadas após 24h de reação.

Foram determinadas três condições de catálise: 1:40:40; 1:40:80, 1:40:400 na razão catalisador: substrato: oxidante. Em uma reação típica 1:40:80 foram adicionados  $1,12 \times 10^{-7}$  mol de substrato,  $2,8 \times 10^{-9}$  mol de catalisador e  $2,24 \times 10^{-7}$  de oxidante. As reações foram realizadas no volume total de 1,5mL e utilizando-se metanol como solvente.

Para realizar as reações, preparou-se uma solução estoque do fármaco de 5mg para 10mL de metanol ( $1,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e retirou-se uma alíquota de 80  $\mu\text{L}$ , adicionando-se ao frasco reacional. Com relação aos catalisadores, foram preparadas soluções de mesma concentração para todos os catalisadores utilizados:  $4,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e retirou-se uma alíquota de 6  $\mu\text{L}$ , adicionando-se ao frasco de reação. Para cada oxidante também foram preparadas soluções estoques para retirada de alíquota para a reação. Para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparou-se uma solução estoque de 10 $\mu\text{L}$  em 10mL ( $1,78 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), para o m-CPBA (70%) uma solução de 5,05mg em 5mL ( $5,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), para o PhIO (77%) uma solução de 6,50mg em 5mL ( $4,59 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e para o hipoclorito uma solução de 175 $\mu\text{L}$  em 5mL ( $5,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Nas tabelas 2, 3 e 4 são mostradas as condições de preparo do sistema para cada oxidante. Além das reações foram preparadas reações controles somente com catalisador e substrato e somente com oxidante e substrato para comparação dos resultados.

Tabela 2 – Descrição das condições de preparo das reações de oxidação do sulindaco utilizando NaClO e m-cpba como oxidantes.

<b>Reação</b>	<b>Alíquota substrato (µL)</b>	<b>Alíquota catalisador (µL)</b>	<b>Alíquota oxidante (µL)</b>	<b>Alíquota solvente (µL)</b>
<b>Controle catalisador</b>	80	6	-	1420
<b>Controle oxidante</b>	80	-	20	1400
<b>1:40:40</b>	80	6	20	1400
<b>1:40:80</b>	80	6	40	1380
<b>1:40:400</b>	80	6	200	1220

Tabela 3 - Descrição das condições de preparo das reações de oxidação do sulindaco utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante.

<b>Reação</b>	<b>Alíquota substrato (µL)</b>	<b>Alíquota catalisador (µL)</b>	<b>Alíquota oxidante (µL)</b>	<b>Alíquota solvente (µL)</b>
<b>Controle catalisador</b>	80	6	-	1420
<b>Controle oxidante</b>	80	-	6	1420
<b>1:40:40</b>	80	6	6	1410
<b>1:40:80</b>	80	6	12	1400
<b>1:40:400</b>	80	6	60	1360

Tabela 4 - Descrição das condições de preparo das reações de oxidação do sulindaco utilizando PhIO como oxidante.

<b>Reação</b>	<b>Alíquota substrato (µL)</b>	<b>Alíquota catalisador (µL)</b>	<b>Alíquota oxidante (µL)</b>	<b>Alíquota solvente (µL)</b>
<b>Controle catalisador</b>	80	6	-	1420
<b>Controle oxidante</b>	80	-	25	1400
<b>1:40:40</b>	80	6	25	1380
<b>1:40:80</b>	80	6	50	1370
<b>1:40:400</b>	80	6	250	1170

Os catalisadores utilizados foram: as metaloporfirinas: MnTFPP, FeTFPP, os Complexos salen – isômeros R, R e S, S-Jacobsen (R, R ou S, S bis (3,5-di-terc-butilsalicilideno)-1,2-clclohexanodiaminomanganês (III)). Além dos complexos de cyclam: trans [Mn (Cyclam) Cl<sub>2</sub>] Cl e [Fe (Cyclam) ] PF<sub>6</sub>.

O efeito do ligante axial também foi avaliado em algumas reações, às quais foram adicionados imidazol ou acetato de amônio (co-catalisadores) na proporção 1:40:400:10, catalisador: substrato: oxidante: co-catalisador.

Todas as reações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após 24 horas de reação.

### 3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Conforme mencionado anteriormente, os produtos das reações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. O método otimizado para separação do sulindaco, produtos e oxidante da reação foi um gradiente utilizando 0,10% TFA (solução aquosa de ácido trifluoroacético) e metanol, apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições cromatográficas de separação das reações de oxidação do sulindaco: tempo de análise, solventes, fase estacionária, fluxo e temperatura

*Condições cromatográficas*

<i>Coluna</i>	C18-Agilent 5µm (4.6x250mm)		
<i>Solvente A</i>	0,1% de ácido trifluoroacético (TFA)		
<i>Solvente B</i>	Metanol		
<i>Gradiente</i>	Tempo (min)	A%	B%
	0,01	50	50
	14,00	10	90
	18,00	50	50
	23,00	50	50
<i>Volume de injeção</i>	20 µL		
<i>Fluxo</i>	1,1 mL/min		
<i>Temperatura</i>	35°C		

O cálculo da conversão do sulindaco em produtos foi realizado por meio da equação da reta dada pela construção da curva de calibração, que relaciona concentração do sulindaco com área do pico do sulindaco no cromatograma. Os cromatogramas foram analisados no comprimento de onda de 237nm.

Para a construção da curva analítica foram injetadas soluções de concentração conhecidas do sulindaco e analisadas em relação à área do pico. Assim, preparou-se uma solução estoque  $1,50 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1}$  utilizando-se 5,30 mg de sulindaco para 10,0 mL e retirou-se alíquotas de 1, 25, 50, 100, 200, 300, 400 500 e 600 µL na preparação de outras soluções de 10 mL que foram injetadas e a área de cada pico foi coletada.

A partir do cálculo da conversão, foram construídos gráficos para análise das conversões de cada sistema. As áreas dos produtos obtidos em cada reação foram analisadas construindo-se tabelas e gráficos de porcentagens relativas para cada produto a partir da equação:

$$\text{Equação (2)} \quad \%relativa = \frac{\text{área do produto } n}{\text{área total dos produtos}} \times 10$$

### 3.8 BIOTRANSFORMAÇÃO POR FUNGOS - *Cunninghamella elegans*

As reações de biotransformação foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química de Microrganismos (LQM) pertencente ao departamento de química orgânica do Instituto de Química da UFBA.

O fungo *Cunninghamella elegans* foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) em placas de Petri, em 40 mL de meio de cultura, conforme as recomendações do rótulo do produto. A massa de BDA foi solubilizada em água destilada contida em um Erlenmeyer de 125 mL e colocada no micro-ondas até a sua ebulição. Em seguida, o erlenmeyer foi vedado utilizando algodão hidrofóbico e autoclavado juntamente com uma pinça e duas placas de Petri durante 15 minutos. Após esse tempo, o material foi transferido para uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e radiação ultravioleta. O meio de cultura BDA foi transferido para as duas placas de Petri ainda quente e só após sua completa solidificação e abaixamento da temperatura que a cultura estoque mantida em solução de glicerol água 1:1 a -20°C, foi inoculada utilizando-se uma pinça.

Após a inoculação, as placas foram vedadas com filme plástico e colocadas na estufa incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) durante 7 dias à 28°C.

Após os 7 dias, a reação de biotransformação foi preparada da seguinte forma: 100 mL de meio Koch's k1 (1,8g de glicose, 0,6 g de Peptona e 0,4 g de Extrato de Levedura para 1L de água destilada) foi adicionado a um erlenmeyer de 125 mL e vedado com algodão hidrofóbico. Este sistema foi autoclavado juntamente com um transfertube e ponteiros de micropipetas embaladas em papel craft durante 15 minutos.

O material foi transferido para a câmara de fluxo laminar e após resfriamento do meio, foram transferidos 5 discos de fungos. Foram adicionados 50mg de sulindaco em 300µL de DMSO, e essa solução foi adicionada ao sistema reacional com o fungo. Além disso foi preparada também uma reação controle, sem adição do fármaco. Essas reações permaneceram em agitação de 120 rpm por 15 dias a temperatura de 28°C

Após esse período as reações foram filtradas à vácuo para isolar o caldo (parte líquida na qual e encontram-se os produtos) da massa micelial. Então foi realizada a extração do caldo 3 vezes de 40mL em acetato de etila. A fase orgânica resultante da extração foi separada, e foi adicionada sulfato de magnésio anidro para secagem de resíduos de água. Assim, essa fase orgânica foi filtrada por filtração gravitacional. A amostra obtida foi secada e analisada por CLAE.

Na separação por cromatografia por coluna utilizou-se sílica como fase estacionária e fase móvel acetato de etila: hexano na proporção volumétrica 90:10, respectivamente. Essas frações separadas por coluna foram analisadas inicialmente por cromatografia em camada delgada CCD utilizando a mesma fase móvel, e posteriormente por CLAE para confirmar a separação.

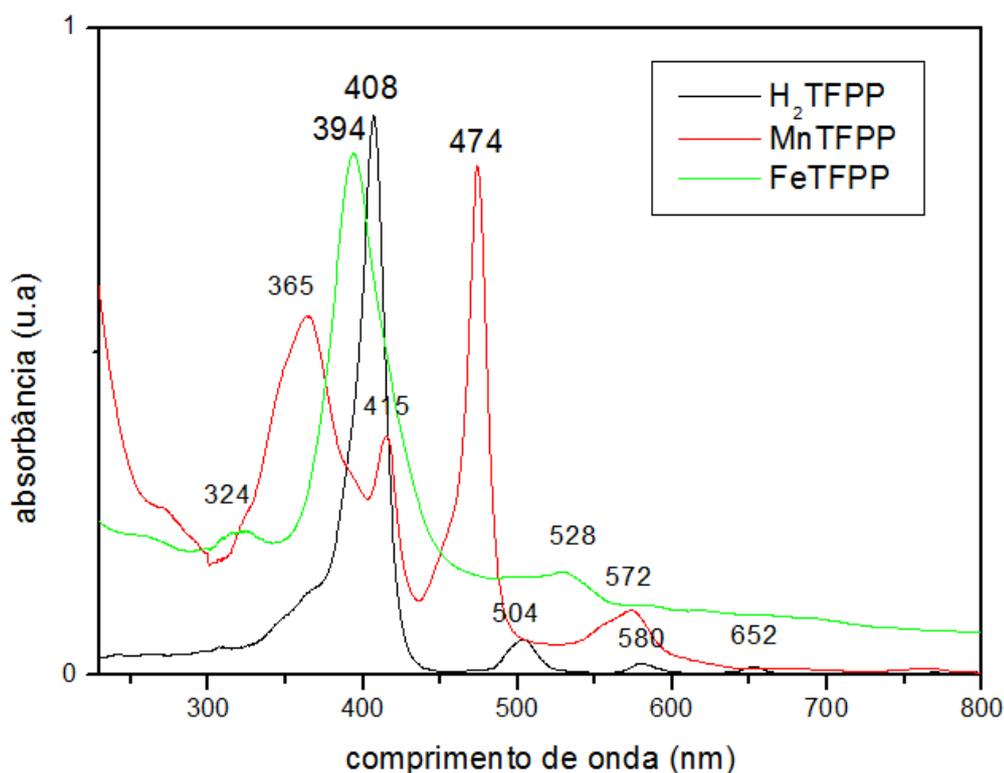
Após a confirmação da separação, os produtos obtidos foram secos novamente e analisados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono: RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para identificação das estruturas e comparação com os produtos obtidos por catálise biomimética. As análises de RMN foram feitas no LABAREMN (Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear) coordenado pela professora Elisângela Boffo. Para essa análise as amostras foram secas e solubilizadas novamente em metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 INSERÇÃO DE MANGANÊS À PORFIRINA BASE LIVRE

A Metalação da H<sub>2</sub>TFPP com manganês foi feita de acordo com o procedimento descrito na parte experimental deste trabalho, respeitando-se o procedimento da literatura (ADLER et al., 1970). O rendimento da metalação da porfirina (5, 10 15, 20 tetraquis pentafluorofenil porfirina - TFPP) foi de 22,4%, após purificação por cromatografia em coluna, utilizando a fase móvel diclorometano e metanol na mesma proporção da placa de TLC. Para caracterizar o produto foi comparado seu espectro de UV-Vis com o da porfirina base livre e do complexo de ferro porfirina (metalado anteriormente). Os espectros das MePs estão apresentados na Figura 12.

Figura 12- Espectros de UV-VIS da H<sub>2</sub>TFPP, MnTFPP e FeTFPP em acetonitrila, analisados em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.



A espectrometria no UV-VIS é a forma mais conveniente de detectar a inserção do metal em porfirinas porque as metaloporfirinas e as porfirinas base livre possuem espectros muito característicos. A porfirina base livre possui simetria D<sub>2h</sub> e apresenta

banda Soret (pico intenso na região do comprimento de onda correspondente a cor azul no espectro visível, correspondente as transições  $\pi-\pi^*$ ) próximo a 410nm. Além disso destacam-se três bandas na região do visível em 504, 580 e 652nm, chamadas de bandas Q. Após a metalação, a simetria da molécula é modificada para  $D_{4h}$ . No caso da FeTFPP ao analisar o espectro percebe-se que há um deslocamento hipsocrômico da banda Soret para 394 nm, e percebe-se apenas uma banda na região do visível em 528nm (OCHIAI, 1985). A porfirina FeTFPP não foi sintetizada nesse trabalho, porém, foi caracterizada para ter como evidência experimental que tratava-se de uma FeP sem formação de dímeros. Ao analisar o espectro acima e comparar com a literatura, observa-se que apresenta as mesmas bandas características de uma FeP sem formação de dímeros, o que possibilitou seu uso como catalisador (BOUCHER, GABBER, 1970).

Com relação ao espectro da MnTFPP percebe-se que há modificações mais visíveis em relação ao espectro da base livre. É observada uma única banda Q em 572 nm. São observadas duas bandas em 365 e 474nm, além de uma banda com baixa intensidade em 415nm. Esse espectro de absorção UV-Vis está de acordo com o relatado na literatura para porfirinas de manganês (MnPs), o que pode-se considerar como evidência de que a metalação ocorreu de forma esperada (BOUCHER, GABBER, 1970).

Outra evidência experimental para confirmar a metalação da porfirina por manganês foi o desaparecimento da fluorescência da base livre, monitorado utilizando luz ultra-violeta, a partir da cromatografia em camada delgada, feitas com alíquotas do meio reacional, à medida em que a metalação transcorria. O desaparecimento da fluorescência da base livre com o avanço da metalação ocorre nas metaloporfirinas porque as interações entre o orbital d do metal e o estado excitado de menor energia da porfirina (singlete  $\pi^*$ ) leva ao decaimento não radioativo na MeP, e por isso a fluorescência é suprimida quando se introduz um metal a base livre (OCHIAI, 1985).

## 4.2 INSERÇÃO DE METAIS A BASE LIVRE CYCLAM

### 4.2.1 Inserção de Manganês (II) ao cyclam

A metalação do Manganês cyclam foi baseada em Létumier e colaboradores (1998), conforme a descrição na parte experimental. Neste procedimento obteve-se 20,1 mg do sólido, atingindo 11,1% de rendimento. O manganês cyclam foi

caracterizado por espectrometria na região do infravermelho (FTIR) (Figura 13 e 14) por espectrometria na região do UV-VIS (Figura 15), e voltametria cíclica (Figura 16).

Figura 13 - Espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR) do ligante cyclam

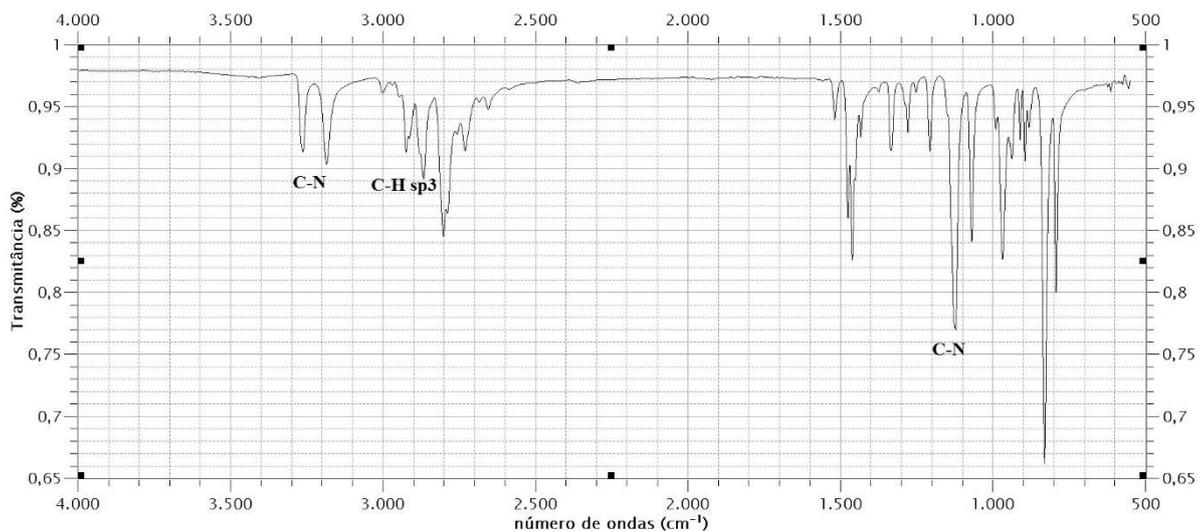
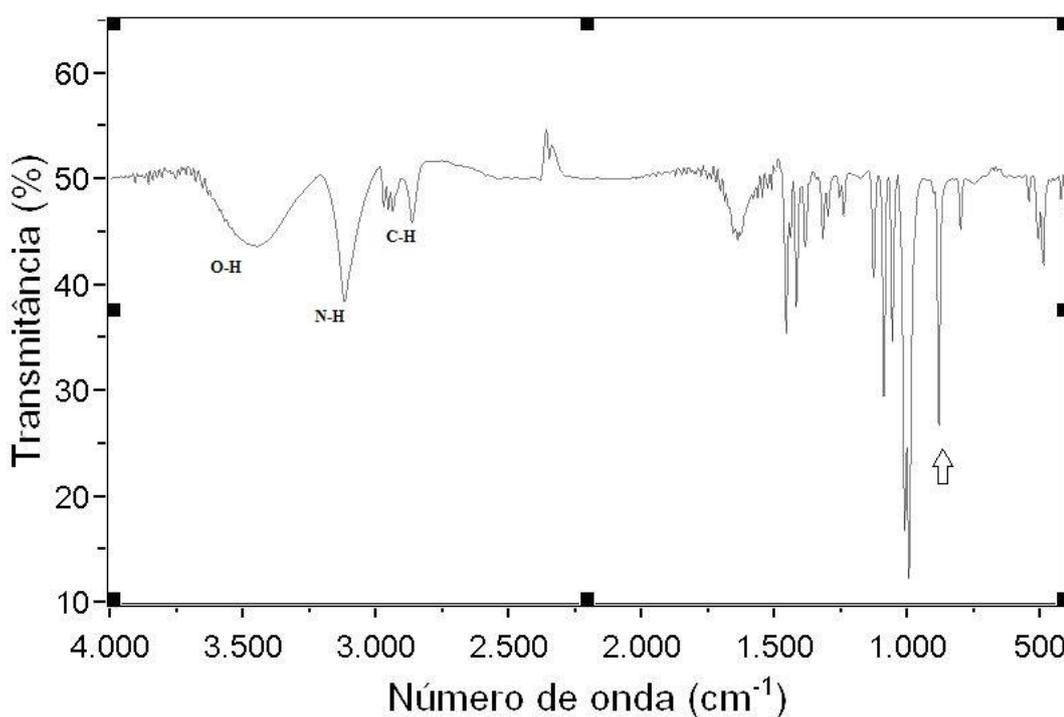


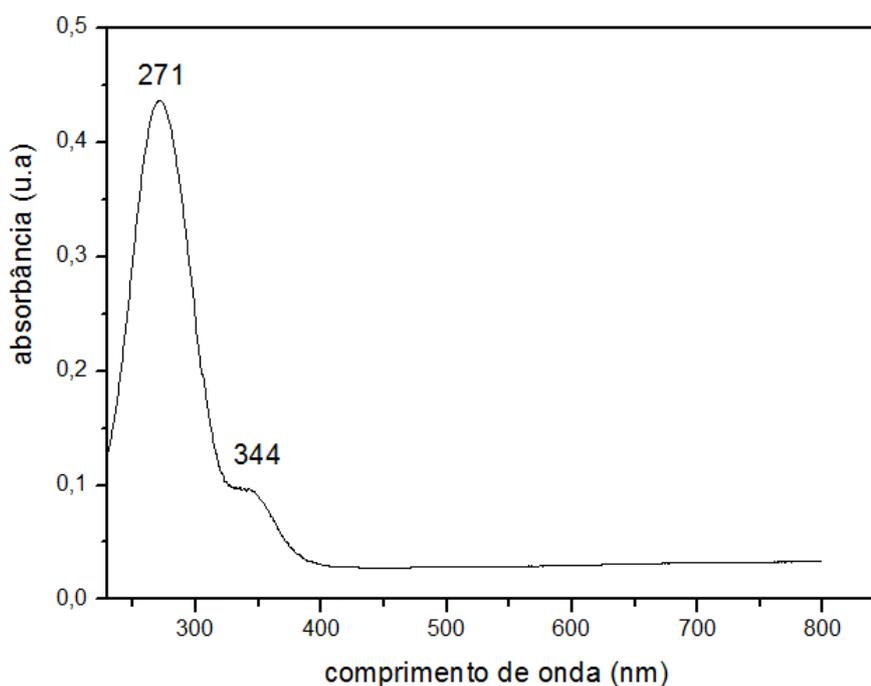
Figura 14 - Espectro de Infravermelho por transformada de Fourier em pastilha de KBr do MnCyclam



Na Figura 13, encontra-se o espectro de infravermelho correspondente ao ligante cyclam. Neste espectro destacam-se as bandas correspondentes à amina, estiramento C-H ( $\nu$ C-H) na região de 3400-3200. A presença dessas bandas é característica de aminas primárias, o que corresponde à estrutura do cyclam. Destacam-se também as bandas de estiramento C-H em alcanos na região próxima a 2900 e o estiramento da ligação C-N na região de 1230-1030  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso em ambos os espectros é possível destacar a banda entre 1400-1500  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a deformação  $\delta\text{CH}_2$  do cyclam.

Além disso segundo Létumier e colaboradores (1998), trabalho no qual baseou-se o procedimento da metalação, enquanto no espectro do *cis*-Mn(Cyclam) aparecem bandas características de  $\text{CH}_2$  em 794-824 $\text{cm}^{-1}$ , além de três a quatro bandas entre 841-926 $\text{cm}^{-1}$ , no espectro corresponde ao *trans* permanece apenas uma banda em 795  $\text{cm}^{-1}$ , indicada na seta da Figura 15, o que é um índice que o composto formado trata-se do complexo *trans*-Mn(Cyclam), além da coloração verde observada na síntese apresentada nesta dissertação.

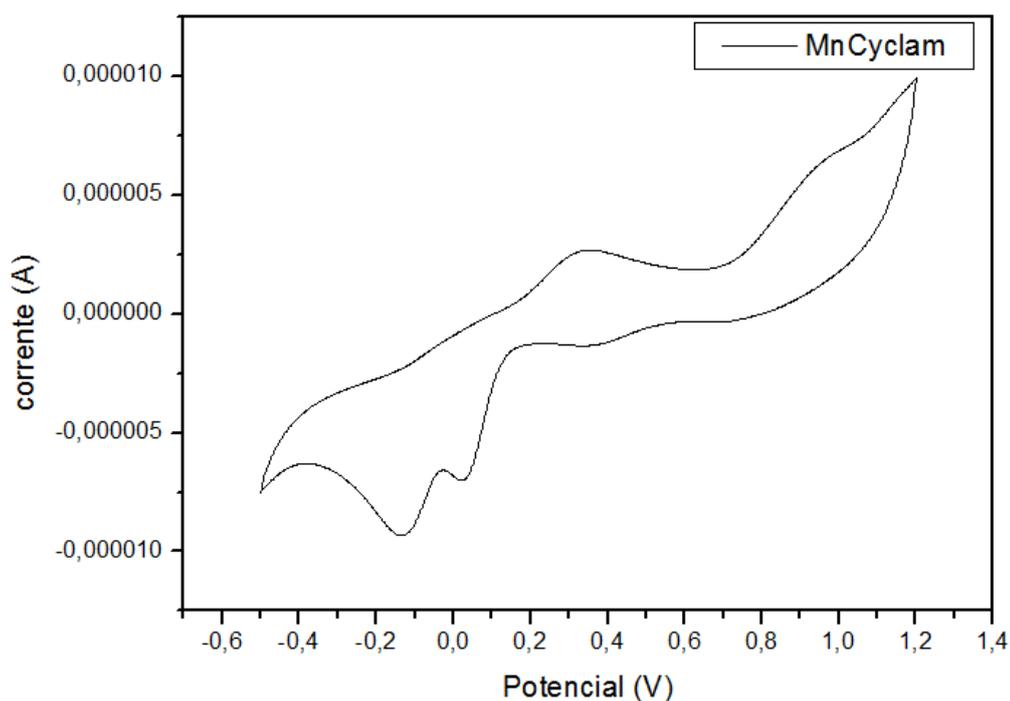
Figura 15 - Espectro UV-VIS do *trans*-MnCyclam, em meio de metanol, analisado em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.



Observam-se duas bandas no espectro de absorção desse complexo em 271 e 344 nm. que correspondem ao que se encontra na literatura. A banda em 344nm confirma a conformação *trans* do complexo. Além disso, a deformação da estrutura de seis coordenadas como resultado do efeito de Jahn-Teller resulta na ampliação dessa banda.

A banda em 271 nm tem alta absortividade comparada a outra banda do mesmo espectro, este alto valor de absortividade  $\xi$ , é correspondente as transições d-d, evidenciando a transferência de carga ligante metal, ou seja nitrogênio  $\longrightarrow$  Mn(III) (Ligante-metal) (TOMCZYK et al, 2012). Esse complexo também foi caracterizado por voltametria cíclica, utilizando solução de KCl 0,1 mol. L<sup>-1</sup> na concentração de 10<sup>-3</sup> mol. L<sup>-1</sup>. Na figura 17 encontra-se o voltamograma do complexo *trans*-Mn-Cyclam..

Figura 16 - Voltamograma do complexo *trans*-MnCyclam, em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>  $v=50\text{mV s}^{-1}$  varredura de -5 a 1,3V. Potencial de circuito aberto 0,42V.



Na figura 16 é possível observar o voltamograma do MnCyclam no qual há um pico em 0,33 V, é atribuído a oxidação do manganês a  $\text{Mn(II)} \rightarrow \text{Mn(III)}$ . Outro pico pode ser observado em 1,10 V, que pode ser atribuído à oxidação do  $\text{Mn(III)} \rightarrow \text{Mn(IV)}$ , em um processo não reversível. Podem ser observados também picos em -0,12 V e próximo a 0,05 V, são atribuídos à redução do  $\text{Mn(IV)} \rightarrow \text{Mn(III)}$  e  $\text{Mn(III)} \rightarrow \text{Mn(II)}$ .

Baseando-se nos dados apresentados de espectroscopia de infravermelho e espectrofotometria no UV-Vis, observam-se as bandas características do complexo *trans*-MnCyclam, confirmando a espécie do complexo e a metalação bem sucedida.

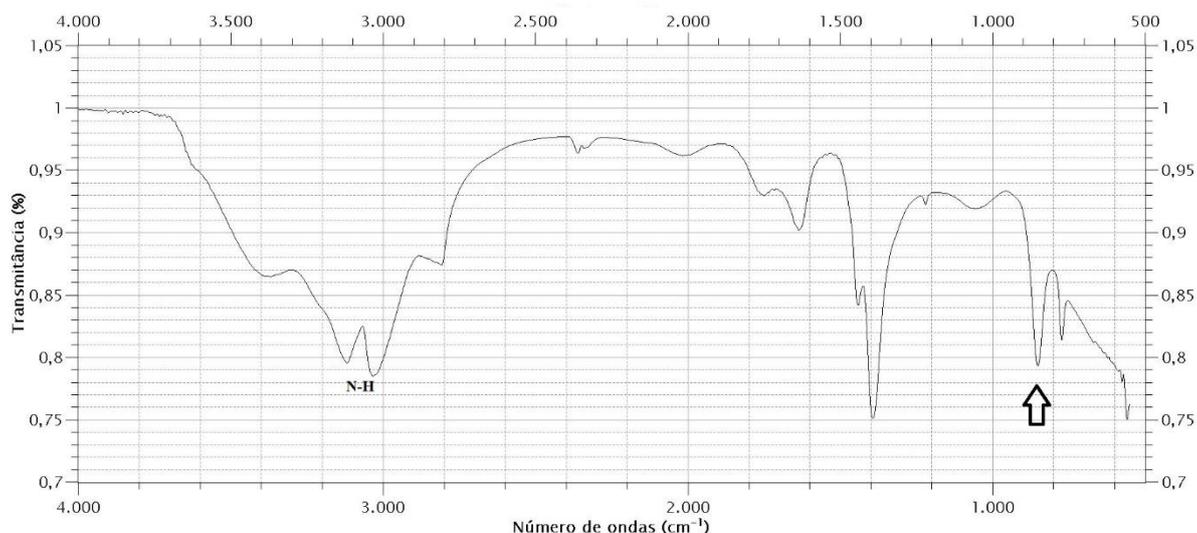
#### 4.2.2 Inserção de Ferro ao cyclam

Para a síntese do FeCyclam seguiu-se o procedimento baseando-se em Guilard e colaboradores (1997) e descrito na parte experimental; Foram feitas as seguintes adaptações: utilizou-se FeCl<sub>3</sub> ao invés de FeCl<sub>2</sub> descrito na referência devido a indisponibilidade deste reagente. Os complexos de Fe(III) são mais estáveis com Cyclam do que os de Fe(II), visto que Fe(III) é um ácido mais duro que Fe(II) e quando facilitando a ligação do nitrogênio na coordenação (BASOLO,1967). O procedimento da literatura que foi pesquisado neste trabalho propõe a metalação com Fe(II) por fatores cinéticos, e o Fe(II)cyclam formado seria posteriormente ser oxidado a Fe(III).

Na síntese efetuada, observou-se a formação de um sólido branco, que foi filtrado à vácuo. Após este procedimento obteve-se além do sólido branco uma solução amarela (filtrado). Segundo a literatura (GUILLARD et al.,1997) o complexo de FeCyclam corresponde a um sólido amarelo, e desta forma concluiu-se que o complexo obtido estava no filtrado. Assim, para favorecer a obtenção do sólido descrito no procedimento de Guilard e colaboradores (1997), adicionou-se NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> ao filtrado, obtendo-se a precipitação de um sólido amarelo, por esse motivo propõe-se que PF<sub>6</sub> seja o seu contra-íon. Obteve-se 119mg de sólido amarelo, e a síntese atingiu um rendimento foi de 48,1%.

Assim como o MnCyclam, o complexo de ferro foi caracterizado por Espectroscopia no Infravermelho com Reflectância Difusa Total Atenuada por transformada de Fourier (FTIR-ATR) e por espectrometria no UV-VIS (Figuras 18 e 19).

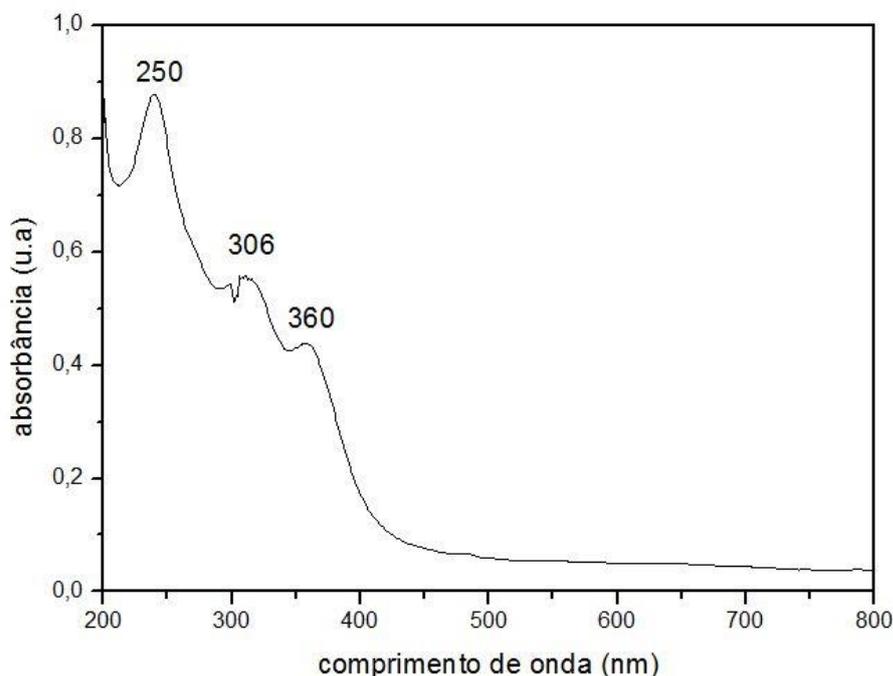
Figura 17 - Espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa total atenuada por transformada de Fourier (FTIR-ATR) do FeCyclam



A Figura 17 apresenta o espectro de infravermelho com reflectância difusa total atenuada por transformada de Fourier (FTIR-ATR) do FeCyclam. Neste espectro observa-se uma banda correspondente a amina primária em  $3200\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ , a qual há um alargamento quando comparada aos espectros de cyclam base livre (Figura 13) e MnCyclam (Figura 17). O alargamento desta banda pode ser explicado devido a banda de estiramento O-H e a de estiramento N-H vibrarem em frequências próximas, podendo haver sobreposição, e o composto pode ter retido umidade, o que alargaria a banda no número de onda citado. No mesmo espectro, destaca-se também a banda próxima a  $1400\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a deformação  $\delta\text{ CH}_2$ , do ligante e a banda de estiramento C-H em  $2800\text{ cm}^{-1}$  que foi sobreposta pelas bandas de estiramento N-H e O-H.

É importante destacar no espectro da Figura 17 duas bandas entre  $940\text{ e }890\text{ cm}^{-1}$  (assinalado por uma seta) que concorda com o isômero *trans* para compostos de cyclam com o centro metálico de ferro, de forma que o espectro de infravermelho fornece indícios que o complexo em questão seja o *trans*-[Fe(Cyclam)]PF<sub>6</sub> (GUILLARD et al, 1997; VASCONCELOS et al,2000).

Figura 18 - Espectro de UV-VIS do FeCyclam, em meio de metanol, analisado em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.



O espectro de espectroscopia no UV-Vis do FeCyclam apresenta 3 bandas: uma de alta intensidade em 250nm, outra de média intensidade em 306 nm e outra de baixa intensidade em 360nm. As bandas em 250 nm e 306 são atribuídas as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  internas dos ligantes, enquanto a banda de maior energia em 360 nm, é atribuída às transições metal-ligante ( $d\pi-\pi^*$ ) (VASCONCELOS et al, 2000). De acordo com o relatado por Vasconcelos e colaboradores (2000), o complexo cis do Fecyclam apresenta bandas no visível próximos a 450, 550 e 650 nm, diferentes das apresentadas pelo composto sintetizado neste trabalho, confirmando junto com a espectroscopia de infravermelho que o complexo sintetizado trata-se do trans-[Fe(Cyclam)] PF<sub>6</sub>.

#### 4.3 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E DAS CONDIÇÕES DE CATÁLISE PARA ANÁLISE DO SULINDACO E DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO.

As reações de oxidação do sulindaco foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em um equipamento com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) conforme mencionado na parte experimental. As reações de oxidação do sulindaco foram feitas inicialmente nas razões molares: 1:40:40, 1:40:80, 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), feitas de modo independente com cada um dos oxidantes:

lodosilbenzeno, peróxido de hidrogênio, *m*-cpba e hipoclorito de sódio. Estas reações foram feitas em 24 h, em metanol, sob agitação magnética, e congeladas. O objetivo da realização destas reações prévias foi para usá-las na separação do sulindaco e produtos nos métodos de CLAE avaliados, e para conferir se os métodos escolhidos eram eficientes para separar o fármaco de seus produtos de oxidação.

Os procedimentos para otimização do método de análise foram realizados durante um ano do trabalho experimental, devido as dificuldades encontradas de separar o fármaco dos oxidantes *m*-cpba e PhIO, cujos picos eluíam juntamente com o fármaco. Inicialmente, baseando-se em um artigo de separação da indometacina (NOVÁKOVÁ et al, 2005), fármaco que é do mesmo grupo estrutural que o sulindaco (ver p.16), o primeiro método testado foi feito com uma coluna Zorbax-CN da SURPELCO de partículas de 5 µm e dimensões de (4.6x150mm). As condições deste método consistiam em 40% de acetonitrila e 60% de solução aquosa de acetato de amônio e fluxo de 0,6 ml/min. Embora a separação funcionasse para reações com peróxido, não funcionavam para as reações que utilizavam os oxidantes *m*-cpba e PhIO, pois o sulindaco e esses oxidantes apareciam no cromatograma com o mesmo tempo de retenção no comprimento de onda de 237nm.

O mesmo problema se repetiu com os demais métodos nos quais foi utilizada a coluna Ciano (Supelco), mesmo modificando a fase móvel em diferentes proporções de acetonitrila/água, acetonitrila/acetato de amônio e acetonitrila/ácido acético em métodos isocráticos e diferentes gradientes. Nenhum destes métodos de análise conseguiu resolver o problema de separação do sulindaco e oxidantes.

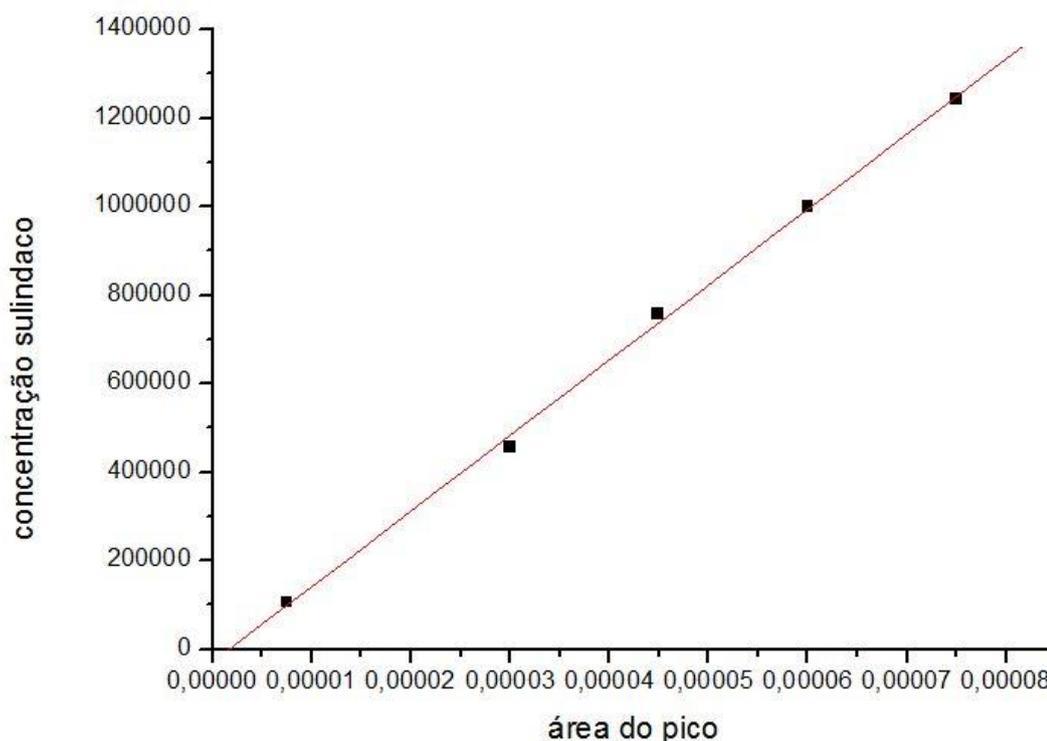
Assim, com base no artigo de Krier e colaboradores (2011) propôs-se a troca da coluna Ciano para uma coluna C18-Zorbax (Agilent), e a utilização de uma fase móvel ácida de pH próximo a 2. A troca do solvente para metanol foi proposta devido ao custo ser menor que a acetonitrila. Outras condições baseadas na mudança destes parâmetros foram testadas até chegar a uma condição ideal de separação de fármaco, produtos e oxidantes. Foram mais de 60 métodos testados até a condição ideal.

O método otimizado está descrito na tabela 5, sendo composto de um gradiente de eluição utilizando-se metanol e solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, com tempo total de análise de 23 minutos.

Uma vez otimizada a condição de separação construiu-se a curva de calibração utilizando soluções de sulindaco em concentrações previamente determinadas,

conforme a Figura 19. Foi feita uma solução estoque de concentração  $1,496 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e desta solução foram feitas 9 diluições referentes a 120%, 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, 5% e 1% da solução estoque, no qual a solução 100% possui concentração exata à utilizada nas reações de oxidação do sulindaco. Com os dados obtidos pelas áreas do sulindaco em diferentes concentrações, foi construída uma curva que foi analisada por regressão linear, dando origem a uma equação da reta. A concentração do sulindaco foi calculada pela substituição do valor de y da reação, referente à área do pico do sulindaco nas reações de oxidação, na equação da reta da curva de calibração e a conversão do substrato em produtos foi obtida pela equação  $y = 2.10^{10}x - 29283$ . Alguns pontos foram retirados para melhorar o coeficiente linear da reta.

Figura 19 - Curva de calibração do sulindaco em metanol (Equação da reta  $y = 2.10^{10}x - 29283$   $R^2 = 0,9986$ ), obtida a partir da análise por CLAE utilizando coluna C18 e metanol e 0,1 %TFA como fase móvel, no método otimizado descrito na parte experimental).



Como foi mencionado no início deste tópico, as condições das reações de oxidação do sulindaco foram estabelecidas testando as condições de 1:40:40, 1:40:80 e 1:40:400 e estas reações juntamente com o padrão do sulindaco e dos oxidantes foram utilizadas para a otimização do método. A proporção molar inicial

correspondente as reações 1:40:40 foi de  $2,8 \times 10^{-8}$ :  $1,12 \times 10^{-6}$ :  $1,12 \times 10^{-6}$ , na ordem catalisador: substrato: oxidante.

Essas condições mostram-se adequadas para prosseguir na otimização do método, porém após a realização dessa etapa foi observado que o pico do sulindaco e oxidantes eram muito altos e extrapolavam o limite de detecção do aparelho. Sabendo-se que altura e área são diretamente proporcionais a concentração, decidiu-se manter as condições estabelecidas (em relação à razão molar catalisador:substrato:oxidante), porém diminuir a concentração inicial dos reagentes, já que isto economizaria reagentes e ainda possibilitaria a análise por CLAE. A proporção molar então foi reduzida para 10 vezes menor que a inicial, sendo assim:  $2,8 \times 10^{-9}$ :  $1,2 \times 10^{-7}$ :  $1,12 \times 10^{-7}$ , quando considerado as reações de 1:40:40. Na Figura 20 é possível observar o cromatograma típico da segunda condição de catálise com proporções molares menores, e na Figura 21 um cromatograma típico de reação da primeira condição de catálise.

Figura 20 - Cromatograma de reação de oxidação do sulindaco analisado após a otimização das condições finais de reação. Foi utilizada a razão molar 1:40:400 (catalisador:substrato:oxidante, PhIO como oxidante, MnTFPP como catalisador, proporção molar 10 vezes menor que a inicial. Pico com tempo de retenção em 11,607 minutos correspondente ao sulindaco.

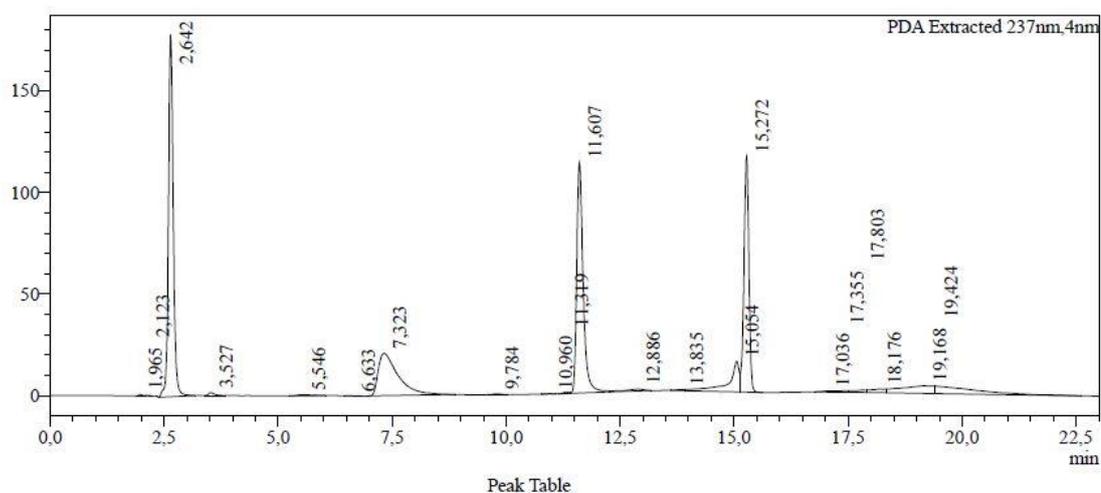
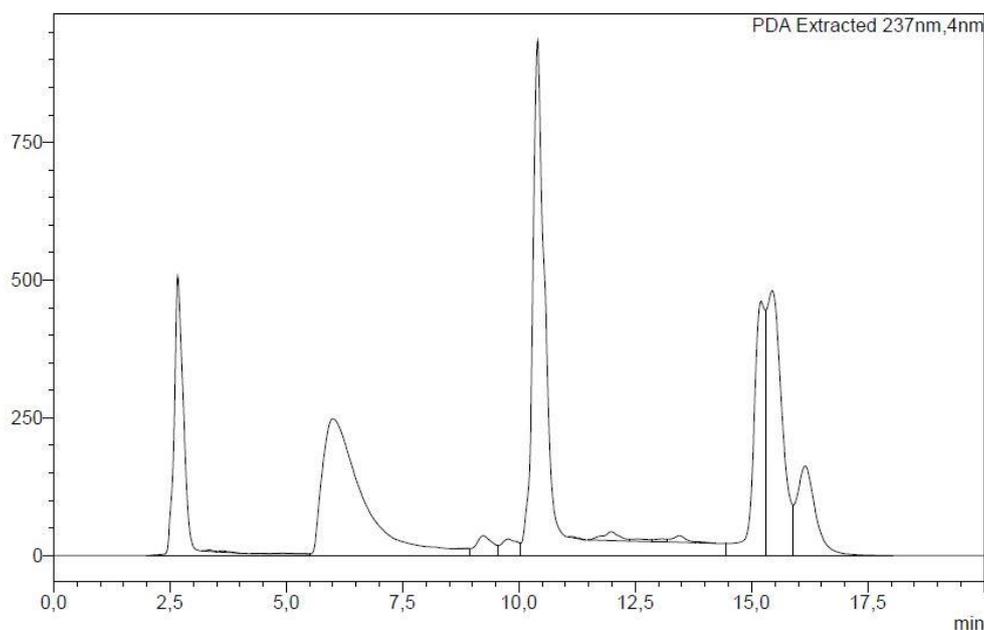


Figura 21 - Cromatograma de reação de oxidação do sulindaco, analisado em reação 1:40:400 (catalisador:substrato:oxidante), utilizando PhIO como oxidante e (MnTFPP como catalisador na primeira otimização das condições de reação. O pico com tempo de retenção em 11 minutos corresponde ao sulindaco.



#### 4.4 ESTUDO DA OXIDAÇÃO DO SULINDACO MONITORADO POR CLAE-DAD

Os estudos de oxidação do sulindaco foram realizados na presença dos catalisadores MnTFPP, FeTFPP, R, R e S, S-Jacobsen; trans-[Mn (Cyclam)]Cl<sub>2</sub> e trans-[Fe(Cyclam) ]PF<sub>6</sub>.

Os catalisadores MnTFPP e FeTFPP são MePs de segunda geração e foram propostos com base na literatura que apresenta a utilização destes como modelos biomiméticos clássicos do Citocromo P-450 (CHAPMAN, JONES, 2015b). A escolha destas MePs de segunda geração é apresentada na literatura como bons catalisadores biomiméticos e seus substituintes periféricos retiradores de elétrons conferem maior estabilidade à porfirina evitando a destruição oxidativa do catalisador (CHAPMAN, JONES, 2015b; SANTOS, 2012).

Os catalisadores S, S e R, R Jacobsen são complexos salen que também são utilizados como mimetizadores do Citocromo P-450. Estes compostos possuem algumas vantagens em relação as MePs, dentre elas o fato de que são mais simples e mais baratos possuindo alta estabilidade sob condições de reação de oxidação, além de permitirem atuar de forma diferenciada em catálise assimétrica. (CHAPMAN, JONES, 2015b)

Como já foi mencionado (p. 42), não há estudos publicados na literatura envolvendo a utilização de complexos cyclam como catalisadores bioinspirados,

porém por serem relatados como oxidantes fortes capazes de oxidar hidrocarbonetos (LYAKIN, 2019), estes complexos tornaram-se alvo dessa pesquisa como investigação da sua ação catalítica como complexos bioinspirados não heme.

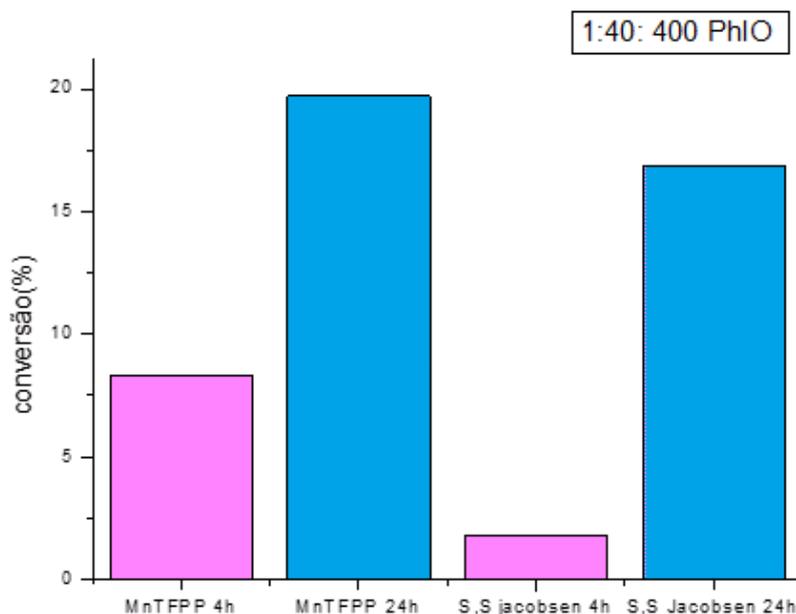
Cada um desses seis catalisadores foi estudado separadamente na presença dos oxidantes: peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido metacloroperbenzóico (*m*-cpba), iodosilbenzeno (PhIO) e o hipoclorito de sódio (NaClO).

O *m*-cpba possui a vantagem de ser solúvel em uma variedade de solventes orgânicos, e pode levar a dois mecanismos de reação. Em uma das possibilidades há a quebra homolítica da ligação O-O, formando radicais, e também pode ocorrer a quebra heterolítica desta mesma ligação, o que é mais favorável. O NaClO e o PhIO favorecem o mecanismo por meio da clivagem heterolítica e assim formam a espécie cataliticamente ativa  $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})^+$ . O PhIO foi escolhido por ser um oxidante padrão, com apenas um oxigênio para doar e por produzir espécies reativas em uma única etapa. Já o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi escolhido por ser um “oxidante verde” e um metabólito natural, com toxicidade reduzida (CHAPMAN; JONES; 2015b; MANSUY; 2007; SANTOS, 2012; SILVA et al, 2015).

Foram feitos também controles os quais havia somente substrato e catalisador ou somente substrato e oxidante, e não foi observado produtos nem conversões significativas.

Inicialmente foram testadas as conversões em 4 horas de reação e comparadas com as condições em 24 horas de reação para saber qual metodologia prosseguir. Os gráficos das figuras 22 e 23 comparam as conversões nos diferentes tempos reacionais.

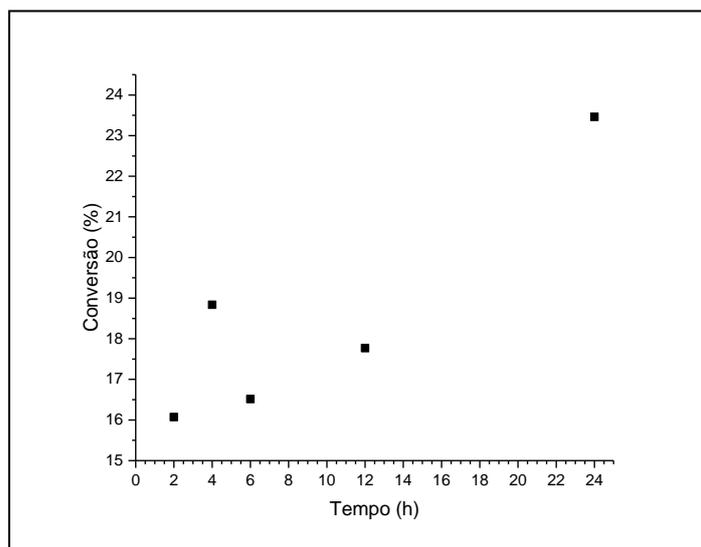
Figura 22- Comparação dos sistemas utilizando MnTFPP e S, S Jacobsen utilizando PhIO como oxidante em 4 horas e 24 horas de reação, na razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato:oxidante), em meio de metanol, analisado por CLAE.



A figura 22 mostra que após 24 horas de reação as conversões catalíticas aumentaram de forma sensível (>10%) em comparação com as análises feitas em 4 horas, mesmo modificando os catalisadores (MnTFPP e S,S Jacobsen). As reações com MnTFPP aumentaram de 7,6% para 19,9%, e as com S,S Jacobsen aumentaram de 2,5% para 16,9% ao comparar os períodos de 4 e 24h. Devido a estes resultados, decidiu-se seguir como condição experimental a realização de reações após 24 h de reação.

Outro estudo da evolução da reação de oxidação do substrato foi efetuado utilizando-se MnCyclam e NaClO como oxidante e as reações foram analisadas em diferentes intervalos de tempo: 2h, 4h, 6h, 12h e 24h. Estes dados são apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Estudo da evolução da reação de oxidação do sulindaco ao longo de 24, realizado em reação 1:40:80 (catalisador:oxidante:substrato), utilizando-se MnCyclam e NaClO como oxidante, em meio de metanol, analisada por CLAE em diferentes períodos.



Ao observar o gráfico apresentado na Figura 23 é possível perceber que a conversão do sulindaco em produtos após 2 de reação horas atinge pouco mais que 16%, enquanto que a conversão após 6 horas de reação não apresenta um aumento drástico, e está em torno de 17% de conversão, mantendo-se próximo a este valor após 12 horas de reação. Após 24 horas a conversão do sulindaco atinge seu maior valor deste sistema, próximo a 24%. Com isto, pode-se perceber que mesmo comparando diferentes sistemas as conversões em 24 horas são as maiores possíveis, o que justifica a escolha do tempo reacional padrão neste trabalho.

Os resultados das conversões de sulindaco em produtos nas reações utilizando todos os seis catalisadores propostos e os quatro oxidantes podem ser observados nas tabelas 6 a 9. Observa-se que alguns catalisadores apresentaram conversões mais altas com determinados oxidantes do que outros, e a conversão depende também da natureza do catalisador. Outro ponto a ser observado é que no geral as melhores conversões são com excesso de oxidante, porém há algumas exceções.

Tabela 6 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se  $H_2O_2$  como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.

	Razão molar	Conversão (%)					
		Catalisador: MnTFPP	FeTFPP	R,R Jacobsen	S,S Jacobsen	MnCyclam	FeCyclam
	Oxidante						
1	1:40:40	1,7	3,5	<1	2,1	4,7	<1
2	1:40:80	1,2	6,4	-<1	4,6	<1	15,1

3	1:40:400	1,4	8,8	1,2	7,3	<1	22,1
---	----------	-----	-----	-----	-----	----	------

Tabela 7 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se **m-CPBA** como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.

Razão molar	Conversão (%)						
	Catalisador:	MnTFPP	FeTFPP	R,R Jacobsen	S,S Jacobsen	MnCyclam	FeCyclam
substrato:							
Oxidante							
1:40:40	0,6	<1	-3,3	<1	<1	<1	3,1
1:40:80	5,2	2,9	7,1	5,4	<1	<1	<1
1:40:400	3,0	<1	4,8	6,5	<1	<1	<1

Tabela 8 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se **PhIO** como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.

Razão molar	Conversão (%)						
	Catalisador:	MnTFPP	FeTFPP	R,R Jacobsen	S,S Jacobsen	MnCyclam	FeCyclam
substrato:							
Oxidante							
1:40:40	19,9	18,4	19,8	5,1	15,3	19,9	19,9
1:40:80	19,1	15,2	16,2	6,2	6,6	22,0	22,0
1:40:400	19,6	21,9	<1	16,9	10,1	25,9	25,9

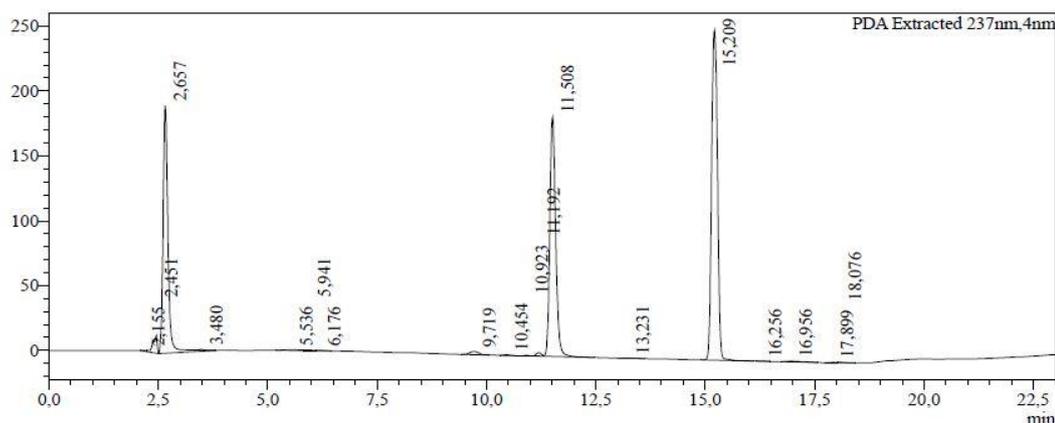
Tabela 9 - Conversão do sulindaco em produtos utilizando os seis catalisadores propostos, em condições catalíticas diversas, utilizando-se **NaClO** como oxidante e metanol como solvente, e analisadas por CLAE após 24h de reação e agitação magnética.

Razão molar	Conversão (%)						
	Catalisador:	MnTFPP	FeTFPP	R,R Jacobsen	S,S Jacobsen	MnCyclam	FeCyclam
substrato:							
Oxidante							
1:40:40	<1	26,1	<1	25,5	14,9	21,4	
1:40:80	<1	16,2	1,9	4,8	3,2	23,3	
1:40:400	<1	31,1	5,4	6,8	23,4	38,2	

As Tabelas 6 a 9 apresentam as conversões catalíticas do sulindaco após reação em 24 h, nas condições molares 1:40:40, 1:40:80 e 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), com todos os catalisadores propostos neste trabalho, utilizando-se os oxidantes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *m*-CPBA, PhIO, e NaClO, respectivamente. Dentre todos os dados apresentados, verifica-se que as conversões catalíticas do sulindaco foram mais altas nos sistemas nos quais utilizou-se hipoclorito de sódio como oxidante. Dentre estes, conversão mais alta (38,2%) foi atingida pelo sistema utilizando o FeCyclam como catalisador e o NaClO na proporção 1:40:400, seguido pela reação utilizando FeTFPP com NaClO na mesma proporção (31,1%) (Tabela 10).

É importante destacar que os sistemas utilizando PhIO apresentaram boas conversões com todos catalisadores, embora seu excesso não tenha favorecido a conversão no sistema do catalisador R, R Jacobsen. No entanto ao observar o cromatograma (Figura 24) da reação em questão (1:40:400, R, R Jacobsen e PhIO) nota-se que há a formação de um pico de alta intensidade de produto em 2,5 minutos e o começo de formação de outro produto próximo ao sulindaco (11,5 minutos) em 11, 2 minutos. Pode-se levantar a hipótese que o aumento da área do pico do sulindaco é devido a formação de um intermediário entre o substrato e esse produto mais próximo (11,3 minutos), que por sair no mesmo tempo de retenção do sulindaco cause este aumento da área.

Figura 24 - Cromatograma obtido pela reação de oxidação do sulindaco utilizando razão molar 1:40:400 (catalisador:oxidante:substrato), R, R Jacobsen como catalisador e PhIO como oxidante, em meio de metanol, após 24 h em agitação magnética.



Seguido dos resultados do PhIO, os segundos mais altos resultados obtidos nos sistemas nos quais utilizou-se NaClO como oxidante, com exceção da MnTFPP que nos sistemas com estes oxidantes não apresentou conversões significativas. Os resultados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e *m*-cpba foram relativamente baixos (Tabelas 6 e 7), embora possa destacar alguns sistemas como: FeTFPP e o FeCyclam apresentaram boas conversões com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os sistemas com S, S e R,R Jacobsen com *m*-cpba.

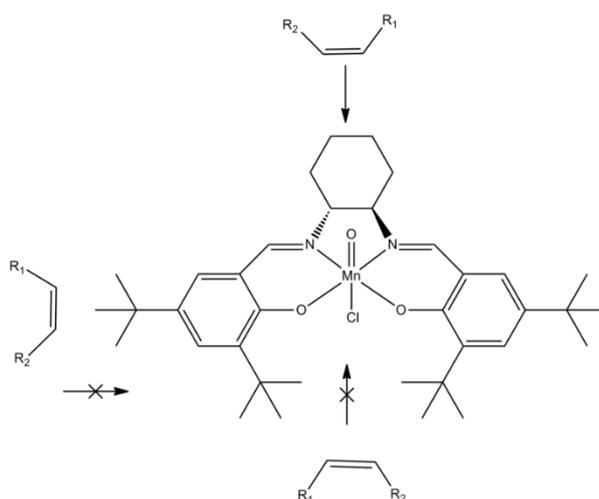
As baixas conversões do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser explicadas pela possível dismutação dessa espécie, que pode ocorrer na presença de complexos como as MePs. (CHAPMAN; JONES, 2015b), o que impediria a formação de intermediários de alta valência por indisponibilidade da espécie doadora de oxigênio. Com relação ao *m*-cpba notou-se durante a realização da parte experimental que a maioria dos sistemas apresentou conversões negativas, possivelmente pela formação de produto no mesmo tempo de retenção do substrato. Isto se deve possivelmente, aos diferentes tipos de mecanismos que podem derivar da oxidação do sulindaco. O *m*-CPBA permite diferentes dois de clivagem que podem acontecer na ligação O-O: quebra homolítica, gerando espécies radicalares que são pouco seletivas, ou clivagem heterolítica, que possivelmente geraria intermediários de alta valência, alguns muito reativos como a ferril π-cátion porfirina radical, ou outros menos reativos como a ferro hidroperóxido, e por isso as diferentes possibilidades de formação de intermediários podem trazer resultados catalíticos insatisfatórios (WATANABE, 2000).

As conversões do sulindaco nos sistemas utilizando R, R e S,S Jacobsen apresentaram diferenças significativas, e em alguns casos isto é notável, por exemplo, na Tabela 9 a reação de R,R Jacobsen atinge <1 % de conversão, enquanto que a reação com S, S-Jacobsen apresenta 25 % de conversão em sistemas catalíticos semelhantes, isto é, em NaClO e razão molar 1:40:40 (catalisador:substrato:oxidante.

Esta grande diferença nos resultados pode ser atribuída à possibilidade destes catalisadores reagirem de forma assimétrica, favorecendo as reações com o isômero S, S. No entanto, a possibilidade de uma possível catálise estereosseletiva só poderia ser confirmada com a utilização de coluna quiral no cromatógrafo líquido ou por análise dos produtos após separação por técnicas nas quais se avaliaria a quiralidade do produto. Existem relatos na literatura da estereosseletividade de complexos salen principalmente com relação a epoxidação e hidrogenação, na utilização destes mesmos catalisadores (CHAPMAN, JONES, 2015b; BHATTACHARJEE, 2004; JACOBSEN et al, 1991 ZHANG, W. et al, 1990).

O mecanismo proposto para explicar o porquê da enantiosseletividade dos complexos Jacobsen é encontrado na referência original de Jacobsen e colaboradores (1991). Assim, segundo essa referência, os complexos Jacobsen apresentam enantiosseletividade maior que os demais Metalosalens, isto porque os substituintes terc-butil na lateral do complexo, representam um impedimento estérico na aproximação do substrato, favorecendo a via de aproximação pela ponte diimina, na qual encontra-se os carbonos quirais, conforme ilustrado na figura 25.

Figura 25 - Proposta de aproximação do substrato em relação ao catalisador Jacobsen(N, N'-bis (3,5-di-terc-butilsalicilideno) -1,2-cyclohexanodiaminomanganês (III)), adaptado de Jacobsen e colaboradores (1991)

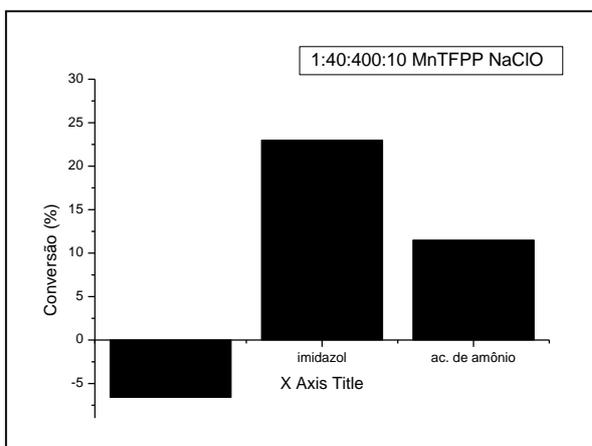


Citocromo P-450 apresenta a cisteína como ligante axial, estabilizando o macrociclo heme, e por este motivo o próximo estudo de catálise biomimética a ser apresentado foi o efeito do co-catalisador. O efeito do ligante axial nos complexos que possuem manganês como centro metálico, ou seja, MnTFPP, MnCyclam e os

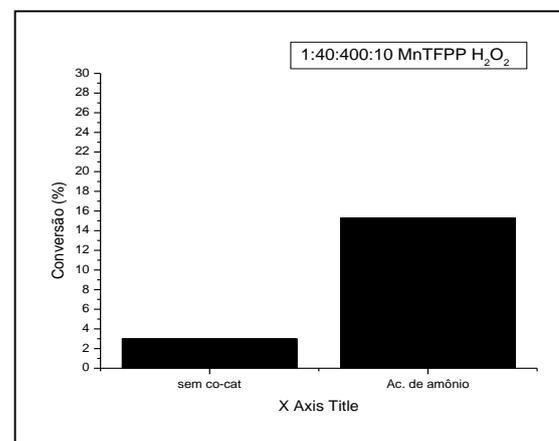
complexos Jacobsen foram estudados ao adicionar um composto que poderia agir como co-catalisadores. Para este estudo foram utilizados o acetato de amônio e o imidazol que se ligam ao centro metálico do complexo de forma a imitar os ligantes coordenados a protoporfirina IX (Sítio ativo da CYP). Segundo a literatura esses ligantes axiais podem afetar diretamente a reatividade desses catalisadores de forma a aumentar o rendimento e a seletividade, pois a relação entre o centro metálico ferro e do enxofre da cisteína cria um efeito “push-pull” atribuído ao poder oxidante da CYP (CHAPMAN et, al, 2016; SILVA et. al., 2015). Para isto as reações foram estudadas nas as condições catalíticas de 1:40:400:10, na ordem catalisador, substrato, oxidante e co-catalisador (Figura 26 e Anexos 7.3 a 7.5).

Figura 26 - Comparação da conversão do sulindaco em sistemas nas condições padrão, utilizando-se MnTFPP como catalisador e na presença dos co-catalisadores acetato de amônio e imidazol, na razão molar 1:10:40:400 (catalisador:ligante axial: substrato:oxidante), em meio de metanol, após 24 h de reação e na presença dos oxidantes: A) NaClO, B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C) *m*-cpba e D) PhIO.

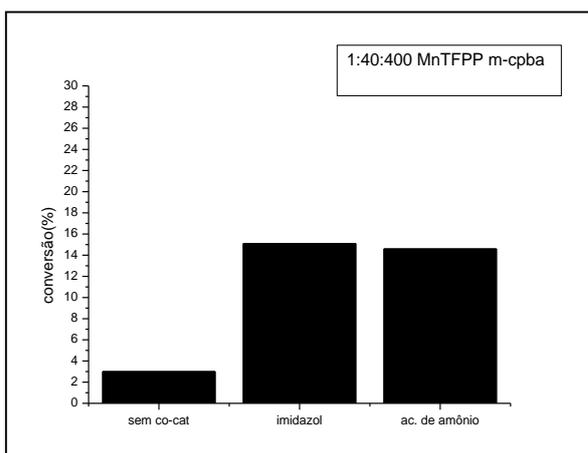
A)



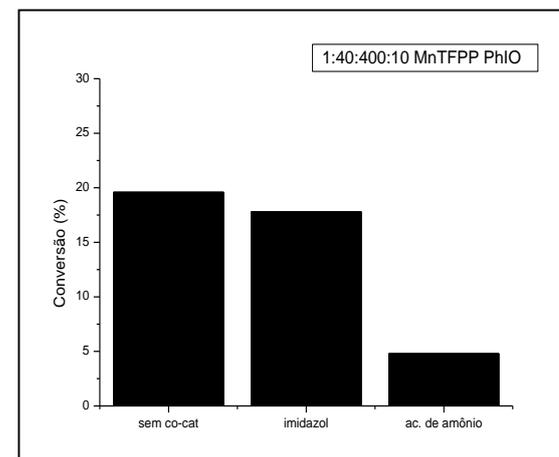
B)



C)



D)



Os gráficos das figuras 26 de apresentam em geral, o aumento da conversão catalítica do sulindaco com o uso de co-catalisadores. Com a exceção do R, R Jacobsen, os sistemas com peróxido apresentaram uma das mais altas conversões, porém é necessário destacar que dentre todos, o sistema com mais alta conversão foi o MnCyclam NaClO que aumentou a conversão utilizando imidazol para 31% (Anexo 7.5). Como foi mencionado na introdução (p.36) o uso do co-catalisador tem a intenção de simular o efeito push-pull criado pela cisteína ligada ao centro metálico no sítio ativo do citocromo p-450 (MACLEOD et al, 2007). O uso desses co-catalisadores nitrogenados favorecem a estabilização do intermediário  $Mn^{IV}(O)$  por se coordenarem ao Mn pela posição trans, e podem agir como catalisador ácido-base favorecendo a clivagem heterolítica no peróxido de hidrogênio, levando ao intermediário  $Mn^V(O)$  (MACLEOD, 2018; SANTOS, 2012).

O uso do acetato de amônio mostrou-se mais eficiente em alguns sistemas (MnCyclam e m-cpba, MnTFPP com  $H_2O_2$  e m-cpba). Na literatura encontra-se que geralmente o acetato de amônio e o bicarbonato de sódio mostram-se mais eficientes quando comparados a base nitrogenadas usuais, isto porque ele apresenta boa estabilidade em meio oxidante, além disso no caso das reações com peróxido o acetato de amônio pode promover a formação de  $HO^{2\cdot}$  favorecendo a formação do complexo hidroperóxido para gerar a espécie ativa  $Mn^V(O)$ . (MACLEOD, 2018; SANTOS 2012). Isto pode fundamentar o porquê de os melhores resultados com acetato de amônio serem correspondentes aos sistemas utilizando  $H_2O_2$ .

As reações de oxidação do sulindaco também foram avaliadas segundo a sua seletividade. Com relação aos produtos formados pela reação foram possíveis identificar nos sistemas após a análise por CLAE-DAD onze (11) possíveis produtos, nomeados de P1 a P11 baseados nos tempos de retenção da análise.

Nas tabelas 10 a 13, encontram-se as porcentagens relativas de cada produto formado nos diferentes sistemas, considerando a proporção com excesso de oxidante (1:40:400). Assim, sabendo-se a quantidade e proporção dos produtos formados em relação aos demais pode-se avaliar a seletividade de cada sistema. As tabelas foram divididas de acordo com o oxidante, analisando os produtos formados em cada catalisador.

Tabela 10 - Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador:

substrato: oxidante), utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE.

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>
<b>MnTFPP</b>	61,6%	-	10,2%	-	5,4%	-	-	22,7%	-
<b>FeTFPP</b>	61,6%	-	10,0%	-	21,3%	1,8%	3,4%	-	2,0%
<b>S,S Jac.</b>	50,4%	-	25,5%	-	-	-	-	8,3%	15,8%
<b>R,R Jac.</b>	72,7%	-	13,0%	-	-	4,5%	-	9,8%	-
<b>FeCyclam</b>	66,0%	0,6%	-	32,0%	-	-	-	1,2%	-

Tabela 11 - Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando *m*-CPBA como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE.

<b>m-cpba</b>	<b>P1</b>	<b>P3</b>	<b>P5</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>
<b>MnTFPP</b>	-	67,0%	-	1,0%	32,0%
<b>S,S Jac</b>	45,8%	45,8%	8,3%	-	-
<b>R,R Jac</b>	30,7%	62,9%	6,3%	-	-

Tabela 12- Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando PhIO como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE.

PhIO	P1	P2	P3	P4	P6	P7	P9
<b>MnTFPP</b>	12,3%	80,1%	-	-	1,9%	2,7%	4,8%
<b>FeTFPP</b>	97,5%	0,2%	0,4%	-	-	2,0%	-
<b>S,S Jac.</b>	86,0%	-	2,8%	-		11,1%	-
<b>R,R Jac.</b>	95,0%	-	1,0%	-	2,2%	1,4%	-
<b>MnCyclam</b>	85,7%	7,9%	-	-	3,4%	-	0,9%
<b>FeCyclam</b>	66,0%	0,63%	-	32,0%	-	-	1,2%

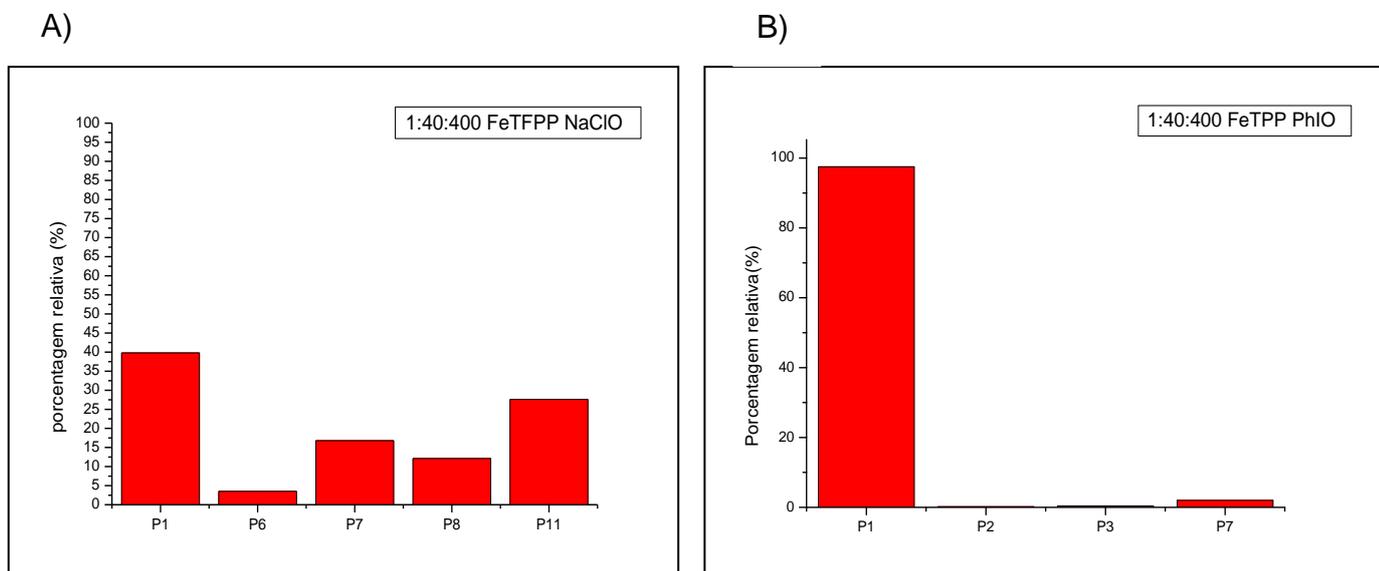
Tabela 13 - Porcentagem relativa de distribuição de produtos na reação de oxidação do sulindaco por todos os catalisadores estudados, em razão molar 1:40:400 (catalisador: substrato: oxidante), utilizando NaClO como oxidante, após 24 h de reação em metanol, analisada por CLAE.

NaClO	P1	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P11
<b>FeTFPP</b>	39,8%	-	-	-	3,5%	16,8%	12,1%	27,6%
<b>S,S Jac.</b>	79,8%	15,2%	-	1,7%	3,3%	-	-	-
<b>R,R Jac</b>	68,5%	11,3%	-	-	2,5%	3,7%	3,1%	9,3%
<b>MnCyclam</b>	48,5%	8,9%	-	-	-	5,3%	10,9%	26,4%
<b>FeCyclam</b>	31,2%	0,6%	0,6%	-	-	14,1%	15,2%	37,2%

Na Figura 27 observa-se um exemplo ilustrado graficamente de um sistema menos seletivo, com NaClO como oxidante à esquerda e um sistema mais seletivo com PhIO como oxidante à direita, ambos com FeTFPP como catalisador.

Figura 27- Comparação de dois sistemas de reação utilizando FeTFPP como catalisador, na razão molar 1:40:400 (catalisador:substrato:oxidante), utilizando o solvente metanol,

analisada por CLAE após 24h de reação. A) O gráfico à esquerda apresenta a distribuição de produtos nas reações utilizando NaClO como oxidante e B) O gráfico à direita apresenta a distribuição de produtos nas reações utilizando PhIO como oxidante.



A seletividade na oxidação do sulindaco depende fortemente do tipo de oxidante empregado. A Figura 27 apresenta a comparação de dois sistemas utilizando FeTFPP como catalisador, em reação com excesso de oxidante (1:40:400 catalisador:substrato:oxidante) na presença de NaClO e PhIO. Estes gráficos mostram que a seletividade é fortemente dependente do tipo de oxidante empregado, e as reações com iodosilbenzeno apresentam majoritariamente um único produto, enquanto as reações com hipoclorito de sódio apresentam 5 produtos diferentes, com razoável distribuição percentual. Este resultado pode ser atribuído ao possível intermediário de reação formado na presença destes oxidantes, NaClO pode reagir de forma radicalar, o que prejudicaria a seletividade, enquanto que o PhIO favoreceria a formação de  $\text{Fe(V)OP}^+$ , que estabilizaria o estado de transição, formando um só produto.

De forma geral, os sistemas mais seletivos são os que empregam PhIO como oxidante, em especial, na presença de R, R e S, S-Jacobsen. Nos sistemas utilizando PhIO há formação de sete produtos de oxidação, nomeados P1 a P7, com predomínio do produto P1 (66 a 97% de seletividade), com exceção das reações realizadas com MnTFPP, que se mostraram as menos seletivas deste grupo. A seletividade do iodosilbenzeno já era esperada, já que PhIO tem somente um oxigênio para doar, o que não permite a clivagem homolítica da ligação que ocorre nos oxidantes com

ligação O-O, permitindo que prevaleça apenas um caminho de reação. (CHAPMAN; GRAHAM, 2015b). Os sistemas na presença de *m*-CPBA foram o segundo mais seletivo, seguido das reações com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaClO, este último com a seletividade prejudicada. Dentre os catalisadores utilizados, destacam-se R, R-Jacobsen e MnCyclam, independentemente do oxidante utilizado.

Na literatura há relatos da separação do sulindaco e seus metabólitos sulindaco sulfeto e sulindaco sulfona (KRIER et al, 2011). Na ausência de padrões autênticos de metabólitos do sulindaco para serem injetados em CLAE e comparados aos produtos de oxidação obtidos via catálise biomimética, foi necessária outra abordagem de estudo dos produtos para identificá-los.

Para comparar os resultados catalíticos e fundamentar que estes são capazes de mimetizar o Citocromo P450, fizemos uma parceria com o laboratório de pesquisa em microorganismos (LQM) para um trabalho de biotransformação com fungos para comparar os produtos obtidos por biotransformação com aqueles obtidos na catálise biomimética.

#### 4.5 REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DOS ESTUDOS BIOMIMÉTICOS E BIOINSPIRADOS.

A biotransformação por *C. elegans* foi realizada em parceria com LQM, com o objetivo de comparar esse sistema que segundo a literatura imita o metabolismo de mamíferos (ZHANG et al.,1996) com os sistemas biomiméticos e bioinspirados proposto nesse trabalho. Dessa forma, foram comparadas as análises por CLAE das reações biomiméticas e da biotransformação, com a intenção de identificar se houve a formação de produtos no mesmo tempo de retenção.

As figuras 28, 29 e 30 apresentam cromatogramas da biotransformação e de alguns dos sistemas biomimético/bioinspirados no qual foram identificados os mesmos produtos: P7, P8, que predominaram principalmente nos sistemas utilizando NaClO como oxidante, porém foram identificadas a formação de P7 em alguns sistemas utilizando PhIO.

Figura 28 - Cromatograma de reação da biotransformação conduzida por *C. elegans*, após 15 dias de inoculação, obtidos a partir da filtragem, extração e secagem do caldo, e separação por CCD, nos quais foram identificados os produtos denominados P7 e P8.

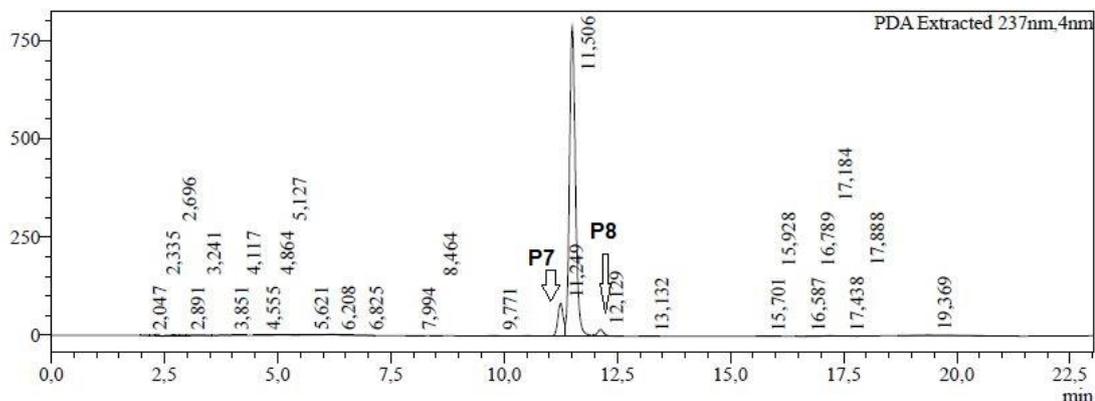


Figura 29- Cromatograma da reação de oxidação do sulindaco, na razão molar 1:40:400 (catalisador:substrato:oxidante), utilizando como catalisador MnCyclam e oxidante NaClO, em metanol, no qual identifica-se os produtos P7 e P8 comuns à biotransformação por *C. elegans*.

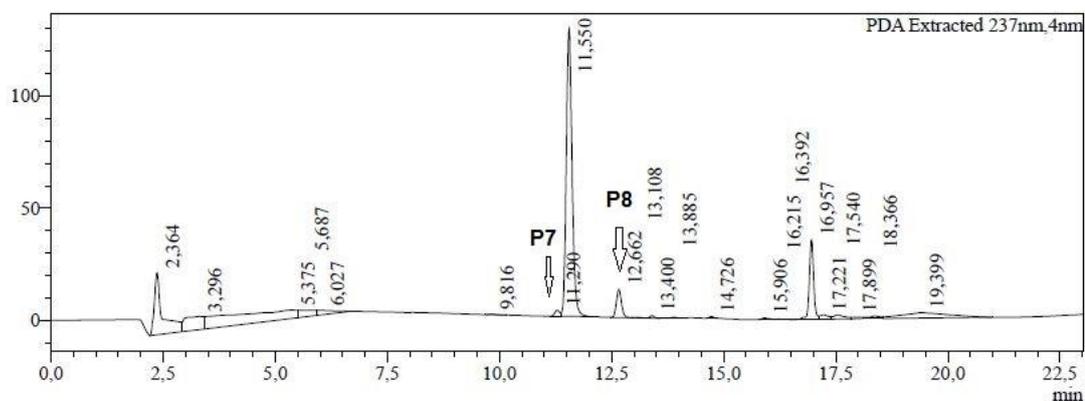
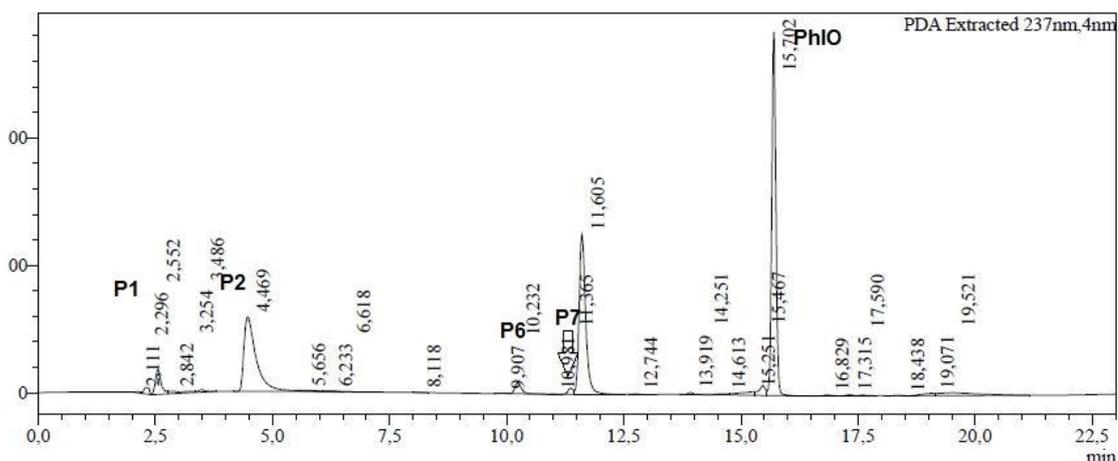


Figura 30 - Cromatograma da reação de oxidação do sulindaco, na razão molar 1:40:400 (catalisador:substrato:oxidante), utilizando como catalisador MnTFPP e oxidante PhIO, em metanol, no qual identifica-se o produto P7 e outros comuns à biotransformação por *C. elegans*.



Ao analisar os cromatogramas dispostos nas figuras 28, 29 e 30, biotransformação por *C. elegans*. Produziu dois compostos chamados aqui de P7 e P8 que também são produzidos em alguns sistemas biomiméticos e bioinspirados.

Após a separação do caldo da biotransformação por coluna cromatográfica, por CCD e em CLAE, o produto P7 foi isolado obtendo-se 39mg e rendimento de 78%, e foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , juntamente com amostra do fármaco sem tratamento de oxidação.

É importante destacar que para a constatação da separação por CLAE-DAD dos produtos sulindaco, desenvolveu um método nas mesmas condições já utilizada, porém substituindo o metanol por acetonitrila grau CLAE, para aumentar a separação entre sulindaco e P7, e permitir confirmar a separação após a realização da cromatografia em coluna.

Porém o que pode ser percebido com os espectros de RMN (Figura 33) é que nas análises das amostras predominou o pico de solvente, devido à pouca quantidade de amostra isolada, e com isto tornou a análise difícil para RMN de  $^1\text{H}$  e impossibilitada para o RMN de  $^{13}\text{C}$ , uma vez que este é menos sensível. Por esse motivo o  $^{13}\text{C}$ RMN será exibido em anexos, e o  $^1\text{H}$ RMN será analisado abaixo.

Figura 31 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do fármaco sulindaco em  $\text{CD}_3\text{OD}$ : Q= quintopletto em 3,40ppm S=singletto em 2,20; 2,90; 2,60 e 7,30 ppm DD=duplo dubleto em 7,80 e 7,70ppm D= dubleto em 7,15 e 6,90ppm. Frequência 550 mHz,

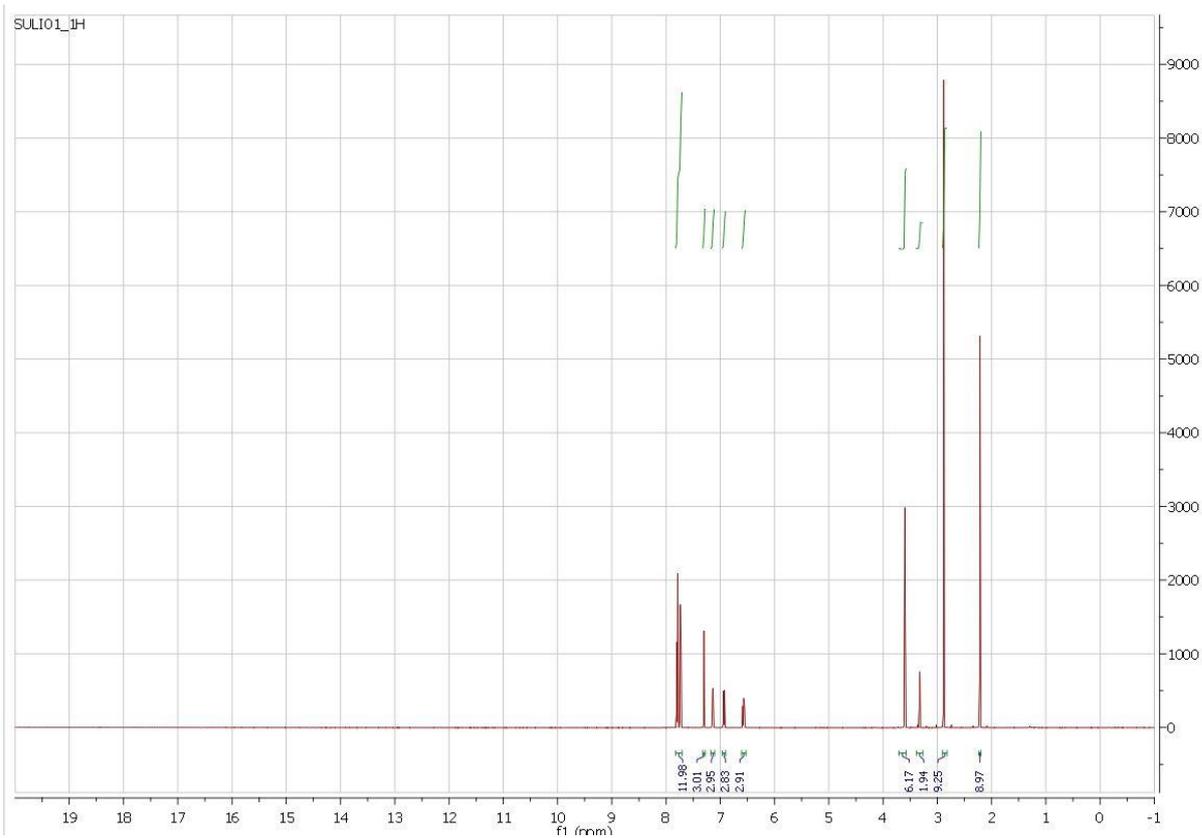


Figura 32- Representação da estrutura química do sulindaco com os sinais de hidrogênios atribuídos

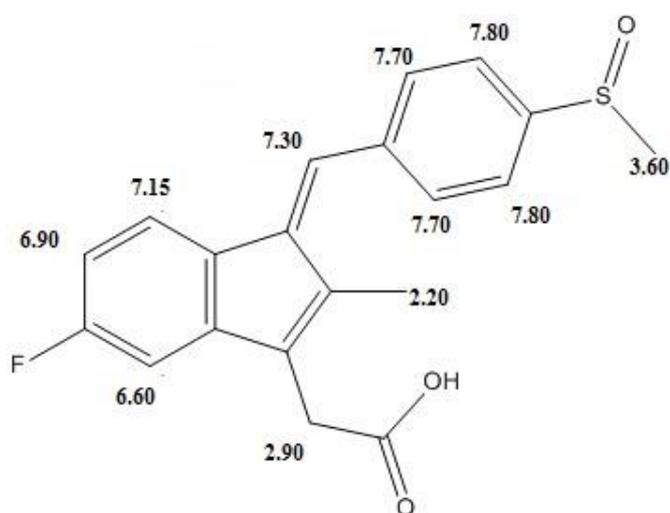
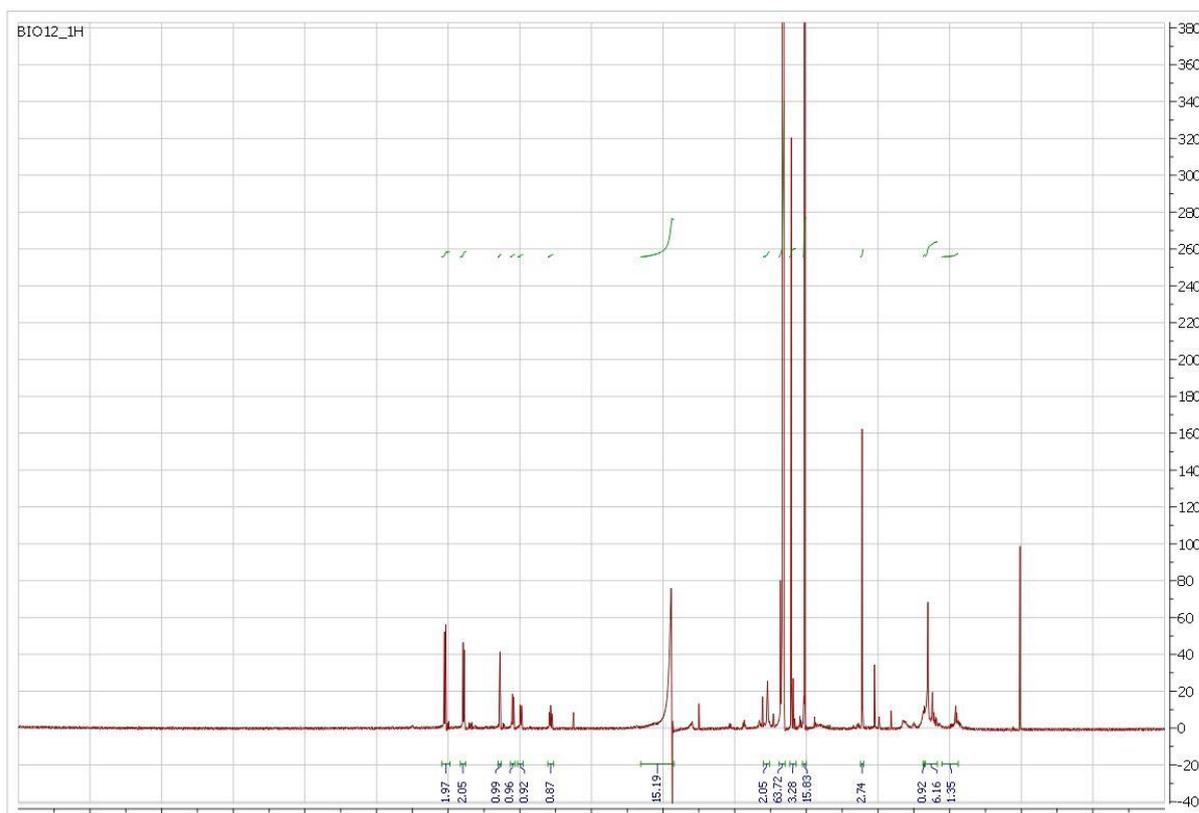


Figura 33 - Espectro de RMN do  $^1\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  do produto P7 obtido após biotransformação por *C. Elegans*: S=singlete em 2,20; 3,20 3,40 e 7,28 ppm DD=duplo dubleto em 7,90 e 8,00 ppm D= dubleto em 7,12; 6,90 e 6,60 ppm QD= quadruplete em 3,0 ppm com ampliação dos picos abaixo. Frequência 550 MHz

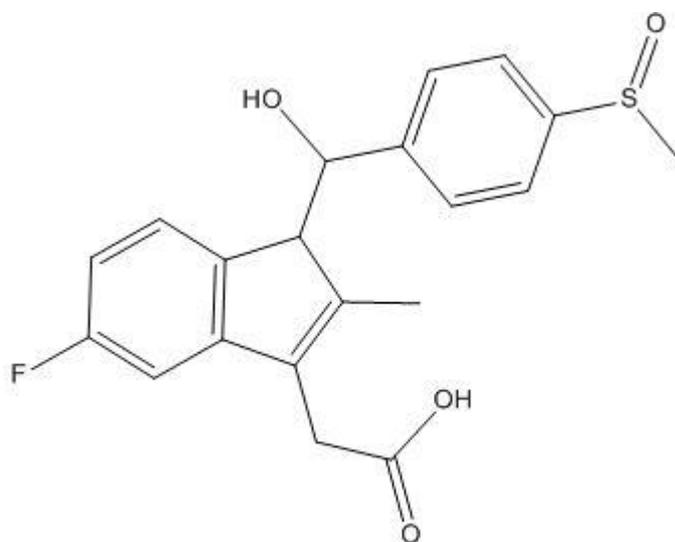


De acordo com as análises de  $^1\text{H}$  RMN, é possível atribuir os mesmos picos de RMN de hidrogênio para o sulindaco e amostra, considerando que o singlete em 3.0 ppm da amostra (maior pico) seja o do solvente em que foi realizada a análise e o quintuplete do sulindaco também corresponda ao solvente. O solvente utilizado para essa análise foi metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Considerando que o produto é derivado do fármaco, é esperado que o espectro de RMN seja semelhante com pequenas modificações

Com isso, tanto para amostra quanto para o fármaco é possível atribuir os picos de deslocamento corresponde a aromático (6-8 ppm) e os demais singletos, fora dessa região, que são atribuídos para os hidrogênios fora do anel. O pico em 4.9 ppm, é um singlete encontrado apenas na amostra, o que pode corresponder a biotransformação.

Baseando-se em Paiva e colaboradores (2010), sabe-se que deslocamentos entre 4-5 ppm podem corresponder a hidrogênios da função álcool, com isto a proposta é tenha ocorrido a oxidação da dupla do carbono 11, e formado o composto ilustrado na Figura 34, identificado como Ácido 2- (5- fluoro-1- (hidroxi- (4- (metilsulfinil) fenil) metil) -2-metil-1H-inden-3-il) acético.

Figura 34 - Proposta de metabólito formado pela biotransformação por *C. Elegans*, correspondente ao produto P7 obtido através da catálise biomimética, identificado como Ácido 2- (5- fluoro-1- (hidroxi- (4- (metilsulfinil) fenil) metil) -2-metil-1H-inden-3-il) acético



Essa proposta, entretanto, seria mais consistente se um conjunto de outras técnicas fossem analisadas, como por exemplo o RMN de  $^{13}\text{C}$ , RMN bidimensional e espectrometria de massas para confirmação da estrutura deste metabólito. No entanto, como o produto P7 foi identificado tanto por catálise biomimética quanto por biotransformação, pode-se concluir que o objetivo do trabalho foi atingido, já que os catalisadores sintéticos se mostraram capazes de conduzir a oxidação do sulindaco, formando produtos semelhantes aos produzidos por métodos *in vitro*, confirmando a importância dos complexos metálicos empregados na mimetização do Citocromo P-450.

## 5 CONCLUSÃO

Baseando-se nos objetivos propostos neste trabalho pode-se afirmar que foi possível realizar e analisar todos os sistemas biomiméticos e bioinspirados propostos, já que a partir das caracterizações pode-se inferir que os complexos de MnCyclam e FeCyclam foram sintetizados com sucesso, assim como a metalação da MnTFPP. Os demais catalisadores foram metalados anteriormente ao início deste trabalho.

Sabendo-se disto foi possível concluir que:

- Os catalisadores utilizados nesse estudo mostraram-se eficientes na oxidação do sulindaco. A mais alta conversão do sulindaco (38,2%) foi atingida pelo sistema utilizando o FeCyclam com NaClO na proporção de 1:40:400, seguida da reação de FeTFPP como catalisador e o NaClO na mesma proporção (31,1%). Observam-se boas conversões nos sistemas utilizando catalisadores Cyclam e NaClO como oxidante.
- Embora não tenha sido possível identificar todos os principais produtos formados, é possível destacar que há predominância na formação do produto P1 em 2,5 minutos na maioria dos sistemas utilizados.
- As reações de oxidação do sulindaco são dependentes do oxidante, sendo que as reações com NaClO e PhIO apresentaram maiores conversões comparados aos demais.
- Dentre os oxidantes utilizados, o PhIO ofereceu menos produtos de oxidação, e os sistemas contendo este doador de oxigênio foram considerados os mais seletivos, em especial FeTFPP/PhIO. Os sistemas menos seletivos foram aqueles contendo NaClO.
- O metabólito P7 da biotransformação foi isolado e caracterizado por RMN de hidrogênio. Este produto foi encontrado em alguns sistemas biomiméticos (No sistema FeTFPP utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante, nos sistemas com FeTFPP, MnTFPP, S, S e R, R Jacobsen utilizando PhIO, e com FeTFPP, MnTFPP, R, R Jacobsen, FeCyclam e MnCyclam nos sistemas utilizando NaClO).
- Os sistemas com os catalisadores Fe e MnCyclam e NaClO foram o que mais se aproximaram dos resultados da biotransformação pois produziram ambos os produtos da biotransformação por *C. Elegans*,

incluindo o produto P7, identificado por  $^1\text{H}$  RMN como o composto Ácido 2- (5- fluoro-1- (hidroxi- (4- (metilsulfinil) fenil) metil) -2-metil-1H-inden-3-il) acético

- O produto P7 foi identificado tanto por catálise biomimética quanto por biotransformação, pode-se concluir que o objetivo do trabalho foi atingido, já que os catalisadores sintéticos se mostraram capazes de conduzir a oxidação do sulindaco, formando produtos semelhantes aos produzidos por métodos *in vitro*, confirmando a importância dos complexos metálicos empregados na mimetização do Citocromo P-450.

## 6 REFERÊNCIAS

ADLER, A. D. et al. On the preparation of metaloporfirins. **J.Inorg. Nucl. Chem.** Vol. 32, p. 2443-2445, 1970.

AONO, Y. et al; Sulindac sulfone inhibits the mTORC1 pathway in colon cancer cells by directly targeting voltage-dependent anion channel 1 and 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications** p. 1-8. 2018

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C. de. **Química Analítica Quantitativa Elementar.** 3 ed. Edgard blucher.

BASOLO, Fred; JHONSON, Ronald. **Química de los compuestos de coordinación.** Barcelona Espanha, Editorial Reverté, 1967

BHATTACHARJEE, S.; DINES, T. J.; ANDERSON, James A. Synthesis and application of layered double hydroxide-hosted catalysts for stereoselective epoxidation using molecular oxygen or air. **Journal of Catalysis.** v. 225 p. 398-407. 2004

BOUCHER, L.J.; GABER, H. K. Manganese Porphyrin Complexes. IV. Reduction of Manganese Porphyrins. **Inorganic Chemistry.** v.9.n 12 p.2644-269, 1970.

BRUNE, K.; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-esteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pain Research.**v. 8 p.105-118. 2015

BRUNELL, D.et al. Studies on the Metabolism and Biological Activity of the Epimers of Sulindac. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v.39 n.6 p 1014-1021. 2011

BRUNTON, L. L.; LAZO, J.; P., Keith. The pharmacological basis of therapeutics. 11ª edição. **The McGraw Hill companies.** 2006

CHAPMAN, C.; GRAHAM, J. B. Biomimetic Oxidations of Xenobiotics by Metalloporphyrin Catalysts: Design Considerations. **Currente Catalysis.** 2015b. N 4. P 166-213

CHAPMAN, C. GRAHAM, J. B. Biomimetic Oxidations of Xenobiotics by Metalloporphyrin and Salen Catalysts: Recent Applications. **Currente Catalysis.** 2015a. N 4. P 77-110

CHAPMAN, C. et al. Biomimetic oxidation of acetaminophen prodrugs catalyzed by ironporphyrins: Effect of nitrogen and thiolate axial ligands on drug and metabolite formation. **Applied catalysis A: general.** v.510 p. 204-215. 2016

DUPERRON, C.; CASTONGUAY, A. Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice. **Carcinogenesis**. v.18 n.15 p.1001-1006. 1997

ETIENNE, F.; et al. Reduction of Sulindac to its active metabolite, sulindac sulfide: assay and role of the methionine sulfoxide reductase system. **Biochemical and Biophysical Communications**. 312. p. 1005-10010. 2003

GONZÁLEZ, J. C. R.; GUERRA, I. R. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. **Revista Cubana de Farmacia**. 2014. N 48 p.495-507

GUERRA, R. B. et al. Solid-state thermal and spectroscopic studies of the anti-inflammatory drug sulindac using UV–Vis, MIR, NIR, DSC, simultaneous TG–DSC, and the coupled techniques TG-EGAMIR and DSC–optical microscopy. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. n.123 p.2523–2530. 2016

GUNARATNA, C. Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: a primer for Bioanalytical chemists Parte I. **Current Separations**. 2000

GUILARD, R. et al One-pot synthesis, physicochemical characterization and crystal structures of cis- and trans-(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)-dichloroiron(III) complexes. **Dalton trans**. p. 3459-3463. 1997

ISMAIL, G. et al Biotransformation of Furanocoumarins by *Cunninghamella elegans*. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**.2014

HÜTELL, W.; HOFFMEISTER, D. **Fungal biotransformation in pharmaceutical science**. Cap. 14. 2ª edição. Industrial applications, 2010.

JACOBSEN, E. N. Highly Enantioselective Epoxidation Catalysts Derived from 1,2-Diaminocyclohexane. **Journal of American Chemical Society**. v.113 p. 7063-7064. 1991

JIANG, H.; CHANG, D. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs with Adverse Psychiatric Reactions: Five Case Reports. **Clinical Rheumatology**. v. 18 p.339-345. 1999

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. Bioinorganic Chemistry: Inorganic elements in the chemistry life. An introduction Guide. 2ªedição. **John Wiley & Sons**. 2013

KEARNEY, P. M. et al. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. **The BMJ**. 2006

KRIER, F.; et al. Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 54. p 694-700. 2011

LÉTUMIER, F. et al. Dichloro (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) manganese(III) chloride:cis–trans isomerisation evidenced by infrared and electrochemical studies. **Dalton trans**. p. 2233-2239. 1998

LINHARES, M. et al. Biomimetic oxidation of indole by Mn(III)Porphyrins. **Applied catalysis A: general**. v. 470. p. 427-433. 2014

LISOWSKA, K. DLUGÓNISK, J. Concurrent corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v.85 p.63–69. 2003

LISOWSKA, K. et al. The effect of the corticosteroid hormone cortexolone on the metabolites produced during phenanthrene biotransformation in *Cunninghamella elegans*. **Chemosphere**. v.64 p.1499-1506. 2006

LOHMANN, W., KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations. **Anal Bioanal Chemistry**. 391 p.79–96.2008

LUCAS, H.J. et al. Iodosobenzene. **Organic Synthesis Collective**, John Willey & Sons: New York, v.3, p.483, 1963.

LUZ, T. B. et al. Fatores associados ao uso de antiinflamatórios não esteroides em população de funcionários de uma universidade no Rio de Janeiro: Estudo Pró-Saúde. **Revista brasileira de epidemiologia** v.9 n.4 p.514-526. 2006

LYAKIN, O. Y. Non-heme oxoiron(V) intermediates in chemo-, regio- and stereoselective oxidation of organic substrates. **Coordination Chemistry Reviews**. n.384. p. 126-139. 2019

MACLEOD, T. C. O. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v.273 p. 259-264. 2007

MACLEOD, T. C. O. **Metaloporfirinas e compostos salen como modelos biomiméticos do citocromo P-450 no metabolismo de fármacos anticonvulsivante e antidepressivo**. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2008

MACLEOD, T. C. O. et al. Primidone oxidation catalyzed by metalloporphyrins and Jacobsen catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v.296 p. 54-60. 2008

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**. v.10 p. 392-413. 2007

MANSUY, D. Brief historical overview and recent progress on cytochromes P450: Adaptation of aerobic organisms to their chemical environment and new mechanisms of prodrug bioactivation. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. 2011. n. 69 p. 62—69

MARCHETTI, M. et al. Sulindac Enhances the Killing of Cancer Cells Exposed to Oxidative Stress. **Plos one**. v.4 n. 6 p. 2009

MEUNIER, B. Biomimetic oxidations catalyzed by transition metal complexes. **Imperial College Press**. 1999

MONTEIRO, E. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica** v.9 n.2 p. 53-63. 2008

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.W.V.; **Manual de soluções reagentes e solventes**. Ed. Edgard Blücher, Campinas, 1980

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug metabolism and disposition**. v. 27 n.10. p.1157-1164. 1999

NOVÁKOVÁ, L. et al. Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v 37 p.899–905. 2005

OCHAI, E. **Química Bioinorgânica**. Barcelona: Editorial Reverté, 1985, p. 81-100.

PAIVA, R. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. 4ª edição. **Cengage Learning**. 2010

PLAKOGIANNIS, F. M.; McCAULEY, J. A. Sulindac. **Analytical profile of drug substances**. American Pharmaceutical Association.

QANDIL, A. M. Prodrugs of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), More Than Meets the Eye: A Critical Review. **International Journal Molecular Science**. v. 13 p. 17244-17274. 2012

RIBEIRO, A.Q; SEVALHO, G.; CÉSAR, C.C. Utilização prévia de anti-inflamatórios não-esteróides por pacientes encaminhados para endoscopia em um hospital universitário brasileiro. **Revista Ciência Farmacêutica Aplicada**. v. 2 n.1. p. 67-65 2007

SANTOS, J. S. **Metaloporfirinas como modelos biomiméticos do citocromo P-450 na oxidação do herbicida simazina**. Universidade de São Paulo. 2012

SANTOS, J. S. et al. Biomimetic simazine oxidation catalyzed by metalloporphyrins. **Applied catalysis A: general**. v.408 p. 163-170. 2011

SILVA, V. S. et al. Effect of imidazole on biomimetic cyclohexane oxidation by first-, second-, and third-generation manganese porphyrins using PhIO and PhI(OAc)<sub>2</sub> as oxidants **Applied Catalysis A: general**. v.491 p. 17-27. 2015

TYZACK, J. D.; KIRCHMAIR; J. Computational methods and tools to predict cytochrome P450 metabolism for drug discovery. **Chemical Biology & Drugs Design**. p.1-10. 2019

TOMCZYC, D. et al. Spectroscopic and electrochemical properties of mononuclear Mn(III) complex and of binuclear di- $\mu$ -oxo bridged Mn(III) and Mn(IV) complex with isocyclam. **Inorganic Chimica Acta**. v. 390 p. 70-78. 2012

SABU, C. et al. Biomimetic and bioinspired systems for advanced drug and gene delivery. **Journal of controlled released (Accepted Manuscript)**. 2018

SANCHEZ, C. et al. Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. **Nature materials**. v.4 p. 277-288. 2005

SHAREFKIN, J. G.; SALTZMANN H. Iodobenzene. **Organic Synthesis, Collect**. Vol 5, New York, Wiley e Sons Ed., p. 658, 1973.

SHEIKHPOUR, M.; BARANI, L.; KASAEIAN, A. Biomimetics in drug delivery systems: A critical review. **Journal of controlled released**. v.253 p.97-109. 2017

URILCH, C.M.; BIGGLER, J.; POTTER, J. D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. **Nature**. V. 6. p.130-140. 2006

VASCONCELOS, F. H., ARAÚJO, G. C. Prevalence of chronic pain in Brazil: a descriptive study. **Br. J. Pain**. v.1 n. 2 p. 176-179. 2018

VASCONCELOS, L. C. G. et al. Structure and properties of iron–cyclam complex of 2-aminophenol. **Polyhedron**. v.20 p.493-499. 2001

WANG, W. et al. Enantioselective epoxidation of olefins with hydrogen peroxide catalyzed by bioinspired aminopyridine manganese complexes derived from L-proline. **Chinese Journal of Catalysis**. v. 39 p.1463-1469. 2018

WATANABE, Y., HIROSHI, F.; **Characterization of High-Valent Oxo-Metalloporphyrin**. In *Metal-Oxo and Metal-Peroxo Species in Catalytic Oxidations*; Meunier, B., Structure and Bonding, Vol. 97, Springer, Berlin, p. 63-89, 2000.

WERMUTH, C. G. Designing Prodrugs and Bioprecursors. Cap. 26 p. 721-746. Wermuth's **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2008

ZHANG, D. et al. Biotransformation of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*. **Drug metabolism and disposition**. v. 23 n. 12 p. 1417-1425. 1995

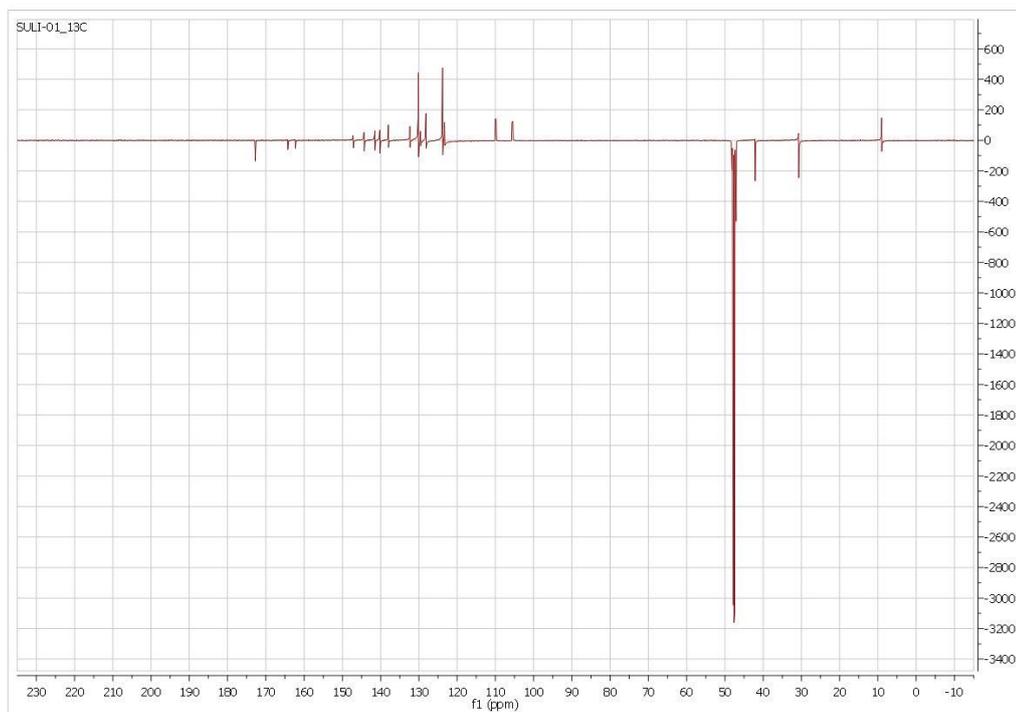
ZHANG, D. et al. Biotransformation of Chlorpromazine and Methdilazine by *Cunninghamella elegans*. **Applied and environmental microbiology**. p. 798–803. 1996

ZHANG, D. et al. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS microbiology letters**. v. 138 p. 221-226. 1996

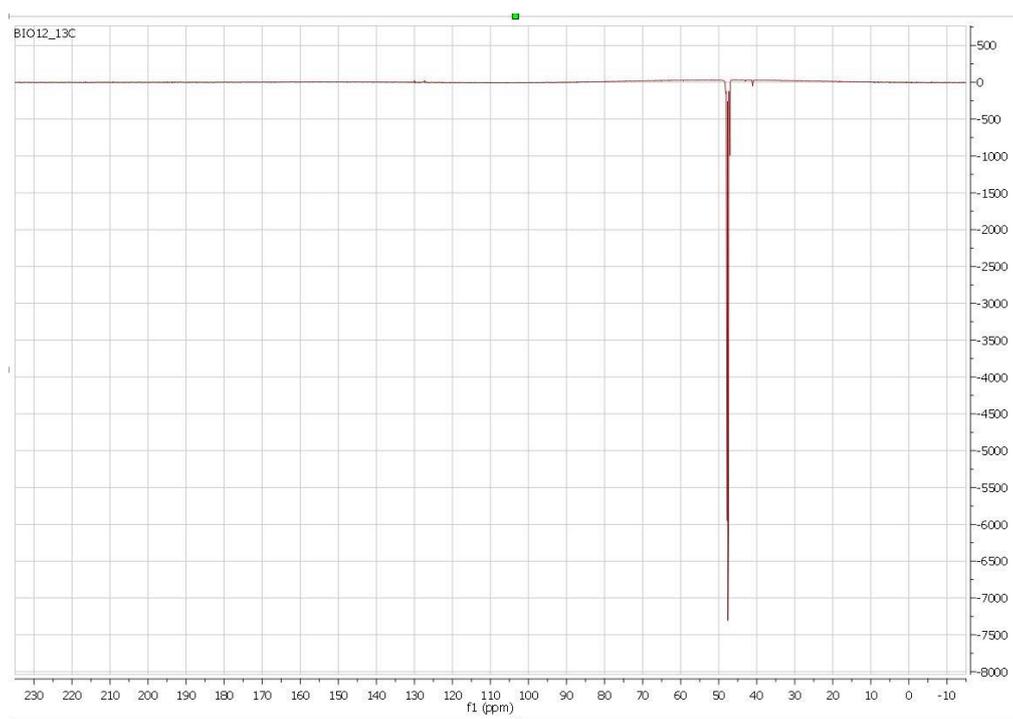
ZHANG, W. et al. Enantioselective Epoxidation of Unfunctionalized Olefins Catalyzed by (Salen) manganese Complexes. **Journal of American Chemical Society**. v.112 p.2801-2803. 1990

## 7 ANEXOS

### 7.1 RMN de $^{13}\text{C}$ sulindaco

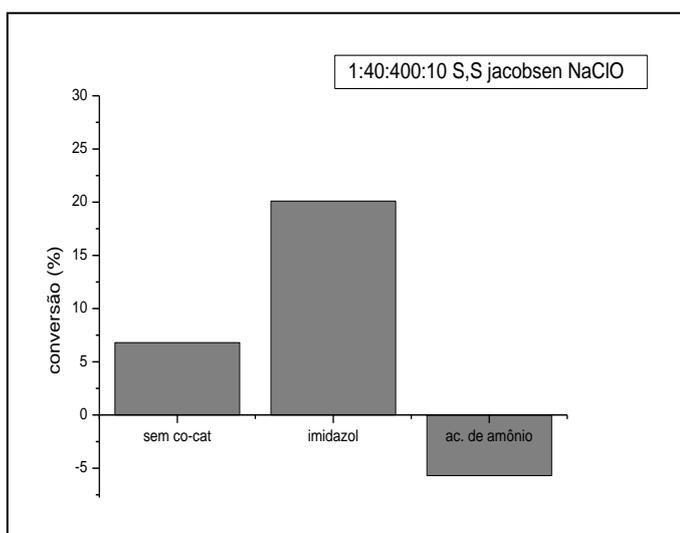


### 7.2 RMN de $^{13}\text{C}$ do P7

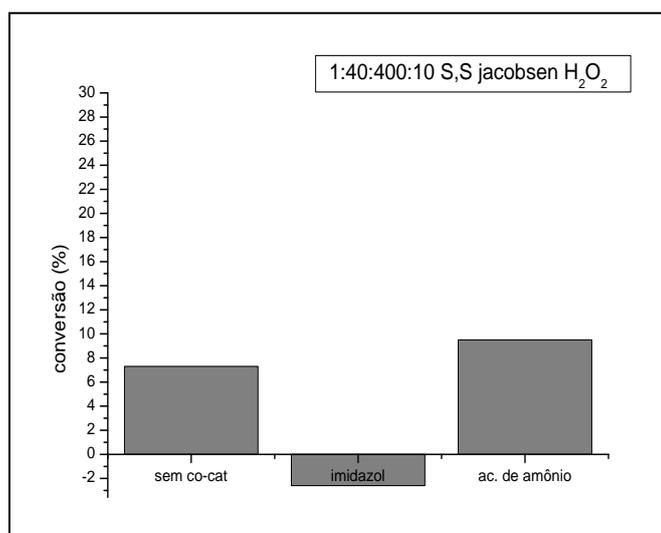


7.3 Gráficos de comparação da conversão do sulindaco com excesso de oxidante, utilizando S,S Jacobsen e na presença de co-catalisadores acetato de amônio e imidazol, na razão molar 1:10:40:400 (catalisador:co-catalisador:substrato:oxidante) em meio de metanol, após 24h de reação, na presença dos oxidantes: A) NaClO B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> C) *m*-cpba D) PhIO e analisados por CLAE.

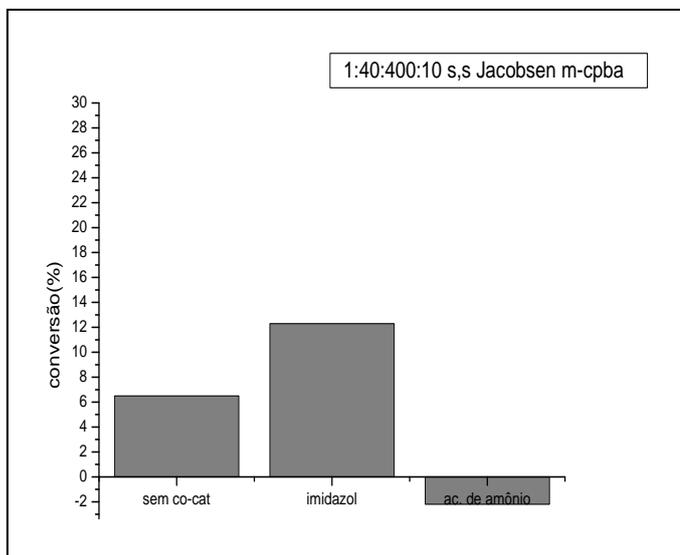
A)



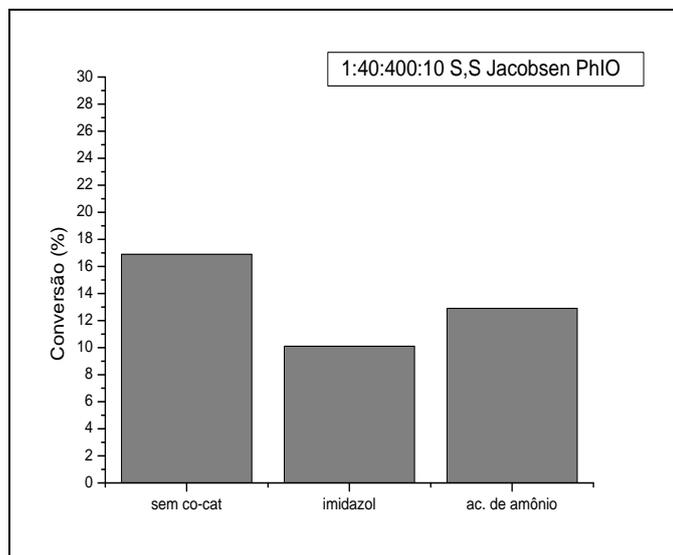
B)



C)

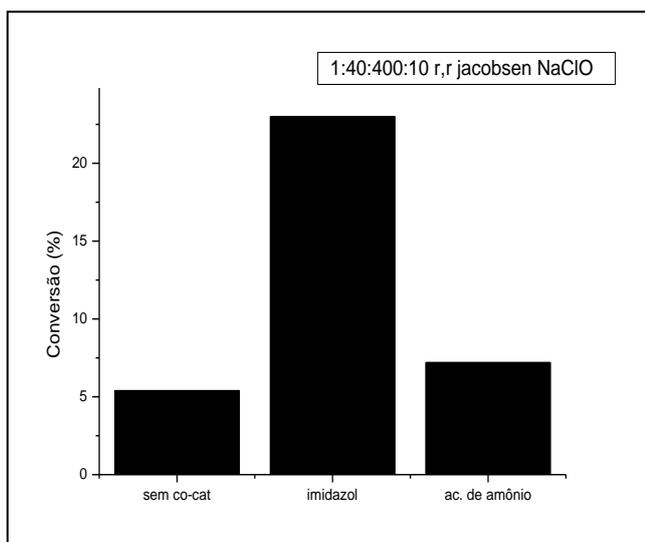


D)

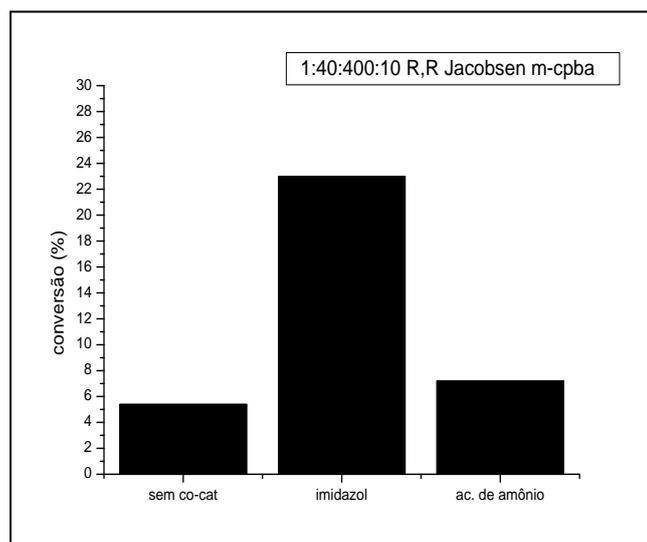


7.4 Gráficos de comparação da conversão do sulindaco com excesso de oxidante, utilizando R,R Jacobsen e na presença de co-catalisadores acetato de amônio e imidazol, razão molar 1:10:40:400 (catalisador:co-catalisador:substrato:oxidante) em meio de metanol, após 24h de reação na presença de oxidantes: A) NaClO B) *m*-cpba, e analisados por CLAE.

A)

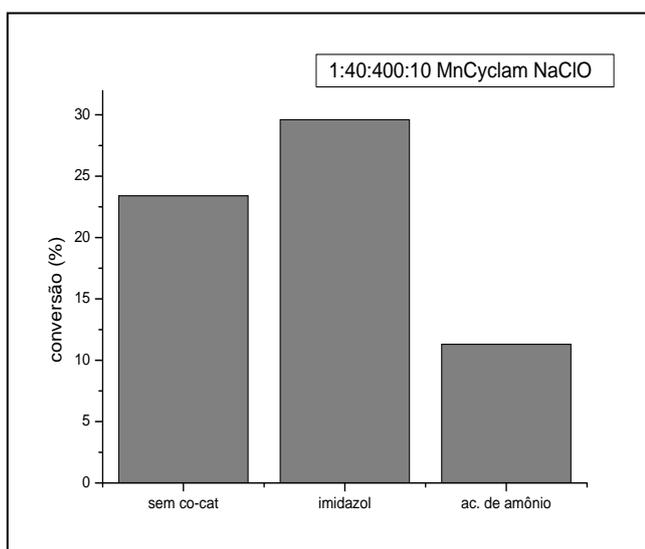


B)

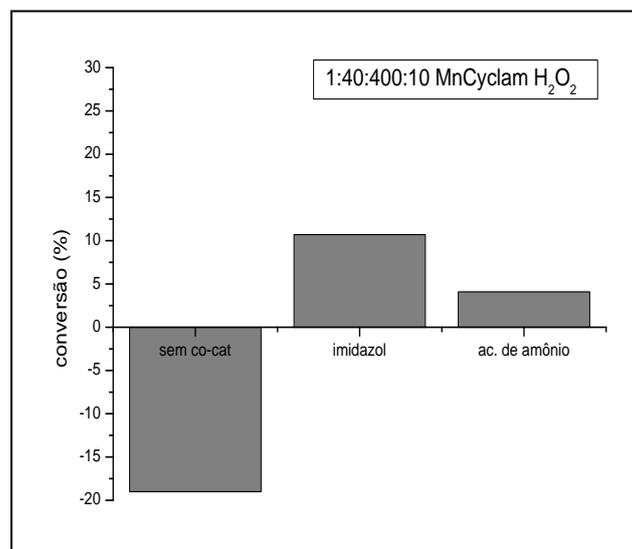


7.5 Gráficos de comparação da conversão do sulindaco com excesso de oxidante, utilizando MnCyclam e na presença de co-catalisadores acetato de amônio e imidazol, na razão molar 1:10:40:400 ( catalisador:co-catalisador:substrato:oxidante) em meio de metanol, após 24h de reação na presença de oxidantes: A) NaClO B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> C) *m*-cpba D) PhIO e analisados por CLAE.

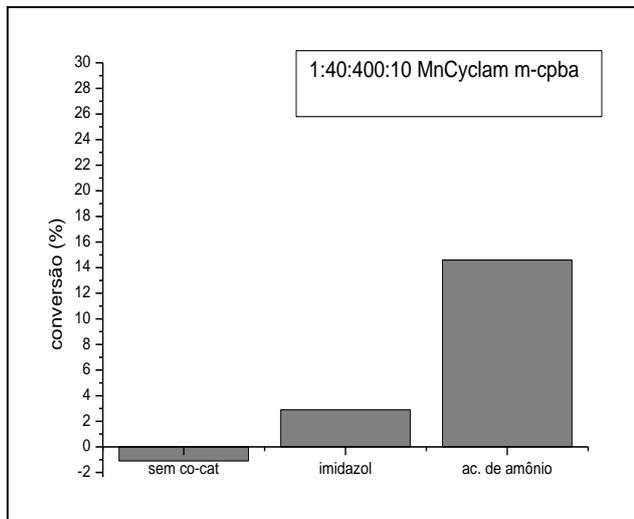
A)



B)



C)



D)

